



COLEGIO DE POSTGRADUADOS
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN
EN CIENCIAS AGRICOLAS

CAMPUS MONTECILLO
POSTGRADO EN BOTÁNICA

CAMBIOS DE ACIDEZ EN HOJAS DEL MAGUEY
Agave salmiana OTTO EX SALM-DYCK DEPENDIENTES DE
LA EDAD DE LA HOJA Y LA PLANTA

ERASMO VÁZQUEZ DÍAZ

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2010

La presente tesis, titulada: **Cambios de acidez en hojas del maguey *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck dependientes de la edad de la hoja y la planta**, realizada por el alumno: **Erasmus Vázquez Díaz**, 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



CONSEJERO:

DR. JOSÉ RODOLFO GARCÍA NAVA



ASESORA:

DRA. CECILIA BEATRIZ PEÑA VALDIVIA



ASESOR:

DR. VICTORINO MORALES RAMOS



ASESOR:

M.C. HUGO MAGDALENO RAMÍREZ TOBIÁS

Montecillo, Texcoco, México, 12 de julio de 2010

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Rodolfo García Nava, Dra. Cecilia Beatriz Peña Valdivia, al nuevo Dr. Hugo Magdaleno Ramírez Tobías y Dr. Victorino Morales Ramos, integrantes de mi consejo particular; por su confianza, colaboración, apoyo, correcciones, paciencia y sugerencias valiosas, con las cuales fue posible concluir esta tesis. Que Dios los bendiga, a ustedes y a sus familias.

Al Colegio de Postgraduados y a sus profesores, por la preparación académica y conocimientos compartidos en cada curso.

A los mexicanos, que gracias a sus impuestos el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), al cual también agradezco, me asignó la beca que permitió realizar mis estudios de maestría.

Al Postgrado en Botánica, al Dr. Carlos Trejo, M.C. Ana Bertha Galicia, Sra. Irma y al Sr. Ricardo del laboratorio de fisiología vegetal ambiental y biofísica; por el apoyo y facilidades otorgadas en el trabajo en laboratorio e invernadero. Al Dr. Juan Rogelio Aguirre Rivera del IIZD (UASLP), por las semillas de maguey facilitadas.

A quienes me encaminaron en el maravilloso mundo de las plantas de zonas áridas: Dra. Ceci Jiménez, M.C. Loraine Matías, Biól. Ruth Chávez, M.C. José Hernández e Ing. Emiliano Sánchez.

A Balois, Rosario(s), Ayne, Huitzi, Gisela, Raquel, Guadalupe, Mayra, Samanta, Karla y demás compañeros, por el apoyo y amistad. A Omar, por los dibujos.

Al grupo San Luis.

A mi familia, por el apoyo incondicional de toda la vida.

A Dios.

DEDICATORIA

A mi familia y a mis padres: Erasmo Vázquez Martínez y Lucía Díaz Castelán.

Al ángel que Dios mandó a nuestra familia, mi sobrina Noemí Medina Vázquez, a su hermanito y papá. En especial a mi hermana Victoria Vázquez Díaz, por el ejemplo de lucha y de nunca dejarse vencer.

CONTENIDO

	PAGINA
CAPITULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.1. Literatura citada	4
CAPITULO II. REVISIÓN DE LITERATURA	6
2.1. Generalidades de los magueyes	6
2.2. Reproducción de los magueyes	7
2.3. Aspectos generales de la fotosíntesis	9
2.4. Rutas o caminos fotosintéticos.....	10
2.5. Metabolismo Acido de las Crasuláceas (MAC)	11
2.6. Plasticidad fisiológica del MAC	13
2.7. Identificación de plantas con MAC	13
2.8. Plantas con la ruta MAC.....	14
2.9. Metabolismo acido de las crasuláceas en plántulas de maguey	15
2.10. Reproducción de magueyes por semilla	16
2.11. Literatura citada	17
CAPITULO III. TAMAÑO DE LA SEMILLA Y DESARROLLO DE LA PLÁNTULA DEL MAGUEY <i>Agave salmiana</i> OTTO EX SALM-DYCK	21
3.1. Resumen.....	21
3.2. Abstract	22
3.3. Introducción.....	23
3.4. Materiales y métodos	25
3.5. Resultados	28
3.6. Discusión.....	39
3.7. Conclusiones.....	42
3.8. Literatura citada	43
CAPITULO IV. CAMBIOS DE ACIDEZ EN HOJAS DEL MAGUEY <i>Agave salmiana</i> OTTO EX SALM-DYCK DEPENDIENTES DE LA EDAD DE LA HOJA Y LA PLANTA	46
4.1. Resumen.....	46
4.2. Abstract	47
4.3. Introducción.....	48
4.4. Materiales y métodos	50
4.5. Resultados	55
4.6. Discusión.....	65
4.7. Conclusiones.....	69
4.8. Literatura citada	69

CAPITULO V. DISCUSIÓN GENERAL	72
5.1. Literatura citada	75
CAPITULO VI. CONCLUSIONES GENERALES.....	77
APÉNDICE.....	78

LISTA DE CUADROS

PÁGINA

CUADRO 1. Géneros y especies que conforman a la familia Agavaceae (Eguiarte y Souza 2007).	7
CUADRO 2. Ejemplos de plantas que pueden cambiar de camino fotosintético de C ₃ a MAC y los factores que promueven el cambio (Andrade <i>et al.</i> , 2007).....	13
CUADRO 3. Familias botánicas que tienen especies con MAC (Kluge y Ting, 1978). .	14
CUADRO 4. Ubicación geográfica y características del sitio de recolección de las semillas de las variantes Blanco, Chino y Liso de <i>A. salmiana</i> (Peña-Valdivia <i>et al.</i> , 2006).....	26
CUADRO 5. Biomasa, longitud y anchura media de las semillas de tres variantes de <i>A. salmiana</i> formadas en la sección central de la infrutescencia (\pm error estándar).	29
CUADRO 6. Promedio de hojas cotiledonares emergidas de tres variantes de <i>A. salmiana</i> 11 días después de la siembra de semillas realizada en verano de 2008 en invernadero (\pm error estándar).....	32
CUADRO 7. Temperaturas máximas, mínimas absolutas y promedio registradas en un invernadero del Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México durante los días transcurridos previos a la exposición de las hojas cotiledonares de tres variantes de <i>A. salmiana</i>	33
CUADRO 8. Longitud media (mm) de hojas cotiledonares de tres variantes de <i>A. salmiana</i> expuestas en invernadero (\pm error estándar).	37
CUADRO 9. Días para exponer la primera hoja lateral en tres variantes de <i>A. salmiana</i> a los 33 días de la siembra en invernadero del verano del 2008 (\pm error estándar).	38
CUADRO 10. Edad (días) de las hojas cotiledonares de tres variantes de <i>A. salmiana</i> usadas para cuantificar su contenido de ácido málico.	52
CUADRO 11. Biomasa húmeda (mg; \pm error estándar) acumulada en hojas cotiledonares, con edades diferentes (días), de tres variantes de <i>A. salmiana</i> crecidas en invernadero.	56

CUADRO 12. Biomasa húmeda (mg; \pm error estándar) de las hojas laterales, con edad máxima de cinco meses (hoja 1), de tres variantes de *A. salmiana* crecidas en invernadero..... 57

CUADRO 13. Biomasa, longitud y anchura media de las semillas de tres variantes de *A. salmiana* correspondientes a la sección central de la infrutescencia (\pm error estándar). 72

LISTA DE FIGURAS

	PAGINA
FIGURA 1. Curva de asimilación de CO ₂ de una planta MAC bien irrigada y sus fases típicas de carboxilación y actividad de enzimas carboxilantes (Andrade <i>et al.</i> , 2007).	12
FIGURA 2. Diseño de la siembra de semillas en invernadero de las variantes Blanco, Chino y Liso del maguey <i>Agave salmiana</i>	27
FIGURA 3. Semillas de tres variantes de <i>Agave salmiana</i> del altiplano potosino zacatecano.	29
FIGURA 4. Distribución de la biomasa (mg) de 250 semillas de tres variantes del maguey <i>Agave salmiana</i>	30
FIGURA 5. Germinación epigea de una hoja cotiledonar de la variante Chino de <i>Agave salmiana</i> crecida en invernadero en el Colegio de Postgraduados.	32
FIGURA 6. Porcentaje de emergencia de hojas cotiledonares de las variantes Blanco  , Chino  y Liso  de <i>Agave salmiana</i> crecidas en invernadero después de tres épocas de siembra. Cada punto representa el promedio de cinco repeticiones (una repetición es una maceta con 20 semillas en verano y otoño del 2008 y 10 semillas en verano del 09).	34
FIGURA 7. Promedio de hojas cotiledonares emergidas de tres variantes de <i>Agave salmiana</i> en invernadero en tres épocas de siembra. Barra izquierda indica el inicio y barra derecha el final del registro. Error estándar de cinco repeticiones (una repetición es una maceta con 20 semillas en verano y otoño de 2008 y 10 semillas en verano de 2009). (dds)=días después de la siembra. Barras ausentes indican no registro de hojas cotiledonares.	35
FIGURA 8. Porcentaje medio de hojas cotiledonares expuestas de tres variantes de <i>Agave salmiana</i> en invernadero. Variante Blanco  , Chino  y Liso  En la siembra de verano y otoño de 2008 se sembraron 100 semillas y 50 semillas en verano del 2009 (dds)=días después de la siembra.	36
FIGURA 9. Tiempo (días) de inicio de la exposición de las hojas laterales de plántulas de <i>Agave salmiana</i> crecidas en invernadero después de la siembra realizada en otoño del 2008. En eje y, 0=día de la siembra de semillas, en eje x, 0=hoja cotiledonar.	38
FIGURA 10. Sección basal de hojas maduras herborizadas de las variantes Blanco, Chino y Liso de <i>Agave salmiana</i> que muestra algunas diferencias entre las hojas y sus dientes laterales (Aguirre R. <i>et al.</i> , 2001).	51

- FIGURA 11.** Maguey con cinco meses de edad que muestra restos de la hoja cotiledonar y el orden de crecimiento de las hojas laterales, numeradas en orden creciente de la más antigua a la más joven..... 53
- FIGURA 12.** Cambios de acidez de la hoja cotiledonar de las variantes Blanco (○), Chino (△) y Liso (□) de *Agave salmiana* crecidas en invernadero durante:(A) verano y otoño (B) de 2008 y verano de 2009 (C). La edad de las hojas era 21, 48 y 28 días en A, B y C, respectivamente. Cada punto es el promedio de tres repeticiones, las barras sobre cada valor medio representa el error estándar. Líneas diagonales indican el periodo nocturno..... 60
- FIGURA 13.** Cambios de acidez de la hoja cotiledonar de las variantes Blanco (○), Chino (△) y Liso (□) de *Agave salmiana* crecidas en invernadero durante:(A) verano y (B) otoño de 2008. Cada punto es el promedio de tres repeticiones, las barras sobre cada valor medio representan el error estándar. Líneas diagonales indican el periodo nocturno. 61
- FIGURA 14.** Cambios de acidez de las hojas laterales de las variantes Blanco, Chino y Liso de *Agave salmiana* crecidas en invernadero durante verano de 2008. La edad máxima es de cinco meses en la hoja lateral 1. Cada punto es el promedio de tres repeticiones, las barras sobre los valores representan el error estándar (hoja lateral: 1 △, 2 ▼, 3 ○, 4 ●, 5 □ y 6 ■). 63
- FIGURA 15.** Cambios de acidez de las hojas laterales de las variantes Blanco, Chino y Liso de *Agave salmiana* crecidas en invernadero, con riego, durante otoño de 2008. La edad máxima es de cinco meses en la hoja lateral 1. Cada punto es el promedio de tres repeticiones, las barras sobre los valores representan el error estándar (hoja lateral: 1 △, 2 ▼, 3 ○, 4 ●; 5 □ y 6 ■)..... 64

CAMBIOS DE ACIDEZ EN HOJAS DEL MAGUEY *Agave salmiana*
OTTO EX SALM-DYCK DEPENDIENTES DE LA EDAD DE LA HOJA Y LA PLANTA

Erasmus Vázquez Díaz, M. C.
Colegio de Postgraduados, 2010

Se evaluaron los cambios de acidez titulable cada cuatro horas durante un ciclo de 24 h y la acumulada en el periodo diurno y nocturno de dicho ciclo. Lo anterior de hojas cotiledonares y hojas laterales con edad promedio de uno y hasta cinco meses de las variantes Blanco, Chino y Liso del maguey *Agave salmiana* de San Luis Potosí, México. Las plantas se obtuvieron a partir de semillas y crecieron en invernadero en el Colegio de Postgraduados en verano y otoño del 2008 y en verano del 2009 sin restricción de humedad y fotoperiodo natural. También se evaluaron las características morfológicas de las semillas de las tres variantes. Se investigó el tiempo y la proporción de la emergencia de la plántula (emergencia de la hoja cotiledonar) y fueron registradas la exposición de las hojas laterales (pencas). La biomasa media de las semillas fluctuó entre 10.7 y 14.5 mg entre variantes; la variante Blanco tuvo las semillas con la menor biomasa (10.8 mg), longitud y anchura (7 y 5.4 mm respectivamente) del grupo, la variante Liso las de mayor biomasa (14.5 mg) y la variante Chino las de dimensiones mayores (8.4 mm de longitud y 6.5 mm de anchura). El porcentaje medio de humedad de las semillas fue 7.0 % sin diferencias estadísticas entre variantes. La hoja cotiledonar (plántula) emergió primero en la variante Blanco después de cada siembra. El 54% de las semillas sembradas logró establecer un maguey nuevo. Con temperatura media de 22° C (y mínima de hasta -4 °C) en otoño 2008, la longitud de las hojas cotiledonares alcanzó 20.4 mm en cinco meses. No se detectó la fluctuación de acidez típica MAC en las hojas cotiledonares de las tres variantes cuando tuvieron un mes de edad, pero con cinco meses comenzaron a exhibir una fluctuación de acidez MAC incipiente. Durante el ciclo de 24 h las hojas laterales, con edad cercana a los cinco meses, presentaron fluctuaciones de acidez parecida al MAC.

Palabras clave: *Agave salmiana*, biomasa y dimensiones de semilla, emergencia y desarrollo de la plántula, ácido málico, acidez titulable, hojas de maguey y MAC.

ACIDITY CHANGES OF MAGUEY *Agave salmiana*
OTTO EX SALM-DYCK RELATED WITH THE AGE OF THE LEAF AND PLANT

Erasmus Vázquez Díaz, M. C.
Colegio de Postgraduados, 2010

Changes of titratable acidity in cotyledon and lateral leaves was assessed every 4 h during a 24 h period. Also, the accumulated acidity was compared between the nocturnal and the diurnal period. The cotyledon and lateral leaves had an average age of one and five months old. In addition, the seed morphology was studied and the moisture content of three accessions of maguey *Agave salmiana* (Blanco, Chino and Liso) from San Luis Potosí, Mexico. Plants were obtained from seeds and grown in the summer and fall 2008 and in the summer 2009, in a greenhouse at the Colegio Postgraduados, Mexico. The plants grew with adequate watering and natural photoperiod. The seed weight range was from 10.8 mg (accession Blanco) to 14.5 mg (accession Liso). Seeds of the accession Blanco had the shortest length (7.1 mm) and wide (5.4 mm), whereas the accession Chino had the longest (8.4 mm) and wide (6.5 mm) seeds. The seed moisture content was of 7.0% among accessions ($p \geq 0.05$). Also, it was registered the time and the proportion of the seedling emergence (cotyledonar leaf) and the lateral leaf exposition. The cotyledonar leaf of the accession Blanco was the first to emerge after each season. The 54% of the seeds had a successful seedling emergence in average of the three seasons. The length of the cotyledon leaves (5 months old) reached 20.4 mm of plants grew with an average temperature of 22°C and a minimum of -4°C in the fall of 2008. Cotyledon leaves one month old did not show the typical fluctuation of malic acid of the crassulacean acid metabolism (CAM) i.e. (higher malic acid content at night and low at midday). In contrast the CAM cycle in 24 h was observed in cotyledon and lateral leaves of approximately 5 months old.

Key words: *Agave salmiana*, seed mass and dimensions, emergence, seedling development, malic acid, titratable acidity, maguey leaves and CAM.

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL

Por su historia natural, etnobotánica y alta productividad en ambientes extremos, los magueyes son un recurso fitogenético importante de México (Colunga-GarcíaMarín *et al.*, 2007; Ruíz *et al.*, 2007). Estas plantas se distribuyen en 75% del territorio mexicano en el tipo de vegetación matorral xerófilo. Pertenecen al género *Agave* de la familia Agavaceae que es endémica del Continente Americano (Nobel, 1988; Aguirre R. *et al.*, 2001; Arizaga y Ezcurra, 2002; García-Mendoza, 2007). Se ha reconocido necesario incrementar el conocimiento en varios aspectos de la biología de magueyes. Por ejemplo, determinar la ruta fotosintética que usan al iniciar su ciclo de vida y la propagación de individuos por semilla.

Los magueyes se reproducen con facilidad de manera asexual por medio de vástagos vegetativos, mejor conocidos como hijuelos o bulbilos (Tello-Balderas, 1988; Arizaga y Ezcurra, 2002; García-Mendoza, 2007). La reproducción de magueyes por semilla es decir de manera sexual, es un evento infrecuente en el ambiente silvestre (Jordan y Nobel, 1979). Desde el punto de vista fisiológico los magueyes se distinguen de la mayoría de las plantas, pues para la fotosíntesis usan la ruta conocida como metabolismo ácido de las crasuláceas (MAC) (Nobel, 1998).

Se sabe que la ruta MAC es una adaptación que adquirieron algunas plantas para sobrevivir en sitios con condiciones ambientales adversas. Entre ellas la escasez de humedad por periodos de tiempo prolongado y la temperatura extrema, principalmente alta. Dichas condiciones se presentan en las zonas áridas y semiáridas, regiones que comúnmente son ocupadas por magueyes (Hernández, 2006).

Una característica de las plantas MAC es que la acidez de sus tejidos fotosintéticos cambia en relación con la hora del día; es decir, presentan mayor acidez nocturna que diurna. Además, sus estomas permanecen abiertos principalmente por la noche para capturar el CO₂ de la atmósfera y tienen hojas con tejidos que almacenan agua (Nobel, 1988; Lütge, 2004; Andrade *et al.*, 2007). Se ha observado que la ruta MAC puede expresarse en dependencia de factores biológicos como la edad y estado

de desarrollo de la planta, y físicos como la luz, temperatura y humedad disponibles en el entorno (Cushman, 2001; Lütge, 2004).

Se menciona que las plantas MAC usan la ruta metabólica C_3 en la etapa de plántula (Nobel, 1998). Sin embargo, algunos resultados experimentales señalan lo contrario. Wen *et al.*, (1996) concluyeron que plántulas de *Agave attenuata* crecidas sin restricción de humedad, expresaron la fluctuación de acidez tipo MAC. Es necesario señalar que el trabajo de Wen y sus colaboradores, es único en su tipo, pues no se localizó otro que usará plantas del género *Agave*. En *Stenocereus beneckeii* (Cactaceae) se detectó que sus plántulas expresaron la fluctuación de acidez MAC al incrementar su edad (Ayala-Cordero *et al.*, 2006). No obstante, las plántulas de *Pereskia aculeata* (Cactaceae) exhibieron la ruta metabólica C_3 poco después de germinar (Altesor *et al.*, 1992).

Es bien conocido que las plantas MAC ahorran agua pues sus estomas, al permanecer abiertos por la noche cuando la temperatura ambiental es menor, reducen su pérdida por evaporación. Lo anterior resulta relevante si se enfoca hacia la agricultura (Andrade *et al.*, 2007). Ecológicamente, la adopción de la ruta MAC ha permitido que las plantas que la presentan, colonicen sitios con condiciones ambientales intolerables para la mayoría; sin embargo les confiere un crecimiento vegetativo lento (Jiménez-Sierra y Reyes-Santiago, 2003).

Algunos magueyes son propagados en poco tiempo en invernadero por medio de la siembra de semilla. Es el caso de la especie *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck, que en el altiplano potosino zacatecano se usa principalmente para fabricar mezcal (Aguirre R. *et al.*, 2001). Al sembrar semillas de este maguey, se podrían obtener plántulas y cuantificar la acidez de los tejidos fotosintéticos de sus hojas. Lo anterior ayudaría a determinar, si al inicio del ciclo vital de este maguey se detecta la fluctuación de acidez MAC típica.

Así, el objetivo de esta investigación fue determinar si la fluctuación de acidez MAC se presenta en la hoja cotiledonar y en las hojas laterales con uno y hasta cinco

meses de edad de magueyes originados de semilla y crecidos sin restricción de humedad en invernadero de las variantes Blanco, Chino y Liso de *A. salmiana*.

Los objetivos particulares fueron, de las variantes Blanco, Chino y Liso del maguey *A. salmiana*:

- i. Determinar el tamaño, dimensiones y contenido de humedad de la semilla.
- ii. Describir el desarrollo de la plántula originada de semilla en invernadero.
- iii. Cuantificar el contenido de ácido málico en la hoja cotiledonar, con edad promedio de uno y hasta cinco meses, durante un ciclo de 24 horas continuas.
- iv. Cuantificar el contenido de ácido málico en las hojas laterales, con hasta cinco meses de edad, durante un ciclo de 24 horas continuas.

Las hipótesis planteadas fueron:

Ho 1: La hoja cotiledonar de las variantes Blanco, Chino y Liso de *A. salmiana* con uno y hasta cinco meses de edad, exhibe la fluctuación de acidez MAC.

Ho 2: Las hojas laterales de las variantes Blanco, Chino y Liso de *A. salmiana* con hasta cinco meses de edad, exhiben la fluctuación de acidez MAC.

Ho 3: La fluctuación de acidez MAC se presenta en la hoja cotiledonar y en las hojas laterales de las tres variantes del maguey *A. salmiana* independientemente de su edad.

1.1. Literatura citada

- Aguirre R. J.R., Charcas-Salazar, H. y Flores-Flores, J.L. 2001. El maguey mezcalero potosino. Consejo Potosino de Ciencia y Tecnología. Instituto de Investigación de Zonas Desérticas. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. San Luis Potosí. México. 87 pp.
- Altesor, A., Ezcurra, E. and Silva, C. 1992. Changes in the photosynthetic metabolism during the early ontogeny of four cactus species. *Acta Oecológica* 13 (6), 777-785.
- Andrade, J. L., De la Barrera, E., Reyes-García, C., Ricalde, M., Vargas-Soto, G. y Cervera, C. 2007. El metabolismo ácido de las crasuláceas: diversidad, fisiología ambiental y productividad. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* (8), 137-50.
- Arizaga, S. and Ezcurra, E. 2002. Propagation mechanism in *Agave macroacantha* (Agavaceae), a tropical arid-land succulent rosette. *American Journal of Botany* 89 (4), 632-641.
- Ayala-Cordero, G., Terrazas, T., López-Mata, L. and Trejo, C. 2006. Morpho-anatomical changes and photosynthetic metabolism of *Stenocereus beneckeii* seedlings under soil water deficit. *Journal of Experimental Botany*. 57(12): 3165-3174.
- Colunga-GarcíaMarín, P., Larqué-Saavedra, A., Eguiarte, L. y Zizumbo-Villarreal, D. (Eds.) 2007. En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología. México.
- Cushman, J. 2001. Crassulacean Acid Metabolism. A Plastic Photosynthetic Adaptation to Arid Environments. *Plant Physiology* 127(4): 1439-1448.
- García-Mendoza, A. 2007. Los Agaves de México. *Ciencias* (87) 14:23.
- Hernández, H. M. 2006. La vida en los desiertos mexicanos. Fondo de Cultura Económico. Secretaría de Educación Pública. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Convenio Andrés Bello. México. 188 pp.
- Jiménez-Sierra, C. y Reyes-Santiago, J. 2003. Las cactáceas de la barranca de Metztitlán. *In: Metztitlán: lugar de la luna y de las maravillas*. Armella-Villalpando, M. A., Yañez-López, M. y Sandoval-Palacios, E. (Eds). Universidad Autónoma Metropolitana. México. 53-77 pp.

- Jordan, P.W. and P.S. Nobel. 1979. Infrequent establishment of seedlings of *Agave deserti* (Agavaceae) in the northwestern Sonoran desert. *American Journal of Botany*, 66: 1079-1084.
- Lütge, U. 2004. Ecophysiology of Crassulacean Acid Metabolism (CAM). *Annals of Botany* (93), 629-652.
- Nobel, P.S. 1988. *Environmental Biology of Agaves and Cacti*. Cambridge Univ. Press. Cambridge. 270 pp.
- Ruíz, G., Peña-Valdivia, C., Trejo, L. y Sánchez, A. 2007. Reacción fisiológica del maguey (*Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck) a la sequía intermitente. *Revista de la Facultad de Agronomía. Universidad del Zulia, Venezuela Supl. (1)* 318-325.
- Tello-Balderas, J.J. 1988. Análisis gráfico-tabular de dos poblaciones silvestres de maguey mezcalero (*Agave salmiana* Otto ex Salm, ssp. *Crassispina* (Trel.) Gentry) en el altiplano potosino-zacatecano. Tesis de maestría en ciencias. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México. 123 pp.
- Wen, H., Wagner, J. and Larcher, W. 1996. Growth and nocturnal acid accumulation during early ontogeny of *Agave attenuata* grown in nutrient solution and in vitro culture. *Biologia plantarum* (39) 1-11.

CAPITULO II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Generalidades de los magueyes

El género *Agave*, al que pertenecen los magueyes, se originó hace 10 millones de años en México (Eguiarte y Souza, 2007). Los magueyes son plantas modificadas morfológica y fisiológicamente para soportar las condiciones ambientales de los sitios que habitan (García-Mendoza, 2007). Ejemplo de tales condiciones son las temperaturas altas, como las que se presentan en la región central de Jalisco en México, que alcanzan entre 7.5 y 17°C en la noche, y entre 25 y 34°C durante el día (Pimienta-Barrios *et al.*, 2006). También soportan la baja disponibilidad de agua en el suelo; pues se ha determinado que los suelos arenosos, donde prosperan muchas de estas plantas, pueden alcanzar -10 megapascales (ψ_{suelo}) (Nobel, 1998). Por lo anterior los magueyes desarrollaron como respuesta fisiológica, el metabolismo ácido de las crasuláceas (MAC), y modificaciones morfológicas, entre ellas hojas gruesas, suculentas y raíces poco profundas para acceder pronto al agua de lluvia (García-Mendoza, 2007).

Los magueyes se distribuyen desde el sur de Estados Unidos hasta el norte de Sudamérica, también en los países rodeados por el mar Caribe. En México son plantas silvestres que caracterizan el paisaje de gran parte del territorio. Se reconoce que la zona central de México, fue su centro de origen y diversificación (Rzedowski, 1978; Eguiarte *et al.*, 2000; Arizaga and Ezcurra, 2002; García-Mendoza 2007). Los magueyes habitan en zonas tropicales, templadas y secas; pero abundan en las zonas áridas y semiáridas del centro y norte del territorio mexicano. Estas zonas abarcan casi la mitad del territorio nacional (Toledo y Ordoñez, 1998; Magallán-Hernández y Hernández-Sandoval, 2000).

Se reportan dos regiones con la mayor diversidad de magueyes en México. Una con 15 especies, localizada en la provincia florística denominada Valle de Tehuacán-Cuicatlán entre los estados de Puebla y Oaxaca (García-Mendoza, 2007) y otra con 24 especies, en la región semiárida del estado de Querétaro (Magallán-Hernández y Hernández-Sandoval 2000).

Se ha reconocido que la taxonomía de la familia *Agavaceae*, a la que pertenecen los magueyes, es aún incompleta. Al respecto, se menciona que con estudios florísticos, etnobotánicos, de biología reproductiva y molecular, se podría caracterizar y delimitar con mayor detalle el germoplasma de estas plantas (Eguiarte y Souza, 2007 y García-Mendoza, 2007). Eguiarte y Souza (2007) reconocen que la familia contiene nueve géneros y que estos abarcan cerca de 300 especies. Por su parte, García-Mendoza (2007) sugiere que son cerca de 200 especies las que integran al género *Agave* y menciona que 150 de ellas se distribuyen solamente en México. Adicionalmente, Eguiarte y Souza (2007), consideran que más de 160 especies son las que integran al género (Cuadro 1).

Cuadro1. Géneros y especies que conforman a la familia *Agavaceae*. (Eguiarte y Souza 2007).

Géneros	No. de especies	No. en México
<i>Yucca</i>	49	29
<i>Hesperoyucca</i>	1	1
<i>Hesperaloe</i>	5	5
<i>Beschorneria</i>	7	7
<i>Furcraea</i>	25	11
<i>Agave</i>	166	125
<i>Manfreda</i>	28	27
<i>Polianthes</i>	13	13
<i>Prochnyanthes</i>	1	1
Total géneros: 9	295	219

2.2. Reproducción de los magueyes

La reproducción es el mecanismo que usan los organismos para asegurar su permanencia a través de una sucesión de generaciones en el tiempo. En las plantas se conocen los tipos sexual y asexual. La reproducción sexual sucede cuando se unen los gametos masculino y femenino y forman una célula diploide (cigoto). En la reproducción asexual un individuo produce descendientes, sin recombinarse con otros genotipos, no hay fecundación pero se repiten los procesos ontogenéticos desde el desarrollo embrionario (Plasencia-López, 2003).

Una forma de reproducción asexual es la propagación por clones. Lo anterior implica la formación de nuevos individuos vegetativos, conocidos también como rametos. Estos tienen el mismo genotipo de la planta madre y en conjunto forman un geneto o clon, el que puede ocupar áreas grandes del terreno. Los individuos vegetativos nuevos se forman a partir de meristemos de la planta progenitora y pueden ser obtenidos por medio de esquejes, bulbilos, o partes de la planta que se separan (Plasencia-López, 2003; Smith y Smith, 2001; Matías-Palafox, 2007).

La reproducción sexual en las plantas implica el desarrollo de flores, frutos y semillas, estructuras energéticamente costosas. En los magueyes, las flores y frutos se producen sólo una vez durante su ciclo de vida y después de la formación de estas estructuras la mayoría de las especies de maguey muere. Esta estrategia se conoce como semelparidad (Nobel, 1998; Eguiarte, *et al.*, 2000; García-Mendoza, 2007).

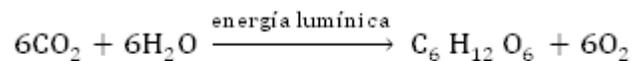
La reproducción sexual en los magueyes tarda varios años en presentarse. Por ejemplo, en *Agave lechuguilla* puede ocurrir cuando los individuos alcanzan 20 años de edad (Reyes-Agüero *et al.*, 2000). Se reconoce que la reproducción sexual es evolutivamente ventajosa porque involucra los principios de la selección natural al producir variación heredable (Plasencia-López, 2003). Se ha encontrado elevada variación genética en algunas especies de magueyes silvestres, pues presentan polinización cruzada, la cual es llevada a cabo principalmente por murciélagos, esfíngidos y abejas (Eguiarte y Souza, 2007).

La reproducción asexual en magueyes ocurre frecuentemente (Arizaga y Ezcurra, 2002; García-Mendoza, 2007). Incluso se menciona que algunas especies presentan sólo este tipo de reproducción. Lo anterior puede ser explicado por genética o por competencia de recursos (Eguiarte *et al.*, 2000). La reproducción asexual tiene ventajas. Así, se pueden propagar magueyes con formas valiosas con facilidad, en poco tiempo y en grandes cantidades. Un ejemplo de lo anterior, es el henequén (*Agave fourcroydes*). De las hojas de este maguey se obtienen fibras usadas como materia prima en la industria textil.

En el henequén se han inducido tres síndromes de domesticación: gigantismo, mayor fibrosidad de hojas y hojas con menos espinas (Valenzuela-Zapata, 2003). Si bien, lo anterior es valioso para la agronomía e industria textil, también representa dificultades para estos monocultivos; pues al estar constituidos por plantas con un solo genotipo, las enfermedades causadas por agentes bien adaptados a ellos, resultan una amenaza. Se ha reconocido que la especie de la cual se obtiene el tequila enfrenta dicha situación (Ezcurra, 2007).

2.3. Aspectos generales de la fotosíntesis

La fotosíntesis es un fenómeno natural importante para el hombre. Pues de este depende la producción de alimentos y oxígeno. Sin embargo, la transformación de la energía luminosa proveniente del sol a energía química, es su principal característica (producción primaria) (Bidwell, 1993). La fotosíntesis consiste de dos grupos de reacciones desarrolladas en secuencia. Una no bioquímica, que requiere luz y otra química, catalizada por enzimas y que requiere CO₂. Estas reacciones se llevan a cabo en tejidos celulares especializados de todas las plantas, algunas algas y cianobacterias. Para que ocurran dichas reacciones, los organismos denominados fotoautótrofos, requieren la energía de la luz del sol, bióxido de carbono y agua, con lo cual producen oxígeno molecular y carbohidratos como lo indica la siguiente ecuación (Bidwell, 1993).



Todas las plantas toman el CO₂ de la atmósfera mediante la vía de Calvin Benson o ruta metabólica C₃. En esta el CO₂ reacciona con un azúcar de cinco carbonos para producir dos moléculas de tres carbonos (dihidroxiacetona-fosfato y gliceraldehído-3-fosfato) (Raya-Pérez y Aguirre-Mancilla, 2008). Las reacciones fotosintéticas se llevan a cabo en organelos celulares altamente especializados llamados plastidios. En algunas algas y en todas las plantas superiores, la clorofila a y

la clorofila b, son los pigmentos fotosintéticos predominantes y los plastidios que contienen dichas clorofilas se denominan cloroplastos (Foyer, 1987).

La característica estructural más importante de los cloroplastos es la membrana tilacoide, esta es una red de membranas y es el sitio de las reacciones dependientes de la luz. La membrana tilacoide se encuentra suspendida en una matriz acuosa conocida como estroma y este es el sitio donde sucede la reducción del bióxido de carbono a carbohidratos (Horton *et al.*, 1995).

2.4. Rutas o caminos fotosintéticos

Los términos ruta fotosintética o camino fotosintético son utilizados para referirse a la forma en que las plantas toman el CO₂ atmosférico para realizar la fotosíntesis. Se conoce que más del 90% de las plantas terrestres presentan la ruta fotosintética C₃. También se sabe que las plantas que usan esta ruta, en el pasado, tuvieron modificaciones que eventualmente originaron otras rutas. Estas otras rutas se conocen son la C₄ y metabolismo ácido de las crasuláceas (MAC), (Raya-Pérez y Aguirre-Mancilla, 2008).

La ruta C₄ la presenta plantas como el maíz (*Zea mays*) y la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*). Se sugiere que esta ruta tuvo un origen polifilético, es decir, se presentó por primera vez en más de un grupo de plantas. También que apareció como consecuencia de la concentración baja de CO₂ prevaleciente en la atmósfera de hace entre 7 y 5 millones de años (Raya-Pérez y Aguirre-Mancilla, 2008).

Para llevar a cabo la ruta C₄ las plantas desarrollaron una anatomía especial en el mesófilo de sus hojas, denominada Kranz o en corona (Esau, 1982). De esta forma, ocurre una separación espacial de dos enzimas que catalizan la reducción del CO₂, la Rubisco (ribulosa bisfosfato carboxilasa) y la PEPCasa (fosfoenol piruvato carboxilasa). Esta última, con la incorporación de CO₂ a piruvato, produce oxaloacetato, posteriormente reducido a malato, con cuatro carbonos en su molécula, y primer producto estable en este proceso (Foyer, 1987). El malato después es transportado a las células de la vaina del haz, donde es descarboxilado y el CO₂ liberado es

incorporado al ciclo de Calvin en una reacción catalizada por la Rubisco y continúa así la síntesis de carbohidratos. Similar es el proceso que sucede en las plantas con la ruta C₃ (Andrade *et al.*, 2007; Raya-Pérez y Aguirre-Mancilla, 2008).

2.5. Metabolismo Acido de las Crasuláceas (MAC)

El camino metabólico ácido de las Crasuláceas es reconocido como una adaptación fisiológica de las plantas para soportar el estrés ambiental. Se presenta en especies que habitan sitios donde prevalecen condiciones prolongadas de escasez de agua, como en las zonas desérticas, o de CO₂ como en ambientes acuáticos (Hernández, 2006; Andrade *et al.*, 2007).

Una de las principales características de las plantas que exhiben el MAC, es que la acidificación de sus tejidos fotosintéticos fluctúa en un periodo de 24 horas. Esto es, los tejidos con cloroplastos de estas plantas presentan valores mayores de acidez durante la noche y menores en el día. Quizá la primera persona que se percató de lo anterior fue Grew en 1682 con las plantas del género *Aloe*. La literatura relacionada con el tema menciona que De Sausure en 1804 registró el mismo hecho en plantas del género *Opuntia*; pero que entre los años 1813 y 1815, Heyne describió con mayor detalle este fenómeno observado en una especie de la familia Crasulaceae, razón por la cual, se incorporó el nombre de esta familia a la ruta fotosintética (Kluge y Ting, 1978; Nobel, 1998).

A partir del estudio bioquímico de la ruta MAC durante la últimas dos décadas, se han identificado las principales fases que la constituyen, los factores que afectan su expresión, las metodologías para su identificación y también se han postulado implicaciones biológicas, ecofisiológicas e incluso de carácter productivo de las plantas que la presentan (Andrade *et al.*, 2007).

En la ruta MAC las plantas fijan el CO₂ atmosférico principalmente por la noche con la intervención catalítica de la enzima PEPCasa. El malato, producto de esta reacción, que es de cuatro carbonos, se almacena en las vacuolas de las células del clorénquima como ácido málico en concentraciones de entre 100 a 200 mEq por kg de

peso fresco. También se almacenan otros ácidos en menores proporciones, entre ellos el isocitrato, fumarato y succinato (Kluge y Ting, 1978). Al iniciar el periodo de luz consecutivo, el malato es descarboxilado y el CO₂ liberado de este proceso se asimila en los cloroplastos por el ciclo C₃ en el que la RUBISCO es la enzima carboxilante. Otra característica sobresaliente de estas plantas, es que sus estomas permanecen abiertos durante la noche en lugar del día (Kluge y Ting, 1978; Cushman, 2001; Andrade *et al.*, 2007).

Se ha aceptado que la captura nocturna de CO₂ es un fenómeno trascendental en el MAC y que presenta cuatro fases principales (Figura 1). Uno de los principales atributos bioquímicos y fisiológicos de las plantas MAC es la oscilación durante el día y la noche de la acidez de sus tejidos fotosintéticos; dicha oscilación es un fenómeno repetitivo y es utilizado para identificar esta ruta metabólica. Los factores que influyen en la expresión del MAC son de tipo biológico como el genotipo y la ontogenia; además de los ambientales como la cantidad de CO₂, agua, luz, temperatura, salinidad y nutrientes disponibles (Cushman, 2001; Lütge, 2004; Corrales *et al.*, 2004).

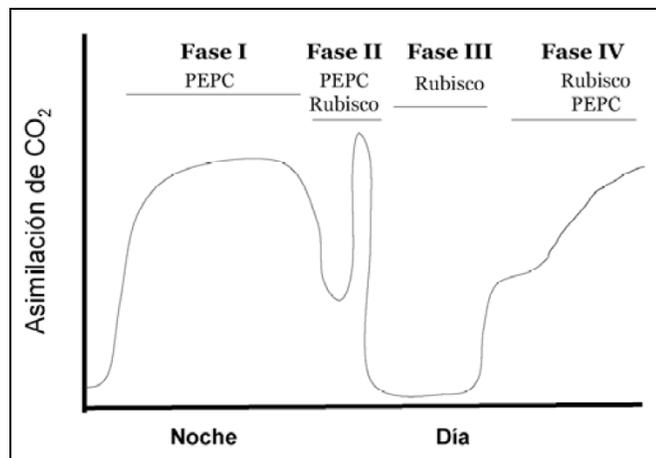


Figura 1. Curva de asimilación de CO₂ de una planta MAC bien irrigada y sus fases típicas de carboxilación y actividad de enzimas carboxilantes (Andrade *et al.*, 2007).

2.6. Plasticidad fisiológica del MAC

La ruta MAC no sólo la presentan plantas de ambientes áridos. Se ha determinado que ciertas plantas que crecen en ambientes tropicales y acuáticos, exhiben la ruta MAC. Por lo anterior se considera una ruta con plasticidad fisiológica. Por ejemplo, la especie acuática *Isoetes howellii* fija el CO₂ en la noche debido a la disminución de CO₂ del agua durante el día por la actividad de otros organismos (Keeley and Bush, 1984). Ha sido posible identificar algunas particularidades de esta ruta en especies de algunas familias (Cuadro 2), pues tienen la capacidad de regular la captura del CO₂ atmosférico entre la ruta C₃ y MAC (Winter *et al.*, 2008). En miembros del género *Portulaca* es posible el cambio de fotosíntesis C₄ a MAC (Andrade *et al.*, 2007).

Cuadro 2. Ejemplos de plantas que pueden cambiar de camino fotosintético de C₃ a MAC y los factores que promueven el cambio (Andrade *et al.*, 2007).

Especie	Familia	Factor inductor
<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	Aizoaceae	Luz, agua o salinidad
<i>Sedum telephium</i>	Crassulaceae	Agua y luz
<i>Tillandsia brachycaulos</i> y <i>T. elongata</i>	Bromeliaceae	Agua
<i>Clusia minor</i>	Clusiaceae	Agua, luz, temperatura, humedad relativa
<i>C. rosea</i>	Clusiaceae	Agua, luz, temperatura, humedad relativa
<i>C. parviflora</i>	Clusiaceae	Agua y luz

2.7. Identificación de plantas con MAC

En las plantas, la fluctuación de acidez MAC puede ser identificada con la titulación de tejidos fotosintéticos macerados, análisis enzimático, medición de la afinidad por isótopos de carbono de las enzimas PEPCasa y RUBISCO y la cuantificación de la asimilación de CO₂ (Andrade *et al.*, 2007). Un criterio fundamental para la caracterización de plantas MAC, es la evidencia de que los tejidos con cloroplastos muestran mayor concentración de ácido málico durante la noche que durante el día. De acuerdo con Osmond *et al.* (1994), la titulación de los tejidos con

cloroplastos es una técnica confiable y una de las más practicadas para identificar el MAC.

La acidez de los tejidos de las plantas MAC, es proporcional a la concentración de ácido málico almacenado en sus vacuolas (Osmond *et al.*, 1994), y puede ser cuantificada por métodos químicos, entre ellos la titulación. Dicha acidez es expresada en unidades de concentración molar, normal (equivalentes) en porcentaje respecto a la biomasa fresca del tejido o relacionada al área o volumen del tejido utilizado (Rosenberg, 1982; Andrade *et al.*, 2007). En la literatura y trabajos relacionados con la identificación de actividad MAC, la expresión de la acidez se reporta tanto en unidades de concentración molar, normal como en porcentajes.

2.8. Plantas con la ruta MAC

Se estima que 7% de las plantas vasculares presentan la ruta MAC. También se ha identificado en especies que integran entre 18 y 34 familias (Kluge y Ting, 1978; Winter *et al.*, 2008). La mayoría de estas plantas tienen distribución intertropical (Cuadro 3), diversos hábitos de crecimiento entre ellos, el epifito (que crecen en árboles) y el epipetrico (que crecen entre rocas), así como distintas formas biológicas (árboles, arbustos, rosetas). Comúnmente se piensa que las plantas MAC habitan lugares áridos y semiáridos. Sin embargo, se ha reconocido que un alto número de especies tropicales epifitas son MAC, incluso que en conjunto, superan a las plantas de ambientes secos con esta ruta metabólica (Andrade *et al.*, 2007).

Cuadro 3. Familias botánicas que tienen especies con MAC (Kluge y Ting, 1978).

Agavaceae	Euphorbiaceae
Aizoaceae	Geraniaceae
Asclepiadaceae	Labiatae
Asteraceae	Liliaceae
Bromeliaceae	Oxalidaceae
Cactaceae	Orchidaceae
Crassulaceae	Piperaceae
Cucurbitaceae	Portulacaceae
Didieraceae	Vitaceae

Varias plantas MAC coinciden en presentar modificaciones en su morfología y anatomía. Entre estas se reconocen la baja relación superficie-volumen, es decir, ocupan poco espacio, tienen cutícula gruesa en la epidermis de sus hojas y tallos, células con vacuolas grandes que sirven para almacenar agua (suculencia) y estomas pequeños con frecuencia baja y protegidos. Dichos caracteres les permiten reducir la pérdida excesiva de agua por respiración y ha ayudado a que puedan colonizar sitios donde prevalecen condiciones ambientales extremas (Cushman, 2001). Un ejemplo claro de plantas con estas modificaciones son los magueyes y los cactus y gracias a ellas también usan eficazmente el agua (Ezcurra, 2007).

No son pocas las especies MAC económicamente importantes. La piña (*Annanas comosus*), el nopal (*Opuntia ficus-indica*) y diversas especies de magueyes entre ellas *Agave tequilana*, *A. lechuguilla* y *A. salmiana* son las más conocidas (Bartholomew *et al.*, 2002; García de Cortázar and Nobel, 1991; Pimienta-Barrios *et al.*, 2007; Reyes-Agüero *et al.*, 2000; Aguirre R. *et al.*, 2001).

También, se ha señalado que la productividad (biomasa seca) de ciertas plantas MAC cultivadas es cercana a la de los cultivos con mayor demanda mundial. Por ejemplo, en el maguey *A. salmiana* se ha registrado una productividad de 42 Mg ha⁻¹ año⁻¹, que es cercana a la de ciertas plantas con metabolismo C₃ y C₄ como la alfalfa (*Medicago sativa*, C₃) que alcanza de 21 a 34 Mg ha⁻¹ año⁻¹ y la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*, C₄) que alcanza 40 a 66 Mg ha⁻¹ año⁻¹ (Kluge y Ting, 1978; Andrade *et al.*, 2007; Pimienta-Barrios *et al.*, 2007).

2.9. Metabolismo ácido de las crasuláceas en plántulas de maguey

La expresión de la ruta MAC se ha estudiado principalmente en magueyes adultos, es decir que tienen más de cinco años de edad. El estado del conocimiento de la expresión de esta ruta en las primeras etapas del ciclo de vida de plantas MAC adultas, es incipiente o nulo. Lo anterior permite reconocer la necesidad de dirigir mayores esfuerzos de investigación a la germinación de semillas, al establecimiento y al crecimiento de las plántulas de magueyes (De la Barrera y Andrade, 2007).

Al respecto, el trabajo de Wen *et al.*, (1996), concluye que la actividad MAC se presentó en plántulas de *Agave attenuata* desde el inicio de su desarrollo cuando crecieron en condiciones favorables de humedad. Lo anterior indica que en la etapa de plántula de este maguey no se presentó la ruta C₃ esperada. Los autores sugieren que la expresión de la actividad MAC registrada en estas plántulas, obedece a factores genéticos de la especie y mencionan que dicha observación se debió a que el cotiledón y las hojas laterales sucesivas, estaban compuestos por células parenquimatosas con cloroplastos en toda la superficie de la hoja.

2.10. Reproducción de magueyes por semilla

El desarrollo del tallo floral o quíote, la formación de frutos y semillas en magueyes silvestres se observa cada año. Sin embargo, es infrecuente el establecimiento de individuos nuevos. Lo anterior se explica parcialmente por la escasa sobrevivencia de las plántulas a la temporada seca del año (Jordan y Nobel, 1979; Sánchez-Urdaneta *et al.*, 2003; Valenzuela-Zapata, 2003). Bajo condiciones controladas se ha podido comprobar que la germinación de las semillas, la emergencia y establecimiento de las plántulas de algunos magueyes (como *A. salmiana*) es relativamente exitosa (Sánchez-Urdaneta *et al.*, 2004). Lo anterior resulta ser del mayor interés científico, ya que es posible diseñar acciones como propagación de individuos generados a partir de semillas y después trasplantarlos en sus lugares de origen.

En magueyes de importancia comercial como el agave azul o el henequén, se ha puesto en práctica el cultivo de tejidos *in vitro*, principalmente con el propósito de reducir el tiempo para obtener nuevas generaciones de plantas para propagar. Sin duda, estas herramientas biotecnológicas permiten manejar el germoplasma y conservar la variabilidad existente dentro y entre las especies de maguey. En cuanto a las poblaciones silvestres y cultivadas es necesario destinar mayores esfuerzos de investigación hacia la propagación por semilla, en particular debido a la pérdida de variabilidad genética que conlleva la multiplicación por vástagos vegetativos (Robert *et al.*, 2007).

2.11. Literatura citada

- Aguirre R. J. R., Charcas-Salazar, H. y Flores-Flores, J. L. 2001. El maguey mezcalero potosino. Consejo Potosino de Ciencia y Tecnología, Gobierno del Estado de San Luís Potosí e Instituto de Investigación de Zonas Desérticas, Universidad Autónoma de San Luís Potosí.
- Andrade, J. L., De la Barrera, E., Reyes-García, C., Ricalde, M., Vargas-Soto, G. y Cervera, C. 2007. El metabolismo ácido de las crasuláceas: diversidad, fisiología ambiental y productividad. Boletín de la Sociedad Botánica de México (8), 137-50.
- Arizaga, Santiago and Ezcurra, Exequiel. 2002. Propagation Mechanisms in *Agave macroacantha* (Agavaceae), a tropical arid-land succulent rosette. American Journal of Botany, Vol. 89, No. 4. pp. 632-641.
- Bartholomew, D.P., Paul, R.E. and Rohrbach, K.G. 2002. CABI Publishing. University of Hawaii at Manoa, Honolulu. U.S.A. 319 pp.
- Bidwell, R.G.S. 1993. Fisiología vegetal. AGT Editor S.A. México
- Cushman, J. 2001. Crassulacean Acid Metabolism. A Plastic Photosynthetic Adaptation to Arid Environments. Plant Physiology 127(4): 1439-1448.
- Corrales-García, J., Peña-Valdivia, C.B., Razo-Martínez, Y. and Sánchez-Hernández, M. 2004. Acidity changes and pH- buffering capacity of nopalitos (*Opuntia* spp.). postharvest biology and technology (32) 169-174.
- De la Barrera, E. y Andrade, J.L. 2007. Diversidad fisiológica de las plantas mexicanas: el caso de un metabolismo fotosintético especial. Boletín de la Sociedad Botánica de México (81):157-159.
- Eguiarte, L. E. y González, A. 2007. De genes y magueyes estudio y conservación de los recursos genéticos del tequila y el mezcal. Ciencias. (87) 28:35.
- Eguiarte, L. E. y Souza, V. 2007. Historia natural del Agave y sus parientes: Evolución y Ecología. In: En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología. México.
- Eguiarte, L. E., Souza, V. y Silva-Montellano, A. 2000. Evolución de la familia Agavaceae: filogenia, biología reproductiva y genética de poblaciones. Boletín de la Sociedad Botánica de México, 66: 131-150.

- Esau, K. 1982. Anatomía de las plantas con semilla. Editorial Hemisferio Sur. Buenos Aires. 512 pp.
- Ezcurra, E. 2007. Las adaptaciones morfo-fisiológicas de los agaves a los ambientes áridos y su prospectiva agroindustrial. In: En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves. Colunga-GarcíaMarín, P., Larqué-Saavedra, A., Eguiarte, L., Zizumbo-Villarreal, D. (Eds). Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología. México.
- Foyer, Ch. 1987. Fotosíntesis. Compañía Editorial Continental, S.A. de C.V. México. 212 pp.
- García de Cortázar, V. and Nobel, P.S. 1991. Prediction and measurement of high annual productivity for *Opuntia ficus-indica*. Agricultural and Forest Meteorology (56):261-272.
- García-Mendoza, A. 2007. Los Agaves de México. Ciencias (87) 14:23.
- Hernández, H. M. 2006. La vida en los desiertos mexicanos. Fondo de Cultura Económico. Secretaría de Educación Pública. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Convenio Andrés Bello. México. 188 pp.
- Horton, H. R., Moran, L., Ochs, R., Rawn, J. y Scrimgeour, G. 1995. Bioquímica. Prentice-Hall Hispanoamericana S.A. México.
- Jordan, P.W.; P.S. Nobel. 1979. Infrequent establishment of seedlings of *Agave deserti* (Agavaceae) in the northwestern Sonoran desert. American Journal of Botany, 66: 1079-1084.
- Keeley, J. E. and Busch, G. 1984. Carbon assimilation Characteristics of the Aquatic CAM Plant, *Isoetes howellii*. Plant Physiology. (76):525-530.
- Kluge, M and Ting, I. 1978. Crassulacean Acid Metabolism. Analysis of an Ecological Adaptation. Springer-Verlag. Berlin. 209 pp.
- Lütge, U. 2004. Ecophysiology of Crassulacean Acid Metabolism (CAM). Annals of Botany 93: 629-652.
- Magallán-Hernández, F. y Hernández-Sandoval, L. 2000. La familia Agavaceae en el estado de Querétaro, México. Boletín de la Sociedad Botánica de México. 66:103-112.

- Matías-Palafox, M.L. 2007. Estructura poblacional y biología reproductiva de *Turbinicarpus horripilus* (Lem.) Vác. John & Riha (Cactaceae). Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana. México. 117 pp.
- Nobel, P.S. 1998. Los incomparables agaves y cactus. Trillas. México. 211 pp.
- Osmond C.B., Adams III W.W. and Smith S.D. 1994. Crassulacean acid metabolism. *In*: Pearcy R. W., Ehleringer J., Mooney H.A. y Rundel P.W. Eds. Plant Physiological Ecology. Field Methods and Instrumentation, pp. 255-280, Chapman y Hall, Londres.
- Pimienta-Barrios, E., Zañudo-Hernández, J. y García-Galindo, J. 2006. Fotosíntesis estacional en plantas jóvenes de *Agave tequilana*. *Agrociencia* 40:699-709.
- Pimienta-Barrios, E., Zañudo-Hernández, J., Nobel, P.S. y García-Galindo, J. 2007. Ecofisiología del agave azul (*Agave tequilana* Weber). *In*: Colunga-GarcíaMarín, P., Larqué-Saavedra, A., Eguiarte, L. y Zizumbo-Villarreal, D. (Eds). En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología. México.
- Plasencia-López, M. T. 2003. Biología reproductiva de *Opuntia bradtiana* (Cactaceae) en Cuatro Ciénegas, Coahuila, México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. 49 pp.
- Raya-Pérez, J. C. y Aguirre-Mancilla, C.L. 2008. Aparición y evolución de la fotosíntesis C4. *Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente* 1(14): 45-50.
- Reyes-Agüero, J.A., Aguirre R. J.R. y Peña Valdivia, C.B. 2000. Biología y aprovechamiento de *Agave lechuguilla* Torrey. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* (67): 75-58.
- Robert, M.L., Herrera, J.L. y Arce-Montoya, M. 2007. La biotecnología aplicada al mejoramiento genético de los agaves. *In* Colunga-GarcíaMarín, P., Larqué-Saavedra, A., Eguiarte, L. y Zizumbo-Villarreal, D. (Eds). En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología. México.
- Rosenberg, J. 1982. Química General. Teoría y 611 problemas resueltos. 6ª edición. Serie Schaum.Mc Graw-Hill. México. 318 pp.
- Rzedowski, J. 1978. Vegetación de México. Limusa. México.

- Sánchez-Urdaneta, A. B., Peña-Valdivia, B., Aguirre R.R., Trejo, C. y Cárdenas, E. 2004. Efectos del potencial de agua en el crecimiento radical de plántulas de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck. *Interciencia* (1) 626-631.
- Smith, R. L. y Smith, T. M. 2001. *Ecología*. 4ª edición. Pearson Educación, S. A. España. 664 pp.
- Toledo, V. M. y Ordoñez, M. J. 1998. El panorama de la biodiversidad de México: una revisión de los hábitats terrestres. En Ramamoorthy, R., Bye., Lot, A. y Fa. J. (Comps.) 1998. *Diversidad Biológica de México, orígenes y distribución*. Instituto de Biología Universidad Nacional Autónoma de México. 792 pp.
- Valenzuela-Zapata, A. G. 2003. *El agave tequilero, cultivo e industria en México*. Ediciones Mundi-Prensa. México, D. F. 208 pp.
- Wen, H., Wagner, J. and Larcher, W. 1996. Growth and nocturnal acid accumulation during aerly ontogeny of *Agave attenuata* grown in nutrient solution and in vitro culture. *Biologia plantarum* 39, 1-11.
- Winter, K., García, M. and Holtum, J. 2008. On the nature of facultative and constitutive CAM: environmental and developmental control of CAM expression during early growth of *Clusia*, *Kalanchoë* and *Opuntia*. *Journal of Experimental Botany*. 59 (7):1829-1840.

CAPITULO III. TAMAÑO DE LA SEMILLA Y DESARROLLO DE LA PLÁNTULA DEL MAGUEY *Agave salmiana* OTTO EX SALM-DYCK

3.1. Resumen

Se determinó la biomasa, longitud, anchura y contenido de humedad de semillas de las variantes Blanco, Chino y Liso del maguey *Agave salmiana* del altiplano potosino zacatecano. Las semillas fueron sembradas en invernadero en tres ocasiones durante el verano y el otoño del año 2008 y verano de 2009. Se registró el desarrollo de la plántula, el que incluyó la emergencia de la hoja cotiledonar así como la longitud y la exposición de las hojas laterales. La biomasa, longitud y anchura de las semillas fueron diferentes estadísticamente ($\alpha=0.05$) entre variantes. La biomasa fluctuó de 10.77 mg (variante Blanco) a 14.49 mg (variante Liso). La variante Blanco tuvo la menor longitud (7.09 mm) y anchura (5.35 mm) del grupo y la variante Chino la mayor longitud y anchura 8.38 mm y 6.48 mm respectivamente. El contenido de humedad de la semilla fluctuó de 3.2 % a 11.6 % entre variantes y no se encontraron diferencias estadísticas significativas al nivel 0.05 de significancia. La germinación fue epigea. Entre épocas de siembra, las hojas cotiledonares comenzaron a emerger, en promedio, 13 días después que fueron sembradas. La mayor cantidad de hojas cotiledonares, de las tres variantes, se presentó en verano y la menor en invierno, cuando la temperatura descendió hasta -4°C. La longitud de las hojas cotiledonares pareció duplicarse con las temperaturas frías en el invernadero. Las hojas laterales se expusieron desde la base de la hoja cotiledonar y comenzaron a desarrollarse en promedio, 33 días después de la siembra y 18 días después de la emergencia de la hoja cotiledonar.

Palabras clave: *Agave salmiana*, semilla, masa y dimensiones, emergencia, desarrollo de la plántula.

3.2. Abstract

The aim of this research was to characterize the seed mass, dimensions (length and wide) and moisture content of three accessions of maguey *Agave salmiana* (Blanco, Chino and Liso) from San Luis Potosí, Mexico. Also, it was studied the time and proportion of emergence of those seeds growing in a greenhouse. The seeds were sown over three seasons in summer and fall 2008 and summer 2009. Seedling emergence (cotyledon leaf) and lateral leaves length were assessed. There were statistical differences ($\alpha=0.05$) among accessions of the seed weight and dimensions. The seed mass range was from 10.7 mg (accession Blanco) to 14.5 mg (accession Liso). Seeds of the accession Blanco had the shortest length (7.1 mm) and wide (5.4 mm), whereas the accession Chino had the longest (8.4 mm) and wide (6.5 mm) seeds. The seed moisture content was of 7.0% among accessions ($\alpha=0.05$). *Agave* seeds had epigeal germination. The cotyledon leaves emerged on average 13 days after the seeds were sown. The highest amount of emerged cotyledon leaves registered was in summer, comparing to the fall season, probably due to the lower temperatures (-4°C) registered in the greenhouse. The length of the cotyledon leaves was doubled in the fall season. Lateral leaves started to grow from the base of the cotyledon leaf in average 33 days after the seed was sown and 18 days after the emergence of the cotyledon leaf.

Key words: *Agave salmiana*, seed mass and dimensions, emergence, seedling development.

3.3. Introducción

El ciclo vital de los magueyes es largo. Se completa al formar semillas; lo cual tarda varios años. Después de la germinación de la semilla, se establece una plántula que crece desarrollando hojas laterales o pencas hasta llegar a la madurez. Con la madurez pronto sucede la floración, donde la inflorescencia o qurote, forma las flores que al ser polinizadas se convierten en frutos. Los frutos producen miles de semillas y se dispersan por el viento (García-Mendoza, 2007).

El maguey *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck presenta reproducción sexual pero principalmente asexual (Tello-Balderas, 1988). Esta es una planta monocotiledónea, pues en su semilla el embrión contiene un cotiledón (Font-Quer, 1977; Bewley and Black, 1994), y exhibe el metabolismo ácido de las crasuláceas (MAC) (García-Mendoza, 2007). Las hojas o pencas de esta especie se desarrollan, exponen y crecen formando una roseta desde un meristemo localizado en la base de la hoja cotiledonar. Por lo que las hojas que conforman un maguey tienen diferente edad (Aguirre R *et al.*, 2001).

Los magueyes producen vástagos vegetativos (hijuelos) antes de la floración, forman semilla una sola vez en su vida, y la mayoría de las especies muere después de ello. Al proceso anterior se le llama monocarpia (Font-Quer, 1977; Nobel, 1998; García-Mendoza, 2007) y semelparidad como patrón reproductivo (Roff, 1992). *A. salmiana* se considera en proceso de domesticación debido a que ha sido objeto de manejo por miles de años para obtener aguamiel, pulque y mezcal (Gentry, 1982; Eguiarte y Souza, 2007; Illsley *et al.*, 2007).

Una característica de las plantas MAC es su crecimiento vegetativo lento (Jiménez-Sierra y Reyes-Santiago, 2003), lo cual permite entender porque la producción de semilla en magueyes ocurre cuando alcanzan más de cinco años de edad (Reyes-Agüero *et al.*, 2000). Cada maguey produce miles de semillas; sin embargo se ha observado que son escasas las que germinan y establecen un individuo nuevo en el ambiente silvestre (Aguirre R. *et al.*, 2001); además, las plántulas que

logran establecerse, pocas veces prosperan por falta de condiciones adecuadas para su crecimiento, principalmente la escasa humedad en el suelo, por herbivoría o enfermedades (Tello-Balderas, 1988; Dodd and Donovan, 1999; Eguiarte *et al.*, 2000).

No obstante, Jordan y Nobel (1979), estimaron que se pueden establecer individuos de *Agave deserti* en el desierto sonorense después de algunos años con lluvias. Dichos autores, confirmaron su estimación al registrar, en un área de 1,500 m² seis plantas pequeñas de esta especie bajo la protección de plantas nodriza. La importancia de los individuos originados de semilla debe ser reconocida, pues son necesarios para mantener la estructura y dinámica de las poblaciones de maguey, y de todas las plantas, ya que su ausencia disminuye la variabilidad genética (Martínez-Morales, 1988; Vázquez-Yañez *et al.*, 1997).

En el área geográfica del altiplano mexicano, en particular en regiones del estado San Luis Potosí, se localizan poblaciones silvestres y cultivadas de *A. salmiana* (Rzedowski, 1978). En estas poblaciones se han descrito las variantes Blanco, Chino y Liso usadas principalmente para fabricar mezcal (Aguirre R. *et al.*, 2001). En las plantas adultas de estas variantes se observan diferencias morfológicas en sus hojas y espinas laterales; sin embargo, se confirmó recientemente su parentesco genético por medio de análisis de ADN de hoja con técnicas moleculares y las diferencias morfológicas en las plantas jóvenes (Peña-Valdivia *et al.*, 2009).

Actualmente la información acerca de las semejanzas, diferencias físicas y fisiológicas de las semillas de las variantes mencionadas es escasa; aunque se ha observado que estos magueyes producen abundante semilla viable, sin latencia, germinación rápida y uniforme (Aguirre R. *et al.*, 2001; Peña-Valdivia *et al.*, 2006). La información relacionada con la biología de la germinación y el establecimiento de *A. salmiana* es limitada, por lo que se considera necesario incrementar el conocimiento al respecto.

Así, el objetivo de este trabajo, fue realizar un análisis descriptivo de la biomasa y longitud de la semilla y su relación con el desarrollo inicial de las plántulas originadas de semilla, de las variantes Blanco, Chino y Liso del maguey *A. salmiana* del altiplano potosino zacatecano en invernadero.

3.4. Materiales y métodos

Material vegetal

Se usaron semillas de las variantes Blanco, Chino y Liso del maguey *A. salmiana* provenientes de plantas que crecían silvestres en la región Minera Las Cuevas, San Luis Potosí, México (Cuadro 4), estas semillas fueron recolectadas por el Dr. Juan Rogelio Aguirre Rivera, del IIZD, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México. Las infrutescencias se recolectaron el 18 de octubre del 2003, las cápsulas fueron separadas por secciones según su ubicación en la infrutescencia, (apical, central y basal) colocadas en la sombra y al aire libre, para facilitar su deshidratación, y almacenadas en refrigeración a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$ (Peña-Valdivia *et al.*, 2006). La presente investigación fue realizada durante los años 2008 y 2009 y se utilizaron únicamente las semillas de las cápsulas de la sección central de la infrutescencia.

Antes de la siembra se registraron la biomasa y dimensiones (longitud y anchura) de las semillas individualmente, en una balanza analítica (Scientech SA120) y con un vernier digital (Mituyoto) respectivamente. Para determinar la humedad en las semillas, cada semilla fue partida por la mitad, pesada individualmente, colocada a 70°C por cuatro días y pesada nuevamente. El contenido de humedad, en porcentaje, se calculó conforme la siguiente relación:

$$\text{Contenido de humedad (\%)} = \frac{100 (w_1 - w_2)}{w_1}$$

Donde w_1 es el peso en mg inicial, w_2 es el peso en seco en mg.

Cuadro 4. Ubicación geográfica y características del sitio de recolección de las semillas de las variantes Blanco, Chino y Liso de *Agave salmiana* (Peña-Valdivia et al., 2006).

Sitio	Estado	Coordenadas y altitud (msnm)	Temperatura promedio anual (°C) y lluvia anual (mm)	Clima
Minera las Cuevas (estación la salitrera)	San Luis Potosí	Latitud N 21°56' Longitud O 100°35' Altitud 1890	16 566.8	Seco o árido, inviernos fríos, lluvias en verano con temperaturas entre 7 a 14°C en ese periodo (BS1kw(e)gw")

Características y siembra de las semillas

Las semillas fueron sembradas en tres ocasiones distintas durante la época de verano y otoño del año 2008 y verano del 2009. Estas siembras se realizaron en un invernadero del Colegio de Postgraduados, en Montecillo, Estado de México (Latitud N 19°29", Longitud O 98°54", Altitud 2250 msnm). Se utilizaron bolsas de polietileno color negro de 30 cm de diámetro y 40 cm de altura. Fueron sembradas 100 semillas de cada variante en el verano y otoño del 2008 y 50 semillas de cada variante en el verano del 2009 (Figura 2), en un diseño completamente al azar con cinco repeticiones.

Se utilizó el mismo sustrato, a capacidad de campo en cada siembra realizada. El sustrato fue una mezcla de suelo agrícola y tezontle en proporción 3:1, con textura migajón arcilloso arenoso, pH 7.73 y 6.22% de materia orgánica. Cada semilla se sembró en un orificio con profundidad aproximada de 1 cm. El riego se realizó con un sistema automático que no restringió el aporte de humedad. La temperatura en el interior del invernadero fue registrada con un Data logger (HOBO).

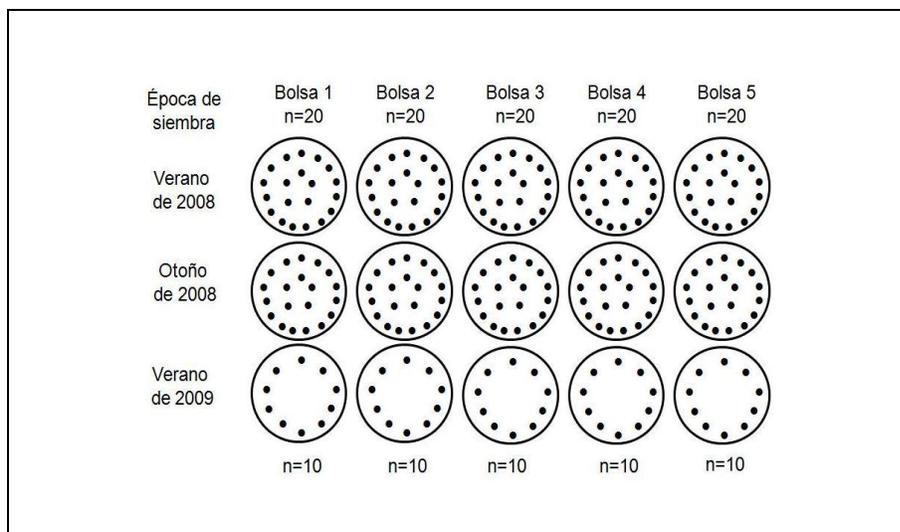


Figura 2. Diseño de la siembra de semillas en invernadero de las variantes Blanco, Chino y Liso del maguey *Agave salmiana*.

Variables evaluadas

Se cuantificaron los días que transcurrieron después de cada siembra hasta visualizar las hojas cotiledonares emergidas. De las hojas cotiledonares que emergieron, se midió su longitud después que transcurrieron 33 días de la siembra efectuada en el verano del 2008 y 48 días después de la siembra del otoño del 2008. Además, se registró el tiempo para la exposición de las primeras hojas cotiledonares durante poco más de un mes y de las hojas laterales sucesivas por alrededor de cinco meses.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron ordenados y verificados. Con un diseño experimental completamente al azar se realizó el análisis de la varianza de la biomasa, longitud, anchura y contenido de humedad de las semillas de cada variante. También se analizó el número de hojas cotiledonares expuestas, longitud de la hoja cotiledonar y el número de hojas laterales. Los tratamientos fueron las tres variantes de maguey (Blanco, Chino y Liso) y como variables respuesta se tomó la biomasa, longitud, anchura y contenido de humedad de cada semilla; número, longitud de hojas cotiledonares expuestas y número de hojas laterales en formación. Se realizó una prueba de separación de

medias con Tukey ($\alpha=0.05$) con el programa estadístico SAS (versión 9). Los resultados fueron presentados gráficamente con el programa SigmaPLOT (versión 10).

3.5. Resultados

Morfometría de las semillas

Las semillas de las tres variantes presentaron testa de color negro brillante, forma de lágrima (lacrimiforme) y caras planas (Figura 3). Con los datos de la biomasa de las semillas de cada variante, se construyeron histogramas de frecuencias (Figura 4), los cuales reflejan una aparente distribución normal de datos, pues la mayoría pertenecen a la masa media de cada variante y el resto se distribuye a su alrededor.

La biomasa de las semillas fluctuó de 10.8 a 14.5 mg entre las variantes. Las semillas de la variante Blanco presentaron la masa menor del grupo y las de la variante Liso la mayor. Las semillas midieron de 7.0 a 8.4 mm de longitud y de 5.4 a 6.5 mm de anchura. Se encontraron diferencias significativas ($\alpha=0.05$) de estas dimensiones entre las variantes. Las semillas de la variante Blanco tuvieron las menores dimensiones y las de la variante Chino las mayores (Cuadro 5). El contenido de humedad fluctuó de 2.8 % a 11.6 %, el porcentaje medio de humedad fue 7.2% entre variantes y las diferencias estadísticas fueron estadísticamente significativas (0.05 de significancia).



Figura 3. Semillas de tres variantes de *Agave salmiana* del altiplano potosino zacatecano.

Cuadro 5. Biomasa, longitud y anchura media de las semillas de tres variantes de *Agave salmiana* formadas en la sección central de la infrutescencia (\pm error estándar).

Variante	Biomasa		Longitud		Anchura	
	media (mg)	n	media (mm)		media (mm)	n
Blanco	10.8 (\pm 0.16) a	250	7.0 (\pm 0.09) a		5.4 (\pm 0.11) a	20
Chino	12.2 (\pm 0.11) b	250	8.4 (\pm 0.09) b		6.5 (\pm 0.10) b	20
Liso	14.5 (\pm 0.08) c	250	8.3 (\pm 0.08) b		5.6 (\pm 0.08) a	20

Valores seguidos por letras distintas indican diferencia significativa según la prueba de comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$).

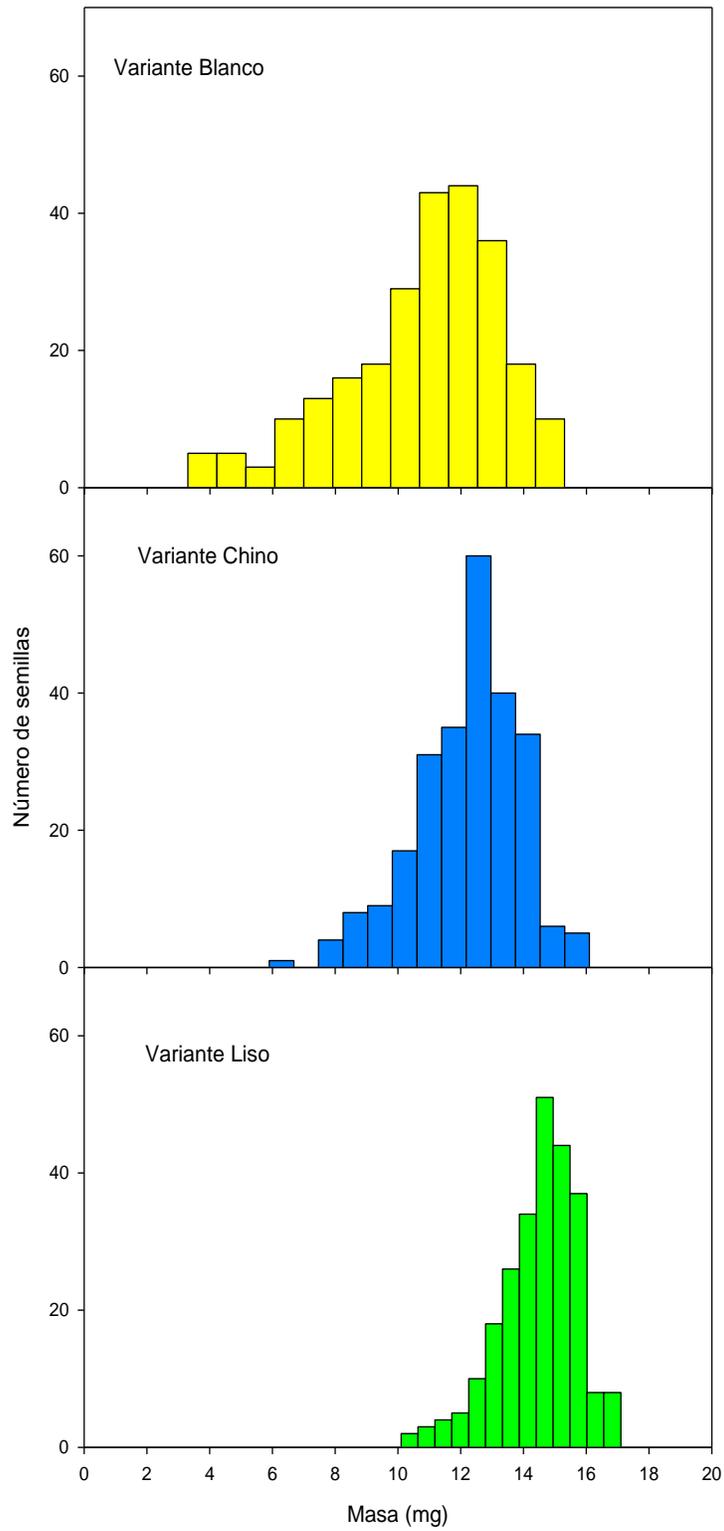


Figura 4. Distribución de la biomasa (mg) de 250 semillas de tres variantes del maguey *Agave salmiana*.

Desarrollo de la plántula y emergencia de la hoja cotiledonar

Las hojas cotiledonares presentaron germinación epigea (Figura 5), y su emergencia tomó, en promedio entre las épocas de siembra, 13 días. Se presentaron diferencias significativas en la tasa de emergencia de estas estructuras entre variantes y épocas de siembra ($\alpha=0.05$). Así, 11 días después de la siembra realizada en verano del 2008, la variante Blanco presentó 20 % de hojas cotiledonares emergidas; mientras que, en el mismo tiempo, en las variantes Chino y Liso se contabilizaron el 1 y 4 % de hojas cotiledonares, respectivamente (Cuadro 6) y se encontraron diferencias estadísticas significativas ($\alpha=0.05$) En la siembra realizada en el otoño del 2008, 18 días después de la misma, la proporción de hojas cotiledonares emergidas de la variante Blanco fue 9% mientras que en las variantes Chino y Liso 3% y 0%, respectivamente. No hubo diferencias significativas ($\alpha=0.05$) en esta variable.

En la siembra realizada en el verano del 2009, 11 días después de la siembra se registró solamente 10% de hojas cotiledonares de la variante Blanco y las variantes Chino y Liso no habían expuesto esa estructura, y no se detectaron diferencias significativas ($p\geq 0.05$). Las temperaturas registradas, entre épocas de siembras, dentro del invernadero durante los días transcurridos para observar el inicio de la emergencia de las hojas cotiledonares, oscilaron desde -4.0 hasta 50.7 (°C) (Cuadro 7).



Figura 5. Germinación epigea de una hoja cotiledonar de la variante Chino de *Agave salmiana* crecida en invernadero en el Colegio de Postgraduados.

Cuadro 6. Promedio de hojas cotiledonares emergidas de tres variantes de *A. salmiana* 11 días después de la siembra de semillas realizada en verano de 2008 en invernadero (\pm error estándar).

Variante	Semillas sembradas	Hojas cotiledonares emergidas (%)	Promedio (\pm ee)
Chino	100	1	0.2 (\pm 0.2) a
Liso	100	4	0.8 (\pm 0.2) a
Blanco	100	20	4.0 (\pm 1.0) b

Promedio y error estándar de cinco repeticiones (una repetición es una maceta con 20 semillas). Letras distintas después del valor en la columna promedio indican no similitud según la prueba de comparación de medias con Tukey ($p \leq 0.05$).

El porcentaje medio de hojas cotiledonares emergidas respecto al total de semillas sembradas, en verano del 2008 a 33 días de la siembra, fue de 15.5% entre variantes. En otoño del 2008 a 73 días de la siembra de las semillas, la emergencia fue de 12.3% entre variantes y en verano del 2009 a 28 días de la siembra fue 4.6%. No se presentaron diferencias significativas ($\alpha=0.05$) de estos porcentajes entre variantes pero si entre épocas de siembra (Figura 6).

El mayor porcentaje medio (15%) de hojas cotiledonares emergidas de las tres variantes al final del registro se obtuvo en la siembra del verano del 2008 (Figura 7). Entre épocas de siembra el mayor porcentaje medio de hojas cotiledonares emergidas fue de 25.8 % de las tres variantes, se registró 33 días después de la siembra de la

época de verano del 2008 (Figura 8). Se registró un retraso en la exposición de hojas cotiledonares de 40 días, entre la siembra realizada en otoño del 2008 y la de verano del 2008, principalmente por las temperaturas que llegaron a ser de -4°C en el invierno de ese mismo año. Las hojas cotiledonares comienzan a marchitarse aproximadamente cinco meses después de la siembra de las semillas.

Cuadro 7. Temperaturas máximas, mínimas absolutas y promedio registradas en un invernadero del Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México durante los días transcurridos previos a la exposición de las hojas cotiledonares de tres variantes de *A. salmiana*.

Siembra	Días transcurridos	Promedio	Temperatura (°C)	
			Mínima	Máxima
30 de mayo del 2008	11	18.0	7.4	29.2
12 de diciembre del 2008	18	17.6	-4.0	50.7
08 de junio del 2009	11	24.9	7.2	51.6

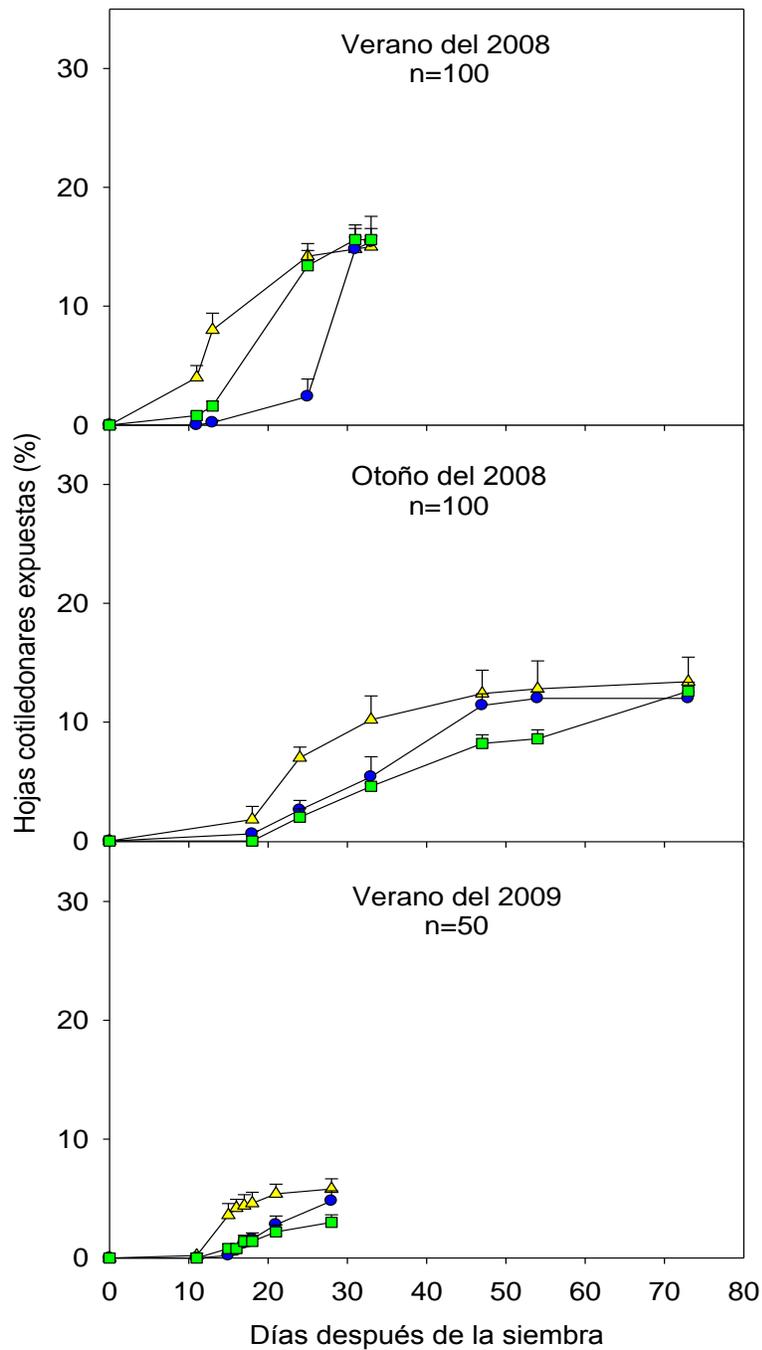


Figura 6. Porcentaje de emergencia de hojas cotiledonares de las variantes Blanco \blacktriangle , Chino \bullet y Liso \blacksquare de *Agave salmiana* crecidas en invernadero después de tres épocas de siembra. Cada punto representa el promedio de cinco repeticiones (una repetición es una maceta con 20 semillas en verano y otoño del 2008 y 10 semillas en verano del 09).

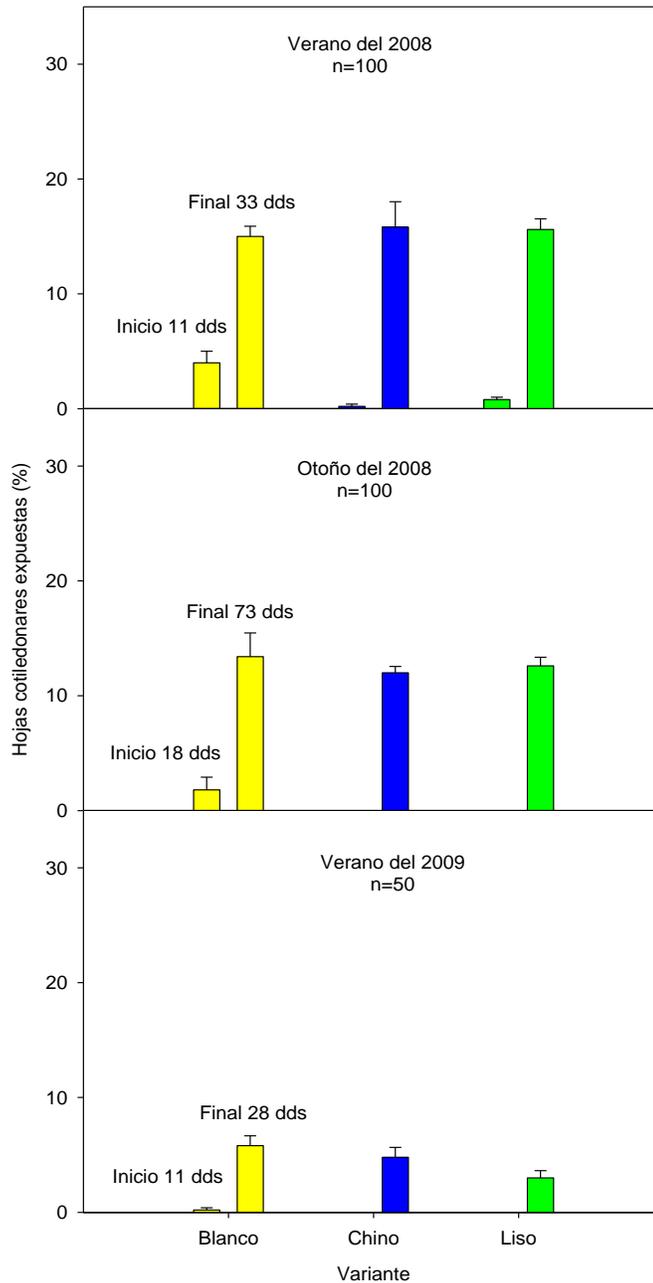


Figura 7. Promedio de hojas cotiledonares emergidas de tres variantes de *Agave salmiana* en invernadero en tres épocas de siembra. Barra izquierda indica el inicio y barra derecha el final del registro. Error estándar de cinco repeticiones (una repetición es una maceta con 20 semillas en verano y otoño de 2008 y 10 semillas en verano de 2009). (dds)=días después de la siembra. Barras ausentes indican no registro de hojas cotiledonares.

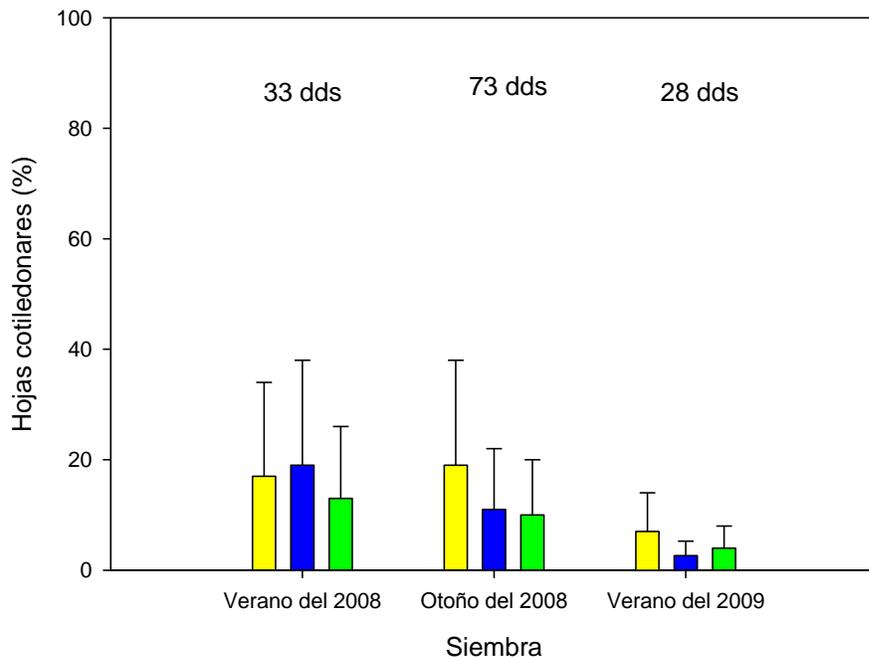


Figura 8. Porcentaje medio de hojas cotiledonares expuestas de tres variantes de *Agave salmiana* en invernadero. Variante Blanco ■, Chino ■ y Liso ■. En la siembra de verano y otoño de 2008 se sembraron 100 semillas y 50 semillas en verano del 2009 (dds)=días después de la siembra.

Longitud de las hojas cotiledonares

Las hojas cotiledonares expuestas, alcanzaron en promedio 10.3 mm de longitud cuando transcurrieron 33 días después de la siembra realizada en verano del 2008, independientemente de la variante. Sin embargo, las hojas cotiledonares emergidas después de la siembra efectuada en otoño del 2008, midieron de 20.4 a 29.3 mm de longitud cuando transcurrieron 48 días de la siembra y se presentó un gradiente de longitudes entre las variantes, con la longitud menor y mayor en Liso y Chino, respectivamente (Cuadro 8).

Cuadro 8. Longitud media (mm) de hojas cotiledonares de tres variantes de *A. salmiana* expuestas en invernadero (\pm error estándar).

Variante	33 dds	n	48 dds	n
Chino	9.8 (\pm 1.03) a		29.3 (\pm 1.60) c	
Blanco	9.8 (\pm 0.64) a	26	24.9 (\pm 2.17) b	31
Liso	11.2 (\pm 0.66) a		20.4 (\pm 1.56) a	

Letras distintas después del valor error estándar en la columna longitud media, indican no similitud según la prueba de comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$), dds=días después de la siembra.

Formación de las hojas laterales

La exposición de la primera hoja lateral inició en la base de la hoja cotiledonar en todas las plántulas. Tal exposición ocurrió, en promedio 31 días después de la siembra y 18 días después de la emergencia de la hoja cotiledonar. En verano del 2008, la primera hoja lateral inició su exposición 25 días después de la siembra y el número de hojas expuestas fue significativamente similar entre las variantes ($p \geq 0.05$). Sin embargo, en esta misma época se encontraron diferencias significativas entre variantes, cuando se cumplieron 33 días de la siembra, pues la variante Liso expuso el promedio mayor de esta primera hoja lateral (Cuadro 9).

En la siembra efectuada en otoño del 2008, la primera hoja lateral en las plántulas se expuso 41 días después de la siembra y a los 28 días de la emergencia de la hoja cotiledonar y no se encontraron diferencias significativas entre variantes ($p \geq 0.05$). En esta misma siembra, se observó que las hojas laterales consecutivas comenzaron a exponerse en promedio 15.2 días después de la exposición de la hoja lateral anterior (Figura 9).

Cuadro 9. Días para exponer la primera hoja lateral en tres variantes de *A. salmiana* a los 33 días de la siembra en invernadero del verano del 2008 (\pm error estándar).

Variante	Promedio primera hoja lateral desdoblada	n
Blanco	4 (± 1) a	100
Chino	9 (± 1) a	
Liso	12.2 (± 1) b	

Promedio y error estándar de cinco repeticiones (una repetición es una maceta con 20 semillas). Letras distintas después del valor error estándar en la columna promedio indican no similitud según la prueba de comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$).

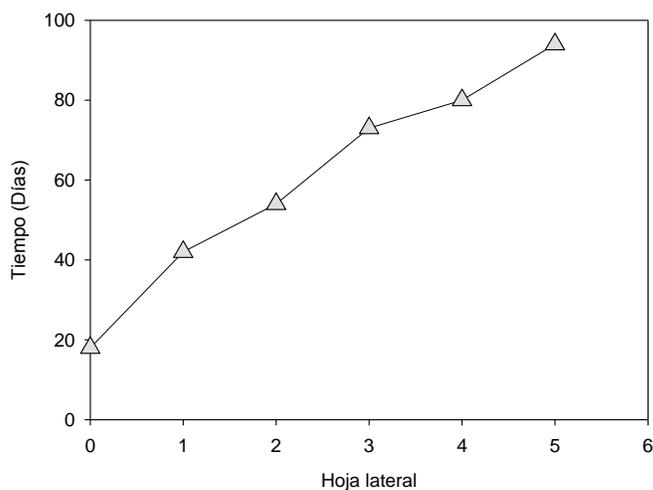


Figura 9. Tiempo (días) de inicio de la exposición de las hojas laterales de plántulas de *Agave salmiana* crecidas en invernadero después de la siembra realizada en otoño del 2008. En eje y, 0=día de la siembra de semillas, en eje x, 0=hoja cotiledonar.

3.6. Discusión

Las semillas de las variantes Blanco, Chino y Liso del maguey *A. salmiana* analizadas en este trabajo, pueden ser consideradas como ligeras si se comparan con las de tres especies del género *Polianthes* (Agavaceae). La biomasa promedio de las variantes de *A. salmiana* fue de 10.8 a 14.5 mg mientras que las del género *Polianthes* fueron de 24, 46 y 55 mg respectivamente (Serrano-Casas *et al.*, 2000). Se señala que las semillas ligeras y que son producidas en grandes cantidades, como ocurre en las plantas del género *Agave*, tienen mayores oportunidades de colonizar otros ambientes y generar individuos nuevos porque son fácilmente dispersadas, especialmente por el viento (Vázquez-Yañez *et al.*, 1997).

La biomasa de las semillas puede ser considerada como una estrategia de las plantas para sobrevivir en las fases iniciales de su ciclo de vida. Al respecto, Ayala-Cordero (2004), argumentó que *Stenocereus beneckeii* (Cactaceae), tiene mayores oportunidades para lograr el establecimiento de individuos nuevos porque presenta semillas con biomasa variable (de 4.2 a 21 mg). Las semillas de los magueyes analizadas tuvieron longitud de 7 a 8.4 mm y anchura de 5.4 a 6.5 mm. Estas dimensiones son mayores que las reportadas para las semillas de *Agave lechuguilla* con 4.5 a 6 mm de longitud por 3.5 a 4.5 mm de anchura (Gentry, 1982). Se menciona que las plantas que producen tamaños variables de semillas, demuestran una buena adaptación al ambiente donde crecen y mayor competencia (Ayala-Cordero, 2004; Moles y Westoby, 2004).

El contenido de humedad de las semillas no fue estadísticamente diferente entre variantes, lo cual sugiere que las diferencias encontradas respecto a la biomasa en estas estructuras no influye sobre estas dos características. Bajo el contexto del tamaño y del número de semillas que pueden producir los magueyes, se esperaría localizar varios individuos generados por semilla de las variantes analizadas en los sitios de distribución silvestre. Sin embargo, se menciona que lo anterior no ocurre o sucede sólo eventualmente y que este hecho también se ha observado en la mayoría de especies de *Agave* estudiadas a la fecha (Martínez-Morales, 1988; Aguirre R. *et al.*,

2001). De esta forma se puede entender como la reproducción asexual, principalmente por hijuelos, es la forma más común de multiplicación en los magueyes tanto silvestres como aquellas bajo cultivo.

Los resultados obtenidos de este trabajo apoyan lo señalado por Aguirre R. *et al.* (2001) en relación con la viabilidad de las semillas de *A. salmiana*; pues las semillas usadas estuvieron almacenadas cinco años en condiciones de laboratorio, y alcanzaron 54 % de exposición total de hojas cotiledonares cuando se sembraron en condiciones de invernadero sin restricciones de humedad. Cabe esperar que las condiciones ambientales, especialmente temperatura y humedad en el suelo, representen los factores moduladores de la germinación de las semillas.

Al respecto, los resultados del presente estudio mostraron que las temperaturas extremas (-4.0 a 51.6 °C) registradas en invernadero y las propias de cada época del año, posiblemente afectaron la velocidad de exposición y el número de hojas cotiledonares expuestas; pues se observó una disminución del número de hojas cotiledonares expuestas después de la siembra realizada en el otoño correspondiente a la época fría del año, en comparación con lo observado en la siembras de verano.

El crecimiento de las hojas cotiledonares fue rápido ya que en 13 días su longitud paso de 10 mm a 20 mm, es decir se duplicó. Lo anterior puede representa una ventaja para el establecimiento de individuos nuevos. Así, es recomendable sembrar semillas de estas tres variantes en invernadero durante el verano. Las variantes Blanco y Liso parecen ser las más recomendables, pues la variante Blanco fue la que en menor tiempo logró desarrollar y exponer una hoja cotiledonar y por ende las demás laterales consecutivas, y la variante Liso, debido a que en esta se contaron la mayor cantidad de hojas laterales.

Los resultados de este trabajo apoyan lo mencionado por Valenzuela-Zapata (2003), en relación a que es posible obtener plantas de maguey originadas de semilla en invernadero. Pues después de cada siembra de semillas, estas germinaron y se establecieron magueyes. Así, la necesidad reconocida de repoblar las poblaciones

silvestres y cultivadas de magueyes con plantas nuevas puede ser cubierta; de esta forma se reduce el riesgo de que las plántulas estén amenazadas por factores naturales propios de su ambiente, como la herbivoría y depredación.

3.7. Conclusiones

Las semillas de tres variantes del maguey *A. salmiana* del altiplano potosino zacatecano presentaron biomasa, longitud y anchura diferente estadísticamente. La variante Blanco presentó semillas con menor masa y tamaño del grupo. El contenido de humedad de las semillas no influyó sobre el peso y emergencia de la plántula. El desarrollo de los magueyes nuevos inició con la germinación epigea de la hoja cotiledonar. Las semillas de la variante Blanco desarrollaron hojas cotiledonares en menor cantidad de días después de la siembra. Las temperaturas en invernadero afectaron el establecimiento de magueyes nuevos. Las semillas de las tres variantes desarrollaron cantidades similares de hojas cotiledonares y estas hojas senescen cuando transcurren alrededor de cinco meses. Las hojas laterales sucesivas iniciaron su exposición en promedio un mes después de la siembra. Se infieren diferencias en vigor de semillas, ya que las hojas cotiledonares de la variante Chino presentaron la mayor longitud entre variantes. La variante Liso desarrolló mayor número de hojas laterales sucesivas en el grupo de variantes. La hoja lateral recién formada en los magueyes nuevos creció al centro de la roseta y la de mayor edad cerca del suelo.

3.8. Literatura citada

- Aguirre R. J. R., Charcas-Salazar, H. y Flores-Flores, J. L. 2001. El maguey mezcalero potosino. Consejo Potosino de Ciencia y Tecnología, Gobierno del Estado de San Luis Potosí e Instituto de Investigación de Zonas Desérticas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí.
- Ayala-Cordero, G. 2004. Germinación y supervivencia de plántulas de *Stenocereus beneckeii* (Ehrenb.) Buxb. (Cactaceae) bajo déficit hídrico. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. México. 64 pp.
- Bewley, J.D. and Black, M. 1994. Seeds: physiology of development and germination. Segunda Edición. Plenum Press. New York. 445 pp.
- Dodd, G.L. and Donovan, L.A. 1999. Water potential and ionic effects on germination and seedling growth of two cold desert shrubs. *American Journal of Botany* 86: 1146-1153.
- Eguiarte, L. E., Souza, V. y Silva-Montellano, A. 2000. Evolución de la familia Agavaceae: filogenia, biología reproductiva y genética de poblaciones. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 66: 131-150.
- Eguiarte, L. E. y Souza, V. 2007. Historia natural del *Agave* y sus parientes: Evolución y Ecología. In: Colunga-GarcíaMarín, P., Larqué-Saavedra, A., Eguiarte, L. y Zizumbo-Villarreal, D. (Eds). *En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves*. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología. México.
- Font-Quer, P. 1977. *Diccionario de botánica*. Editorial Labor, S.A. Barcelona. 1244 pp.
- García-Mendoza, A. 2007. Los Agaves de México. *Ciencias* (87) 14:23.
- Gentry, H. S. 1982. *Agaves of Continental North America*. The University of Arizona Press, Tucson.
- Illsley, C., Vega, E., Pisanty, I., Tlacotempa, A., García, P., Morales, P., Rivera, G., García, J., Jiménez, V., Castro, F. y Calzada, M. 2007. Maguey papalote: hacia el manejo campesino sustentable de un recurso colectivo en el trópico seco de Guerrero, México. In: *En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves*. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología. México.

- Jiménez-Sierra, C. y Reyes-Santiago, J. 2003. Las cactáceas de la barranca de Metztlán. In: Metztlán: lugar de la luna y de las maravillas. Armella-Villalpando, M. A., Yañez-López, M. y Sandoval-Palacios, E. (Eds). Universidad Autónoma Metropolitana. México. pp.: 53-77.
- Jordan, P.W. and P.S. Nobel. 1979. Infrequent establishment of seedlings of *Agave deserti* (Agavaceae) in the northwestern. Sonoran desert. *American Journal of Botany*, 66: 1079-1084.
- Martínez-Morales, R. 1988. Dinámica poblacional de las magueyerías silvestres en el altiplano potosino zacatecano. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. 91pp.
- Moles, A. T. and Westoby, M. 2004. What do seedlings die from and what are the implications for evolution of seed size? *Oikos* (106) 1: 193-199.
- Nobel, P.S. 1998. Los incomparables agaves y cactus. Trillas. México. 211 pp.
- Roff, D.A. 1992. The evolution of life histories, theory and analysis. Chapman & Hall. New York. 535 pp.
- Peña-Valdivia, C.B., Sánchez-Urdaneta, A.B., Aguirre R., J.R., Trejo, C., Cárdenas, E. y Villegas, M.A. 2006. Temperature and mechanical scarification on seed germination of "maguey" (*Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck). *Seed Sci. and Technol.* (34) 47-86.
- Peña-Valdivia, C.B., Meza-Rangel, J., Juárez- Muñoz, J., López-Herrera, M., Trejo-López, C y Vázquez-Díaz, E. 2009. Caracterización de germoplasma de *Agave* spp. con marcadores moleculares RAPD y análisis morfométrico. Simposium Biodiversidad: enfoques en biología molecular. Centro de Investigación Científica de Yucatán.
- Roff, D.A. 1992. The evolution of life histories, theory and analysis. Chapman & Hall. New York. 535 pp.
- Reyes-Agüero, J.A., Aguirre R. J.R. y Peña-Valdivia, C.B. 2000. Biología y aprovechamiento de *Agave lechuguilla* Torrey. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* (67) 75-58.
- Rzedowski, J. 1978. Vegetación de México. Limusa. México.
- Serrano-Casas, H., Solano-Camacho, E. y Ocampo-López, A. 2000. Morfología de semillas, germinación y desarrollo postemergente de tres especies del género *Polianthes* L. (Agavaceae). *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 66:55-65.

- Tello-Balderas, J. J. 1988. Análisis gráfico-tabular de dos poblaciones silvestres de maguey mezcalero (*Agave salmiana* Otto ex Salm, ssp. *Crassispina* (Trel.) Gentry) en el altiplano potosino-zacatecano. Tesis de maestría en ciencias. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México. 123 pp.
- Valenzuela-Zapata, A. G. 2003. El agave tequilero, cultivo e industria en México. Ediciones Mundi-Prensa. México, D. F. 208 pp.
- Vázquez-Yañez, C., Orozco, M., Rojas, M., Sánchez, M. y Cervantes, V. 1997. La reproducción de plantas: semillas y meristemos. Fondo de Cultura Económico. Secretaría de Educación Pública. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Colección la ciencia para todos, 157. México, D.F. 170 pp.

CAPITULO IV. CAMBIOS DE ACIDEZ EN HOJAS DEL MAGUEY *Agave salmiana* OTTO EX SALM-DYCK DEPENDIENTES DE LA EDAD DE LA HOJA Y LA PLANTA

4.1. Resumen

Se cuantificó la acidez titulable equivalente al contenido de ácido málico, en las hojas cotiledonares y hojas laterales con edad de uno y hasta cinco meses, de tres variantes del maguey *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck. Se usaron hojas de magueyes generados por semilla, la cual fue sembrada en invernadero en verano y otoño del año 2008 y en verano del 2009. Las plantas crecieron sin restricción de humedad y en fotoperiodo natural. Las hojas fueron colectadas cada cuatro horas durante un ciclo de 24 horas continuas. El contenido de ácido málico fue determinado con la técnica química de la acidez titulable. El rango de la masa en fresco de las hojas cotiledonares, con un mes de edad, osciló de 93.4 mg a 125 mg entre variantes, y con cinco meses de edad, de 114.6 mg a 145.9 mg. No se detectó la fluctuación de acidez MAC en las hojas cotiledonares de las tres variantes con edad promedio de un mes. Se observó un comportamiento similar a la fluctuación de acidez MAC en hojas cotiledonares y laterales con edad cercana a los cinco meses. Se infiere que las condiciones de crecimiento en invernadero y propias de la época afectaron la expresión del MAC en las hojas cotiledonares y laterales de las variantes de maguey estudiadas. Las temperaturas extremas durante el crecimiento de los magueyes y su edad, afectaron la expresión del MAC.

Palabras clave: ácido málico, acidez titulable, hoja cotiledonar, hoja lateral, MAC.

4.2. Abstract

Malic acid content was assessed in cotyledon and lateral leaves of three plant agave accessions of *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck. The *Agave* leaves were one and five months old. Plants were obtained from seeds. Seeds were sown in the summer 2008 and 2009, also in the fall 2008 in a greenhouse at the Colegio Postgraduados, Mexico. The plants grew up with adequate watering and natural photoperiod. Plant leaves were collected every 4 h during 24 h. The cotyledon leaf fresh biomass fluctuates from 93.4 mg to 125 mg among accessions. Lateral leaf range was from 114.6 mg to 145.9 mg. Cotyledon leaves one month old did not show the typical fluctuation of malic acid of the crassulacean acid metabolism (CAM) i.e. (higher malic acid content at night and low at midday). In contrast the CAM cycle was observed in cotyledon and lateral leaves of approximately 5 months old. It was concluded that the extreme temperature (50 and -4°C) growing conditions and the age of the plant affected the CAM metabolism.

Key words: malic acid, titratable acidity, maguey leaves and CAM.

4.3. Introducción

Maguey es el nombre común usado en Latinoamérica para referirse a las plantas del género *Agave*. En México, los magueyes se distribuyen principalmente en regiones áridas y semiáridas. Dichas regiones se caracterizan principalmente porque presentan temperaturas extremas y la precipitación pluvial es menor que el agua pérdida por las plantas (Hernández, 2006). Los magueyes sobreviven en dichas regiones por la presencia de tejidos suculentos en sus hojas, en los que almacenan agua, y por el metabolismo ácido de las crasuláceas (MAC), que les permite asimilar el CO₂ atmosférico (Nobel, 1998; Aguirre R. *et al.*, 2001; García-Mendoza, 2007).

Los magueyes son plantas monocotiledóneas. Se reproducen escasamente por semilla pero con mayor frecuencia lo hacen de manera asexual. Al germinar la semilla, emerge una hoja cotiledonar que tiene forma cónica alargada. Es a partir de esta hoja cotiledonar que se desarrollan las hojas laterales o pencas, las cuales crecen arregladas en roseta y por el orden de su exposición, tienen diferente edad en el maguey (Aguirre R. *et al.*, 2001).

La ruta metabólica MAC, ha sido reconocida como una adaptación fisiológica, adquirida por algunas plantas para sobrevivir a condiciones limitantes de humedad y con escasa disponibilidad de CO₂. Se diferencia de las rutas fotosintéticas tipo C₃ y C₄ porque las reacciones que la constituyen, suceden en tiempo y región subcelular distinta (Bidwell, 1993; Taiz y Zeiger, 2002). Las plantas con la ruta MAC capturan el CO₂ atmosférico por la noche, cuando sus estomas permanecen abiertos, y lo asimilan con la intervención catalítica de la enzima PEPCasa. El producto principal de la reacción anterior es el malato, el cual tiene estructura química de cuatro carbonos. Este malato se almacena en las vacuolas de células del clorénquima, como ácido málico, y al iniciar el periodo de luz consecutivo en el día, es descarboxilado. El CO₂ que se libera de esta descarboxilación es asimilado en los cloroplastos por la ruta fotosintética C₃, con la RUBISCO como enzima carboxilante (Kluge y Ting, 1978; Cushman, 2001).

Con técnicas químicas como la que cuantifica la acidez titulable, es posible determinar la acidez de los tejidos fotosintéticos y caracterizar las plantas MAC. Al medir la acidez en dichos tejidos se ha observado un patrón fluctuante; este consiste en que los valores mayores se registran por la noche y los menores durante el día (Osmond *et al.*, 1994).

El MAC es relevante desde el punto de vista fisiológico. Se menciona que las plantas que lo presentan requieren poca agua para sobrevivir. Lo anterior se explica parcialmente porque la apertura de sus estomas sucede por la noche, cuando la temperatura del ambiente es menor, respecto al día, de esta forma evitan que el agua de sus tejidos se evapore durante la adquisición de CO₂ atmosférico (Kluge y Ting 1978; Rosenberg, 1982; Osmond *et al.*, 1994; Cushman, 2001; Lütge, 2003 y 2004).

Se ha sugerido que las plantas MAC usan la ruta C₃ al inicio de su ciclo de vida (Nobel, 1998). Sin embargo, resultados experimentales, de Wen *et al.*, (1996), Ayala-Cordero (2004) y García R. (2007), señalaron lo contrario. Dichos autores detectaron que en plántulas de maguey, de algunas cactáceas columnares y tallos jóvenes de nopal, respectivamente, se exhibió la fluctuación típica de la acidez MAC.

Se ha observado que la expresión del MAC en las plantas es afectada por factores biológicos, fenológicos y ambientales, como edad, estado de desarrollo, disponibilidad de luz, temperatura y humedad del entorno (Kluge y Ting 1978; Lütge, 2004). Determinar si la fluctuación de acidez MAC se presenta cuando los magueyes inician su vida, incrementaría el conocimiento en su biología. También ayudaría a entender aspectos de relevancia ecológica como el establecimiento y sobrevivencia de este grupo de plantas, lo cual ha sido escasamente estudiado.

Así, el objetivo de esta investigación fue determinar si la fluctuación de acidez MAC se presenta en la hoja cotiledonar y en las hojas laterales jóvenes (con uno y hasta cinco meses de edad) de plantas de tres variantes del maguey *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck, originadas de semilla y crecidas sin restricción de humedad, en condiciones de invernadero.

4.4. Materiales y métodos

Material vegetal

Semillas de las variantes Blanco, Chino y Liso del maguey *A. salmiana* de la región Minera las Cuevas, San Luis Potosí, (Latitud N 21°56', Longitud O 100°35'), fueron seleccionadas para el estudio. Estas variantes se usan en la región del altiplano potosino zacatecano para fabricar mezcal y presentan diferencias en la morfología de sus hojas, particularmente en sus dientes laterales (Figura 10). Cabe mencionar que el nombre científico para este maguey de acuerdo con Gentry es *Agave salmiana* ssp. *crasisspina* (Trel.), su nombre común es maguey cimarrón, y derivado de las controversias taxonómicas expuesta por Aguirre R. *et al.* (2001) y de acuerdo con este autor, en el presente trabajo se utiliza el nombre de *A. salmiana*.

Desarrollo del experimento

Las hojas cotiledonares y laterales se obtuvieron de magueyes generados por semilla. Las semillas fueron proporcionadas por el Dr. Juan Rogelio Aguirre Rivera, IZZD, de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí y sembradas en verano y otoño del año 2008 y en verano del 2009. Cada siembra fue realizada en un invernadero del Colegio de Postgraduados de Montecillo, Estado de México. El sustrato usado para la siembra consistió de una mezcla de suelo agrícola y tezontle, en proporción 3:1, con textura migajón arcilloso arenoso, pH 7.73 y 6.22% de materia orgánica. Se utilizó un diseño completamente al azar con tres tratamientos (Blanco, Chino y Liso).

El sustrato y las semillas fueron colocados en bolsas de polietileno color negro de 30 cm de diámetro y 40 cm de altura. El riego posterior fue realizado con un sistema automático, programado para mantener el aporte de humedad sin restricción. Las plantas crecieron con fotoperiodo natural. Al transcurrir en promedio, uno y cinco meses de cada siembra, las hojas cotiledonares y laterales de las tres variantes fueron recolectadas por triplicado. A estas hojas se les cuantificó el contenido de ácido málico con la técnica de la acidez titulable.

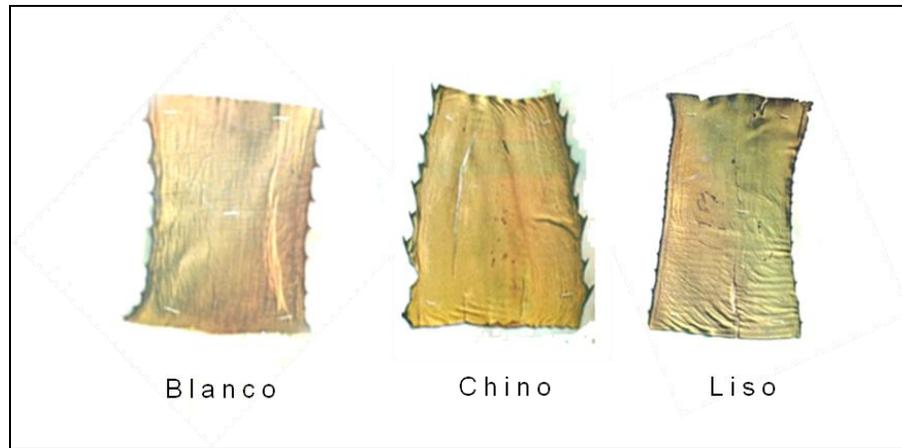


Figura 10. Sección basal de hojas maduras herborizadas de las variantes Blanco, Chino y Liso de *Agave salmiana* que muestra algunas diferencias entre las hojas y sus dientes laterales (Aguirre R. *et al.*, 2001).

Determinación de la edad y recolecta de las hojas cotiledonares

La edad en días de las hojas cotiledonares de cada variante de maguey se determinó a partir de la siembra de sus semillas. Las hojas cotiledonares emergidas de dichas semillas, fueron cosechadas al transcurrir 21 días de la siembra realizada en verano del 2008, 48 días después de la siembra del otoño, también del 2008, y a los 28 días de la siembra, pero del verano del 2009. La edad promedio calculada de estas hojas cotiledonares fue un mes. Adicionalmente, otras hojas cotiledonares emergidas de las semillas sembradas en verano del 2008, fueron cosechadas, pero cuando transcurrieron 157 días de dicha siembra. Cuando transcurrieron 174 días de la siembra del otoño del mismo año. La edad promedio de estas hojas fue de cinco meses. En verano del 2009 no fueron colectadas hojas cotiledonares con edad de cinco meses (Cuadro 10). Las hojas cotiledonares fueron recolectadas en invernadero. La recolecta consistió en tomar cada cuatro horas, durante un ciclo continuo de 24 h, las hojas cotiledonares con edad promedio de un mes, las cuales, fueron separadas del sustrato en el que crecían por medio de un corte transversal, a nivel del sustrato, usando navaja. Las hojas cotiledonares con cinco meses de edad fueron separadas manualmente de la planta extraída del sustrato, pues con esa edad, los magueyes contaban con alrededor de 5 y 6 hojas laterales. En cada medición se recolectaron tres

plantas completas de cada tratamiento (variante) y para cada uno de las determinaciones del ciclo de 24 h.

Las hojas clasificadas como cotiledonar y hojas laterales (primera, segunda, etc.) fueron lavadas superficialmente, para retirar el sustrato remanente, con agua destilada y secadas, para eliminar el exceso de humedad de la superficie, con papel absorbente. En el laboratorio, las hojas fueron pesadas individualmente, en una balanza analítica (Scientech SA120), envueltas en hojas de papel aluminio, congeladas con nitrógeno líquido y almacenadas a -16°C hasta determinar la acidez de sus tejidos.

Cuadro 10. Edad (días) de las hojas cotiledonares de tres variantes de *A. salmiana* usadas para cuantificar su contenido de ácido málico.

Variante	Verano 08*	Otoño 08	Verano 09
Blanco	21 y 157	28 y 174	48
Chino	157	28 y 174	48
Liso	157	28 y 174	48

*Las hojas cotiledonares de las variantes Chino y Liso fueron insuficientes para completar las repeticiones necesarias del experimento.

Edad y recolecta de las hojas laterales

La edad de las hojas laterales también fue determinada a partir de la siembra de las semillas. La exposición de la primera hoja lateral ocurrió, en promedio, 18 días después de la emergencia de la hoja cotiledonar y 33 días después de la siembra de las semillas (Capítulo III, de este documento). Con esta información se aseguró que las hojas laterales presentan un gradiente de edad. Así, a la primera hoja lateral expuesta le fue asignada la edad máxima, cercana a cinco meses y las hojas expuestas posteriormente contaron con cuatro, tres, dos y un mes, de edad respectivamente, al momento de las evaluaciones.

Como fue el caso de las hojas cotiledonares, las hojas laterales fueron recolectadas en un ciclo de 24 h continuas de tres plantas del sustrato. Las hojas fueron separadas después de realizar un corte transversal en la base del tallo. Cada hoja fue identificada y les fue asignado un número progresivo según el orden de su exposición. A la hoja lateral con mayor edad se le asignó el número uno (Figura 11). En

laboratorio, a las hojas les fueron retiradas una sección de la base, que corresponde a tejido color blanco, sin clorofila aparente, y los dientes en los márgenes. Cada hoja fue pesada en una balanza analítica (Scientech SA120), envuelta en un segmento de hoja de aluminio, congelada por inmersión en nitrógeno líquido y almacenada a -16°C , hasta determinar la acidez de sus tejidos.



Figura 11. Maguey con cinco meses de edad que muestra restos de la hoja cotiledonar y el orden de crecimiento de las hojas laterales, numeradas en orden creciente de la más antigua a la más joven.

Cuantificación de la acidez titulable

La acidez titulable fue evaluada con la metodología propuesta por la AOAC (Association of Official Analytical Chemist, 1990). Cada hoja cotiledonar y lateral congelada, fue macerada en un mortero con 10 mL de agua destilada y centrifugada 10 minutos, a $250 \times g$ (equivalente a 1500 rpm). Del sobrenadante, fueron tomadas dos alícuotas de 5 mL. Cada alícuota fue valorada con hidróxido de sodio 0.01N, para las hojas cotiledonares y con 0.1N, para las hojas laterales. La diferencia de normalidad del hidróxido de sodio entre las hojas, cotiledonar y laterales, fue debido la diferencia de su masa, menor en la primera. Como indicador de la neutralización de la acidez, se usó fenolftaleína, la cual provoca un cambio de la solución de incolora a color ligeramente rosa. Con esa información se calculó el porcentaje de ácido málico respecto a la masa fresca, según la siguiente relación:

$$\text{Ácido málico \%} = \frac{(\text{ml NaOH utilizados})(\text{Concentración del NaOH})(0.067)(\text{Vol. total})(100)}{(\text{Peso de la muestra})(\text{Vol. de la alícuota})}$$

Donde: Ácido málico %, es el porcentaje de ácido málico contenido en la solución por cada 100 unidades de tejido fresco; mL NaOH utilizados, son los mL de hidróxido de sodio gastados hasta observar el cambio de color de la solución; concentración del NaOH, es la normalidad del hidróxido de sodio utilizado; 0.067 es un factor que debe utilizarse para calcular el contenido de ácido málico (Association of Official Analytical Chemist, 1990); Vol. total, son los mL de la solución en los que se maceró la muestra; 100 es el factor para expresar el resultado en porcentaje; Peso de la muestra, corresponde a la (masa) en gramos (g) de cada hoja cotiledonar o lateral; y Vol. de la alícuota, corresponde a los mL de solución individual valorada.

Diseño experimental y análisis estadístico

Se realizó el análisis de la varianza del contenido de ácido málico. El análisis incluyó la biomasa húmeda de las hojas, la acidez titulable en un ciclo de 24 h continuas, en el periodo diurno y en el nocturno. Los tratamientos son las variantes de maguey (Blanco, Chino y Liso). La variables de respuesta, acidez titulable, se cuantificó a un mes (hojas cotiledonares) y a cinco meses (hojas cotiledonares y laterales), utilizando tres repeticiones. Se realizó la prueba de separación de medias con Tukey ($\alpha \leq 0.05$) con el programa estadístico SAS (versión 9) y su representación gráfica se realizó con el programa SigmaPLOT (versión 10).

4.5. Resultados

Biomasa húmeda de las hojas cotiledonares

En el verano del 2008 las hojas cotiledonares de la variante Blanco, con 21 días de edad, acumularon, en promedio, 94.4 mg de biomasa húmeda (Cuadro 11). La heterogeneidad de la emergencia de las variantes Chino y Liso generó un número limitado de hojas cotiledonares con la edad requerida para el análisis, por lo que en este primer ensayo esas dos variantes fueron excluidas. En el otoño del 2008, las hojas cotiledonares, con 48 días de edad, acumularon biomasa húmeda estadísticamente diferente entre variantes ($\alpha=0.05$); la variante Chino tuvo las hojas cotiledonares con mayor biomasa (93.4 mg) y la variante Liso presentó las menores (52.8 mg). En el verano del 2009 la biomasa húmeda de las hojas cotiledonares, con 28 días de edad, osciló entre 32.7 mg en la variante Blanco y 296 mg en la variante Liso, aunque las medias no fueron significativamente diferentes ($\alpha\geq 0.05$). La biomasa de las hojas cotiledonares con cinco meses de edad, crecidas en verano del 2008, varió de 49.5 mg en la variante Liso hasta 259.7 mg en la variante Chino, y no hubo diferencia significativa entre sus medias ($\alpha=0.05$). Además, la biomasa húmeda de las hojas cotiledonares con 174 días de edad, crecidas en el otoño del 2008, también fue estadísticamente similar entre variantes (Cuadro 11).

Biomasa húmeda de las hojas laterales

La biomasa de las hojas laterales en las tres variantes de maguey fluctuó con la época de crecimiento, variante y orden de exposición, por lo que existieron diferencias significativas dependientes de estos factores ($p\leq 0.05$). Las medias mayores fueron: 683 mg correspondiente a la hoja cuatro, con edad de entre tres y cuatro meses de la variante Blanco y 966 mg correspondiente a la hoja cuatro, con edad aproximada de entre dos y tres meses, de la variante Chino y 994 mg, de la hoja cinco de la variante Liso, con edad de cinco meses. La cantidad menor de biomasa acumulada fue 82 mg, y correspondió a la hoja seis de la variante Blanco, que por su exposición le fue asignado el número seis, el cual quiere decir que tenía alrededor de un mes cuando fue

recolectada, es decir dichas hojas eran las más jóvenes o de reciente formación en el maguey (Cuadro 12).

Cuadro 11. Biomasa húmeda (mg; \pm error estándar) acumulada en hojas cotiledonares, con edades diferentes (días), de tres variantes de *A. salmiana* crecidas en invernadero.

Variante	Verano 2008		Otoño 2008		Verano 2009
	21 días	157 días	48 días	174 días	28 días
Blanco	94.4 (\pm 7)	115 (\pm 7.2) a	75 (\pm 4.2) b	138 (\pm 137.6) a	125 (\pm 18.6) a
Chino	-	146 (\pm 13.5) a	93 (\pm 5.5) a	145 (\pm 18.4) a	133 (\pm 9.8) a
Liso	-	126 (\pm 11.1) a	53 (\pm 3.5) c	125 (\pm 17.4) a	114 (\pm 21.0) a

Valores seguidos con la misma letra son estadísticamente iguales, según la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey ($\alpha=0.05$) (Valor medio calculado con=21 unidades experimentales). Los datos ausentes indican la carencia de suficientes hojas para completar las repeticiones del experimento.

Cuadro 12. Biomasa húmeda (mg; \pm error estándar) de las hojas laterales, con edad máxima de cinco meses (hoja 1), de tres variantes de *A. salmiana* crecidas en invernadero.

Variante	Hoja lateral	Verano 2008	n	Hoja Lateral	Otoño 2008	n
Blanco	1†	169 (\pm 83.0) c	21	1‡	316 (\pm 61.5) c	15
	2	305 (\pm 84.0) bc	20	2	281 (\pm 55.9) cd	21
	3	528 (\pm 42.0) ab	16	3	464 (\pm 42.4) bc	21
	4	683 (\pm 17.1) a	15	4	679 (\pm 49.6) a	20
	5	427 (\pm 61.0) b	14	5	554 (\pm 23.1) ab	21
	6	82 (\pm 56.9) c	8	6	206 (\pm 55.8) d	20
Total		2194			2500	
Chino	1†	254 (\pm 21.6) b	21	1‡	223 (\pm 104.2) c	15
	2	495 (\pm 14.0) ab	20	2	380 (\pm 92.7) bc	15
	3	850 (\pm 16.9) a	18	3	665 (\pm 63.8) ab	21
	4	771 (\pm 43.1) a	17	4	966 (\pm 30.4) a	21
	5	527 (\pm 79.9) ab	9	5	730 (\pm 39.2) a	21
					6	192 (\pm 55.8) c
Total		2897			3156	
Liso	1†	212 (\pm 84.5) c	14	1‡	249 (\pm 113.2) b	18
	2	420 (\pm 116.9) c	20	2	389 (\pm 105.5) b	21
	3	853 (\pm 96.0) b	20	3	732 (\pm 64.4) a	21
	4	1270 (\pm 19.8) a	19	4	950 (\pm 33.7) a	21
	5	994 (\pm 41.3) ab	17	5	904 (\pm 29.2) a	18
	6	305 (\pm 158.8) c	10	6	218 (\pm 55.5) b	14
Total		4054			3442	

†Hojas laterales con edad máxima de 157 días. ‡Hojas laterales con edad máxima de 174 días. Valores seguidos con la misma letra son estadísticamente iguales, según la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey ($\alpha=0.05$).

Acidez en hojas cotiledonares con edad promedio de un mes

La acidez de las hojas cotiledonares de la variante Blanco, con 21 días de edad, crecidas en verano del 2008, se mantuvo sin cambios significativos durante el ciclo de 24 h ($\alpha=0.05$). El contenido medio de ácido málico en estas hojas cotiledonares fue 1.9% y la acidez acumulada en el periodo diurno (1.8%) respecto al nocturno (1.9%) resultó estadísticamente igual ($\alpha=0.05$). La acidez de las hojas cotiledonares de las variantes Chino y Liso no fue determinada por falta de repeticiones al momento del muestreo (Figura 12 A).

La acidez de las hojas cotiledonares con 48 días de edad, crecidas durante el otoño de 2008, mostró diferencias significativas ($\alpha=0.05$) en las tres variantes en algunas horas del ciclo de 24 h. La acidez mayor de las variantes Blanco y Chino se presentó en la noche, a las 24 h (4.2 y 5.6 %, respectivamente). Las tres variantes presentaron valores bajos de acidez en diferentes horas del día, pero las tres coincidieron a las 8 y 20 h (2.5 y 3 %). La acidez acumulada en el periodo diurno (3.3%) fue estadísticamente similar al nocturno (3.9%) en las variantes Blanco y Liso ($p\geq 0.05$) (Figura 12 B).

La acidez de las hojas cotiledonares con 28 días de edad, crecidas en verano de 2009, mostró diferencias significativas en las variantes Blanco y Liso ($p\leq 0.05$) durante el ciclo de 24 h. Los promedios mayores de acidez se detectaron por la noche (20 h) con 2.6% y (24 h) con 1.5% respectivamente, y los menores durante el día (12 h) con 0.6% y (8 h) con 1% respectivamente (Figura 12 C). En la variante Blanco la diferencia estadística ($\alpha=0.05$) de la acidez acumulada fue mayor en el periodo nocturno (1.8%) respecto al diurno (1%) (Apéndice A).

Acidez en hojas cotiledonares con edad promedio de cinco meses

La acidez de las hojas cotiledonares con 157 días de edad, crecidas durante el verano del 2008, se mantuvo significativamente constante durante las 24 h, y la acidez acumulada en estos periodos también fue estadísticamente similar ($\alpha=0.05$) (Figura 13 A). Sin embargo, la acidez de las hojas cotiledonares con 174 días de edad, del otoño del 2008, sí mostró diferencias estadísticas significativas ($\alpha=0.05$) en el ciclo de 24 h. En este ciclo, las hojas cotiledonares de la variante Blanco presentaron la mayor y menor acidez a las 24 h (3.8%) y 12 h (0.3%), respectivamente. Fluctuaciones similares fueron observadas en las hojas cotiledonares de la variante Liso, en las que la acidez mayor y menor fue detectada también a las 24 h (1.6%) y 12 h (0.3%), respectivamente. La comparación entre la acidez acumulada en las hojas cotiledonares en el periodo diurno y nocturno, señaló que la acidez de éste último fue significativamente mayor ($\alpha=0.05$) en las variantes Blanco y Liso (2.9 y 1 % en la noche y 1.3 y 0.4 % en el día, respectivamente) (Figura 13 B).

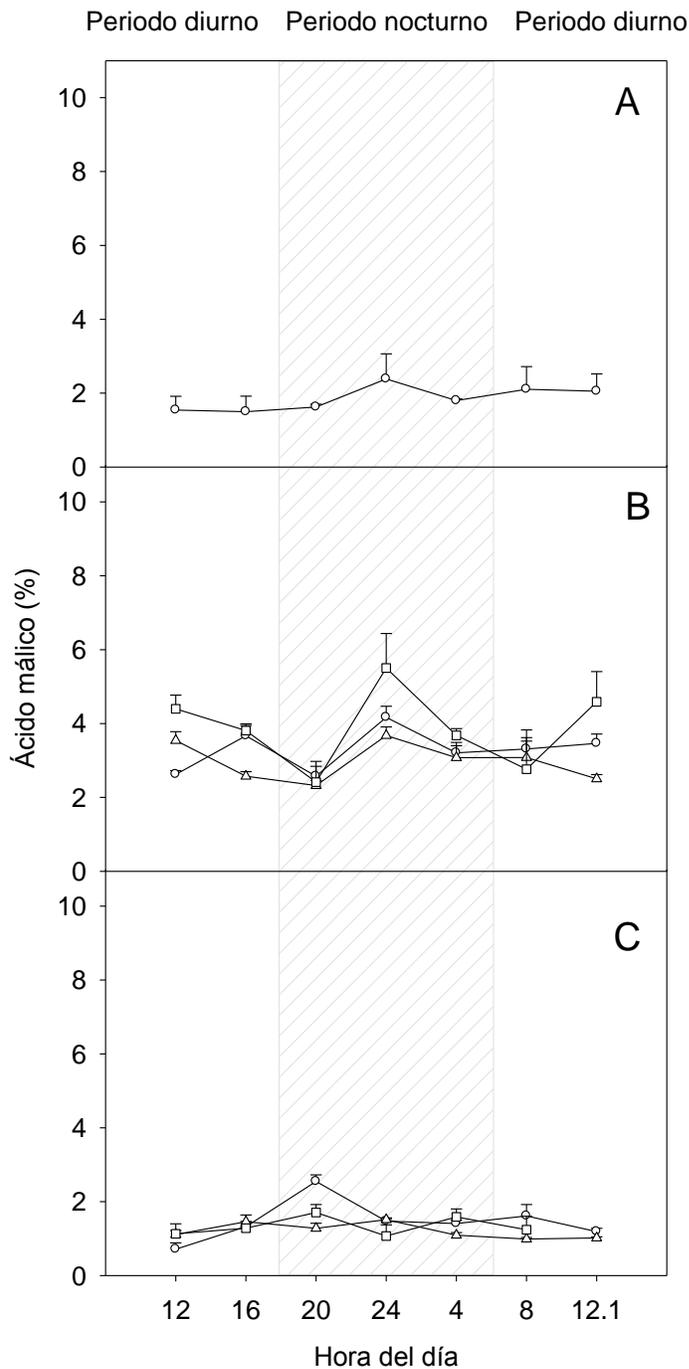


Figura 12. Cambios de acidez de la hoja cotiledonar de las variantes Blanco (○), Chino (△) y Liso (□) de *Agave salmiana* crecidas en invernadero durante:(A) verano y otoño (B) de 2008 y verano de 2009 (C). La edad de las hojas era 21, 48 y 28 días en A, B y C, respectivamente. Cada punto es el promedio de tres repeticiones, las barras sobre cada valor medio representa el error estándar. Líneas diagonales indican el periodo nocturno.

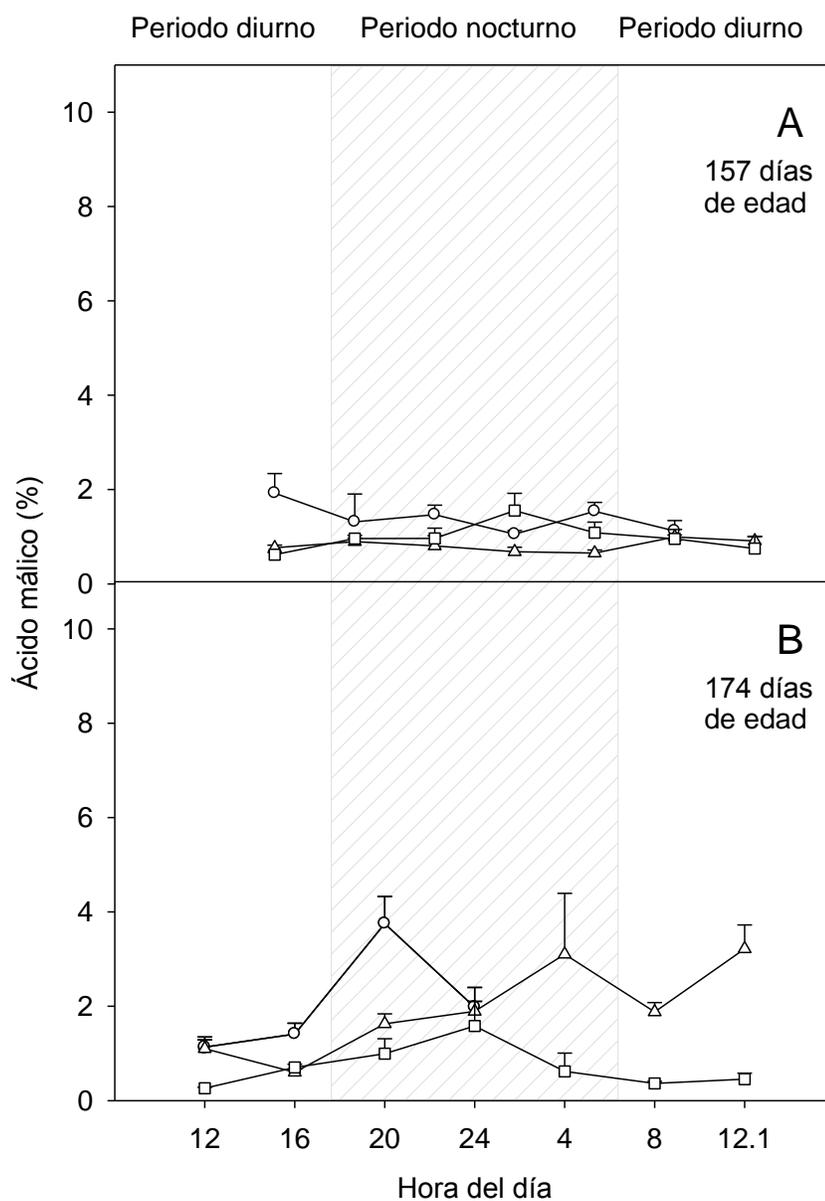


Figura 13. Cambios de acidez de la hoja cotiledonar de las variantes Blanco (○), Chino (△) y Liso (□) de *Agave salmiana* crecidas en invernadero durante:(A) verano y (B) otoño de 2008. Cada punto es el promedio de tres repeticiones, las barras sobre cada valor medio representan el error estándar. Líneas diagonales indican el periodo nocturno.

Acidez en hojas laterales

Las tres variantes de maguey analizadas desarrollaron hasta seis hojas laterales en un periodo ligeramente mayor de cinco meses después de sus semillas.

La acidez de las hojas laterales, con edades de tres a cinco meses, crecidas en verano de 2008, presentaron fluctuaciones significativas ($\alpha=0.05$) del contenido de ácido málico durante el ciclo de 24 horas de medición. En varios casos, las hojas laterales de las tres variantes mostraron los mayores promedios de acidez al finalizar el periodo de oscuridad (inicio el día, 8 h) y en la madrugada (4 h). La acidez baja se detectó más de una vez, por la tarde (16 h) y medio día (12 h). La comparación de la acidez acumulada en el periodo diurno con el nocturno mostró diferencias significativas ($\alpha=0.05$), sólo para algunas hojas laterales en las tres variantes, principalmente en hojas con edades de entre tres y cuatro meses (Figura 14 y Apéndice B).

Las tres variantes desarrollaron seis hojas laterales después de cinco meses de la siembra de otoño de 2008. En la mayoría de las hojas, de las tres variantes, de estas plantas se encontraron diferencias estadísticas significativas del contenido de ácido málico ($\alpha=0.05$) durante el ciclo de 24h. Los valores mayores de acidez se detectaron al concluir el periodo de oscuridad (inicio de luz), a las 8 h, y los menores al medio día (Figura 15 y apéndice C).

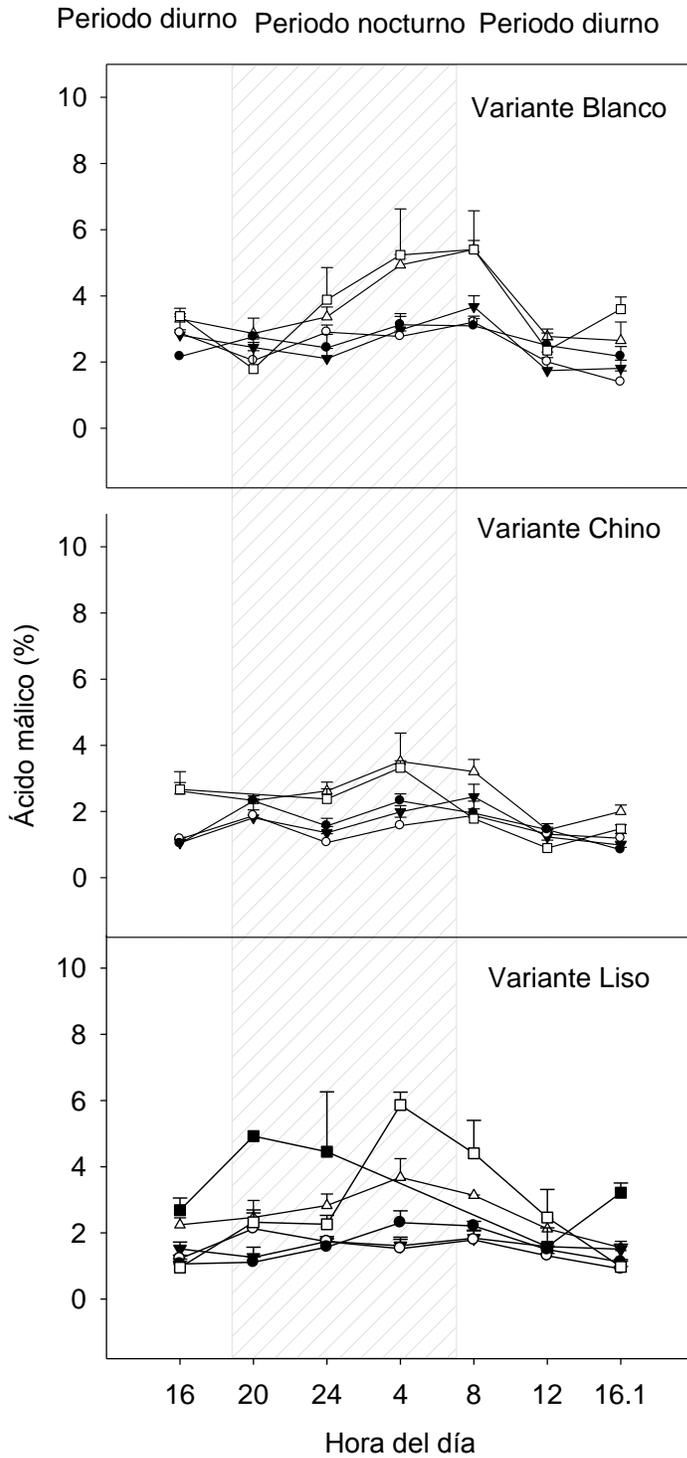


Figura 14. Cambios de acidez de las hojas laterales de las variantes Blanco, Chino y Liso de *Agave salmiana* crecidas en invernadero durante verano de 2008. La edad máxima es de cinco meses en la hoja lateral 1. Cada punto es el promedio de tres repeticiones, las barras sobre los valores representan el error estándar (hoja lateral: 1 △, 2 ▼, 3 ○, 4 ●, 5 □ y 6 ■).

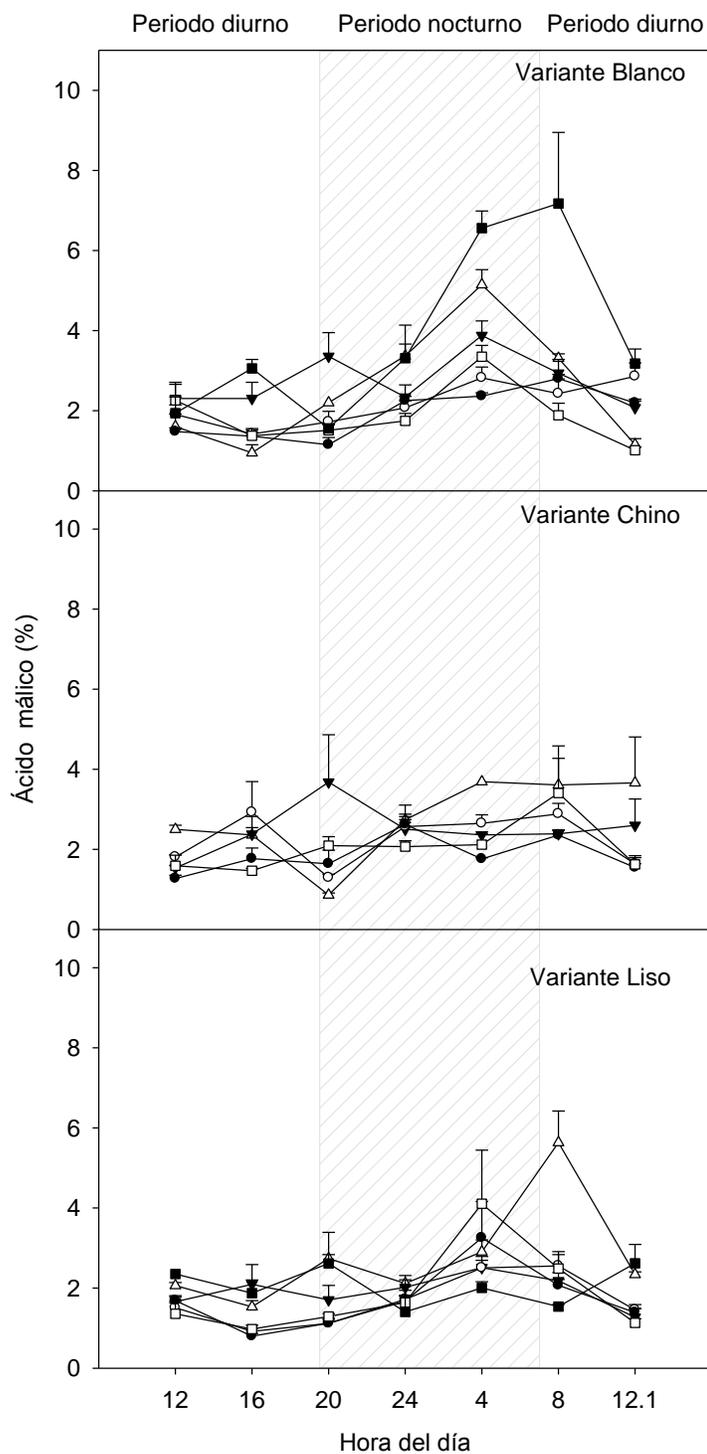


Figura 15. Cambios de acidez de las hojas laterales de las variantes Blanco, Chino y Liso de *Agave salmiana* crecidas en invernadero, con riego, durante otoño de 2008. La edad máxima es de cinco meses en la hoja lateral 1. Cada punto es el promedio de tres repeticiones, las barras sobre los valores representan el error estándar (hoja lateral: 1 \triangle , 2 \blacktriangledown , 3 \circ , 4 \bullet ; 5 \square y 6 \blacksquare).

4.6. Discusión

En las hojas cotiledonares de las tres variantes de *A. salmiana* estudiadas se detectó modificación de la acumulación de biomasa húmeda con la época de crecimiento. En otoño de 2008 la biomasa de estas hojas alcanzó valores entre 94 y 125 mg, cuando tenían edad promedio de 48 días, mientras que en verano de 2009 las tres variantes acumularon en promedio 124 mg en sus hojas cotiledonares, cuando tenían 28 días de edad (Cuadro 10). La variabilidad de esa acumulación parece depender de las condiciones ambientales de cada época del año, ya que, aunque la emergencia y crecimiento de las plantas se llevaron a cabo en invernadero, las condiciones ambientales, como intensidad luminosa y temperatura, fluctuaron según la época del año. En relación con esto, la temperatura media del periodo de verano, 23 °C, fue más cálida que la de otoño, la que disminuyó a 19 °C dentro del invernadero (datos registrados con un Data logger, HOBO). Debe señalarse que entre los factores que si se mantuvieron bajo control, además de la fecha de siembra, están el riego y el sustrato (volumen y tipo).

La distribución de biomasa húmeda de las hojas laterales, en la roseta sobre el tallo, presentó un patrón tipo campana en las tres variantes. Así, las hojas laterales de mayor y menor edad, es decir las hojas uno y seis respectivamente, presentaron la biomasa menor en la planta y representaron entre 5 y 13% y entre 4 y 8% respectivamente del peso total de las hojas laterales de las plantas. Por el contrario, las hojas de edad intermedia, entre las número tres y cinco de las tres variantes, acumularon la proporción mayor de biomasa total de las hojas laterales; específicamente, las número cuatro acumularon entre 27 y 33%. Aunque, las proporciones porcentuales de la biomasa de las hojas fueron similares entre las tres variantes debe destacarse que la tendencia de acumulación de biomasa total de las hojas laterales fue variante Blanco (2194 a 2500 mg) < variante Chino (2897 a 3156 mg) < variante Liso (3442 a 4054 mg) (Cuadro 12). Las hojas de los magueyes desde las etapas iniciales del desarrollo de la plántula deben cumplir con la función fotosintética, para mantenerse como organismo autótrofo, por lo que el incremento de

la biomasa y la superficie del tejido fotosintéticamente activo asegurará el desarrollo y formación de nuevas hojas.

Los valores de acidez obtenidos (menores a 2%) durante el ciclo de 24 h y específicamente la ausencia de fluctuaciones diurnas y nocturnas significativas, en las hojas cotiledonares con 21 a 28 días de edad, indican que el patrón de acidez MAC estuvo ausente, al menos en ese intervalo de edad, en las tres variantes (Figura 12 A y 12 C). Además, en las hojas cotiledonares de las tres variantes crecidas en verano de 2009, con edad poco mayor a cinco meses, también se observó que la acidez acumulada se mantuvo menor a 2% a lo largo de 24 h y que las fluctuaciones fueron escasas e insignificantes (Figura 13 A). En contraste, las hojas cotiledonares crecidas en la época de otoño del 2008 y con tres semanas más de edad (48 días) que las del ciclo de verano de 2008, pero menores (cuatro meses y medio) que las del ciclo de verano de 2009, presentaron valores de acidez mayores a 2% y su fluctuación durante el día fue evidente, aunque con patrones parcialmente diferentes entre las variantes (Figura 12 B). En general, en estas últimas se observó una tendencia a incrementar la acidez de los tejidos en la media noche, el incremento fue evidenciado por la caída previa de la acidez, en tres variantes, a las 20 h, y los valores de este pico nocturno de la acidez varió entre las especies desde 3.5 % en Chino hasta 5.5% en Liso. Sin embargo, tanto la variante Chino como la Liso presentaron otro máximo a las 12 h con acidez alrededor de 4%.

En general, los resultados anteriores indican que la acumulación de ácido málico, y su variación durante el día, en las hojas cotiledonares de *A. salmiana* es dependiente del ambiente y de su interacción con el genotipo, pues las plantas cultivadas en el ciclo de verano, más cálido (25.0 °C) que el ciclo de otoño, mostraron acidez baja y sin fluctuaciones, mientras que las hojas cotiledonares de las plantas crecidas en el ciclo de otoño, más frío, acumularon mayor cantidad de ácido málico y sus fluctuaciones a lo largo del día fueron conspicuas sólo en las variantes Chino y Liso.

Los resultados también son evidencia de que en determinadas condiciones las plántulas de los magueyes, de las variantes analizadas, exponen y desarrollan la hoja cotiledonar con metabolismo tipo C_3 o un tipo CAM incipiente, caracterizado por concentración relativa de ácido málico baja y ausencia de fluctuación de ese contenido a lo largo del día; y en algún momento del desarrollo, o cambio de condiciones ambientales, el metabolismo se modifica y se evidencia el tipo CAM, todo al inicio de su ciclo de vida de la planta. Cabe señalar que los valores menores de acidez de la hoja cotiledonar de las plantas de maguey, fluctuaron entre 1 y cerca de 2% de la biomasa húmeda y son mayores a los obtenidos en yemas vegetativas de *Opuntia* y nopalitos, que en todos los casos alcanzaron valores menores que 1% (Corrales-García *et al.*, 2004; García R, 2007).

En las hojas laterales de las variantes estudiadas se observó el incremento no generalizado de acidez en algunas horas del día. En las variantes Blanco y Liso los incrementos mayores se presentaron en periodos nocturnos (a las 4 h) o al inicio del periodo diurno (8 h). En contraste, en la variante Chino las fluctuaciones de la acidez de las hojas laterales, a lo largo del día, fue mínima y alcanzó menores porcentajes que las otras dos variantes (Figuras 14 y 15). Esas concentraciones de ácido málico y su acumulación nocturna, típicas de las plantas MAC, en las variantes Blanco y Liso fue variable entre las hojas de la roseta, y parece estar ausente algún patrón dependiente de la edad de la hoja o periodo de desarrollo. La edad de las primeras hojas laterales y de las plantas era cercana a los cinco meses; por lo que, los resultados indican la posibilidad de que, en dependencia de las condiciones de germinación, emergencia y desarrollo, las plantas de maguey se desarrollen inicialmente (los primeros meses) con un metabolismo atípico, diferente al típico MAC de las plantas adultas documentado ampliamente (Nobel, 1988), que incluye acumulación elevada de ácido málico en los tejidos fotosintéticos, mínimos o incipientes fluctuaciones a lo largo del día y acumulación nocturna igualmente incipiente. Además, los cambios hacia la expresión típica CAM parece que se lleva a cabo con el desarrollo de la planta, a partir de los cuatro o cinco meses. Existe información limitada referente al metabolismo fotosintético de plántulas o plantas jóvenes de magueyes. Al respecto, Wen (1996) evaluó plantas

del género *Agave*, con menos de tres años de edad y originadas de semilla. El citado autor aseguró que las plántulas de *Agave attenuata* si mostraron acumulación de ácido málico durante la noche, por lo que aseguró que mostraron metabolismo tipo MAC, lo cual contrasta con los resultados obtenidos de este trabajo. Sin embargo, como ya fue señalado, las condiciones de desarrollo parecen tener el mayor efecto en la expresión de ese carácter al inicio del desarrollo de la planta

Aunque las plantas de ambientes secos, han sido investigadas con cierta profundidad, es necesario incrementar el conocimiento de su biología (Andrade *et al.*, 2007), pues desde un enfoque florístico y etnobotánico, estos recursos de ambientes desérticos son importantes para México (Magallán-Hernández y Hernández-Sandoval, 2000; Colunga-GarcíaMarín *et al.*, 2007).

La importancia de la hoja cotiledonar, es que es la primera hoja que crece fuera de la semilla y sobre esta recae la energía invertida por la planta progenitora para lograr el establecimiento (Font-Quer, 1977; Morris and Morris, 2002). Se ha observado que las células de las plantas MAC son grandes igual que sus vacuolas (Nelson *et al.*, 2005), bajo este contexto es posible argumentar que la expresión del MAC en las hojas cotiledonares esté relacionado con la madurez de los tejidos que conforman estas hojas iniciales y laterales.

En el contexto ambiental, destaca que las hojas de las plantas terrestres, son órganos con importancia evolutiva, pues realizan la fotosíntesis indispensable para la planta, como protección incluso para reproducción (Marshall and Roberts, 2000) y en el caso de los magueyes son órganos considerados como ejemplos de adaptaciones a los ambientes extremos y aun necesitan ser estudiados. En todo esto, destaca el contingente de plantas vasculares con el MAC, casi 16 mil especies, que representa el mismo número de oportunidades para el estudio de la expresión de este metabolismo (De la Barrera y Andrade, 2007).

4.7. Conclusiones

La fluctuación de acidez típica del MAC estuvo ausente en las hojas cotiledonares de las variantes Blanco, Chino y Liso de *Agave salmiana* cuando tuvieron un mes de edad. Cuando tuvieron cinco meses, la acidez de sus tejidos reveló un comportamiento similar a las plantas MAC. Las hojas laterales con edad cercana a cuatro y cinco meses de la variante Liso presentó la fluctuación de acidez típica o más cercana a las del MAC.

4.8. Literatura citada

- Aguirre R. J. R., Charcas-Salazar, H. y Flores-Flores, J. L. 2001. El maguey mezcalero potosino. Consejo Potosino de Ciencia y Tecnología, Gobierno del Estado de San Luis Potosí e Instituto de Investigación de Zonas Desérticas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí.
- Andrade, J. L., De la Barrera, E., Reyes-García, C., Ricalde, M., Vargas-Soto, G. y Cervera, C. 2007. El metabolismo ácido de las crasuláceas: diversidad, fisiología ambiental y productividad. Boletín de la Sociedad Botánica de México, 81:37-50.
- AOAC. 1990. Oficial method of analysis. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington, D.C. 1141 pp.
- Ayala-Cordero, G. 2004. Germinación y supervivencia de plántulas de *Stenocereus beneckeii* (Ehrenb.) Buxb. (Cactaceae) bajo déficit hídrico. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. México. 64 pp.
- Bidwell, R.G.S. 1993. Fisiología vegetal. AGT Editor S.A. México.
- Colunga-GarcíaMarín, P., Larqué-Saavedra, A., Eguiarte, L. y Zizumbo-Villarreal, D. (Eds.) 2007. En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología. México.
- Corrales-García, J., Peña-Valdivia, C.B., Razo-Martínez, Y. y Sánchez-Hernández, M. 2004. Acidity changes and pH- buffering capacity of nopalitos (*Opuntia* spp.). Postharvest biology and technology (32) 169-174.
- Cushman, J. 2001. Crassulacean Acid Metabolism. A Plastic Photosynthetic Adaptation to Arid Environments. Plant Physiology 127(4): 1439-1448.
- De la Barrera, E. y Andrade, J.L. 2007. Diversidad fisiológica de las plantas mexicanas: el caso de un metabolismo fotosintético especial. Boletín de la Sociedad Botánica de México (81):157-159.

- Eguiarte, L. E., Souza, V. y Silva-Montellano, A. 2000. Evolución de la familia Agavaceae: filogenia, biología reproductiva y genética de poblaciones. Boletín de la Sociedad Botánica de México, 66: 131-150.
- Font-Quer, P. 1977. Diccionario de botánica. Editorial Labor, S.A. Barcelona. 1244 pp.
- García-Mendoza, A. 2007. Los Agaves de México. Ciencias (87) 14:23.
- García R, M.T. 2007. Procesos fisiológicos y contenido de polisacáridos estructurales en nopalito (*Opuntia spp.*) y su modificación por el potencial de agua del suelo. Tesis de Maestría. Colegio de Posgraduados. 124 pp.
- Hernández, Héctor M. 2006. La vida en los desiertos mexicanos. Fondo de Cultura Económico. Secretaría de Educación Pública. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Convenio Andrés Bello. México. 188 pp.
- Kluge, M and Ting, I. 1978. Crassulacean Acid Metabolism. Analysis of an Ecological Adaptation. Springer-Verlag. Berlin. 209 pp.
- Lütge, U. 2003. Photosynthesis: CAM plants. In: Thomas B, Murphy D, Murphy B, eds. Encyclopedia of applied plant sciences. Oxford Academic Press. Pp 688-705.
- Lütge, U. 2004. Ecophysiology of Crassulacean Acid Metabolism (CAM). Annals of Botany 93: 629-652.
- Magallán-Hernández, F y Hernández-Sandoval, L. 2000. La familia Agavaceae en el estado de Querétaro, México. Boletín de la Sociedad Botánica de México. 66:103-112.
- Marshall, B. and Roberts, J. (eds.) 2000. Leaf development and canopy growth. Sheffield academic press. CRC press. 317 pp.
- Morris, D. W. and Morris, M. Z. 2002. Dictionary of Plant Biology. Cambridge, GBR: Cambridge International Science Publishing. 100 pp.
- Nelson, E., Sage, T. and Sage R. 2005. Functional leaf anatomy of plants with crassulacean acid metabolism. Functional Plant Biology (32): 409-419.
- Nobel, P.S. 1988. Environmental Biology of Agaves and Cacti. Cambridge Univ Press. Cambridge.
- Osmond C.B., Adams III W.W. and Smith S.D. 1994. Crassulacean acid metabolism. En: Pearcy R. W., Ehleringer J., Mooney H.A. and Rundel P.W. Eds. Plant Physiological Ecology. Field Methods and Instrumentation, pp. 255-280, Chapman y Hall, Londres.
- Rosenberg, J. 1982. Química General. Teoría y 611 problemas resueltos. 6a edición. Serie Schaum.Mc Graw-Hill. México. 318 pp.
- Taiz, L. and Zeiger, E. 2002. Plant physiology. Third edition. Sinauer Associates, Inc., Publishers. Massachusetts. 679 pp.

Wen, H., Wagner, J. and Larcher, W. 1996. Growth and nocturnal acid accumulation during aerly ontogeny of *Agave attenuata* grown in nutrient solution and *in vitro* culture. *Biologia plantarum* 39, 1-11.

CAPITULO V. DISCUSIÓN GENERAL

La testa negra brillante, la forma lacrimiforme y las caras planas, fueron las características comunes de las semillas del maguey (*A. salmiana*) de las variantes Blanco, Chino y Liso, estudiadas. En cambio, entre variantes, las semillas mostraron biomasa en fresco significativamente diferente ($\alpha=0.05$). En las semillas de la variante Blanco se registró la menor masa promedio del grupo, mientras que las semillas de la variante Liso presentaron la masa mayor. El contenido de humedad de las semillas las tres variantes fue estadísticamente similar ($\alpha=0.05$). Lo anterior permite sugerir que, las diferencias de la biomasa húmeda de las semillas es un carácter propio de las variantes. También existieron diferencias significativas ($\alpha=0.05$) en la longitud y anchura de semillas entre las variantes. Las semillas de la variante Blanco tuvieron longitud y anchura media menores, y las semillas de la variante Chino presentaron las dimensiones mayores del grupo (Cuadro 13).

Cuadro 13. Biomasa, longitud y anchura media de las semillas de tres variantes de *A. salmiana* correspondientes a la sección central de la infrutescencia (\pm error estándar).

Variante	Biomasa media (mg)	n	Longitud media (mm)	Anchura media (mm)	n
Blanco	10.77 (\pm 0.16) a	250	7.09 (\pm 0.09) a	5.35 (\pm 0.11) a	20
Chino	12.23 (\pm 0.11) b	250	8.38 (\pm 0.09) b	6.48 (\pm 0.10) b	20
Liso	14.49 (\pm 0.08) c	250	8.29 (\pm 0.08) b	5.57 (\pm 0.08) a	20

Valores seguidos por letras distintas en la columna de la masa indican diferencia significativa según la prueba de comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$).

Como explicación a las diferencias encontradas en el tamaño y biomasa de las semillas, se propone la genética de la especie y las respuestas al ambiente donde se desarrollaron las plantas. Todas las semillas usadas, fueron recolectadas en la misma localidad de San Luis Potosí, época fenológica y sección (central) de la infrutescencia. También estuvieron almacenadas en condiciones constantes de temperatura $5 \pm 1^\circ\text{C}$ y humedad hasta su evaluación (Peña-Valdivia *et al.*, 2006), por lo que las diferencias debidas al origen o manejo de las semillas pueden descartarse. En cuanto a la condición ecológica, se menciona que para colonizar nuevos terrenos, las plantas producen miles de semillas, ligeras y pequeñas (Vázquez-Yañez *et al.*, 1997).

Lo anterior se ha identificado como una estrategia de dispersión, usada por plantas como los magueyes, en la cual el viento facilita que sus semillas lleguen a distancias alejadas de la planta progenitora (García-Mendoza, 2007). Sin embargo, hasta hace poco se aseguraba que las semillas de *A. salmiana* y de la mayoría de las especies de *Agave* eran inviables e incapaces de germinar en condiciones naturales, debido a que la reproducción de estas plantas es frecuentemente asexual (Peña-Valdivia *et al.* 2006).

En invernadero, con fotoperiodo natural y sin restricciones de humedad, la hoja cotiledonar en las tres variantes presentó germinación epigea. Entre variantes y épocas de siembra, fueron encontradas diferencias estadísticas significativas de la tasa de emergencia de estas estructuras ($\alpha=0.05$). En el verano del 2008, 11 días después de la siembra, la variante Blanco había acumulado 20% de emergencia; mientras que, las variantes Chino y Liso únicamente acumularon 1% y 4%, respectivamente en las mismas condiciones.

Con lo anterior, puede señalarse que de las tres variantes analizadas, la variante Blanco, con las semillas de menor tamaño y masa, fue la que logró establecer el número mayor de individuos en menor tiempo respecto a las otras variantes. Los resultados indican que en el ciclo de otoño, la temperaturas media de 19 °C, y las temperaturas eventuales de -4 hasta 50.7 (°C), afectaron la velocidad de emergencia de las hojas cotiledonares. Así, en otoño del 2008 la emergencia de la hoja cotiledonar de las tres variantes tomó 40 días más que el verano del mismo año.

Con la información actual es difícil indicar si las temperaturas extremas bajas o las máximas alcanzadas en el ciclo fueron las que tuvieron mayor efecto en la demora de la emergencia; sin embargo, es posible asegurar que la temperatura media del ciclo de verano fue 4 °C mayor que la de otoño, por lo que parece probable que las temperaturas cálidas favorezcan la emergencia de las plántulas de maguey. En contraste, las hojas cotiledonares alcanzaron 10.3 mm de longitud en verano del 2008 y en la época de otoño del mismo año se duplicó (20.4 mm) aún cuando la temperatura ambiente disminuyó.

La exposición de la primera hoja lateral se dio cuando transcurrieron cerca de 30 días de la emergencia de la hoja cotiledonar en las diferentes épocas de siembra. Los magueyes acumularon entre cinco y seis hojas laterales en el periodo de cinco meses posterior a la siembra. A partir de los cinco meses de la siembra de las semillas las hojas cotiledonares de las tres variantes que aún permanecían en las plantas comenzaron a mostrar signos de marchitamiento, y se tornaron amarillas; en relación con lo anterior, cabe señalar que la biomasa total media de las hojas cotiledonares crecidas en la época de verano, con 21 días de edad, fue 94.4 mg y como podría esperarse fue incrementándose con la edad, hasta los cinco meses.

Los resultados del presente estudio apoyan lo señalado por Aguirre R. *et al.* (2001) y Valenzuela-Zapata (2003) en relación con la viabilidad de las semillas de *A. salmiana* pues las semillas usadas estuvieron almacenadas cuatro años en condiciones de laboratorio, y la prueba estándar de germinación superó el 90 % de germinación; además, presentaron 54% de emergencia en condiciones de invernadero.

El contenido de ácido málico en las hojas cotiledonares con edad promedio de un mes mostró fluctuaciones significativas en el ciclo de 24 h, sólo en unos pocos casos. Así, es posible señalar que las hojas cotiledonares de plantas de maguey desarrolladas en condiciones de invernadero, con edades de uno y cinco meses no presentaron fluctuación de la acidez típica MAC. Aunque, la concentración de ácido málico de estas estructuras fue alta si se compara con los contenidos de ácido málico de otras especies típicas CAM, como *Opuntia* spp. (Corrales-García *et al.*, 2004; García R, 2007). Por lo que, es posible sugerir la presencia de un metabolismo fotosintético diferente al CAM o uno CAM incipiente en las hojas cotiledonares de las plantas de maguey crecidas en las condiciones de este estudio.

En contraste con las hojas cotiledonares, en las hojas laterales que conformaban la planta con mayor edad, sí se encontraron fluctuaciones del contenido de ácido málico en el ciclo de 24 h, e incrementos significativos del contenido de ácido en el periodo nocturno, respecto al diurno. Por lo que es posible sugerir que la expresión de metabolismo tipo MAC, en las condiciones del presente estudio, se dio después de que

las plantas de maguey alcanzaron cierta edad, después de un mes. Los resultados también indican que el ambiente tiene efecto en la expresión del citado metabolismo fotosintético. La expresión del comportamiento MAC en las hojas cotiledonares, tiene importancia ecológica, pues se ha señalado que las plantas MAC tienen la capacidad de ahorrar agua en sus tejidos suculentos. Lo cual resulta trascendente si se enfoca hacia la agricultura.

Con la realización de este estudio se identificaron oportunidades para realizar investigaciones futuras sobre la expresión del MAC de plántulas de maguey. Se sugiere cuantificar la captura de CO₂ y respiración. También verificar con microscopia, la histología de las hojas cotiledonares y hojas laterales con diferentes edades; en particular observar el tamaño de las células y vacuolas del clorénquima, pues se reconoce el papel fundamental de este organelo en la acumulación del ácido málico en las hojas de las plantas MAC (Smith, 1986; Nelson *et al.*, 2005). En la literatura se menciona que es necesario dirigir mayores esfuerzos de investigación hacia las plantas que habitan zonas áridas y semiáridas. Es el caso de los magueyes y las cactáceas, las cuales representan grandes retos al estudiarlos en los aspectos genético, taxonómico, ecofisiológico y agroindustrial (Andrade *et al.*, 2009).

5.1. Literatura citada

- Aguirre R. J. R., Charcas-Salazar, H. y Flores-Flores, J. L. 2001. El maguey mezcalero potosino. Consejo Potosino de Ciencia y Tecnología, Gobierno del Estado de San Luis Potosí e Instituto de Investigación de Zonas Desérticas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí.
- Andrade, J. L., Cervera, J. C. and Hraham, E. 2009. Microenvironments, water relations, and productivity of CAM plants. In. De la Barrera, E. and Smith, W. K. (Eds.) Perspectives in biophysical plant ecophysiology: a tribute to Park S. Nobel. Universidad Nacional Autónoma de México. 95-120.
- Corrales, J.; C. B. Peña-Valdivia; Y. Razo M. y M. Sánchez H. 2004. Acidity changes and pH-buffering capacity of nopalitos (*Opuntia* spp.). Postharvest Biology and Technology 32(2): 169-174.
- García-Mendoza, A. 2007. Los Agaves de México. Ciencias (87) 14:23.

- García R, M.T. 2007. Procesos fisiológicos y contenido de polisacáridos estructurales en nopalito (*Opuntia spp.*) y su modificación por el potencial de agua del suelo. Tesis de Maestría. Colegio de Posgraduados. 124 pp.
- Nelson, E., Sage, T. and Sage R. 2005. Functional leaf anatomy of plants with crassulacean acid metabolism. *Functional Plant Biology* (32): 409-419.
- Peña-Valdivia, C.B., Sánchez-Urdaneta, A.B., Aguirre R., J.R., Trejo, C., Cárdenas, E. y Villegas, M.A. 2006. Temperature and mechanical scarification on seed germination of "maguey" (*Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck). *Seed Sci and Technol* (34) 47-86.
- Smith, J. A. 1986. Vacuolar accumulation of organic acids and their anions in cam plants. 79:87 Pp. In. Marin, B. (Ed.) *Plant vacuoles Their Importance in Solute Compartmentation in Cells and Their Applications in Plant Biotechnology*. Plenum Press. New York.
- Valenzuela-Zapata, A. G. 2003. El agave tequilero, cultivo e industria en México. Ediciones Mundi-Prensa. México, D. F. 208 pp.
- Vázquez-Yañez, C., Orozco, M., Rojas, M., Sánchez, M. y Cervantes, V. 1997. La reproducción de plantas: semillas y meristemas. Fondo de Cultura Económico. Secretaría de Educación Pública. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Colección la ciencia para todos, 157. México, D.F. 170 pp.

CAPITULO VI. CONCLUSIONES GENERALES

Las semillas de la sección central de la infrutescencia de las variantes Blanco, Chino y Liso aunque pertenecen a la misma especie de maguey (*A. salmiana*) y fueron recolectadas en la misma región (Minera las Cuevas, SLP. México), coincidieron en características, como su forma, color de la testa y contenido de humedad, pero contrastaron en su tamaño (dimensiones) y biomasa. En invernadero y sin restricción de humedad, la emergencia (hoja cotiledonar) entre las variantes fue afectada, al parecer por la época de siembra, y por variante. En este sentido, la variante Blanco fue la más precoz y la época de verano, en contraste con la de otoño, fue la que favoreció la emergencia. La hoja cotiledonar es la estructura expuesta inicialmente para asegurar el establecimiento de la planta como unidad autótrofa, al finalizar el desarrollo de la plántula que depende de las reservas de la semilla, en las tres especies tuvo vida media de cinco meses y su longitud varió entre las épocas de siembra, en otoño tuvo mayor longitud que en verano. En las tres variantes, después de casi un mes de la emergencia de la hoja cotiledonar se expusieron las hojas laterales. Al transcurrir cinco meses de que fueron sembradas las semillas, los magueyes nuevos presentaron hasta seis hojas laterales. Las hojas cotiledonares de ninguna de las tres variantes presentaron las fluctuaciones de acidez típica de las plantas MAC, independientemente de la edad, uno o cinco meses. En contraste, las fluctuaciones de la acidez durante el ciclo de 24 h en las hojas laterales, con edad de entre tres y cuatro meses, sí presentan evidencia del MAC; aunque esto fue evidente sólo en las variantes Blanco y Liso. La presencia de concentraciones elevadas de ácido málico en las hojas cotiledonares y laterales de las plantas jóvenes (menores que cinco meses) permiten sugerir la presencia del metabolismo MAC incipiente en algunas de esas estructuras.

APÉNDICE

A. Contenido de ácido málico (%) por ciclo de medición en hojas cotiledonares con edad promedio de uno y cinco meses de tres variantes de *A. salmiana* crecidas en invernadero

Época de crecimiento	Variante	Significancia	Ciclo de 24 horas						Periodo diurno					Periodo nocturno					D vs N			
			Promedio %	Promedio % mayor	Hora del día	Promedio % menor	Hora del día	Significancia	Promedio %	Promedio % mayor	Hora del día	Promedio % menor	Hora del día	Significancia	Promedio %	Promedio % mayor	Hora del día	Promedio % menor	Hora del día	Significancia	Promedio diurno	Promedio nocturno
Verano 2008††	Blanco	NS	1.9	2.4	24	1.5	16	NS	1.8	2.1	8	1.5	16	NS	1.9	2.4	24	1.6	20	NS	1.8	1.9
	Blanco	*	3.3	4.2	24	2.6	20	*	3.3	3.7	16	2.6	12	*	3.3	4.2	24	2.6	20	NS	3.3	3.3
	Otoño 2008	NS	3	3.7	24	2.3	20	NS	2.9	3.6	12	2.5	12.1	*	3	3.7	24	2.3	20	NS	2.9	3
Verano 2009	Liso	*	3.9	5.6	24	2.4	20	*	3.9	4.6	12.1	2.8	8	*	3.9	5.6	24	2.4	20	NS	3.9	3.9
	Blanco	*	1.5	2.6	20	0.6	12	*	1.2	1.6	8	0.6	12	*	1.8	2.6	20	1.5	4	*	1.8	1
	Chino	*	1.2	1.5	24	1	8	*	1.2	1.5	16	1	8	*	1.3	1.5	24	1	4	NS	1.2	1.3
Verano 2008	Liso	NS	1.4	1.7	20	1	24	NS	1.2	1.3	16	1.1	12	NS	1.5	1.7	20	1	24	NS	1.2	1.5
	Blanco	NS	1.4	1.9	16	1	4	NS	1.5	1.9	16	1.1	12	NS	1.3	1.5	24	1	4	NS	1.5	1.3
	Chino	NS	0.8	1	12	0.7	4	NS	0.8	1	12	0.7	8	NS	0.7	0.8	20	0.7	4	NS	0.8	0.8
Otoño 2008	Liso	NS	1	1.6	4	0.6	16	NS	0.9	1	8	0.6	16	NS	1.2	1.6	4	0.9	20	NS	0.8	1.2
	Blanco	*	2	3.8	24	1.1	12	NS	1.3	1.4	16	1.1	12	*	2.9	3.8	24	2	4	*	1.3	2.9
	Chino	*	1.9	3.2	12.1	0.6	16	*	1.7	3.2	12.1	0.6	16	NS	2.2	3	4	1.7	20	NS	1.7	2.2
Otoño 2008	Liso	*	0.7	1.6	24	0.3	12	*	0.5	0.7	16	0.3	12	NS	1	1.6	24	0.6	4	*	0.4	1

(NS) No significativo ($p \geq 0.05$) y (*) significativo ($P \leq 0.05$). Valores obtenidos de la prueba de comparación de medias de Tukey. (††) Ausencia de hojas cotiledonares por insuficiencia de hojas para completar las repeticiones. (¶) Hojas cotiledonares con edad promedio de un mes, y (†) con cinco meses. (n=21). Hora del día de registro del promedio.

B. Contenido de ácido málico (%) por ciclo de medición en hojas laterales de hasta cinco meses de edad de tres variantes de *A. salmiana* crecidas en invernadero

Época de crecimiento	Variante	Hoja lateral	Significancia	Ciclo de 24 horas						Periodo diurno					Periodo nocturno					D vs N			
				Promedio %	Promedio % mayor	Hora del día	Promedio % menor	Hora del día	Significancia	Promedio %	Promedio % mayor	Hora del día	Promedio % menor	Hora del día	Significancia	Promedio %	Promedio % mayor	Hora del día	Promedio % menor	Hora del día	Significancia	Promedio diurno	Promedio nocturno
Verano 2008	Blanco	1	*	3.6	5.4	8	2.7	16.1	NS	2.95	3.4	16	2.7	16.1	*	3.7	5	4	2.7	20	NS	3	3.7
		2	*	2.5	3.7	8	1.7	12	*	2.5	3.7	8	1.7	12	NS	2.4	3	4	2.1	24	NS	2.5	2.5
		3	*	2.5	3.2	8	1.4	16.1	*	2.4	3.2	8	1.4	16.1	NS	2.6	3	24	2	20	NS	2.4	2.6
		4	NS	2.6	3.1	4	2.1	16	NS	2.5	3	8	2.1	16	NS	2.7	3.1	4	2.4	24	NS	2.5	2.7
		5	NS	3.7	5.4	8	1.8	20	*	3.7	5.4	8	2.3	12	NS	3.7	5.2	4	1.8	20	NS	3.7	3.7
		6	*	13.1	31.9	4	4.5	8	*	11.4	19	16	5	8	*	14.2	32	4	5.4	20	NS	25	14
	Chino	1	*	2.5	3.5	4	1.4	12	*	2.3	3.2	8	1.4	12	NS	2.8	3.5	4	2.3	20	NS	2.3	2.8
		2	*	1.6	2.5	8	0.9	16.1	*	1.5	2.5	8	0.9	16.1	NS	2	4	1.4	24	20	NS	1.5	1.7
		3	NS	1.4	1.9	8	1	24	*	1.4	1.9	8	1.2	16	NS	1.5	1.9	20	1	24	NS	1.4	1.5
		4	*	1.6	2.3	20	0.9	16.1	*	1.3	2	8	0.8	16.1	*	2.1	2.3	4	1.5	24	*	1.3	2.1
		5	NS	2.6	3.5	12	1.5	16.1	NS	3.8	3.4	12	1.5	16.1	NS	2.7	3.3	4	2.4	24	NS	2.6	2.7
	Liso	1	*	2.5	3.7	4	1.5	16.1	*	2	3.1	8	1.5	16.1	NS	2.9	3.7	4	2.5	20	*	2	3
		2	NS	1.6	1.8	8	1.3	20	NS	1.6	1.8	8	1.5	16.1	NS	1.5	1.7	24	1.3	20	NS	1.6	1.5
		3	NS	1.5	2.1	20	0.9	16.1	*	1.2	1.8	8	0.9	16.1	NS	1.8	2.1	20	1.5	4	*	1.3	1.8
		4	*	1.5	2.3	4	1	16	*	1.4	2.2	8	1	16	*	1.6	2.3	4	1.1	20	NS	1.4	1.6
		5	*	2.3	5.9	4	0.9	16	*	2	4.4	8	0.9	16	*	3.3	6	4	2.2	24	*	2	3.2
		6	NS	3	4.9	20	1.6	12	*	2.6	3.2	16.1	1.6	12	NS	4.5	4.9	20	4.4	24	NS	3	4.5

(NS) No significativo ($p \geq 0.05$) y (*) significativo ($P \leq 0.05$). Valores obtenidos de la prueba de comparación de medias de Tukey. (††) Ausencia de hojas cotiledonares por insuficiencia de hojas para completar las repeticiones. (¶) Hojas cotiledonares con edad promedio de un mes, y (†) con cinco meses. (n=21). Hora del día de registro del promedio. La hoja 1 es la de mayor edad (cinco meses).

C. Contenido de ácido málico (%) por ciclo de medición en hojas laterales con edad promedio de uno y cinco meses de tres variantes de *A. salmiana* crecidas en invernadero

Época de crecimiento	Variante	Hoja lateral	Significancia	Ciclo de 24 horas						Periodo diurno						Periodo nocturno						D vs N	
				Promedio %	Promedio % mayor	Hora del día	Promedio % menor	Hora del día	Significancia	Promedio %	Promedio % mayor	Hora del día	Promedio % menor	Hora del día	Significancia	Promedio %	Promedio % mayor	Hora del día	Promedio % menor	Hora del día	Significancia	Promedio diurno	Promedio nocturno
Otoño 2008	Blanco	1	*	2.4	5.1	4	0.9	16	*	1.5	3.3	8	0.9	16	*	3.7	5.1	4	2.2	20	*	1.5	3.8
		2	*	2.7	3.9	4	2	12.1	NS	2.4	2.9	8	2	12.1	NS	3.1	3.9	4	2.3	24	*	2.4	3.2
		3	*	2.2	2.9	12.1	1.4	16	*	2.1	2.9	12.1	1.4	16	*	2.2	2.8	4	1.7	20	NS	2.1	2.2
		4	*	1.9	2.8	8	1.1	20	*	2	2.8	8	1.3	16	*	1.9	2.4	4	1.1	20	NS	1.9	1.9
		5	*	1.9	3.4	4	1	12.1	*	1.6	2.2	12	1	12.1	*	2.2	3.4	4	1.5	20	*	1.6	2.2
		6	*	3.6	7.1	8	1.5	20	*	3.9	7.1	8	1.9	12	*	3.4	6.5	4	1.6	20	NS	3.8	3.4
	Chino	1	NS	2.7	3.7	4	0.8	20	NS	3.0	3.6	12.1	2.4	16	*	2.1	3.7	4	0.8	20	NS	3	2.1
		2	NS	2.5	3.7	20	1.5	12	NS	2.2	2.6	12.1	1.6	12	NS	2.9	3.7	20	2.3	4	NS	2.2	2.8
		3	NS	2.2	3	16	1.3	20	NS	2.3	3	16	1.6	12.1	*	2.1	2.7	4	1.3	20	NS	2.3	2.1
		4	*	1.8	2.6	24	1.3	12	*	1.7	2.4	8	1.3	12	*	1.82	2.6	24	1.7	20	NS	1.7	2
		5	*	2	3.4	8	1.3	12.1	NS	1.5	1.8	12	1.3	12.1	NS	2	2.1	4	1.8	20	*	1.6	2
		6	NS	11.5	19.7	12	6.4	12.1	NS	11.1	19.8	12	6.4	12.1	NS	11.9	13.1	4	10	24	NS	11	11
	Liso	1	NS	2	2.5	4	1.2	12.1	NS	1.8	2.2	8	1.2	12.1	NS	2	2.5	4	1.7	20	NS	1.8	2
		2	NS	1.9	2.5	4	1.2	12.1	*	1.6	2.5	8	0.9	16	NS	2	2.5	4	1.1	20	NS	1.8	2
		3	*	1.6	2.6	8	0.9	16	*	1.6	2.6	8	0.9	16	*	1.7	2.5	4	1.1	20	NS	1.6	1.7
		4	*	1.7	3.2	4	0.7	16	*	1.4	2	8	0.7	16	*	2	3.2	4	1.1	20	NS	1.4	2
		5	*	1.8	4.1	4	0.9	16	*	1.5	2.5	8	0.9	16	*	2.1	4.1	4	1.2	20	NS	1.5	2
		6	NS	2	2.6	20	1.4	24	NS	2	2.6	12.1	1.5	8	NS	2.1	2.6	20	1.4	21	NS	2	2.1

(NS) no significativo ($p \geq 0.05$) y (*) significativo ($p \leq 0.05$). Valores obtenidos de la prueba de comparación de medias de Tukey. (†) ausencia de hojas cotiledonares por insuficiencia de hojas para completar las repeticiones. (‡) hojas cotiledonares con edad promedio de un mes, y (†) con cinco meses. (n=21). Hora del día de registro del promedio. La hoja 1 es la de mayor edad (cinco meses).