



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE SAN LUIS POTOSI
FACULTAD DE AGRONOMIA Y VETERINARIA



VARIACION DE LA FOTOSINTESIS CAM DE DOS ESPECIES DE AGAVE
INFLUIDA POR EL DESARROLLO Y EL AMBIENTE

Por:

Ma. Guadalupe Ruiz García

Tesis presentada como requisito parcial para obtener el título de
Ingeniero Agrónomo Fitotecnista



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE SAN LUIS POTOSI
FACULTAD DE AGRONOMIA Y VETERINARIA



VARIACION DE LA FOTOSINTESIS CAM DE DOS ESPECIES DE AGAVE
INFLUIDA POR EL DESARROLLO Y EL AMBIENTE

Por:

Ma. Guadalupe Ruiz García

Tesis presentada como requisito parcial para obtener el título de
Ingeniero Agrónomo Fitotecnista

Asesores:

Dr. Hugo Magdaleno Ramírez Tobías.

Dr. Pablo Delgado Sánchez.

Dr. José Arturo de Nova Vázquez

Asesor externo:

Dr. Joel Flores Rivas

La presente tesis, titulada: **VARIACIÓN DE LA FOTOSÍNTESIS CAM EN DOS ESPECIES DE AGAVE POR EL DESARROLLO Y EL AMBIENTE**, fue realizada por la alumna: Ma. Guadalupe Ruiz García como requisito parcial para obtener el título de Ingeniero Agrónomo Fitotecnista y fue revisado y aprobado por el suscrito Comité de Tesis:

Dr. Hugo Magdaleno Ramírez Tobías.

Asesor

Dr. Pablo Delgado Sánchez

Co-asesor

Dr. José Arturo de Nova Vázquez

Co-asesor

Soledad de Graciano Sánchez, S.L.P. a los 7 días del mes de Julio de 2014.

DEDICATORIA

Esta tesis se la dedico primeramente a Dios, el creador que nunca me abandonó y me hizo una mujer de fe que salió adelante en contra de todos los pronósticos humanos, aguerrida, atrevida y persistente y también me hizo sentir que las limitaciones físicas y sociales no son un pretexto para dejarse vencer sino un reto para esforzarse más. Y me rodeo de las personas buenas y malas, condiciones buenas y malas que necesitaba para motivarme a ser una persona de bien y de provecho.

A mis papas: Eduardo Efraín Ruiz Gloria y Ma. Esther García Meza, por motivarme desde el momento en que empecé a existir a ser una persona trabajadora, responsable, de bien para la sociedad. Por su paciencia y apoyo incondicional en todos los problemas que enfrenté para llegar hasta hoy, por escucharme, aconsejarme y apoyarme en cada cosa que yo deseaba, porque nunca se avergonzaron de mí. Espero llenarlos siempre de orgullo y satisfacciones.

A mis hermanos: Eduardo Ruiz García y Rocío Araceli Ruiz García por ser muchas veces ejemplo para mí, por su apoyo y por defenderme haciéndome saber que no estoy sola, por hacerme soñar en grande junto a ustedes.

A mis amigos y amigas por acompañarme y motivarme en este camino de lucha para ser alguien en la vida.

A mis tíos, abuelos y primos, por tener siempre fe en mí y hacerme sentir una gran seguridad y una persona querida e importante.

A quienes alguna vez se consideraron mis enemigos, desearon verme fracasada o pequeña, por ser un motivo más de crecer mi coraje pero para superarme a mí misma y desear un mundo mejor de personas de bien. Ahora pueden contar conmigo sin ningún rencor.

A todas las personas que me desearon el bien, me brindaron su cariño a pesar de no estar muy cerca o no convivir, porque aunque no lo crean son parte importante de mi alegría y motivación para hacer todo de la mejor forma posible.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme alcanzar esta meta no solo para mi sino para toda la gente que me rodea, por los padres que me dio y el entorno en que nací.

A mi papá: Eduardo Efraín Ruiz Gloria, por esos más de 20 años de sacrificio alejado de su amada esposa, su pueblo y sus sueños trabajando muy duro para ofrecerme a mi y a mis hermanos un mejor futuro y una vida sin carencias, sin dejar de ser una gran padre siempre presente en nuestras vidas, en verdad, muchas gracias.

A mi mamá: Ma. Esther García Meza por ser desde el inicio de mi vida una madre, maestra y apoyo de tiempo completo, gracias por estar siempre detrás de mi, exigiéndome y convirtiéndome en una mujer responsable y que aprecia cada cosa que tenemos y a no desperdiciar el valioso tiempo.

A mis hermanos: Rocío Araceli Ruiz García y Eduardo Ruiz García, por apoyarme en toda mi carrera pero sobretodo en este trabajo, por ayudarme con la búsqueda de materiales, gracias hermano por acompañarme a la facultad a media noche, por cuidarme y su ayuda en general para este trabajo.

A mi familia por su gran ayuda, paciencia y ánimo en este trabajo final, especialmente a mi tía Ma. Guadalupe Ruiz Gloria por su interés y apoyo en este trabajo, a mis tíos Norma Beatriz Ruiz Gloria y Joel Zamora Amaro por su ayuda en la facultad y casa y su apoyo como mis colegas, a mi abuelita Ma. de Jesús Gloria Ruiz por su constante motivación desde el inicio de mis estudios y mi carrera, por decirme que era una verdadera gracia lo que yo hacía con mis limitaciones físicas y que Diosito me había ayudar, a mi tía Martha Alicia Ruiz Gloria por sus deseos de saberme titulada en una carrera y dejarme encargada, a mis primos por sus ánimos y bromas para hacerme mas llevadero todo cuando me estresé mucho, muchas gracias.

A mi siempre compañera y amiga: Yolanda Elizabeth López Barrón, por su sincera amistad, comprensión y ayuda desde que nos conocimos especialmente en este trabajo

gracias por tu ayuda desinteresada y desvelarte y trabajar conmigo durante meses amiga te quiero mucho.

A mis amigos: Silvia Stephanie, Dalia, Maricela Guadalupe, Karla, Paty, Emma, Mary, Francisco, Ricardo, y quienes no mencione pero saben que los aprecio, agradezco su apoyo y amistad.

A mi asesor de tesis: Hugo Magdaleno Ramírez Tobías, por su confianza, ayuda, paciencia y dirección, así como apoyo cuando se presentaron diversos problemas en la investigación.

A mis entrañables profesores desde el inicio de mi vida escolar hasta mi carrera profesional; por todas sus enseñanzas, paciencia y ayuda cuando mas los necesité en las diferentes etapas de mis estudios, por todo lo que hicieron con el único interés de dejarnos las mejores enseñanzas y dejarnos lo mejor preparados posible haciendo la diferencia de cuando caemos en manos de profesores que no tienen esta vocación.

A todas aquellas personas que desde lejos me quisieron y me desearon el bien, gracias.

A don Miguel, por su paciencia y ayuda en la parte práctica de mi tesis, al tenderme su mano más allá de su obligación y por brindarme su amistad muchas gracias.

A la Institución que me formo como ingeniera agrónoma, La Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, gracias por todo lo que me brindó para ser una profesionista y por todo lo bueno que viví en sus instalaciones, por sus servicios e iniciativas.

A PROMEP por la Beca otorgada a través del proyecto: Formas de propagación natural y factores ambientales que limitan el establecimiento de plántulas en *Agave* (PROMEP/103.5/11/6650)

CONTENIDO

	Página
CONTRAPORTADA.....	i
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	v
CONTENIDO.....	vii
INDICE DE CUADROS.....	ix
INDICE DE FIGURAS.....	x
RESUMEN.....	xii
SUMMARY.....	xiii
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	3
Objetivo General.....	3
Objetivos Específicos.....	3
Hipótesis.....	3
REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
Los Magueyes.....	4
El CAM (metabolismo ácido de las crasuláceas por sus siglas en inglés).....	5
El CAM en los Magueyes.....	5

¿Cómo Afecta el Desarrollo de las Plantas al CAM?.....	8
Métodos de Observación de la Actividad CAM en los Magueyes.....	9
MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
Material Vegetal.....	11
Titulación del Tejido.....	14
Medición del Contenido Relativo de Agua (CRA).....	15
Medición de la Conductividad Eléctrica.....	15
Diseño de Experimento y Análisis.....	17
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
CONCLUSIONES.....	33
LITERATURA CITADA.....	34

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Resultado del ANAVA de dos factores con los datos de contenido relativo de agua de las muestras de dos especies de <i>Agave</i> en dos condiciones hídricas.....	28
2	Prueba de Tukey: Nivel de significancia, condición hídrica con los datos de contenido relativo de agua de las muestras de 2 especies de <i>Agave</i> en dos condiciones hídricas.....	28

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Curva de asimilación de CO ₂ de una planta MAC bien irrigada de agua, con sus fases típicas de carboxilación y actividad de enzimas carboxilantes (Andrade et al., 2007).....	2
2	Recolección de semillas, preparación del sustrato y siembra de semillas de <i>Agave salmiana</i> y <i>A. striata</i>	11
3	Semilleros de 200 cavidades con <i>Agaves</i> en diferentes condiciones hídricas, arriba un semillero con 200 <i>Agaves</i> con semanas ininterrumpidas de riego al sustrato presentando una buena coloración y turgencia aceptable a su especie y abajo uno con semanas sin irrigación alguna al sustrato de agua y signos de coloración y turgencia típicos de un estrés hídrico.....	12
4	Corte de las muestras, identificación y congelamiento en nitrógeno líquido para su posterior análisis en laboratorio.....	13
5	Alícuota de una de las repeticiones de las muestras al momento de ser titulada y alícuotas ya tituladas con la coloración característica de la interacción del hidróxido de sodio con el indicador fenolftaleína.....	14
6	Frascos correspondientes a cada repetición de las muestras con agua destilada en la agitadora para tomar lectura de su conductividad eléctrica con el conductímetro portátil.....	16
7	Porcentaje de ácido málico a lo largo del día (Periodo diurno ) y noche (Periodo nocturno ) de la hoja Cotiledonar de <i>A. salmiana</i> y <i>A. Striata</i> en condiciones de riego y de sequía.....	19
8	Porcentaje de ácido málico a lo largo del día (Periodo diurno ) y noche (Periodo nocturno ) de la primer hoja Lateral de <i>A. salmiana</i> y <i>A. Striata</i> en condiciones de riego y de sequía.....	20
9	Porcentaje de ácido málico a lo largo del día (Periodo diurno ) y noche (Periodo nocturno ) de la segunda hoja Lateral de <i>A. salmiana</i> y <i>A. Striata</i> en condiciones de riego y de sequía.....	21
10	Porcentaje de contenido relativo de agua en hojas cotiledonar (HC), primera lateral (H1L) y segunda lateral (H2L) de las especies <i>A. salmiana</i> (<i>A.Sa</i>) y <i>A. striata</i> (<i>A.St</i>) inducidas a condiciones de sequía	

	y condiciones de riego. Las líneas color negro indican el error estándar. n= 36.....	25
11	Ejemplares de <i>A. striata</i> en su hábitat natural. Moro Andrea, Barcelona España.....	26
12	Ejemplar de <i>A. salmiana</i> en su hábitat natural. Ruiz García, 2013, Villa de Arista, San Luis Potosí, México.....	27
13	Conductividad eléctrica de muestras con riego en μScm^{-1} de las hojas <i>A. salmiana</i> cotiledonar (), <i>A. salmiana</i> primera lateral (), <i>A. salmiana</i> segunda lateral (), <i>A. striata</i> cotiledonar (), <i>A. striata</i> primera lateral () y <i>A. striata</i> segunda lateral () cada 30 minutos en un ciclo de 120 minutos. Las líneas negras en cada punto representan el error estándar.....	30
14	Conductividad eléctrica de muestras con estrés hídrico en μScm^{-1} de las hojas <i>A. salmiana</i> cotiledonar (Sa HC ), <i>A. salmiana</i> primera lateral (Sa H1L ), <i>A. salmiana</i> segunda lateral (Sa H2L ), <i>A. striata</i> cotiledonar (St HC ), <i>A. striata</i> primera lateral (St H1L ) y <i>A. striata</i> segunda lateral (St H2L ) cada 30 minutos en un ciclo de 90 minutos. Las líneas negras en cada punto representan el error estándar.....	31

RESUMEN

Los magueyes, son plantas exitosas en ambientes donde otras difícilmente podrían establecerse. Las plantas de este género han desarrollado adaptaciones a ambientes áridos, la principal adaptación es el tipo de fotosíntesis conocida como metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM, por sus siglas en inglés). La fotosíntesis CAM puede cambiar a la ruta C₃, que es la fijación de CO₂ diurna. El cambio también puede ocurrir a la inversa y podría ser por el estadio de desarrollo de la planta o por déficit de agua. Los objetivos de este trabajo fueron evaluar la variación del contenido de ácido málico de plántulas de *Agave salmiana* y *Agave striata* en función de la disponibilidad de agua y del desarrollo, observar el efecto de la restricción de humedad del sustrato en el nivel de hidratación de los tejidos y daño celular y asociar el nivel de hidratación del tejido con la actividad fotosintética CAM. Se definieron tres estadios de desarrollo, cada uno correspondió a la presencia de una hoja, la cotiledonar, primera lateral y segunda lateral. Las plántulas de ambas especies se dividieron en dos grupos, a uno se le suspendió el riego y el otro permaneció bien irrigado. Se evaluaron los cambios de acidez titulable como ácido málico durante el día y noche. Se registró el contenido relativo de agua y la conductividad eléctrica en muestras de tejido fresco. *Agave salmiana* presentó mayor cantidad de ácido málico que *A. striata*, lo cual indica diferencias genotípicas propias de cada especie. Cuando hubo déficit hídrico el aumento nocturno de la acidez tisular de las dos especies fue mayor en la segunda hoja lateral. *Agave salmiana* no presentó un patrón de variación de acidez típico CAM sin déficit hídrico. En *A. striata* se registró variación que coincidió parcialmente con el patrón CAM, de manera particular, en el descenso de la acidez durante el día en la hoja cotiledonar y primera lateral. El déficit hídrico disminuyó significativamente el contenido relativo de agua en ambas especies; sin embargo, esto no provocó aumento de la conductividad eléctrica del medio de resuspensión del tejido, como sí ocurrió en las plantas bien irrigadas. *Agave salmiana* y *A. striata* son plantas CAM facultativas debido a que cambian su ruta fotosintética en función del desarrollo y carencia de agua.

SUMMARY

The magueyes are successfully plants in environments where another could hardly settle. Plants of this genus have developed adaptations to arid environments; the main adaptation is the type of photosynthesis known as crassulacean acid metabolism (CAM). The CAM photosynthesis can change to the type C₃, which is the daytime fixation of CO₂. The change may also occur in reverse order and could be by the stage of development of the plant or by drought. The objectives of this study were to evaluate the variation of malic acid of seedlings of *Agave salmiana* and *Agave striata* in function of the water availability and the development, to observe the effect of the restriction of moisture of the substrate over the tissues and over de cellular damage and to associate the hydration of tissue with photosynthetic CAM activity. Three development stages were defines as cotyledonary leaf, first and second lateral leaves. Plants were divided on two groups, water was suspended for one and for the other did not. Titrable acidity changes over day and night were recorded. Relative water content and electrical conductivity were registered on fresh sample tissues. *A. salmiana* had higher malic acid content than *A. striata*. This fact shows genetic differences. With water stress, the tissue acidity further rose in the second lateral leaves for the two species. Without water deficit acidity variation of *A. salmiana* tissue did not correspond with a CAM trend. Likewise, acidity variation of *A. striata* partially coincided with a CAM trend, specifically in the decrease of tissue acidity over the day in cotyledonary and first lateral leaf. Water deficit significantly decreased relative water content for both species, but did not promoted increase of electrical conductivity for osmolality increase as was observed for well irrigated plants. *A. salmiana* and *A. striata* are facultative CAM plants because they changed their photosynthetic path due to the development and to water stress.

INTRODUCCION

México es considerado centro de origen del género *Agave* debido a que a la fecha se han registrado en nuestro país 272 especies de las 310 registradas en el mundo (García, 2002). Los magueyes, como se denomina comúnmente a las plantas de este género, son exitosos en ambientes donde otras plantas difícilmente podrían establecerse. El hombre ha aprovechado a estas plantas desde hace 9,000 años; sobretodo como alimento en diferentes formas aprovechando las hojas, flores, tallo floral, como forraje para ganado, entre otros (Granados, 1993).

Las plantas de este género han desarrollado adaptaciones a ambientes áridos y semiáridos, como son raíces someras y ramificadas, cutícula gruesa, tejidos suculentos, bajo número de estomas que además se encuentran hundidos y la principal adaptación es el tipo de fotosíntesis conocida como metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM, por sus siglas en inglés) (Nobel, 1998). En esta vía fotosintética la fijación del CO₂ sucede durante la noche, cuando la pérdida de agua por transpiración es poca debido a las bajas temperaturas.

En las plantas CAM la enzima encargada de fijar el CO₂ durante la noche en células del mesófilo, en forma de ácido málico en la vacuola, es la fosfoenol-piruvato-carboxilasa (PEPC) (Lira, 2007). Primero ocurre una precarboxilación con la PEPC que forma un ácido de 4 carbonos (malato principalmente) y después una subsecuente descarboxilación del malato para formar CO₂ que entra en el ciclo de Calvin al iniciar el día (Granados, 1993). El CO₂ liberado, se fija con la enzima ribulosa difosfato carboxilasa (RUBISCO) en los cloroplastos de la célula durante el día, como ocurre en el caso de las plantas C₃ (Nobel, 1998). Es por esto que durante la noche las plantas CAM presentan acidez en sus hojas y ésta disminuye durante el día (Figura 1).

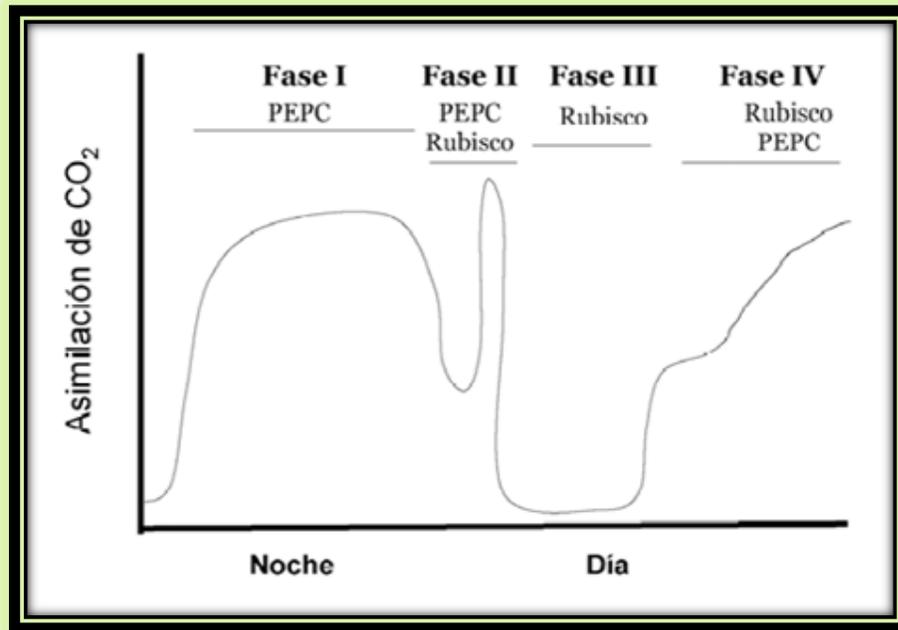


Figura 1. Curva de asimilación de CO₂ de una planta MAC bien irrigada de agua, con sus fases típicas de carboxilación y actividad de enzimas carboxilantes (Andrade *et al.*, 2007).

El metabolismo CAM puede cambiar a la fotosíntesis o ruta C₃ (Nobel, 1998), que es la fijación de CO₂ diurna. Se sabe también que el cambio puede ocurrir a la inversa y que esto podría ser por el estadio de desarrollo de la planta o por los factores ambientales. Hay que considerar que existen cambios bruscos o paulatinos en el medio ambiente en cuanto a humedad, temperatura, radiación, entre otros. Esto debido a que existen días y noches cortos o largos, así como noches calurosas, días frescos, precipitaciones escasas o abundantes que dependen solo del entorno natural o la estación del año en todo el mundo incluyendo zonas áridas que son las áreas dónde comúnmente se establecen las plantas del género *Agave* (Martin, 1999). Es posible sugerir que los magueyes muestran el metabolismo CAM sólo en ciertos estadios de desarrollo o en ciertas temporadas del año, o bajo ciertas condiciones de estrés abiótico (Lira, 2007). Lo anterior puede ocurrir cuando no existe limitación de agua como ocurre en la estación de lluvias, como se ha observado en varias plantas CAM que toman el CO₂ con los estomas abiertos durante el día, utilizando el metabolismo C₃ (Nobel, 1998).

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Objetivo General

El objetivo de este trabajo fue, determinar la influencia del desarrollo y del ambiente en el tipo de fotosíntesis en plantas de *Agave*.

Objetivos Específicos

- Evaluar la actividad fotosintética CAM, a través de la medición de acidez tisular, de plántulas de *Agave salmiana* Salm-Dyck y *Agave striata* Zucc. en función de la disponibilidad de agua y del desarrollo.
- Determinar el contenido relativo de agua en los tejidos de plántulas de *A. salmiana* y *A. striata* en condiciones controladas de estrés hídrico y riego frecuente.
- Evaluar la conductividad eléctrica de *A. salmiana* y *A. striata* en tratamientos de riego y déficit hídrico.

Hipótesis

- Las plantas de *Agave* son facultativas y cambian su actividad fotosintética de C₃ a CAM, por cambios debidos a situaciones de estrés como lo es el déficit de humedad, también de CAM a C₃ por cambios en el desarrollo e inexistencia de estrés alguno.
- Conforme se desarrolla la plántula de maguey, aumenta su capacidad de tolerar condiciones ambientales adversas, y esa capacidad depende de cambios en la ruta fotosintética.
- La comparación entre *A. salmiana* y *A. striata* exhibe diferencias en el funcionamiento de la actividad CAM cuando ésta se presenta.

REVISION DE LITERATURA

Los Magueyes

Los magueyes, como se denomina de forma común a las especies del género *Agave*, son plantas adaptadas a condiciones de aridez porque poseen raíces someras y ramificadas, cutícula gruesa, son suculentas, tienen estomas hundidos y realizan el metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM). Otras características de las plantas de *Agave* son sus hojas grandes dispuestas en roseta que terminan en una espina y forman una inflorescencia única (Granados, 1993).

Nobel (1998) menciona que debido a que la caza de animales era difícil y algunas veces estacional, los indioamericanos primitivos usaban las plantas de su entorno para cubrir las necesidades básicas de su dieta. En el proceso, se convirtieron en verdaderos expertos en el aprovechamiento de las plantas como los magueyes y las cactáceas. Alrededor de la mitad de los excrementos humanos momificados con 9000 años de antigüedad, encontrados en las cavernas de Tamaulipas y Tehuacán, Puebla, México, contenían remanentes tanto de magueyes como de cactáceas, lo que corrobora el consumo de tales plantas. Asimismo, los artículos de tela y herramientas antiguos muestran muchos otros aprovechamientos de los agaves.

Granados (1993) menciona que Mesoamérica y Aridoamérica, como los antropólogos han dividido a México, son escenarios del origen y evolución del maguey (*Agave* spp). En ambas regiones esta planta ha sido utilizada, desde los primeros pobladores hasta la actualidad, para satisfacer y complementar una serie de necesidades básicas: alimento, forraje, medicamentos y construcción, entre otras.

Los magueyes son plantas modificadas morfológica y fisiológicamente para soportar las condiciones ambientales de los sitios que habitan (García, 2002). La conservación del agua es una de las ventajas ecológicas y agronómicas potenciales más importantes de estas plantas pues almacenan grandes volúmenes de agua en relación con sus superficies,

también son interesantes sus adaptaciones a la temperatura y radiación solar, así como su proceso CAM y C₃ (Nobel, 1998).

El CAM (metabolismo ácido de las crasuláceas, por sus siglas en inglés)

El metabolismo ácido de las crasuláceas es un proceso por el cual las plantas fijan CO₂, muy parecido al proceso C₄, con la diferencia de que la enzima reacciona en la obscuridad y con demandas evapotranspirativas bajas. Las plantas con este metabolismo fijan el CO₂ durante la noche, el CO₂ tomado se fija inicialmente con la PEPCasa en las células del clorénquima, en malato u otro ácido que es almacenado en la vacuola y su asimilación fotosintética ocurre estando las estomas cerrados durante el siguiente periodo de luz (Granados, 1993). El almacenamiento del ácido málico hace que las plantas CAM tengan un sabor más amargo o ácido durante la noche que durante el día (Nobel, 1998). Más de un 90% de las plantas que habitan la tierra utilizan la ruta fotosintética C₃, pero algunas plantas han tenido modificaciones originando otras rutas como la C₄ y la CAM (Raya *et al.*, 2008).

La importancia ecológica de la fijación nocturna de CO₂ por las plantas CAM radica en su contribución a la sobrevivencia de las mismas al proveer un mecanismo de recirculación interna de CO₂ en condiciones de severa sequía. Esto evita la inhibición del aparato fotosintético cuando el cierre estomático total impide la absorción de CO₂ externo (Medina, 1987).

El CAM en los Magueyes

Los magueyes acumulan CO₂ durante la noche para su uso diurno en la fotosíntesis y así conservar el agua acumulada en las hojas. Las temperaturas diurnas muy altas conducen a una pérdida de agua muy alta a través de los estomas abiertos, con respecto a la pérdida que se da por la noche. Así la senda CAM es crucial para la conservación de agua de la mayoría de las agaváceas y cactáceas (Nobel, 1998).

Teóricamente las plantas CAM funcionan con esta ruta fotosintética mientras se encuentre en condiciones de estrés, y cambian a la ruta fotosintética alternativa (C₃) si no existen tales condiciones limitantes (Pedroza *et al.*, 2006). Cuando la conservación de

agua no es de fundamental importancia para los agaves, es decir cuando las condiciones ambientales son por ejemplo tiempo de lluvias abundantes o temperaturas bajas, la mayoría de estas plantas toman el CO₂ a través de los estomas abiertos durante el día. El CO₂ adquirido durante el día lo fija la RUBISCO al igual que se fija el CO₂ que toman las plantas C₃ durante el día (Nobel, 1998).

El factor temperatura es importante desde el punto de vista fisiológico, ya que determina la apertura de los estomas y por ende el intercambio gaseoso. La temperatura óptima para la fotosíntesis puede cambiar o ser igual a la temperatura ambiental de las plantas, en tales cambios se consideran adaptaciones, aclimataciones que tienen bases bioquímicas y que pueden ocurrir en periodos cortos de tan solo un día. Se ha reportado que de 10 a 15°C es la temperatura óptima para la fijación nocturna de CO₂ (Granados, 1993).

Granados (1993) hace la observación de que las plantas CAM están bien adaptadas a bajas temperaturas, la toma de CO₂ solo se reduce en un 20% a 5°C, comparada con su máximo valor nocturno y cuando la temperatura se eleva por arriba de los 15°C la toma de CO₂ declina mas rápidamente en comparación con los valores de la conductancia de vapor de agua y llega a ser de 0 a los 30°C; aunque algunos estomas aun se abren. En *Agave*, la toma y fijación de CO₂ es más evidente justo después del amanecer, próximo al periodo más fresco del día. La apertura de estomas se da también al final de la tarde, cuando la temperatura ha disminuido de sus valores máximos (Nobel, 1998).

El metabolismo CAM no es solo una alternancia de patrones diurnos y nocturnos, existen varias fases metabólicas que están caracterizadas cada una por diversas actividades y también hay cambios a largo plazo en patrones de las plantas CAM conforme avanzan las estaciones. Asimismo, ciertas plantas muestran el metabolismo CAM sólo en ciertas épocas de su ciclo vital o en ciertas temporadas del año, o bajo la influencia de ciertas condiciones como salinidad o presión de agua (Lira, 2007).

Lira (2007) menciona que las plantas CAM solamente abren los estomas por la noche. Sin embargo, se propone que altas temperaturas en la noche, suelo con alto contenido de humedad y muchas horas luz convierten paulatinamente a las plantas CAM en plantas

C₃. El incremento de la acidez nocturna en las plantas CAM depende del total de cantidad de luz recibida (RFA) durante el día. La relación entre el acomodamiento de las hojas, la RFA y el incremento de acidez nocturna va de acuerdo con la ubicación de las hojas en la roseta de la planta (Granados, 1993).

A medida que aumenta la temperatura, los estomas tienden a cerrarse, lo cual disminuye la pérdida de agua. La absorción nocturna de CO₂ es óptima alrededor de 15°C. Cuando la temperatura es mas baja la toma de CO₂ decrece, aunque la apertura de los estomas se incrementa ligeramente, esto indica que temperaturas mas bajas inhiben el proceso metabólico incluido en la carboxilación o etapa enzimática subsecuente (Granados, 1993).

Factores ontogénicos, genotípicos y ambientales, como intensidad de luz, humedad relativa y disponibilidad de agua, se combinan para gobernar el grado en el cual los atributos bioquímicos y fisiológicos del CAM son expresados (Cushman *et al.*, 2002). *Mesembryanthemum crystallinum* es una especie C₃ modelo en la cual el CAM se induce en respuesta a estrés hídrico, osmótico y salino, alta luz, por exposición de las raíces a bajas temperatura o anoxia, o por tratamiento con ácido abscísico (Chu *et al.*, 1990; Herppich *et al.*, 1992; Taybi *et al.*, 2002). Morfológicamente, se observa un incremento en la turgencia de la hoja, así como un aumento del tamaño y turgencia de las células epidérmicas que acumulan sal.

(Acevedo *et.al.*, 1983) observaron cambios diurnos de acidez en *Opuntia ficus-indica* y encontró que exhibe el patrón característico CAM (la acidez titulable tuvo un mínimo al anochecer y un máximo al amanecer) y que este patrón está relacionado con la edad de los cladodios y la RFA interceptada.

Estos factores (temperatura, RFA e intercambio gaseoso) tienen un impacto sobre la productividad; pero el factor clave es el agua, sin la cual no existe una apertura estomática (Granados, 1993).

¿Cómo Afecta el Desarrollo de las Plantas al CAM?

En la regulación de C₃ a CAM y a la inversa, están involucrados factores como el balance iónico, la succulencia, la disponibilidad hídrica a la que se asocia el balance de las citocininas y el ácido abscísico y factores endógenos que se manifiestan a través de la concentración del ácido málico (Bidwell, 1979). Considerando esto, en plantas C₃, la eficiencia fotosintética varía dentro y entre especies, edad y etapa fenológica de la planta y diferentes ambientes, como los gradientes de aridez. Cuando las plantas de *Agave* inician su desarrollo al germinar, no están sometidas a condiciones de estrés ambiental puesto que la semilla proporciona los primeros nutrientes y factores necesarios para que se desarrolle con éxito, sin embargo, tal estrés ambiental se puede presentar conforme ocurren las diferentes etapas de desarrollo de la planta (primera hoja cotiledonar, lateral, segunda lateral, etc.) e inducir al metabolismo CAM.

Según las influencias ambientales y/o del desarrollo, una variedad de características de asimilación de CO₂, de flujo de ácidos orgánicos y de comportamiento estomático se ha observado más allá del patrón convencional de las cuatro fases del CAM (Lara *et al.*, 2010).

Las plantas CAM pueden clasificarse también en CAM obligadas o facultativas, las obligadas exhiben dicho metabolismo independientemente de cualquier factor interno o externo, y en especies CAM facultativas o inducibles, en las que el CAM se presenta como resultado de condiciones ambientales particulares o del desarrollo (Lara *et al.*, 2010; Andreo, 2010).

Trabajos previos han clasificado a *P. ortulaca oleracea* como una planta C₄, a pesar de que el estado de desarrollo es uno de los factores más importantes en la determinación de la operación del tipo de fotosíntesis (Kennedy *et al.*, 1973). De esta manera, se demostró que las hojas senescentes contenían grandes cantidades de enzimas pertenecientes a la fotosíntesis C₃ (Kennedy, 1976). Posee pequeñas hojas succulentas con anatomía Kranz y grandes células de reserva de agua (CRA). Posteriormente, se sugirió que podía cambiar su modo fotosintético de C₄ a CAM cuando era sometida a condición de sequía o fotoperiodos cortos (Koch y Kennedy, 1982; Kraybill y Martin, 1996).

Métodos de Observación de la Actividad CAM en los Magueyes

La determinación de los cambios en acidez tisular ha sido una medición confiable de la actividad CAM y se ha practicado desde mucho antes de que se hicieran mediciones de fijación de CO₂. El incremento en la acidez tisular es proporcional a la concentración de ácido málico en las vacuolas de las células, ya que por cada molécula de CO₂ fijada por una planta CAM se produce una molécula de ácido málico y dos iones de hidrogeno (Nobel, 1988). Para medir la actividad CAM se requiere hacer dos titulaciones del tejido, una al anochecer y otra al amanecer, con una solución alcalina de KOH o NaOH en concentraciones del 0.01-0.05 N (Osmond *et al.*, 1994). La acidificación se expresa como el incremento nocturno del ácido málico en unidades de equivalentes de acidez o concentraciones de iones hidrogeno (H⁺) por peso fresco, por área o por volumen de agua de los tejidos (Medina *et al.*, 1989).

El pH del punto final de la titulación depende del pK del ácido involucrado ($pK = -\log [K]$, donde [K] denota la concentración de una base requerida para disociar 50% del ácido; (Nelson y Cox, 2000). Como el ácido málico tiene un pK₁ de 3.4 y un pK₂ de 5.1 a 25°C, la titulación a pH 6.5 o a 7 remueve 99% del H⁺ que puede disociarse (Nobel, 1988; Osmond *et al.*, 1994). Para las especies que también acumulan ácido cítrico (Luttge, 2006), el cual tiene tres carboxilos, se necesitaría titular hasta un pH de 8.4 para remover la mayor parte de H⁺, ya que el pK₃ del ácido cítrico es de 6.4 (Franco *et al.*, 1990).

Cuando se recolectan muchas muestras y la titulación no se puede hacer inmediatamente se recomienda almacenar las muestras en etanol al 80%, en hielo seco o en nitrógeno líquido. Si se almacenan en etanol al 80%, las muestras deben ser hervidas para evaporar el etanol y posteriormente hervidas con agua para extraer el ácido málico; también las muestras congeladas deben ser hervidas con agua. En todo caso debe evitarse la evaporación total del agua y enfriar el extracto antes de la titulación (Osmond *et al.*, 1994).

El CRA es la expresión más usada para medir el nivel de agua de un tejido. Es una medida del contenido de agua respecto al total de agua que este puede almacenar, se expresa como porcentaje y permite conocer el estado hídrico de la planta. Se relaciona

con el potencial hídrico porque este y sus componentes (potencial de presión y de solutos) son función del volumen de agua del protoplasma (Argentel *et al.*, 2006).

Los niveles de estrés hídrico y estado hídrico de una planta se pueden observar mediante distintos métodos, entre ellos el análisis de contenido relativo de agua (CRA) (Chaman, 2007) el cual se obtiene en porcentaje midiendo el peso fresco de la hoja de la planta inmediatamente después de cortarla, después el peso túrgido seguido de una estancia por 12 horas en agua y el peso seco obtenido luego de mantenerlas en ambiente caliente hasta tener un peso constante. Luego se utiliza la formula $CRA = \frac{PF - PS}{P T - PS} \times 100$ de acuerdo a Kramer (1974).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal

Se trabajó con plántulas de dos especies de *Agave*: *A. salmiana* y *A. striata*, ambas de las zonas áridas del estado de San Luis Potosí. En los cuales se midió la fluctuación de acidez por la noche y día bajo diferentes condiciones de humedad y en distintas etapas de desarrollo. Las plántulas se produjeron a partir de semilla, estas semillas fueron recolectadas en la carretera numero 57 de el municipio de Villa de Arista, S.L.P. Las semillas se sembraron en semilleros de poliestireno de 200 cavidades, en un sustrato formado por 50% suelo de campo y 50% arena previamente esterilizado el 22 de Agosto de 2013 (Figura 2). Los semilleros se colocaron dentro de invernaderos de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la U.A.S.L.P.



Figura 2. Recolección de semillas, preparación del sustrato y siembra de semillas de *A. salmiana* y *A. striata*.

Para observar diferencias y semejanzas de la actividad CAM (acidez) en las plántulas debidas al ambiente, se utilizaron dos condiciones de humedad. Las plántulas con edad de dos meses y medio y con hoja cotiledonar y las primeras dos hojas laterales expuestas y de un tamaño promedio se dividieron en dos grupos. A un grupo se le restringió el riego, de manera que se le indujo un contenido de humedad del sustrato bajo. Al otro grupo se le mantuvo humedad adecuada con riego frecuente (Figura 3).



Figura 3. Semilleros de 200 cavidades con *Agaves* en diferentes condiciones hídricas, arriba un semillero con 200 *Agaves* con semanas ininterrumpidas de riego al sustrato presentando una buena coloración y turgencia aceptable a su especie y abajo uno con semanas sin irrigación alguna al sustrato de agua y signos de coloración y turgencia típicos de un estrés hídrico.

Las muestras se tomaron en tres etapas de desarrollo de las plántulas. Se consideró que cada hoja presenta un grado de desarrollo distinto. Así que se recolectaron la hoja cotiledonar, la primera hoja lateral y la segunda hoja lateral. Las hojas cotiledonares fueron cortadas al nivel del sustrato en forma perpendicular al mismo, las laterales en forma perpendicular al eje de la planta, esto ocurrió inmediatamente después de observar que las plantas ya se encontraban en sus tres primeras etapas de desarrollo y que éstas presentaban ya signos visibles de estrés hídrico tales como coloración púrpura, ausencia de turgencia en las hojas y esto fue después de un tiempo considerable de 12 semanas con inducción a sequía la mitad de la cantidad de plantas, se fijaron como días de recolección de muestras el 22 y 23 de Noviembre de 2013. Las muestras se recolectaron en la noche (20:00 h), antes del amanecer (5:00 h), después del amanecer (7:00 h), al medio día (12:00 h) y al atardecer (18:00 h). Todas las hojas fueron lavadas con agua destilada y secadas con toallas absorbentes en campo para eliminar residuos, una vez identificadas, se colocaron en nitrógeno líquido para inactivar la actividad fisiológica (Figuran 4). Las estimaciones de acidez en el tejido se realizaron posteriormente en laboratorio.



Figura 4. Corte de las muestras, identificación y congelamiento en nitrógeno líquido para su posterior análisis en laboratorio.

Titulación del Tejido

La acidez de los tejidos se evaluó con el método propuesto por la AOAC (Association of Official Analytical Chemists, 1990). Las muestras a evaluar se pesaron con una balanza analítica marca Ohaus Explorer y posteriormente se maceraron en un mortero con 50ml de agua destilada. Después de macerar, la muestra se centrifugó por 10 minutos a 1500 rpm en una centrífuga marca HERMLE Z300. Del sobrenadante se tomaron tres alícuotas de 15ml que fueron valoradas cada una con hidróxido de sodio 0.01 N. Como indicador de la neutralización de la acidez se utilizó fenolftaleína que es un compuesto químico orgánico el cual ocasiona un cambio en la solución incolora que es ácida a un color rosado en presencia de bases (Figura 5). De esa manera se calculó el porcentaje de ácido málico respecto a la masa fresca mediante la siguiente relación:



Figura 5. Alícuota de una de las repeticiones de las muestras al momento de ser titulada y alícuotas ya tituladas con la coloración característica de la interacción del hidróxido de sodio con el indicador fenolftaleína.

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

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 Chemists, 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.

Medición del Contenido Relativo de Agua (CRA)

Antes de la medición de contenido de ácido málico en las muestras, se realizó la medición de contenido relativo de agua para verificar que en realidad se estuviese comparando la actividad CAM entre muestras con estrés hídrico y muestras en óptimas condiciones hídricas.

El CRA se calculo mediante la formula $CRA = \frac{PF - PS}{PT - PS} \times 100$ de acuerdo con Kramer (1974). A cada muestra se le midió el peso fresco (el peso de la hoja al cortarla de la planta (PF)). Enseguida se coloco cada muestra en frascos de vidrio con agua destilada durante 24 horas después de las cuales se registro nuevamente su peso obteniendo el dato de peso túrgido (PT). La muestra se coloco después en una estufa a 60°C hasta tener peso constante, es decir, el peso seco (PS).

Medición de la Conductividad Eléctrica

Al tiempo que se midió el contenido relativo de las muestras, se midió también la conductividad eléctrica como otro indicativo del nivel de estrés ambiental que tenían las muestras con riego y las muestras inducidas a sequía.

La medición de la conductividad eléctrica de las muestras se llevó a cabo de la manera siguiente: primero se pesaron cada una de las muestras en una balanza analítica, a continuación se vertieron 70 mililitros de agua destilada en frascos de vidrio. Para conocer la conductividad inicial del agua usada como medio de resuspension, se le tomó

el dato de conductividad eléctrica con un conductímetro portátil marca WATERPROOF PcsTestr 35 Multi-Parameter, esto antes de introducir las muestras cada una en su respectivo frasco con agua destilada (Figura 6). Se anotó ese dato y después de 30 segundos contabilizados se introdujo la primer muestra en uno de los frascos, 30 segundos mas tarde se introdujo a otro frasco la siguiente muestra y de esa manera consecutivamente hasta el total de muestras.

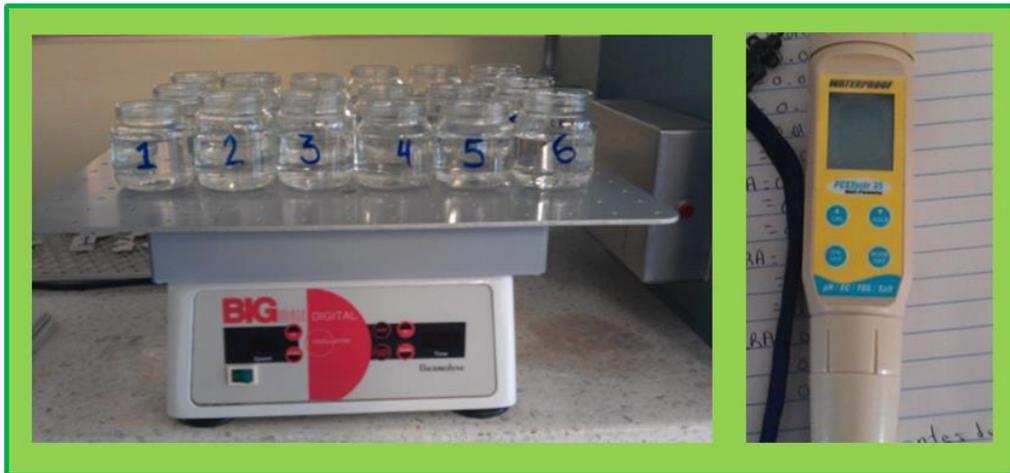


Figura 6. Frascos correspondientes a cada repetición de las muestras con agua destilada en la agitadora para tomar lectura de su conductividad eléctrica con el conductímetro portátil.

Todos los frascos se pusieron en un agitador eléctrico marca Thermolyne digital el cual comenzó a funcionar y después de 30 minutos en agitación se comenzó a tomar datos de la conductividad eléctrica en con el conductímetro, después de tomar el dato a una muestra sin dejar de agitar el frasco se esperaron 30 segundos para tomar lectura al segundo frasco, de esa forma consecutivamente hasta completar el total de muestras. El proceso de la toma de lecturas se repitió cuatro veces hasta completar un ciclo de 120 minutos. Se tomó lectura de la conductividad eléctrica en μScm^{-1} cada 30 minutos mediante el procedimiento correspondiente en un ciclo de 120 minutos en las muestras con riego y un ciclo de 90 minutos en las muestras inducidas a sequía, posteriormente los datos obtenidos se dividieron entre el peso de cada repetición de la muestra y se sacó

un promedio de cada muestra en los diferentes horarios en que se tomo la lectura de conductividad eléctrica.

Diseño de Experimento y Análisis

El experimento se realizó acorde con un diseño completamente aleatorio con tres repeticiones. Se evaluaron los factores especie (*A. striata* y *A. salmiana*) y nivel de humedad en el sustrato (bien irrigado y con suspensión del riego). La oscilación de acidez titulable y la conductividad eléctrica en el medio de resuspensión se analizaron de forma gráfica en el tiempo, considerando el promedio y el error estándar. El contenido relativo de agua se analizó con un análisis de varianza ($\alpha \leq 0.05$) y comparación múltiple de medias de Tukey. Los gráficos se realizaron con el programa Excel y el análisis estadístico con el programa SAS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La cantidad de ácido málico cuantificada en *A. salmiana* fue más baja que la observada en *A. striata* (Figuras 7, 8 y 9). Este hecho indica que la magnitud de ácido málico en las plantas CAM es una característica que depende de la especie. La mayor cantidad de ácido málico en *A. striata* puede deberse a que esta especie es menos suculenta, y tiene mayor cantidad de clorénquima por unidad de volumen que *A. salmiana*. En *A. salmiana* el ácido málico se diluye en el tejido que almacena agua. Las hojas de agave generalmente son gruesas y suculentas, aunque algunas especies son de consistencia dura como *A. striata*, (Verduzco *et al*, 2008). El *A. salmiana* es una planta robusta, sus hojas son carnosas y macizas, ha sido una de las especies mas importantes del país debido al aprovechamiento de su abundante savia fresca para aguamiel o pulque (Vargas, 2009).

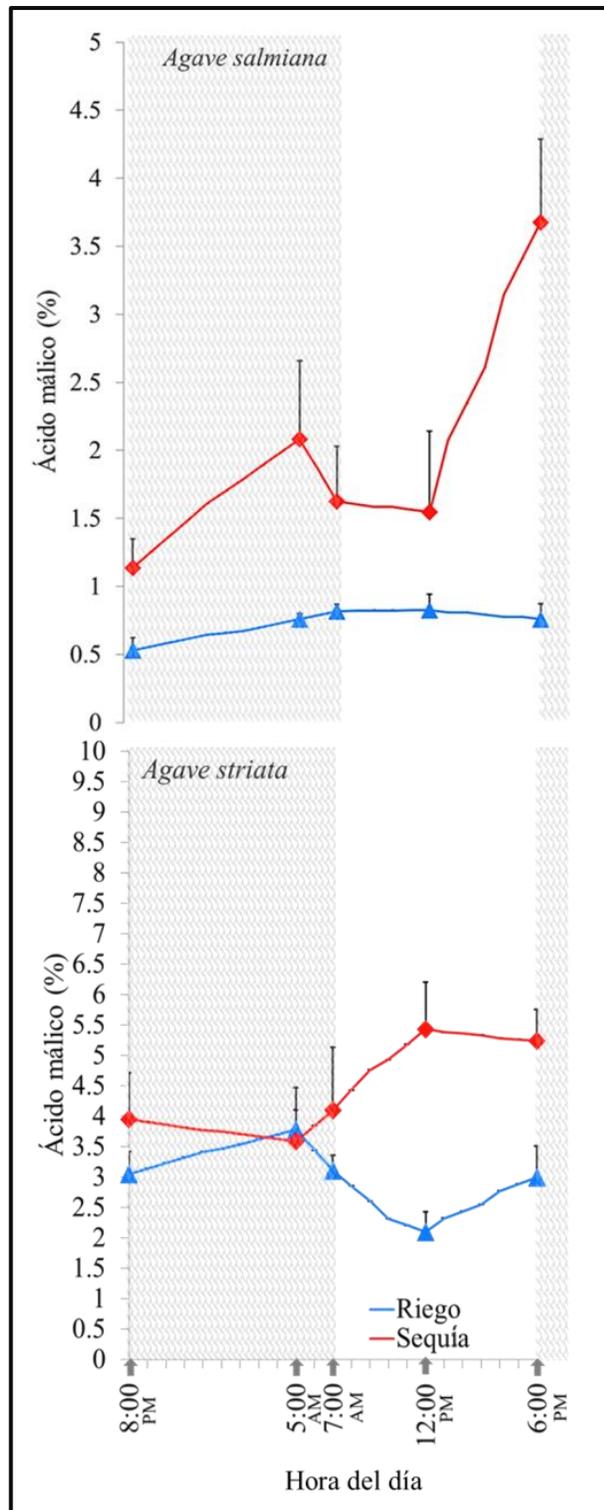


Figura 7. Porcentaje de ácido málico a lo largo del día (Periodo diurno ) y noche (Periodo nocturno ) de la hoja Cotiledonar de *A. salmiana* y *A. Striata* en condiciones de riego y de sequía. Las barras verticales indican un error estándar., n= 5.

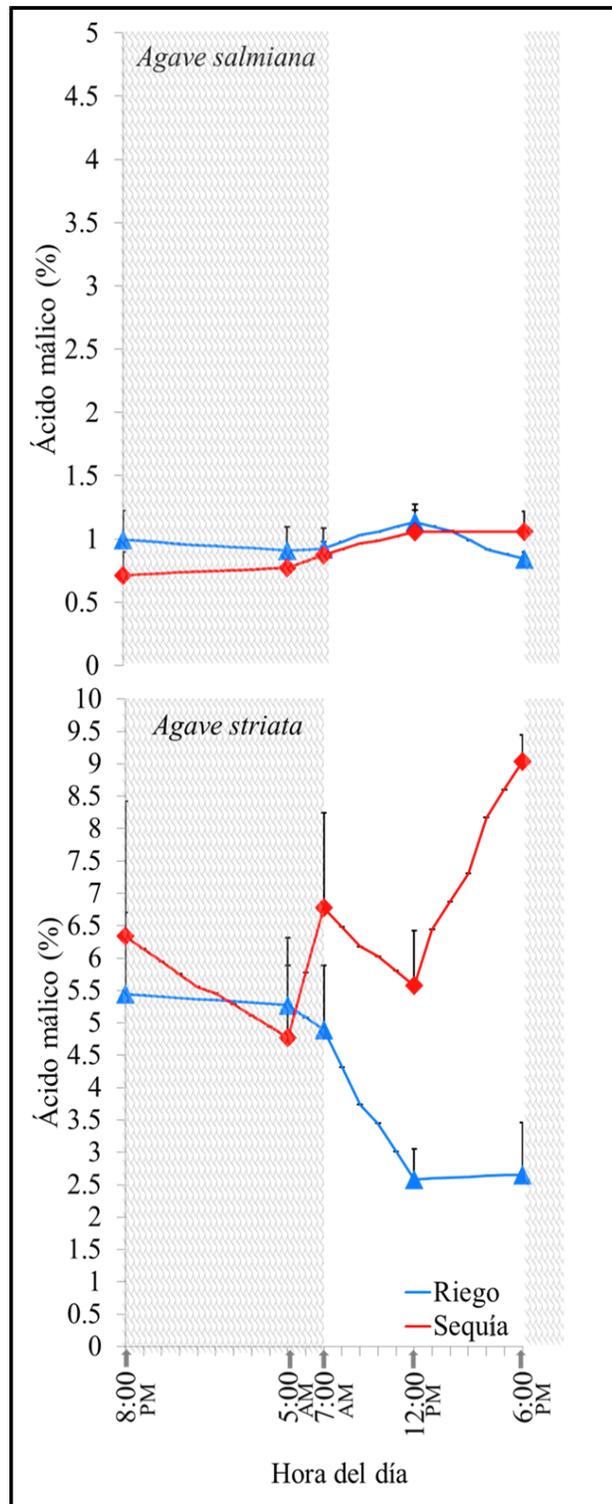


Figura 8. Porcentaje de ácido málico a lo largo del día (Periodo diurno ) y noche (Periodo nocturno ) de la primer hoja lateral de *A. salmiana* y *A. Striata* en condiciones de riego y de sequía. Las barras verticales indican un error estándar., n= 5.

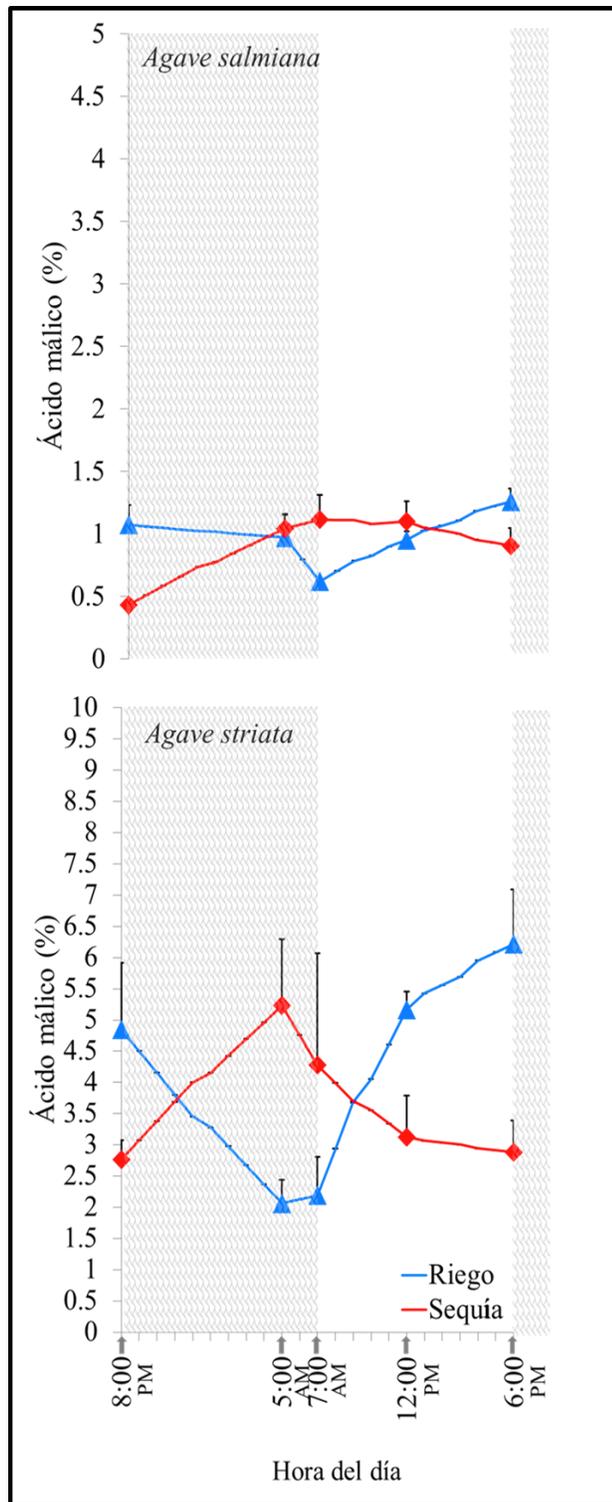


Figura 9. Porcentaje de ácido málico a lo largo del día (Periodo diurno ) y noche (Periodo nocturno ) de la segunda hoja Lateral de *A. salmiana* y *A. Striata* en condiciones de riego y de sequía. Las barras verticales indican un error estándar., n= 5.

En *A. salmiana* la acidez en condiciones de sequía se elevó durante el periodo diurno en su primer hoja lateral (Figuras 8), y ocurrió lo contrario en la hoja cotiledonar (Figura 7). La oscilación de la acidez en la hoja cotiledonar tiende a coincidir con el patrón de variación de las plantas CAM, lo que no ocurrió con todas las hojas laterales. Esto podría indicar que conforme avanza el desarrollo de la planta encontrándose en condiciones ambientales de sequía no aparece ni se perfecciona el metabolismo CAM, sino que esta presente desde el desarrollo inicial, en la hoja cotiledonar. Lo anterior se afirma por lo menos en el desarrollo de las primeras tres hojas ya que no se muestró otras etapas mas avanzadas, podría tratarse de una aparición de fotosíntesis CAM en etapas muy avanzadas de desarrollo tanto en condiciones ambientales de sequía como de riego y dependería mas bien de otros factores como genética propia de la especie. La expresión de la ruta CAM se ha estudiado principalmente en magueyes adultos, es decir que tienen más de 5 años de edad. El estado del conocimiento de la expresión de esta ruta en las primeras etapas del ciclo de vida de las plantas CAM adultas es incipiente o nulo (De la Barrera y Andrade, 2005) lo cual coincide y explica los resultados obtenidos y observados en las gráficas de curvas de acidez de todas las etapas de desarrollo del *A. salmiana* estudiadas. Los resultados de este trabajo muestran poca o nula la coincidencia de la variación de la acidez con la propia de la fotosíntesis CAM tanto en condiciones ambientales de sequía como de riego. Ya que se trata de la hoja cotiledonar y las dos primeras hojas laterales después de la germinación, siendo magueyes extremadamente jóvenes.

En *A. salmiana*, en condiciones de riego, la acidez observada en el tejido no mostró una tendencia clara de fotosíntesis CAM en las hojas cotiledonar y primera lateral durante los periodos diurno y nocturno (Figuras 7 y 8). Una ligera variación de la acidez parecida a la típica de las plantas CAM se observó en la segunda hoja lateral (Figura 9). Este resultado lo puede indicar inexistencia de la fotosíntesis CAM (Figuras 7,8 y 9) cuando hay adecuada disponibilidad de humedad y una incipiente aparición de la misma con el desarrollo (Figuras 7, 8 y 9). Una planta de maguey utiliza sus mecanismos de supervivencia (entre ellos el metabolismo CAM) cuando se encuentra en condiciones ambientales extremas de sequía, por lo que en un ambiente donde siempre tiene agua, no es necesario activarlos. Las plantas muestran ante el estrés hídrico respuestas que

tienden a evitarlo o bien mecanismos o adaptaciones que permiten tolerarlo, y ambas estrategias coexisten en cualquier tipo de sistemas (Castelán, 2009).

Las fluctuaciones de acidez observadas en *A. striata* durante los periodos diurno y nocturno tienen una tendencia inversa entre las plantas sometidas a sequía y las plantas con humedad adecuada (Figuras 7,8 y 9). Con base en este hecho se interpreta que en esta especie de *Agave* el comportamiento de la actividad fotosintética en las células es completamente diferente según las condiciones ambientales en que se encuentre, en la cantidad y fluctuación de acidez durante el día y la noche. Por lo cual queda claro que dichas condiciones ambientales sí afectan su metabolismo al elevar o disminuir el ácido málico en sus tejidos, por lo tanto la asimilación del CO₂ en diferentes horas del día según el nivel de hidratación de los mismos. Se ha mencionado que ciertas plantas, entre ellas algunas especies de agaves tienen distinta forma de afrontar problemas para su supervivencia, tienen un comportamiento en condiciones de sequía y otro en condiciones de abundancia de agua y esto se refleja por primera vez en la etapa de desarrollo según dicte la genética propia de su especie, cuando una planta está sometida a unas condiciones significativamente diferentes de las óptimas para la vida se dice que está sometida a estrés, si bien las diferentes especies o variedades difieren en sus requerimientos óptimos y por tanto en su susceptibilidad a un determinado estrés (Hsiao 1973; Levitt 1980). Valladares et al. (2004), mencionan que además hay periodos o etapas de desarrollo como el estadio de plántula, donde las especies pueden ser particularmente sensibles (o insensibles) a un estrés determinado.

En *A. striata* los niveles de acidez en todas las hojas cambiaron drásticamente con el paso del tiempo, la diferencia de acidez entre un horario y otro fue elevada (Figura 7, 8 y 9). Esto indica que en esta especie de *Agave* el comportamiento durante el paso de las horas es rápido y drástico, asegurando rápidamente buenas condiciones a nivel celular, es decir, que esta especie de *Agave* activa o desactiva un metabolismo CAM en muy poco tiempo asimilando el CO₂, la mayor fuente de alimento y conservando el agua que necesita. *A. striata* es una especie muy poco suculenta debido al reducido tamaño de sus hojas, por lo que almacena mayor cantidad de ácido málico en diferentes horas y menor cantidad de agua. De igual manera, si se llega a encontrar frente a condiciones de sequía

extremas llegaría a un nivel de estrés hídrico o muerte muy rápidamente a diferencia de otras especies más suculentas, ya que al perder la poca agua que poseen por la estructura de sus hojas propia de su especie, ese espacio es llenado con el ácido málico de la acción de la fotosíntesis CAM lo que explica el nivel alto de acidez en sus hojas y el cambio drástico en poco tiempo pues son poco suculentas y tienen poca agua almacenada. Las hojas de agave se originan en forma espiral, generalmente son gruesas y suculentas, aunque algunas especies son de consistencia dura como *A. striata* (Verduzco et al., 2008).

En condiciones de sequía *A. striata* presenta una curva de acidez típica del metabolismo CAM en la segunda hoja lateral (Figura 9) y en la primer hoja lateral muestra una ligera tendencia aumento de la acidez por la noche, tal como ocurre en la fotosíntesis CAM. Esto indica que en esta especie de *Agave* conforme avanza el desarrollo y la planta se encuentra en condiciones adversas, va apareciendo o bien, perfeccionando dicho metabolismo para su supervivencia, también indica que cambia su ruta fotosintética al pasar de una etapa de desarrollo a otra de C_3 a CAM cuando se encuentra frente a condiciones ambientales adversas. Cuando los magueyes nacen, aun no han madurado todos sus mecanismos celulares puesto que en la semilla se encuentran todos los nutrientes y las condiciones necesarias para su supervivencia inicial. Las semillas son estructuras reproductoras que garantizan la supervivencia del embrión desde que este se separa de la planta progenitora hasta que se inicia el crecimiento de la plántula (Simón y Moysset, 2006). Es decir que no presentan de forma inmediata un estrés hídrico o de otro tipo, por lo cual no es necesario activar mecanismos de supervivencia de forma inmediata a la germinación (hoja cotiledonar), en este trabajo no se quitó el riego a ninguna plántula hasta que completó tres etapas de desarrollo (tres primeras hojas) y por lo tanto recibieron nutrientes y agua mientras creció la hoja cotiledonar, esta fue la que menor tiempo estuvo sometida a estrés hídrico a diferencia de las hojas laterales que emergieron después.

En todas las hojas del *Agave* muestreadas se observó un mayor contenido relativo de agua cuando crecieron bien irrigadas que cuando se sometieron a déficit de agua, tal como se sugirió en la hipótesis (Figura 10). Esto indica que las hojas si percibieron un

grado de estrés hídrico al quitarles riego durante sus primeras etapas de desarrollo. Se considera que la sequía es un evento ambiental y meteorológico, y se define como la ausencia de lluvia durante un tiempo suficientemente largo como para causar carencia de humedad en el suelo y daño en las plantas. Si dicha sequía es un estrés ambiental de suficiente duración, produce un déficit de agua en las plantas, que a su vez afecta los procesos fisiológicos. El estrés hídrico afecta la distribución de biomasa (Kramer, 1980).

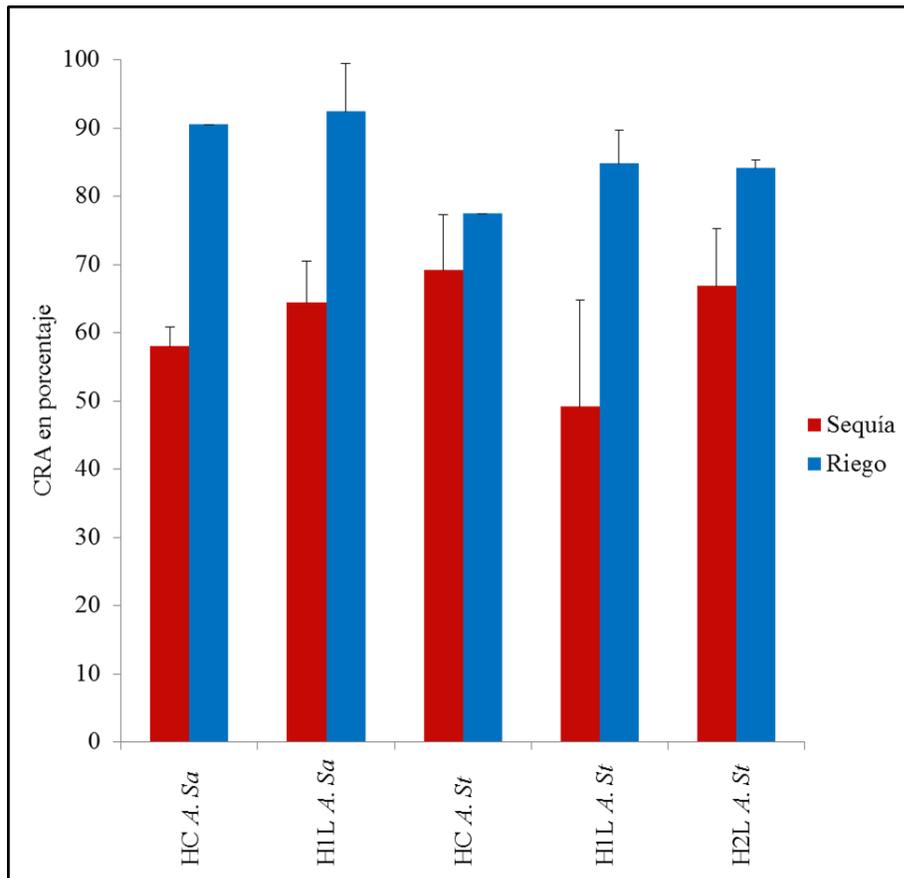


Figura 10. Porcentaje de contenido relativo de agua en hojas cotiledonar (HC), primera lateral (H1L) y segunda lateral (H2L) de las especies *A. salmiana* (*A.Sa*) y *A. striata* (*A.St*) inducidas a condiciones de sequía y condiciones de riego. Los datos representan la media \pm error estándar. $n= 36$.

A. striata muestra una menor disminución de contenido relativo de agua en el mismo tiempo de inducción a sequía que *A. salmiana*, por lo tanto un menor estrés hídrico. Lo

anterior a pesar de que *A. striata* es una especie mucho menos suculenta y con mayor cantidad de clorénquima en sus hojas. En palabras de la clave taxonómica (Gentry, 1982) *A. striata* tiene roseta cespitosa (crecimiento apiñado a partir de la producción de ramas basales, brotes basales o bulbillos), hojas 0.8 a 1.5 centímetros de ancho, duras, rígidas, con espinas erectas (figura 11). Vargas (2009) menciona que *A. salmiana* es una planta robusta, de tamaño mediano a grande, forma rosetas macizas de 1.5 a 2 metros de alto e igual o mas de ancho, hojas carnosas y macizas (figura 12).



Figura 11. Ejemplares de *A. striata* en su hábitat natural. Moro Andrea, Barcelona España.

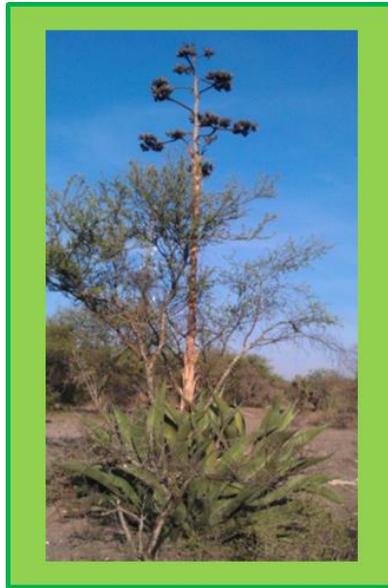


Figura 12. Ejemplar de *A. salmiana* en su hábitat natural. Ruiz García, 2013, Villa de Arista, San Luis Potosí, México.

En la hoja cotiledonar de *A. salmiana* y *A. striata* el cambio en el CRA entre las muestras con riego y las muestras inducidas a sequía fue más drástico que en las demás hojas (de 10 a 35% mayor en muestras con riego). Esto nos dice que la hoja cotiledonar está provista de condiciones de supervivencia distintas que las hojas laterales, lo que la vuelve muy diferente de las demás hojas y por lo tanto puede haber una diferencia muy significativa de la actividad del metabolismo CAM. Peter *et al.*, (1992) mencionan que durante todo el periodo de formación del embrión de una planta en una semilla se establece un flujo continuo de nutrientes entre la planta madre y los tejidos del óvulo. De manera que se produce un almacenamiento masivo de productos de reserva dentro del endosperma o cotiledones de la semilla en desarrollo.

Después con los mismos resultados, se realizó un análisis estadístico ANAVA (análisis de Varianza) de dos factores que es una técnica de diseño de experimentos que se emplea para el estudio de los efectos que pueden tener dos factores A y B sobre una variable respuesta, suponiendo que pueda existir interacción entre ambos, permite el estudio de la influencia individual de ambos factores como de su posible interacción (Núñez, 2001) y una prueba alternativa de Tukey que consiste en comparar el valor

absoluto de las diferencias entre las medias con el rango menos significativo de Tukey (R_T) que es el producto del rango estudentizado de Tukey (r_T) por la desviación típica de las diferencias (O_T), si el valor absoluto de una de las diferencias es mayor que R_T , se consideran las medias correspondientes significativamente diferentes (Vargas, 1995), obteniendo los siguientes resultados en el cuadro 1 y 2.

Cuadro 1. Resultado del ANAVA de dos factores con los datos de contenido relativo de agua de las muestras de dos especies de *Agave* en dos condiciones hídricas.

Fuente de variación	DF	Tipo III SS	Cuadrado	Valor de F	Pr>F
Especie	1	89	89	1.04	0.3252
Condición hídrica	1	2689	2689	31.31	<.0001
Especie x condición hídrica	1	58	58	0.67	0.4261

Cuadro 2. Prueba de Tukey: Nivel de significancia, condición hídrica con los datos de contenido relativo de agua de las muestras de 2 especies de *Agave* en dos condiciones hídricas.

Condición hídrica	Significancia	N	Agrupación Tukey
Riego	86.0	9	A
sequía	61.6	9	B
Especie	Significancia	N	Agrupacion Tukey
<i>A. salmiana</i>	77.016	6	A
<i>A. striata</i>	72.291	12	A

No se encontró diferencia significativa entre especies por las diferentes condiciones hídricas (Cuadro 1), lo que significa que no hay mucha diferencia entre los *A. salmiana* y los *A. striata* entre si al inhibirles o no el riego. Esto indica que en condiciones ambientales iguales una especie de *Agave* no alcanza un nivel de estrés mucho más alto

o diferente que la otra de las especies aquí estudiadas. Según la prueba de Tukey (Cuadro 2) las especies son estadísticamente iguales, lo cual indica que se llegó a un nivel de estrés y condición de riego igual.

Se observó una diferencia significativa de los CRA entre condiciones hídricas en ambas especies (Cuadros 1 y 2). Esto significa que en ambas especies a las que se les indujo estrés hídrico, sí se logró tal objetivo para posteriormente estudiar el comportamiento o aparición de la actividad CAM en *A. salmiana* y *A. striata* en distintas condiciones hídricas. La reducción del CRA podría considerarse evidencia de que la restricción de humedad en el sustrato produce un estrés hídrico en las plántulas de *Agave*. Para inducir a un estrés hídrico, el tiempo de restricción de humedad depende de las condiciones ambientales del sitio de producción, el tipo de sustrato y envase utilizado, así como la especie y sus características morfológicas (Prieto, 2004).

Se midió también la conductividad eléctrica y los resultados se graficaron por cada hoja y especie tanto en condiciones de riego como en condiciones de sequía (Figura 13 y Figura 14) y arrojaron los siguientes resultados:

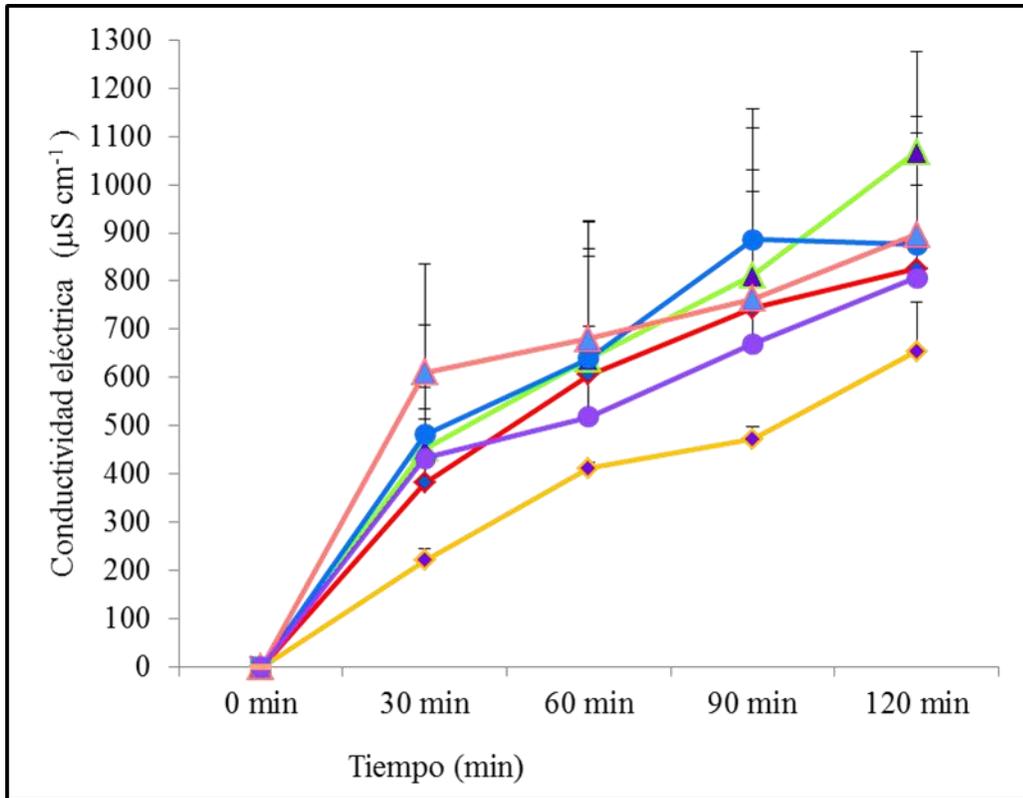


Figura 13. Conductividad eléctrica de muestras con riego en $\mu\text{S cm}^{-1}$ de las hojas *A. salmiana* cotiledonar (—◆—), *A. salmiana* primera lateral (—▲—), *A. salmiana* segunda lateral (—●—), *A. striata* cotiledonar (—◆—), *A. striata* primera lateral (—▲—) y *A. striata* segunda lateral (—●—) cada 30 minutos en un ciclo de 120 minutos. Las líneas verticales en cada punto representan el error estándar.

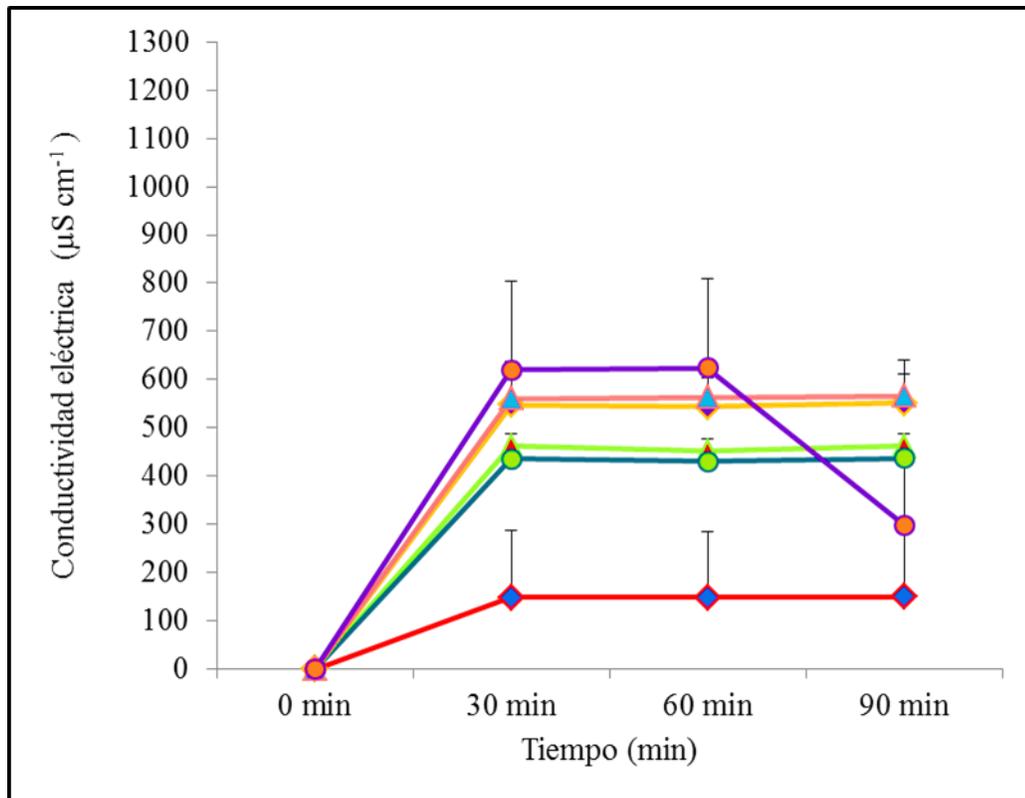


Figura 14. Conductividad eléctrica de muestras con estrés hídrico en $\mu\text{S cm}^{-1}$ de las hojas *A. salmiana* cotiledonar (Sa HC \blacklozenge), *A. salmiana* primera lateral (Sa H1L \blacktriangle), *A. salmiana* segunda lateral (Sa H2L \blacklozenge), *A. striata* cotiledonar (St HC \blacklozenge), *A. striata* primera lateral (St H1L \blacktriangle) y *A. striata* segunda lateral (St H2L \blacklozenge) cada 30 minutos en un ciclo de 90 minutos. Las líneas verticales en cada punto representan el error estándar.

La conductividad eléctrica en todas las hojas con riego tuvo una magnitud mayor a los seiscientos μScm^{-1} a los 90 minutos, mientras que en las hojas con estrés hídrico fueron todas por debajo de los seiscientos μScm^{-1} (Figura 13 y 14). Las muestras en sequía tienen una mayor estabilidad de conductividad eléctrica que las muestras en condiciones de riego.

Esto indica que los *Agave* en condiciones de riego se encuentran mas dañados e inestables quizá porque también sufren un estrés hídrico inverso o de inundación al ser regadas todos los días mientras que los que están en estrés hídrico se muestran más

estables por el hecho de que son plantas adaptadas a condiciones de sequía y se encuentran preparadas más para enfrentar esta situación que una inundación, recordando que se trata de plantas suculentas en condiciones ambientales normales y de sequía. El *A. salmiana* prospera con éxito en climas que van de semiseco a seco y con una precipitación pluvial de 320 a 720mm anuales (Gentry, 1982).

CONCLUSIONES

El contenido de ácido málico en los tejidos de las especies *A. striata* y *A. salmiana*, como indicador de la fotosíntesis CAM, varía en función de los cambios en el desarrollo de la plántula y de la restricción de humedad. En el caso de *A. striata* las plántulas son más afectadas cuando se encuentran en condiciones hídricas muy elevadas.

La restricción de humedad en el sustrato de plántulas de *Agave* de tres meses de edad durante dos semanas, disminuye el nivel de hidratación de los tejidos creando un estrés hídrico significativo.

Los magueyes de la especie *A. salmiana* y *A. striata* presentaron oscilación de acidez negativas y positivas variables lo que sugiere que son facultativos, es recomendable confirmar estos cambios con otras técnicas.

El nivel de hidratación del tejido se asocia con la actividad fotosintética CAM. Un nivel alto de hidratación del tejido expresa una actividad CAM completamente opuesta a las de las plantas que tienen un nivel bajo de hidratación del tejido. Este hecho es más notable en *A. striata* por la menor succulencia en sus hojas y menor grado de estrés hídrico comparado con *A. salmiana*.

LITERATURA CITADA

- Acevedo E., Badilla I. y Nobel P. 1983. Water relations, diurnal acidity changes, and productivity of a cultivated cactus, *Opuntia ficus-indica*. *Plant Physiology*. 72. Pp: 775-780.
- Andrade J.L., de la Barrera E., Reyes C., Ricalde F., Vargas G. y Cervera C. 2007. El Metabolismo Acido de las Crasuláceas: Diversidad, Fisiología Ambiental y Productividad. Unidad de Recursos Naturales, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Mérida, Yucatán. P:15.
- Argentel L., González L.M., Ávila C. y Aguilera R. 2006. Cultivos Tropicales. Comportamiento del contenido relativo de agua y la concentración de pigmentos fotosintéticos de variedades de trigo cultivadas en condiciones de salinidad. vol. 27, núm. 3. Pp: 49-53.
- Association of Official Analytical Chemists, 1990.
- Bidwell R.G.S. 1979. Fisiología Vegetal. AGT Editor. S.A. México. D.F. Pp: 10-690.
- Castelan M. L. 2009. Plantas mexicanas adaptadas a la sequia: dos nuevos modelos para el estudio de la tolerancia al estrés hídrico. P: 8.
- Chaman M.E. 2007. Variaciones en el contenido relativo de agua y la concentración de prolina en *Capsicum annum* L. inducido por NaCl. Pp: 253-255.
- Chu C., Dai Z., Ku M.S.B. y Edwards G.E.1990. Induction of CAM in the facultative halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* by abscisic acid. *Plant Physiology* 93, Pp: 1253-1260.
- Cushman J.C. y Borland A.M. 2002. Induction of Crassulacean acid metabolism by water limitation. *Plant, Cell & Environment* .25. Pp: 295 –310.
- De la Barrera E. y Andrade J.L. 2005. Challenges to plant megadiversity: how environmental physiology can help. *New Phytologist* .167. Pp: 5-8.
- Franco A.C., Ball E. y Lüttge U. 1990. Patterns of gas exchange and organic acid oscillations in tropical trees of the genus *Clusia*. *Oecologia* .85. Pp: 108-114.

- García M.A. 2002. Distribución of *Agave* (Agavácea) in México. Cact. Succ. J. (USA) 74. 4. Pp: 177-187
- Gentry H.S. 1982. Agaves of continental North America. Pp: 30-250.
- Gentry H. S. 1982. Agaves of Continental North America. University of Arizona. USA. P: 670.
- Granados D. 1993. Los Agaves en México. Universidad Autónoma de Chapingo. México. Pp: 9- 72.
- Herppich W., Herppich M. y Von W.D.J.1992. The irreversible C₃ to CAM shift in the well-watered and salt-stressed plants of *Mesembryanthemum crystallinum* is under strict ontogenic control. *Botanica Acta* 105. Pp: 34-40.
- Hsiao T. C. 1973. Plant responses to water stress. *Ann. Rev. Plant Physiology*. 24. Pp: 519-570.
- Kennedy R.A. y Laestsch W.M. 1973. Relationship between leaf development and primary photosynthetic products in the C₄ plant *Portulaca oleracea*. *Planta (Berl.)* Pp: 20-113.
- Kennedy R.A. 1976. Relationship between leaf development, carboxylase enzyme activities and photorespiration in the C₄ plant *Portulaca oleracea* L. *Planta* 128. Pp: 149-154.
- Koch K.E. y Kennedy R.A.1982. Crassulacean Acid Metabolism in the succulent C₄ dicot, *Portulaca oleracea* L under natural environmental conditions. *Plant Physiology* 69. Pp: 757-761.
- Kramer P.J. 1974. Relaciones hídricas de suelos y plantas. Edutex S.A. México. P: 538.
- Kramer P. J. 1980. Drought, stress and the origin of adaptations. Adaptations of plants to water and high temperature stress. Pp: 7-18.
- Kraybill A.A. y Martin C.E. 1996. Crassulacean Acid Metabolism in three species of the C₄ genus *Portulaca*. *International Journal of Plant Sciences* 157. Pp: 103-109.

- Lara M.V., Drincovich M.F. y Andreo C.S. 2010. Transiciones metabólicas en la fijación fotosintética del carbono en plantas del género *Portulaca*. Consejo Superior de Investigaciones Científicas - Fundación Ramón Areces. Madrid, España. Pp: 43-55
- Levitt J. 1980. Responses of plants to environmental stresses. Academic Press, New York.
- Lira S. R.H. 2007. Fisiología Vegetal. Editorial Trillas, México. P: 237.
- Lüttge U. 2006. Photosynthetic flexibility and ecophysiological plasticity: questions and lessons from *Clusia*, the only CAM tree, in the neotropics. *New Phytologist* .171. Pp: 7-25.
- Martin V.J. 1999. La influencia del clima en la historia. Arco Libros, Madrid. Pp: 15-90.
- Medina E. 1987. Aspectos ecofisiológicos de plantas CAM en los trópicos. *Revista Biología Tropical*. 35. Pp: 55-70.
- Medina E., Olivares E., Díaz M. y Van D.M.N. 1989. Metabolismo ácido de crasuláceas en bosques húmedos tropicales. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden* .27. Pp: 56-67.
- Müller G., Drincovich M.F., Andreo C.S. y Lara M.V. 2010. Role of photosynthesis and analysis of key enzymes involved in primary metabolism throughout tobacco flower lifespan. 61. Pp: 3675-3688.
- Nelson D.L. y Cox M.M. 2000. *Lehninger Principles of Biochemistry*. Worth Publishers, Nueva York.
- Nobel P.S. 1988. *Environmental Biology of Agaves and Cacti*. Cambridge University Press, Nueva York.
- Nobel P.S. 1998. Los Incomparables Agaves y Cactus. Editorial Trillas. México, D.F. Pp: 5-162.
- Núñez L.P.J. 2001. Análisis experimental de la calidad superficial en procesos de eliminación de material. Ediciones de la Universidad de Castilla-La Mancha.

- Tesis doctorales. Servicio de publicaciones de la universidad de Castilla-La Mancha. P:39.
- Osmond C.B., Adams W.W. y Smith S.D. 1994. Crassulacean acid metabolism. En: Pearcy R.W., Ehleringer J., Mooney H.A. y Rundel P.W. Eds. *Plant Physiological Ecology. Field Methods and Instrumentation*. Chapman y Hall, Londres. Pp: 255-280.
- Pedroza S.A. y Gómez. F. 2006. La Sábila. Universidad Autónoma Chapingo. México. Pp: 62-63.
- Peter H., Ray F. V. y Eichhorn E.S. 1992. Biología de las plantas Volumen 2. Ed Reverte. P: 379.
- Prieto R.J.A. 2004. Factores que influyen en la producción de planta de *Pinnus* spp. En vivero y en su establecimiento de campo. Pp: 32-46.
- Raya P. J.C. y Aguirre M.C.L. 2008. Aparición y Evolución de la Fotosíntesis C4. Revista Chapingo. Chapingo, México, Pp: 45-50.
- Simón M.E. y Moysset A.LI. 2006. Prácticas de crecimiento y desarrollo de los vegetales. Departamento de Biología Vegetal. Textos docentes 248. Publicaciones y ediciones de la Universidad de Barcelona. España. 1. P: 3.
- Taybi T. y Cushman. 2002. Abscisic acid signalling and protein synthesis requirements for phosphoenolpyruvate carboxylase transcript induction in the common ice plant. *J. Plant Physiology*. 159. Pp: 1235- 1243.
- Valladares F., Vilagrosa A., Peñuelas J., Ogaya R., Camarero J.J., Corcuera L., Sisó S. y Gil P.E. 2004. Ecología del bosque mediterráneo en un mundo cambiante. P: 165.
- Vargas C.G. 2009. Obtención de insumos de interés industrial a partir de las fructanas del agave mezcalero potosino (*Agave salmiana*). Pp: 19-20.

- Vargas S.A. 1995. Estadística descriptiva e inferencial .Colección ciencia y técnica. Servicio de publicaciones de la universidad de Castilla-La Mancha. P: 427.
- Vázquez D.E. 2010. Cambios de Acidez en Hojas del Maguey *Agave salmiana* (Otto Ex Salm-Dyck) dependientes de la edad de la hoja y la planta. Tesis de maestría en ciencias. Colegio de Posgraduados. Montecillo, Estado de México. Pp: 12-68.
- Verduzco M.J., Predo R.C.I. y Mercado R. 2008. Caracterización e identificación taxonómica del maguey . P: 79.