

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE INGENIERÍA**

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA



**INDICADORES NUTRICIONALES Y BIOQUÍMICOS DEL
METABOLISMO DEL NITRÓGENO
EN *Agave tequilana* Weber**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR CIENCIAS
PRESENTA**

Cecilia Velez Gutierrez

DIRECTOR

Jaime Xavier Uvalle Bueno

CODIRECTOR

Miguel Juan Beltrán García

Mexicali, B. C.

Diciembre, 2011

Agradecimientos

Gracias a Dios, por concederme la vida, la salud y acompañarme en cada proyecto que decido emprender.

A mis padres, con todo mi amor y respeto.

*A Miguel Juan por ser uno de mis motores hacia la superación profesional y mi compañero de aventuras por más de 20 años.
Con amor para ti.*

*A Miguel BV, gracias por acompañarme y llenarme de amor.
Hijo, compartamos este logro!!*

A la familia Villalobos-Vélez, por su cariño y apoyo constante.

Dr. Uvalle, agradezco sus enseñanzas profesionales, personales y académicas. Gracias por su esfuerzo constante.

A todos mis profesores por sus enseñanzas.

A Casa Cuervo, compañía donde desarrollo y aplico mis conocimientos.

Amigos y compañeros de Casa Cuervo: Leo, Beto, Marta (sin "h"), Ady, Contreras, Alex, Ruben, Mario, Mariana, Lucy y Karla gracias por su colaboración, apoyo, cariño y respeto.

Ing. David, gracias por su confianza y amistad.

Sr. Eleuterio, gracias por su reconocimiento, apoyo y amistad.

*Gracias a mis compañeros de la Generación 2008-2011 Nodo Guadalajara:
Cynthia, Karla, Mirna, y David*

Un agradecimiento especial al Dr. Ignacio Del Real Laborde de Promoción y Fomento de Agave S. de R. L. de C. V. filial de Tequila Sauza, S. de R. L. de C. V. por la donación de 300 plántulas micropropagadas; así como al Dr. Fernando Santacruz Ruvalcaba Prof. Investigador de la Universidad de Guadalajara por la donación de las plántulas "H" y "ES".

Agradezco al CONACyT por soportar mis estudios de Doctorado con la beca no. 69086

Índice general

Resumen	i
Abstract	ii
I. Introducción	1
II. Antecedentes	4
2.1 Generalidades del <i>A. tequilana</i>	4
2.2 Nutrición vegetal del agave	8
2.3 El nitrógeno.....	11
2.3.1 Asimilación de nitrógeno por las plantas.....	15
2.4 Pigmentos fotosintéticos	22
III. Justificación.....	24
IV. Objetivos.....	27
4.1 Objetivo general	27
4.2 Objetivos particulares	27
V. Materiales y Métodos.....	28
5.1 Condiciones de cultivo	28
5.1.1 Adaptación de plántulas "M"	28
5.1.2 Crecimiento de plántulas "H" y "ES".....	30
5.2 Evaluación del crecimiento vegetal	30
5.3 Evaluación nutricional del tejido vegetal.....	30
5.3.1 Determinación de nitrógeno-nitratos.....	31
5.3.2 Determinación de nitrógeno-amoniaco	33
5.3.3 Determinación de sulfatos	34
5.3.4 Determinación de fósforo total	35
5.3.5 Determinación de boro total	36
5.3.6 Determinación de minerales por espectrofotometría de absorción atómica: K, Ca, Mg, Na, Cu, Fe, Mn y Zn.	37
5.3.7 Determinación de molibdeno.....	38

5.4 Ensayos para determinación de actividades enzimáticas.....	39
4.5.1 Extracción de proteínas	39
5.5.2 Cuantificación de proteína	41
5.5.3 Actividad de nitrato reductasa (NR, EC 1.7.1.1).	43
5.5.4 Actividad de nitrito reductasa (NiR, EC 1.7.1.4).....	44
5.5.5 Evaluación de actividad de glutamina sintetasa (GS, EC 6.3.1.2)..	46
5.6 Evaluación de pigmentos fotosintéticos	48
4.6 Análisis estadístico	49
VI. Resultados y Discusión	50
6.1 Adaptación de plántulas "M"	50
6.1.1 Evaluación del crecimiento vegetal	51
6.2 Crecimiento de plántulas en invernadero "H" y "ES"	56
6.2.1 Evaluación del crecimiento.....	57
6.3 Evaluación nutricional del tejido vegetal	64
6.3.1 Macronutrientes	65
6.3.2 Elementos menores o micronutrientes	87
6.4 Medición de actividad enzimática.....	99
6.5 Evaluación de pigmentos fotosintéticos	102
6.6 Demanda nutricional de plántulas de <i>A. tequilana</i>	105
VII. CONCLUSIONES	109
VIII. BIBLIOGRAFÍA	111
ANEXOS:	118

Índice de cuadros

Cuadro 1. Descripción botánica del agave tequilero.....	4
Cuadro 2. Valores de suficiencia en base seca para tejido foliar de agave tequilero cultivado en el estado de Jalisco.	10
Cuadro 3. Composición de las soluciones nutritivas mmol L ⁻¹	29
Cuadro 4. Preparación de la curva de calibración para cuantificación de proteína por el método Bradford.	42
Cuadro 5. Frecuencia de plántulas "M" por número de hojas desarrolladas <i>ex vitro</i> . ..	51
Cuadro 6. Evaluación de parámetros de crecimiento de plántulas de <i>A. tequilana</i> "M" después de 16 semanas de adaptación	54
Cuadro 7. Parámetros evaluados al establecimiento del experimento con plántulas de <i>A. tequilana</i> "H" y "ES".	56
Cuadro 8. Crecimiento en 25 semanas de plántulas de <i>A. tequilana</i> de acuerdo al origen de la plántula "H" y "ES".	57
Cuadro 9. Evaluación del crecimiento en 25 semanas de plántulas "H" y "ES" de <i>A. tequilana</i> por tratamiento.	58
Cuadro 10. Evaluación del color por el método Munsell en plantas de <i>A. tequilana</i> "H".	63
Cuadro 11. Evaluación del color por el método Munsell en plantas de <i>A. tequilana</i> "ES".	64
Cuadro 12. Contenido elemental (mgL ⁻¹) de las soluciones nutritivas.	65
Cuadro 13. Influencia del tratamiento nutricional sobre la cantidad de macronutrientes presentes en tejido foliar de <i>A. tequilana</i> "M"	66
Cuadro 14. Concentración de nitratos (gKg ⁻¹) en tejido de hoja y raíz de plántulas "H" y "ES".	70
Cuadro 15. Concentración de magnesio (g Kg ⁻¹) en tejido de hoja y raíz de plántulas de <i>A. tequilana</i> "H" y "ES" por tratamiento	84
Cuadro 16. Influencia del tratamiento nutricional sobre la cantidad de micronutrientes en tejido foliar del <i>A. tequilana</i> "M" después de 16 semanas de adaptación.....	88

Cuadro 17. Influencia del tratamiento nutricional sobre la cantidad de micronutrientes en tejido foliar del <i>A. tequilana</i> "H" y "ES" después de 25 semanas de crecimiento.	88
Cuadro 18. Promedio de la actividad enzimática por tratamiento de <i>A. tequilana</i> en período de adaptación.	100
Cuadro 19. Evaluación de la actividad enzimática por origen del material	101
Cuadro 20. Evaluación de la actividad enzimática por tratamiento	102
Cuadro 21. Cantidad de clorofila promedio dependiendo del origen de la plántula ...	104
Cuadro 22. Cantidad de pigmentos fotosintéticos por tratamiento en plantas "H" y "ES"	104
Cuadro 23. Relación de longitud, peso fresco y demanda de macronutrientes en plántulas de <i>A. tequilana</i>	105
Cuadro 24. Extracción de hierro por <i>A. tequilana</i> y su relación con la fuente inorgánica nitrogenada	107
Cuadro 25. Requerimiento de molibdeno por plántulas de <i>A. tequilana</i> bajo distintas fuentes inorgánicas nitrogenadas.....	108

Índice de Figuras

Figura 1. El ciclo del nitrógeno	12
Figura 2. Asimilación de nitrógeno por las plantas.....	17
Figura 3. Asimilación de ion amonio vía glutamina sintetasa (GS)-glutamato sintasa (GOGAT).	22
Figura 4. Estructuras químicas de las clorofilas a y b.	23
Figura 5. Estructuras química del β -caroteno.....	23
Figura 6. Consumo anual de agave para la producción de tequila por categoría	25
Figura 7. Exportación anual de tequila por categoría de 2001 a 2010.	25
Figura 8. Establecimiento de plántulas de A. tequilana "M" para adaptación.	50
Figura 9. Diferencia visual entre hojas desarrolladas in vitro y ex vitro.	52
Figura 10. Daño tisular de plántulas de A. tequilana bajo tratamiento C- (NH ₄) ₂ SO ₄	53
Figura 11. Frecuencia de plántulas de A. tequilana "M" de acuerdo al número de hojas desenvueltas en cada tratamiento después de 16 semanas en adaptación.....	54
Figura 12. Crecimiento de plántulas de A. tequilana "M" bajo distintas fuentes de nitrógeno.....	55
Figura 13. Plántulas de A. tequilana "ES" después de 25 semanas en tratamiento nutricional..	59
Figura 14. Plántulas de A. tequilana "H" después de 25 semanas de tratamiento..	60
Figura 15. Clasificación de A. tequilana en base a las tablas de color de Munsell.....	62
Figura 16. Plántulas de A. tequilana "ES" mostraron coloraciones distintas en base a la tabla de color para tejido vegetal de Munsell	63
Figura 17. Acumulación de N-NO ₃ ⁻ en hojas y raíces de A. tequilana "M" en respuesta a 16 semanas de exposición a distintas fuentes de nitrógeno inorgánico..	68

Figura 18. Grafica de medias para contenido de N-NO ₃ (mg Kg ⁻¹) en tejido foliar y radicular base seca de A. tequilana "H" y "ES" por tratamiento (n=10)..	69
Figura 19. Presencia de N-NH ₄ ⁺ en raíces y hojas de A. tequilana "M" después de 16 semanas de exposición a distintas fuentes de nitrógeno inorgánico.	72
Figura 20. Acumulación de NH ₄ ⁺ en hojas y raíces de plantas de A. tequilana "H" y "ES" como respuesta a diferentes fuentes de nitrógeno inorgánico..	73
Figura 21. Acumulación de sulfatos (SO ₄ ²⁻) en hojas y raíces de A. tequilana "M" expuesto por 16 semanas a distintos tratamientos nutricionales.	74
Figura 22. Efecto de tratamientos con nitrógeno inorgánico sobre la cantidad de fósforo total presente en hojas y raíces de A. tequilana "M" después de 16 semanas de exposición.....	76
Figura 23. Acumulación de fósforo hojas y raíces de plantas de A. tequilana "H" y "ES" como respuesta a diferentes fuentes de nitrógeno inorgánico.....	77
Figura 24. Potasio total en tejido de hojas y raíces de plántulas de A. tequilana "M" bajo distintas fuentes de nitrógeno inorgánico por 16 semanas.	79
Figura 25. Acumulación de potasio en hojas y raíces de plantas de A. tequilana "H" y "ES" como respuesta a diferentes fuentes de nitrógeno inorgánico..	80
Figura 26. Efecto de tratamientos con nitrógeno inorgánico sobre la cantidad de calcio total presente en hojas y raíces de A. tequilana "M" después de 16 semanas de exposición.....	81
Figura 27. Acumulación de calcio en hojas y raíces de plantas de A. tequilana "H" y "ES" como respuesta a diferentes fuentes de nitrógeno inorgánico.	82
Figura 28. Efecto de tratamientos con nitrógeno inorgánico sobre la cantidad de magnesio total presente en hojas y raíces de A. tequilana "M" después de 16 semanas de exposición.....	83
Figura 29. Acumulación de magnesio en hojas y raíces de plantas de A. tequilana "H" y "ES" como respuesta a diferentes fuentes de nitrógeno inorgánico..	83
Figura 30. Efecto de tratamientos con nitrógeno inorgánico sobre la cantidad de sodio total presente en hojas y raíces de A. tequilana "M" después de 16 semanas de exposición.....	86
Figura 31. Acumulación de sodio en hojas y raíces de plantas de A. tequilana "H" y "ES" como respuesta a diferentes fuentes de nitrógeno inorgánico..	87

Figura 32. Efecto de tratamientos con nitrógeno inorgánico sobre la cantidad de boro total presente en hojas y raíces de A. tequilana "M" después de 16 semanas de exposición.....	89
Figura 33. Acumulación de boro en hojas y raíces de plantas de A. tequilana "H" y "ES" como respuesta a diferentes fuentes de nitrógeno inorgánico..	90
Figura 34. Cu, Fe, Mn y Zn total evaluado en tejido de hojas y raíces de plántulas de A. tequilana "M" en proceso de adaptación por 16 semanas bajo distintas fuentes de N inorgánico.....	92
Figura 35. Acumulación de cobre en hojas y raíces de plantas de A. tequilana "H" y "ES" como respuesta a diferentes fuentes de nitrógeno inorgánico..	92
Figura 36. Acumulación de hierro en hojas y raíces de plantas de A. tequilana "H" y "ES" como respuesta a diferentes fuentes de nitrógeno inorgánico..	94
Figura 37. Acumulación de manganeso en hojas y raíces de plantas de A. tequilana "H" y "ES" como respuesta a diferentes fuentes de nitrógeno inorgánico..	95
Figura 38. Acumulación de zinc en hojas y raíces de plantas de A. tequilana "H" y "ES" como respuesta a diferentes fuentes de nitrógeno inorgánico.....	97
Figura 39. Acumulación de molibdeno en hojas y raíces de plantas de A. tequilana "H" y "ES" como respuesta a diferentes fuentes de nitrógeno inorgánico..	99
Figura 40. Pigmentos fotosintéticos ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) presentes por tratamiento en plántulas de A. tequilana "M".	103
Figura 41. Extracción de elementos secundarios (Ca, Mg y Na) por plantas de A. tequilana tratamientos "H" y "ES".	107
Figura 42. Micronutrientes extraídos por plántulas de A. tequilana bajo diferentes fuentes de nitrógeno inorgánico.....	108

Resumen

El nitrógeno es el elemento de mayor influencia en el crecimiento de cualquier cultivo, pues regula en gran medida el crecimiento y rendimiento de las plantas. En el caso de *Agave tequilana*, han sido pocos los esfuerzos en conocer la dinámica nutricional del cultivo en sus etapas productivas, faltando aún más información en la etapa de plántula para el establecimiento de nuevos cultivos comerciales. En la actualidad se ha incrementado el interés de producir plántula micropropagada para la producción de *A. tequilana*, de ahí la importancia de conocer las condiciones óptimas de desarrollo a fin de tener la mejor plántula disponible para el campo.

Se estudió el comportamiento del *A. tequilana* bajo tres esquemas de suministro de nitrógeno inorgánico, a fin de definir la forma de nitrógeno que incrementa el desarrollo de éste y conocer la bioquímica de los procesos de absorción, determinando las principales enzimas involucradas en la fijación de nitrato y amonio.

Los resultados indican que el agave tequilero tiene una fase de adaptación adecuada e incrementa la producción del área foliar bajo el suministro de nitratos como única fuente de nitrógeno, en comparación con la aplicación de sulfato de amonio o nitrato de amonio. Se compararon además dos procesos de cultivo de tejidos, utilizando material generado por organogénesis "H" y por embriogénesis somática "ES" donde fue notorio el incremento en la tasa de crecimiento foliar de las plántulas "ES" en comparación con las plantas "H", aunque su masa radicular fue menor.

Se aportan además protocolos para la determinación de la actividad enzimática de nitrato reductasa, nitrito reductasa y glutamina sintetasa principales enzimas involucradas en la asimilación de nitrógeno en *Agave tequilana*.

Abstract

Nitrogen is the most influential element in the growth of any crop because it regulates the growth and yield of plants. In the case of *Agave tequilana*, there have been few efforts to understand the dynamics of the crop nutrient production stages, specially in the generation of plants for the establishment of new crops. Lately it has been a growing interest to produce plantlets for the micropropagation of *A. tequilana* thrus the importance of knowing the optimum conditions for development in order to have the best plant available for the field.

We studied the behavior of *A. tequilana* under three schemes of inorganic nitrogen supply, in order to define the form of nitrogen that increases the development and know the biochemical absorption processes that conform the major enzymes involved in the determination of nitrate and ammonium.

The results indicate that *A. tequilana* has a proper adaptation phase and increases the production of leaf area under a low supply of nitrate as the sole source of nitrogen, compared with the application of ammonium sulfate or ammonium nitrate. Two processes of tissue culture were also compared, using material generated by organogenesis "H" and somatic embryogenesis "ES" and there was a notable increase in leaf growth rate of plantlets "ES" compared with plantlets "H" although root mass was lower.

We also provide protocols for the determination of the enzymatic activity of nitrate reductase, nitrite reductase and glutamine synthetase, enzymes involved in nitrogen assimilation by *A. tequilana* plants.

I. Introducción

En México existe una gran diversidad de especies de *Agave* nativas de este país, y que han pasado de ser explotadas en sus ambientes naturales a ser cultivadas por el hombre con mucha o poca tecnología aplicada al laboreo según la región o la economía dependiente del cultivo. Tal es el caso del *Agave fourcroides* (henequén), cultivado en el sureste de México por la industria textil debido a la calidad y cantidad de su fibra. En el estado de Oaxaca se produce mezcal, bebida alcohólica a base de *Agave angustifolia* y espadín (DOF, 1994). El tequila, bebida también considerada mezcal, es producido a partir del *Agave tequilana* Weber variedad azul protegido por la Denominación de Origen del Tequila desde el año 1974 y que a la fecha constituye un gran desarrollo agrícola e industrial en el occidente del país principalmente en el Estado de Jalisco que alberga el municipio que da nombre a la bebida "Tequila".

Agave significa "admirable", y vaya que lo es, pues se le atribuyen una serie de cualidades medicinales y artesanales por los lugareños. La bebida denominada "tequila" se puede considerar como el primer destilado espirituoso producido en la Nueva España después de que los españoles trajeron la destilación en el siglo XVI (Nobel, 2010).

Aun cuando se trata de un cultivo ancestral, los procesos agronómicos alrededor del cultivo han sufrido pocas alteraciones a la luz de la investigación científica, pues hasta la década de 1990-2000 se encuentran los primeros reportes relacionados con *A. tequiliana* enfocados principalmente a contribuir en aspectos fitosanitarios del cultivo. También se reporta sobre procesos de

propagación de agave *in vitro* con fines de multiplicación masiva; la organogénesis y embriogénesis han sido utilizadas mayormente como estrategia de multiplicación en procesos de investigación. Poco se conocía sobre la fisiología de la planta, y hasta la siguiente década, del 2000 al 2010 se incrementó el interés por la planta generándose estudios alrededor de la misma. Uvalle-Bueno y Vélez-Gutiérrez (2007) dieron a conocer los “Valores de referencia de tejido foliar” y “Valores de referencia de la fertilidad de los suelos” en el cultivo del *A. tequilana*. Los datos nutricionales se basan en la concentración elemental total en el tejido deshidratado, esta información ha sido base para evaluar el estado fisiológico de las plantaciones de *A. tequilana* en la actualidad. Nikolaeva y Niño (2007) señalan la sintomatología de deficiencia nutricional en *A. tequilana* en plantas micropropagadas durante la etapa de adaptación.

El interés en la producción de plantas *in vitro* se ha incrementado debido a enfermedades causadas por microorganismos que afectan *A. tequilana* y a la falta de conocimiento para evaluar la condición sanitaria de los hijuelos utilizados para iniciar nuevas plantaciones. Con el empleo de la biotecnología vegetal para la producción de plántula, no sólo es posible llevar a cabo una propagación masiva de algún ejemplar, sino también, realizar mejoras genéticas, obtener materiales élites y libres de patógenos (Santacruz-Ruvalcaba, 2008).

Las plantas obtenidas bajo procesos de micropropagación en algunos cultivos muestran hojas con menor número de capas celulares, menor tamaño de las células del parénquima empalizada y menor grado de diferenciación de las

células, esto es, se desarrollan los órganos como hojas, tallo y raíz; mas no siempre son funcionales. Una vez terminado el proceso *in vitro* se requiere una etapa de adaptación o aclimatación a las condiciones ambientales para que la planta sea autótrofa.

En general, los protocolos de adaptación cuidan el sustrato a utilizar, las condiciones de humedad, luz y temperatura, a que serán expuestas las plantas después de haber sido crecidas en un ambiente *in vitro* caracterizado por alta humedad (90-100%), temperatura de 25-27°C e intensidad lumínica controlada. Cabrera (2003), recomienda la utilización de turba más agrolita con un tratamiento de fertilización 4 N-0.15 P-2.64 K meq L⁻¹ para favorecer el proceso de adaptación y crecimiento de plantas en invernadero, sin embargo, no hace mención de las fuentes (compuestos minerales) a utilizar para llegar a estas condiciones elementales.

En cultivos como nopal, soya, *Kalanchoë*, planta del té (*Camellia sinensis*), arroz y pepino se ha demostrado la importancia de fertilizar con la fuente nitrogenada adecuada a fin de obtener mayores rendimientos en los cultivos (Gallegos-Vazquez, et al., 2000; Israel and Jackson, 1982; Chang, et al., 1981; Ota, 1988; Ruan, et al.; 2007).

El presente trabajo muestra el efecto de los iones nitrato y amonio sobre el desarrollo vegetal, nivel nutricional, actividad enzimática de la nitrato reductasa, nitrito reductasa y glutamina sintetasa así como, la producción de pigmentos fotosintéticos en plántulas de *Agave tequilana* Weber en las etapas de adaptación y crecimiento en invernadero.

II. Antecedentes

2.1 Generalidades del *A. tequilana*

El agave tequilero fue descrito botánicamente por Weber en 1902 y años después por Gentry en 1982 citado por Nobel (2010) como una autoridad en la descripción del género *Agave* (Cuadro 1). Portillo-Martinez (1997) nombra al agave tequilero como "*Agave tequilana* Weber cultivar azul", partiendo del hecho que por más de 200 años se ha domesticado la especie para la producción del tequila.

Cuadro 1. Descripción botánica del agave tequilero.

Reino	Vegetal
Organización	Cormophyta
Grupo	Espermatophyta
División	Angiospermeae
Clase	Monocotiledoneae
Sub-clase	Liliidae
Orden	Liliales
Familia	Agavaceae
Sub-familia	Agavoideae
Tribu	Agaveae
Género	<i>Agave</i>
Sub-género	Euagave
Sección	Rigidae
Especie	<i>tequilana</i> (Weber,1902)
Cultivar	azul

Recientemente, se realizó nuevamente la descripción de la especie bajo la coordinación del CRT (Consejo Regulador del Tequila), el propósito de dicha descripción fue actualizar el conocimiento, y cumplir los requerimientos de

registro como "Variedad de Uso Común" ante el Sistema Nacional de Inspección y Certificación de Semillas de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación (SAGARPA), y a su vez proteger a nivel internacional al agave tequilero como una planta originaria de México de uso común como materia prima para la elaboración de la bebida alcohólica que todos conocemos, el tequila. Para los fines del registro la planta recibió el nombre de *Agave tequilana* Weber variedad azul Mayahuel.

Se describe como planta acaule (planta que no presenta tallo), multianual, monocárpica (planta que florece y fructifica una sola vez, muriendo después), roseta de 1.35 a 2.10 m de alto; 2.3 m de diámetro, con 153 a 186 hojas.

En cada una de las hojas del agave tequilero, podemos encontrar una espina terminal que mide en promedio 12.3 mm de longitud y presenta una curvatura cóncava; además presenta espinas laterales dispuestas a todo lo largo de la hoja en forma de sierra, son curvadas, ganchudas, en pocas ocasiones son rectas. Su color varía del negro, marrón, marrón rojizo o rojizo; son de menor tamaño que la espina terminal, en promedio miden 5.3 mm de largo y de 3.3 mm de ancho en su base. Cabe mencionar que el tamaño varía dependiendo de su posición a lo largo de la hoja.

Las hojas son largas, dispuestas en roseta, succulentas y fibrosas una vez que la planta está bien establecida en campo. Dependiendo de la edad de la planta, las hojas van aumentando en número y en tamaño; en algunas investigaciones realizadas se ha definido una aparición de hojas nuevas mensual de hasta 6 unidades avanzado el temporal de lluvias, esto es, en los meses de agosto a octubre; después, la tasa de crecimiento decrece y puede ser nula en época de

sequía y altas temperaturas. Las fibras foliares son resistentes y tienen varios usos artesanales. El color de las hojas es verde azulado, según las tablas para descripción de color definidas por Munsell®, podemos clasificar el color como 5BG 6/2 (Uvalle-Bueno y Vélez-Gutiérrez, 2007).

La base de las hojas, forma parte de lo que se conoce como “la piña”, sección que se procesa en la industria para la producción del tequila. Y bien, el “mezontle”; es el centro o corazón de la planta, soporta en su parte más alta el meristemo apical; y está constituido por un tejido diferente al de las hojas, es el lugar a donde las hojas están enviando todo el azúcar que producen como resultado de la fotosíntesis. En general es un tallo grueso, corto, de 30 a 50 cm de longitud.

El meristemo apical, es el tejido que contiene la información para la generación de cada una de las nuevas hojas que formaran parte de la planta y es, en este punto, donde se desencadena el proceso de floración; se encuentra en el interior del “cogollo”, pero es difícil imaginar que dentro de una gran planta de 4 o 5 años de cultivo se encuentren estructuras pre-foliares de milímetros de longitud con minúsculas espinas terminales en formación.

Se sabe que el agave es una planta “semélpara” término que se utiliza para nombrar aquellas plantas que solo florecen una vez en su vida, y al cabo de este proceso, la planta muere. La inflorescencia del agave es majestuosa, pues, desarrolla una panícula de 3 a 6 m de longitud total; dicha estructura, es llamada “quiote”, se produce generalmente después de 7 u 8 años de vida de la planta y se desarrolla a una velocidad de crecimiento aproximada de 10 cm por día al inicio de su formación de acuerdo a nuestras observaciones.

Una vez alcanzada su altura máxima, se producen las ramificaciones para dar lugar a las flores que se desarrollan de la parte inferior hacia la punta del quiole. Las flores son de color verde amarillento, aunque, por los paisajes agaveros son poco conocidas; pues, para los productores de agave, es preferible cosechar antes de que se produzca el quiole ya que se conoce la disminución en el contenido de azúcar en la piña por la demanda energética para la producción del quiole, flores, fruto y semilla. El fruto es una cápsula de color negro con restos del perianto persistentes, elipsoide, en ocasiones asimétrica por el escaso desarrollo de alguno de los carpelos, de 3 a 4 cm de largo y de 1 a 2 cm de diámetro. Es un fruto dehiscente, esto es, al madurar se abre y libera las semillas. El fruto no tiene pulpa, está constituido por semillas ordenadas en cuatro líneas, las semillas son semicirculares y de color negro. Cuando se presentan estructuras similares en color blanco, se trata de sacos embrionarios sin el embrión, esto es, semillas vanas o inmaduras.

En la inflorescencia además de las flores, el fruto y las semillas se producen pequeñas plantas en los nudos terminales de las ramas del quiole que conocemos como "bulbillos", los bulbillos constituyen una forma asexual de reproducción que no se utiliza comercialmente, sin embargo, en la mayoría de los casos se producen cientos de bulbillos por cada quiole maduro. Cada bulbillo es una roseta con alrededor de 5 a 12 hojas, las exteriores con aspecto de brácteas, coriáceas, ovadas y anchas, de margen entero, las interiores foliáceas, lanceoladas, el margen con dienteillos separados por espacio de 1.5 a 2 mm.

Otra forma de reproducción asexual del *Agave tequilana* Weber, es la formación de “hijuelos”, estructuras formadas a partir de rizomas y que son la base de reproducción comercial del cultivo. Es la estructura reproductiva más conocida, pues al quito rara vez se le permite su desarrollo pues al dejarlo crecer hasta su fructificación implica perder azúcares en la piña hasta un 70% aproximadamente.

Las raíces, son órganos de sostén de la planta que se extienden en un radio de 1.2 a 1.8 m de longitud, son gruesas, duras y fibrosas; en temporada de lluvias, es decir, de julio a septiembre se desarrolla un sistema radicular de raicillas pequeñas absorbentes, que tienen la función de absorber el agua y nutrientes del suelo en mayor proporción para almacenarla y estar protegidas durante las temporadas de sequía. Sin embargo, el sistema radical primario activa mecanismos para resistir a la sequía.

2.2 Nutrición vegetal del agave

El agave tequilero presenta metabolismo ácido crasuláceo (CAM por sus siglas en inglés, crassulacean acid metabolism) y se ha reportado la reducción de la fotosíntesis e incremento de la respiración al incrementar las temperaturas, también se ha encontrado que esta especie es sensible al daño por bajas temperaturas (Ruiz-Corral *et al.*, 2002). Las plantas con metabolismo CAM se distinguen por la absorción nocturna de CO₂ (apertura nocturna de estomas), fijación por la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) y almacenamiento en las vacuolas en forma de ácidos orgánicos, como el ácido málico principalmente. Durante el día, la remoción de los ácidos orgánicos de la

vacuola, la descarboxilación y asimilación de CO_2 en el ciclo de Calvin complementan el proceso.

En general, las plantas CAM han sido estudiadas desde su ambiente epífita en relación a la adquisición de nutrientes, se han reportado contenidos de Ca, Mg y Mn que tienden a ser más altos que en la mayoría de las plantas. Son considerables los altos niveles de Ca observados en géneros como *Aloë*, *Crassulaceae* y *Clusia* nombrados como plantas calciotrópicas. Junto con K^+ , Na^+ y Mg^{2+} , el Ca^{2+} funciona como contra-ion para el almacenamiento de carboxilatos, que se cree, ayudan a la regulación osmótica. Es difícil identificar el Ca^{2+} que se encuentra libre o asociado a los ácidos orgánicos, se supone que actúa como regulador de la acumulación y removilización del ácido, sin embargo no existe aún evidencia contundente. Esto es importante, pues el Ca^{2+} puede unirse a proteínas ó lípidos de membrana negativamente cargados, modificando la fluidez de la membrana (Lüttge, 2004).

Existen pocos reportes sobre los requerimientos nutricionales del cultivo de *A. tequilana* para optimizar su rendimiento comercial, Nobel (1989) reporta una correlación positiva entre el número de hojas desenvueltas anualmente por la planta y la condición nutricional del suelo, considerando básicamente los niveles de N, P, K, B y Na en la región de Amatitán, Jalisco-México. Uvalle-Bueno y Vélez-Gutiérrez (2007) describen las condiciones de suelo y los niveles foliares de *A. tequilana* Weber bajo condiciones de producción, sustentando los datos en el Diagnostico Diferencial Integrado (DDI) aplicado en una gran variedad de cultivos anuales como trigo, soya y perennes como el manzano con buenos resultados (Mancera-López, 2007). En el Cuadro 2 se

muestran los niveles de suficiencia del tejido foliar de *A. tequilana* en cultivo comercial, donde resalta la alta demanda de K^+ y Ca^{2+} por ésta planta. Por otra parte, Cabrera (2003) reporta dosis de fertilización NPK durante un proceso de adaptación de plántulas micropropagadas en invernadero, concluye que la interacción de los nutrimentos que favoreció la mejor respuesta en la aclimatación y crecimiento de las plantas fue con 4-0.15-2.64 meq L^{-1} de N, P y K respectivamente. Años después Nicolaeva y Niño (2007), describen las características foliares durante procesos de deficiencias nutrimentales de plántulas de agave bajo condiciones de invernadero en un sistema hidropónico, resaltando que después de 120 días de cultivo las deficiencias en nitrógeno, fósforo ó potasio pueden ser visualmente detectadas, más para el resto de los elementos esenciales se requiere mayor tiempo de carencia.

Cuadro 2. Valores de suficiencia en base seca para tejido foliar de agave tequilero cultivado en el estado de Jalisco.

Elemento	Unidades	Concentración*
Nitrógeno, (N-NO₃)	mgKg ⁻¹	210 – 297
Fósforo, (P)	gKg ⁻¹	2.5 – 3.6
Potasio, (K)	gKg ⁻¹	25.2 – 35.7
Calcio, (Ca)	gKg ⁻¹	27.3 – 38.7
Magnesio, (Mg)	gKg ⁻¹	8.6 – 12.2
Boro, (B)	mgKg ⁻¹	40.9 – 57.9
Cobre, (Cu)	mgKg ⁻¹	25.2 – 35.7
Fierro, (Fe)	mgKg ⁻¹	126 – 178
Manganeso, (Mn)	mgKg ⁻¹	84 – 119
Zinc, (Zn)	mgKg ⁻¹	42 – 59

*Uvalle-Bueno y Vélez-Gutiérrez; 2007

Actualmente crece el interés por proporcionar a la planta los nutrientes necesarios para su desarrollo que incrementen el rendimiento de forma eficaz

y eficiente sin causar alteraciones al medio ambiente. En el caso del *A. tequilana* se desconoce aún la influencia de la fuente proveedora de nitrógeno sobre la maquinaria enzimática y en consecuencia el los efectos sobre el desarrollo vegetal.

2.3 El nitrógeno

El nitrógeno, es el principal elemento involucrado en el crecimiento y formación de estructuras vegetales con influencia directa en el rendimiento de las plantaciones. Solamente el oxígeno, carbono y el hidrógeno son elementos más abundantes en las plantas que el nitrógeno. El nitrógeno sufre una serie de transformaciones en la naturaleza y es aprovechado por microorganismos y plantas en diferentes estados de oxidación de tal forma, que existe una dependencia constante entre ambos. En la Figura 1 se describe el ciclo del nitrógeno de forma simplificada considerando el proceso de transformación que sufre el nitrógeno orgánico presente en los suelos. Este sistema involucra varios procesos, el primero, la transformación a N mineral involucra dos subprocesos: amonificación o mineralización que es la transformación de N-orgánico a N-amoniaco y nitrificación que es la oxidación de N-amoniaco a N-nítrico. Para la transformación de éste último participan dos especies de bacterias; *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*, ambas presentes en el suelo realizando éstos procesos de forma dinámica. Por otra parte, la fijación biológica de nitrógeno (FBN) es un proceso de ganancia de nitrógeno al suelo, pues es la transformación de nitrógeno atmosférico en amonio. Este proceso lo llevan a cabo las bacterias, ya sea en vida libre o en simbiosis con raíces vegetales. La principal asociación simbiótica sucede entre el género *Rhizobium* y varias

especies de leguminosas. En ambos procesos descritos, el nitrógeno queda disponible para el aprovechamiento por las plantas.

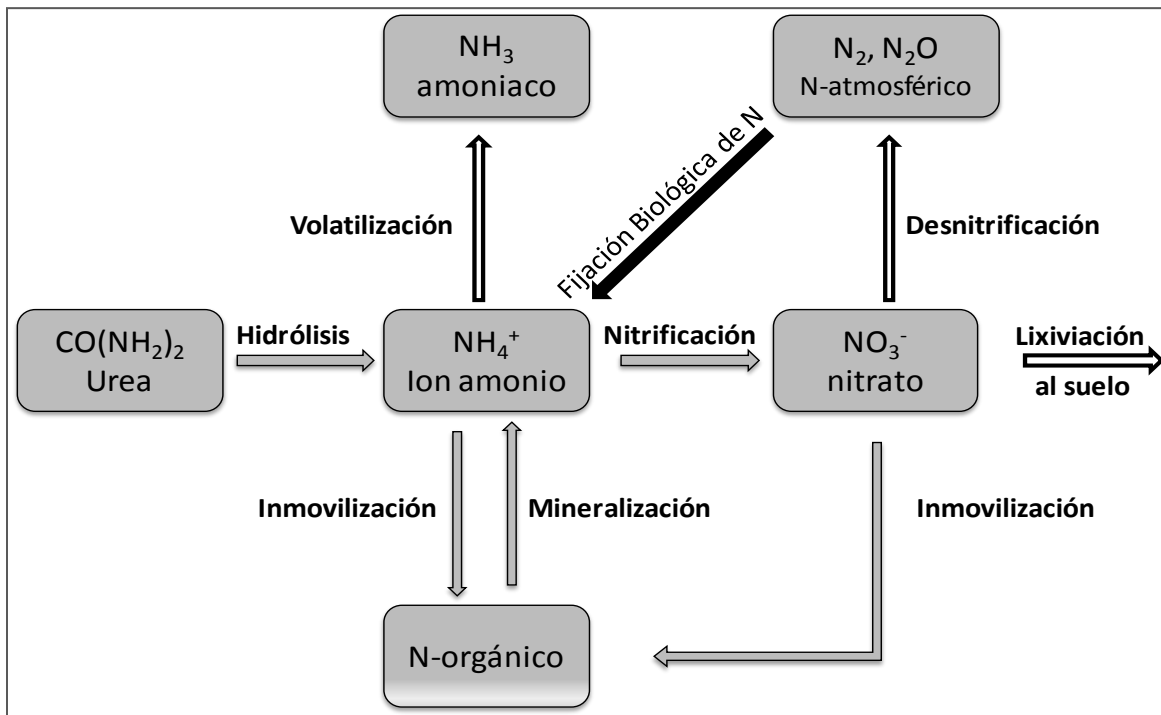


Figura 1. El ciclo del nitrógeno

La inmovilización, es el proceso donde el N-mineral es transformado a N-orgánico al ser incorporado por los microorganismos, es, por tanto, un tipo de competencia entre los microorganismos y las plantas por las reservas de nitrógeno mineral y ocurre clásicamente cuando se incorporan al suelo grandes cantidades de residuos de cultivo de alta relación C/N. Es un proceso temporal, pues una vez que las bacterias reducen esta relación mediante la respiración microbiana (liberación de CO_2) el balance entre mineralización e inmovilización comienza a crecer a favor de la mineralización.

Dependiendo de las condiciones agroclimáticas, el nitrógeno proporcionado en forma de fertilizantes inorgánicos puede perderse por lixiviación al suelo, desnitrificación o volatilización amoniacal. La desnitrificación es un proceso de pérdida gaseosa de nitrógeno que se favorece en condiciones de falta de oxígeno, alta disponibilidad de carbono orgánico y presencia de nitratos. Al no haber suficiente oxígeno, los microorganismos utilizan el ion nitrato como aceptor de electrones y lo reducen a NO, N₂O y N₂. En esta forma se escapa a la atmósfera en forma gaseosa. Este proceso se ve favorecido en suelos arcillosos, con problemas de permeabilidad, compactación o alto contenido de sodio en fase de intercambio. Las pérdidas de N vía desnitrificación pueden variar del 5 al 50% dependiendo de las condiciones a que se someta el cultivo. Las pérdidas por volatilización amoniacal ocurren cuando se utiliza una fuente amoniacal como fertilizante del tipo amoníaco, urea, sulfato de amonio o nitrato de amonio; éste proceso se favorece en suelos con pH alto (mayor a 7), baja capacidad de intercambio catiónico, en condiciones de alta temperatura o cuando las aplicaciones de fertilizante nitrogenado se realizan de forma superficial (Castellanos *et al.*, 2000).

El nitrógeno, es el elemento más importante para la nutrición vegetal pues forma parte esencial de proteínas (estructurales y enzimáticas), hormonas, vitaminas y ácidos nucleicos; impacta directamente sobre el desarrollo vegetal. El nitrógeno se absorbe mediante el sistema radicular en su forma iónica como amonio o nitrato, dependiendo de las condiciones al interior de la raíz, la disponibilidad y la genética de la planta. Se ha probado que algunas plantas prefieren la forma de nitratos para su absorción como *Ricinus communis* (Van

Beusichem *et al.*, 1988) y por el contrario se obtienen mayores rendimientos en la planta del té (*Camellia sinensis*) cuando se suministra nitrógeno en forma de amonio (Ruan *et al.*, 2007).

La asimilación de nitrógeno requiere una serie compleja de reacciones bioquímicas con un alto costo energético. En la asimilación del nitrato (NO_3^-), el nitrógeno es convertido en una forma de energía superior, nitrito (NO_2^-), luego en una mayor forma de energía, ion amonio (NH_4^+) y finalmente en nitrógeno amídico en la glutamina. Este proceso consume 12 ATPs por molécula de nitrógeno.

La respuesta de las plantas al crecimiento y absorción de las distintas formas de nitrógeno, pueden variar de acuerdo a los cambios externos de pH; continuando con el ejemplo de la planta del té, se reporta que prefiere suelos ácidos y es capaz de desarrollarse en suelos con pH debajo de 5.0, situación muy conveniente para su cultivo en China, dónde cuentan con pH alrededor de 4.0 (Ma *et al.*, 2000). En el caso del cultivo de *A. tequilana* en el estado de Jalisco la situación en cuanto al pH es muy similar; en la región de Tequila, los pH del suelo oscilan entre 4.0 y 5.5; se reportan pH en solución de cloruro de calcio 0.01M en parcelas del municipio de Etzatlán pH 4.19, Antonio Escobedo pH 3.87, Tala pH 5.35, Ahualulco del Mercado pH 4.11, Hostotipaquillo pH 3.80, Teuchitlan pH 4.40, Ameca pH 4.90 y Tequila pH 4.90, sitios que son tratados con aplicación de cal agrícola a fin de incrementar el pH e incidir en un incremento en la absorción de nutrimentos.

Ensayos realizados con *Ricinus communis* revelan un incremento del 20% en la producción de materia seca en tratamientos con NO_3^- comparado con la

utilización de NH_4^+ . El impacto en nutrientes fue incremento del 19% en nitrógeno total y 27% como nitrógeno orgánico, los cationes como K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} se vieron incrementados y los aniones H_2PO_4^- , Cl^- y SO_4^{2-} fueron reducidos (Van Beusichem *et al.*, 1988).

Todas las formas del nitrógeno son móviles dentro de la planta y cuando se presenta deficiencia de este elemento en *A. tequilana* se manifiesta clorosis de las hojas maduras o viejas, se tornan color amarillo limón a diferencia del verde-azuloso reportado en plantas sanas. Con el tiempo, se observa una coloración rojiza en la base de las hojas y en los márgenes de las hojas viejas sin presentar necrosis del tejido vegetal. Además se ve reducido su crecimiento manifestado por la formación de hojas nuevas, las que se forman bajo esta condición presentan una coloración verde pálido y consecuentemente la planta tiene un menor porte que plantas crecidas con la cantidad de nitrógeno requerido (Nicolaeva y Niño, 2007).

En resumen, las plantas absorben nitrógeno del suelo en su forma inorgánica iónica, oxidada o reducida, que son asimiladas como glutamina y otros aminoácidos en su incorporación a cadenas de carbono. La absorción de NO_3^- y NH_4^+ es importante ya que desencadena procesos de asimilación e inducción del metabolismo nitrogenado.

2.3.1 Asimilación de nitrógeno por las plantas

La absorción de nitrato por las raíces está sujeta a una regulación positiva o de inducción y otra negativa, ésta última depende del nivel de N en la plantas. Se ha sugerido que el ciclo de los aminoácidos entre los tallos y las raíces sirven

para proveer la información necesaria respecto del nivel de N en la planta, que le permite a las raíces regular la absorción de N (Cooper y Clarkson, 1989).

La absorción del nitrato en las plantas terrestres está mediada al menos por tres sistemas de transporte que coexisten en las membranas plasmáticas de las células radicales. Estos sistemas pueden ser divididos en dos clases, referidos como sistemas de transporte de alta y baja afinidad por el ion nitrato. Por otra parte los sistemas de transporte de alta afinidad pueden ser constitutivos o inducibles. Los sistemas de transporte de baja afinidad están involucrados en la absorción de altas concentraciones de nitratos (>0.2 mM) mientras que los de sistemas de alta afinidad se saturan con una baja concentración externa de nitratos.

Las plantas asimilan la mayor parte del nitrato absorbido por sus raíces en compuestos orgánicos nitrogenados. Las principales enzimas relacionadas con la asimilación de nitrógeno por las plantas se esquematizan en la Figura 2. La nitrato reductasa (NR, EC 1.7.1.1), enzima dependiente de NAD que cataliza la reducción de nitrato a nitrito. Es una flavoproteína que contiene hierro (Fe) y molibdeno (Mo) y está implicada en el primer paso de la asimilación de nitrato por las plantas, hongos y bacterias. En 1961 fue caracterizada como EC 1.6.6.1. y a partir de 2002 se clasifica como EC 1.7.1.1 (NC-IUBMB)

La nitrito reductasa (NiR, EC 1.7.1.4), enzima que cataliza la reacción de reducción del nitrito a amonio que utiliza NADH ó NADPH como cofactor en plantas y microorganismos respectivamente. Es una hierro-sulfuro-hemo flavoproteína que contiene un sirohemo. Clasificada en 1961 como EC 1.6.6.4 y transferida en 2002 como EC 1.7.1.4 (NC-IUBMB).

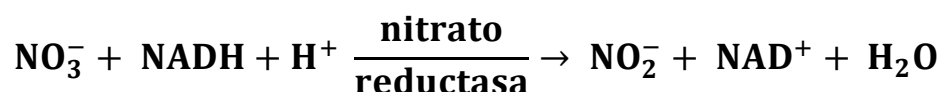


17

carece de reportes en *A. tequilana* sobre la función o actividad de estas enzimas hasta el momento.

2.3.1.1 Nitrato reductasa (NR, EC 1.7.1.1)

Enzima localizada en el citosol en la mayoría de las plantas. En raíces de cebada se ha encontrado unida al plasmalema y se ha propuesto que podría estar implicada en el transporte también. Es una enzima homodimera con cada subunidad formada por un polipéptido de 100-kD. Presenta dos sitios activos, uno donde el NADH dona electrones a FAD para iniciar el transporte de electrones vía Fe-hemo a Mo/Mo-MPT y el segundo sitio activo, donde el nitrato es reducido a nitrito. La NR mantiene el estado de equilibrio cinético entre ambos sitios, la enzima juega entre las formas oxidadas y reducidas del NADH/NAD que se unen en el sitio donador de electrones activo y se une el nitrato/nitrito en el sitio aceptor de electrones (Campbell, 1996).



Tanto la absorción de nitratos como su posterior reducción están reguladas directa o indirectamente, por diversos factores, entre los que destacan la luz, la presencia de nitratos y formas reducidas de nitrógeno en el medio. El nitrato promueve la síntesis del sistema de transporte, activando así su rápida absorción; la presencia de ion amonio en el medio suele originar un descenso de la velocidad de absorción del nitrato, aunque en algunas plantas la

regulación es por la presencia de glutamina o algún producto resultante de la asimilación del amonio.

La regulación de la NR involucra procesos de transcripción y traduccionales, regulando la cantidad y actividad de la enzima. En el caso de espinaca, la actividad de NR es modulada por fosforilación en la ser543; en presencia de cationes divalentes las formas fosfatadas-NR forman un complejo inactivo uniéndose a una proteína, sin embargo, cuando se encuentran los cationes quelatados, la enzima permanece activa (Kaiser, *et al.*, 2002). Existen evidencias que el ion nitrato actúa como señal regulatoria entre los metabolismos del nitrógeno y carbono, así como en dirigiendo el desarrollo de la raíz (Mendel y Hänsch, 2002).

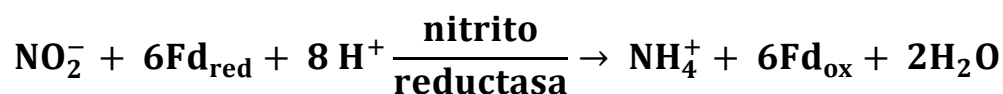
2.3.1.2. Nitrito reductasa (NiR, EC 1.7.1.4)

Dado que el nitrito formado es altamente reactivo, siendo un ion potencialmente tóxico, las células vegetales lo transportan inmediatamente después de ser generado por la reducción del nitrato desde el citoplasma a los cloroplastos en las hojas y a los plástidos en las raíces. En estos organelos la enzima NiR reduce el nitrito a amonio.

La NiR es codificada por un gen nuclear y sintetizada en el citosol en forma de una proteína precursora que posee en su extremo N-terminal un fragmento de unos 30 aminoácidos que constituye el péptido de tránsito. La función de este péptido es facilitar el paso de la proteína precursora a través de la envoltura del cloroplasto, escindiéndose posteriormente y liberando en el interior, la enzima madura. La luz, a través del fotorreceptor fitocromo tiene también un marcado efecto positivo sobre la inducción de las enzimas NR y NiR. La luz

estimula la acumulación de transcriptos de NR y NiR únicamente cuando el ion nitrato se encuentra presente, mientras que la luz, a través del fitocromo activo, actúa modulando positivamente la transcripción génica inducida por el ion nitrato.

Es una enzima presente en los cloroplastos. En los tejidos no fotosintéticos como la raíz la NiR se encuentra en los plastidos. En dichos tejidos el donador de electrones es una proteína tipo de las ferredoxinas que es reducida por una NADPH-ferredoxina reductasa con NADPH generado en la vía de pentosas fosfato (Suzuki *et al.*, 1985). La NiR cataliza la reducción de NO_2^- a NH_4^+ en una reacción que involucra 6 electrones que son tomados de una ferredoxina reducida:



Donde Fd indica la ferredoxina reducida (red) u oxidada (ox). La ferredoxina reducida deriva del transporte de electrones de la fotosíntesis en los cloroplastos y el NADPH generado por la vía oxidativa de las pentosas fosfato en los tejidos no fotosintéticos.

La enzima está constituida por un solo polipéptido de masa molecular entre 61 y 63kDa. Contiene un centro sulfoférico (4Fe-4S) y un sirohemo como grupos

prostéticos redox. El grupo sirohemo es una tetrahidroporfirina de hierro del tipo de la isobacterioclorina que también se encuentra presente en la sulfito reductasa. Los grupos prostéticos se hallan unidos entre sí por el átomo de azufre de una cisteína, formando parte del sitio catalítico para la reducción de los nitratos.

2.3.1.3. Glutamina sintetasa (GS, EC 6.3.1.2)

Las células vegetales evitan la toxicidad del amonio incorporando rápidamente en los esqueletos carbonados para formar aminoácidos. El paso primario de esta incorporación involucra las acciones secuenciales de la glutamina sintetasa y la glutamato sintasa (Figura 3).

La glutamina sintetasa de las plantas superiores tiene una masa molecular entre 320 y 360 kDa, y está constituida por ocho subunidades de 38 a 45 kDa. La enzima se presenta bajo diferentes isoformas que difieren entre sí en el tipo o tipos de subunidades que la integran. Ello confiere a las diversas isoformas distintas propiedades cinéticas e inmunológicas.

En las hojas existen dos isoformas, denominadas GS₁ Y GS₂, que se localizan en el citosol y en los cloroplastos, respectivamente. La función de la isoforma GS₂ es la asimilación de amonio producido en la reducción de nitritos, así como la reasimilación del amonio liberado durante la fotorespiración. La GS₁ está involucrada en la síntesis de glutamina en tejidos no fotosintéticos y en hojas senescentes para su posterior transporte a otros órganos de la planta. Las proporciones entre ambas isoformas varían entre especies y durante el desarrollo de los órganos y ciertos factores externos principalmente la ausencia o presencia de luz y ion nitrato.

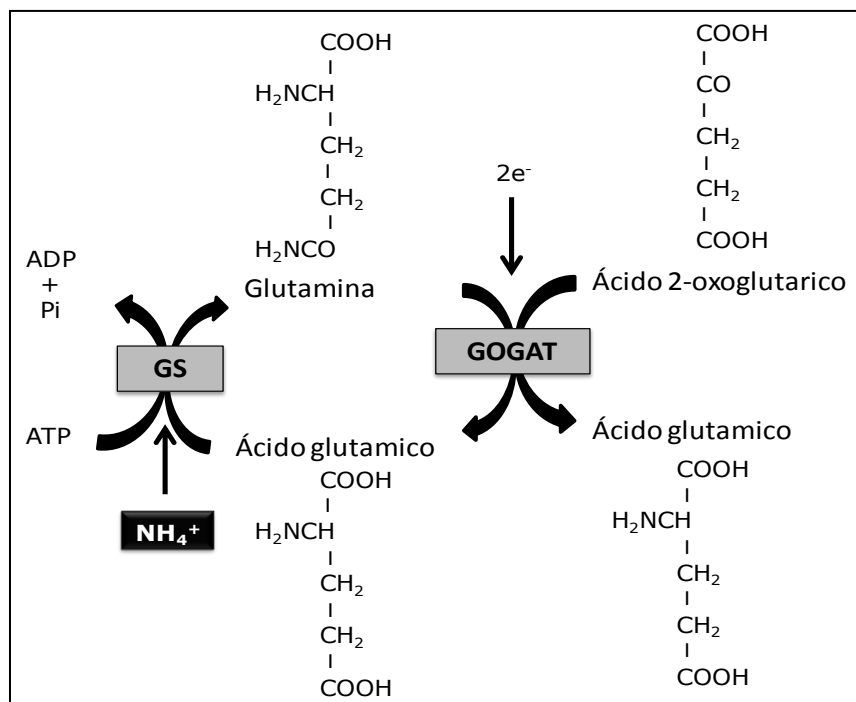


Figura 3. Asimilación de ion amonio vía glutamina sintetasa (GS)-glutamato sintetasa (GOGAT).

En la raíz existe una sola isoforma de GS, denominada GS_r , que es citosólica y posee propiedades muy parecidas a las GS_1 de las hojas. En los nódulos radicales de las leguminosas se han identificado diversas isoformas de GS, las cuales en su conjunto se denominan GS_n (Maldonado, 1996).

2.4 Pigmentos fotosintéticos

Sorby en 1873 (citado por Wellburn, 1994) fue el primero en distinguir el color azul-verde de la clorofila a y la llamó <clorofila azul> extraída de *Focus* o *Laminaria*. La clorofila b, la nombró <clorofila amarilla> y el tercer tipo de clorofila llamado <chlorofuscina> actualmente se conoce como clorofila c_1 y c_2 . Las clorofilas tienen un núcleo tetrapirrólico que contiene Mg^{2+} . Principalmente se miden dos tipos de clorofilas, la clorofila a y la clorofila b (Figura 4). Ambas se extraen con el mismo solvente, puede ser mezcla acetona-agua (80:20),

DMF o metanol, la decisión sobre el solvente a utilizar depende también de la especie vegetal en estudio. También es importante medir la relación clorofila a/b, pues la cantidad presente en las distintas secciones de una hoja pueden variar, más se conoce que la relación que guardan clorofila a/b es constante en cualquier sección de la planta y generalmente con distintos solventes (Porra *et al.*, 1989).

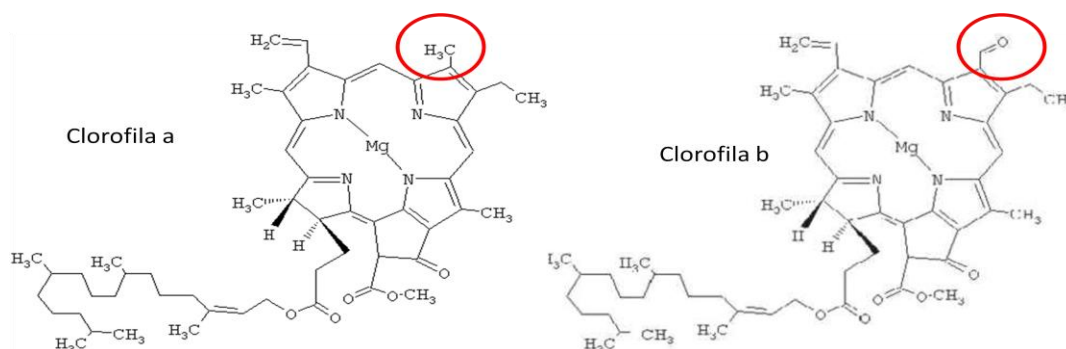


Figura 4. Estructuras químicas de las clorofilas a y b.

Los carotenoides fotosintéticos son compuestos de cuarenta átomos de C dispuestos fundamentalmente en línea con grupos metilo laterales regularmente espaciados, que pueden ser considerados como el resultado de la fusión de ocho unidades isoprenoides. Los extremos de la molécula pueden formar anillos o llevar sustituyentes oxigenados. Los carotenoides oxigenados se denominan xantofilas, y los hidrocarburos son carotenos (Figura 5).

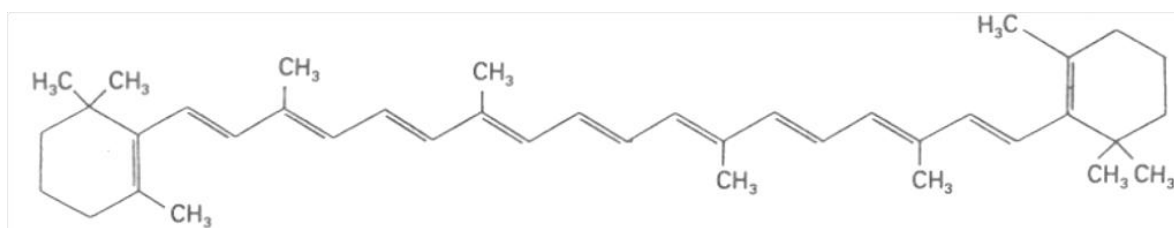


Figura 5. Estructuras química del β -caroteno.

III. Justificación

La industria del tequila depende de la producción de plantas de *Agave tequilana* Weber, materia prima esencial en su elaboración; circunscrita para su cultivo a una región del occidente de México protegida por la Denominación de Origen del Tequila proclamada en 1974. En el año 2010 se produjeron 107.7 millones de litros de tequila y 148.8 millones de litros de tequila 100% que demandaron 1,015.1 toneladas de agave para su producción (CRT, 2011).

En la

Figura 6 se muestra el consumo de agave en los últimos 10 años y cómo se ha visto incrementada la producción de tequila 100% a partir del año 2007, esta información muestra una correlación directa con el incremento en los volúmenes de exportación de esta categoría (Figura 7). La producción de tequila se realiza en México con el trabajo de familias tradicionalistas y de profesionistas que se han dado a la tarea de eficientar procesos productivos en las fábricas y en el campo.

El incremento sostenido en el consumo de agave demanda estrategias de manejo de cultivo que mejoren su producción, el cultivo del agave dos décadas atrás se realizaba de forma totalmente empírica, bajo la consideración de que por ser una planta con buen desarrollo en zonas áridas, no requería mayor manejo agronómico, incluyendo el nutricional.

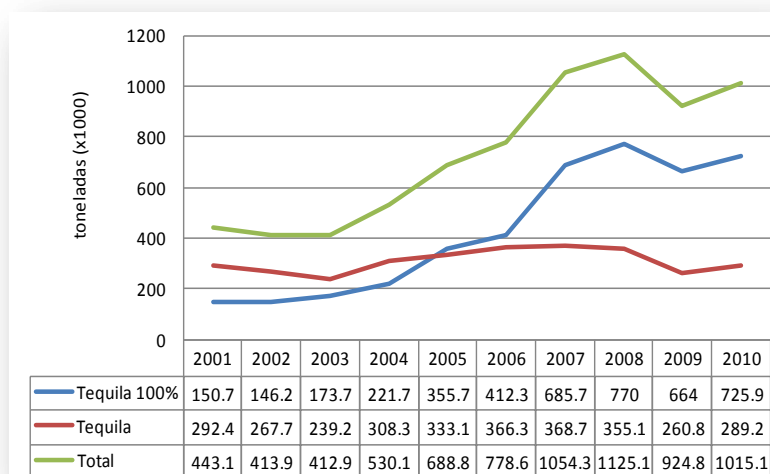


Figura 6. Consumo anual de agave para la producción de tequila por categoría de 2001 a 2010. Tequila 100% y Tequila (Datos CRT, 2011)

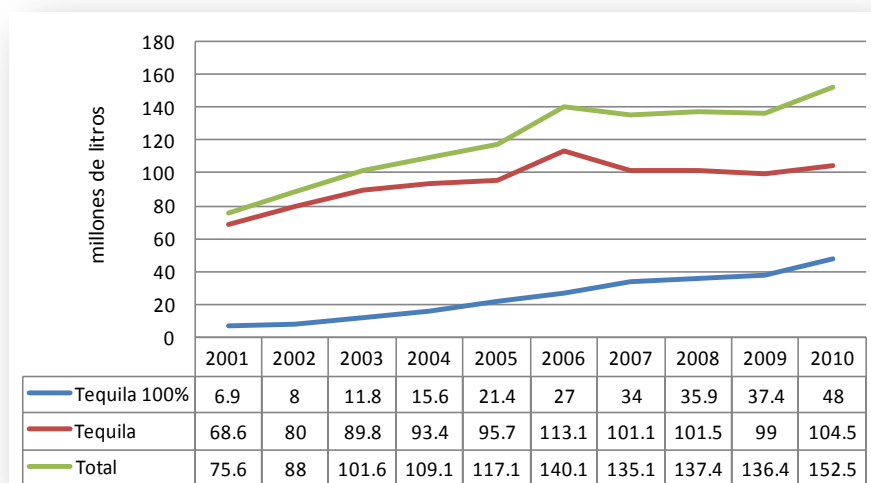


Figura 7. Exportación anual de tequila por categoría de 2001 a 2010. Volumen expresado en millones de litros al 40% alc. (Datos CRT, 2011)

La respuesta del sector productivo y científico se ha enfocado mayormente a resolver los problemas de enfermedades que aquejan al cultivo y pocos son los estudios relacionados con la fisiología de la planta.

La necesidad de contar con plantas de *A. tequilana* sanas, ha obligado a incursionar en el proceso de generación de plántulas mediante procesos de biotecnología vegetal, de tal forma, que se cuentan con metodologías de producción de plántula, más no se ha reportado el manejo de adaptación que se pudiese dar para obtener plántulas adecuadas para salir al campo. Es necesario conocer un esquema de fuentes nutrimentales que favorezcan el establecimiento de las plántulas en sus fases de adaptación y crecimiento en el invernadero; así como la cuantificación de parámetros bioquímicos que satisfagan la necesidad de conocer el estado fisiológico de la planta contribuyendo directamente al desarrollo de tecnologías de manejo agronómico en un cultivo de importancia nacional, por el contexto de las tradiciones mexicanas y las comunidades que sostienen su economía en el cultivo del agave, en la producción y comercialización del tequila ligado a la economía turística alrededor de la industria el tequila.

IV. Objetivos

4.1 Objetivo general

Determinar el efecto de NH_4NO_3 , NH_4^+ y NO_3^- sobre el desarrollo vegetal, composición mineral y algunos parámetros bioquímicos relacionados con la asimilación de nitrógeno por plántulas micropropagadas de *A. tequilana* en las fases de adaptación y crecimiento en invernadero.

4.2 Objetivos particulares

4.2.1 Determinar el efecto de NH_4NO_3 , NH_4^+ y NO_3^- sobre el proceso de adaptación *ex vitro* de plántulas de *A. tequilana* micropropagadas

4.2.2 Determinar el efecto de NH_4NO_3 , NH_4^+ y NO_3^- sobre el crecimiento de plántulas de *A. tequilana* adaptadas al invernadero provenientes de dos procesos biotecnológicos.

4.2.3 Evaluar el estado nutricional de las plántulas de *A. tequilana* adaptadas y crecidas bajo distintas fuentes de nitrógeno inorgánico en invernadero.

4.2.4 Determinar el efecto de NH_4NO_3 , NH_4^+ y NO_3^- sobre la actividad enzimática de nitrato reductasa, nitrito reductasa y glutamato sintetasa y la cantidad de pigmentos fotosintéticos tejido foliar de *A. tequilana*.

V. Materiales y Métodos

5.1 Condiciones de cultivo

Las plántulas de *A. tequilana* fueron recibidas en dos fases de desarrollo. El primer grupo, fue recibido en condiciones *in vitro*, provenientes de un proceso de micropropagación comercial y se le denominó "M". El material fue donado por la compañía Promoción y Fomento de Agave S. de R. L. de C. V. filial de Tequila Sauza, S. de R. L. de C. V.

El segundo grupo de plántulas estuvo constituido por plantas producidas en el Laboratorio de Micropropagación del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) perteneciente a la Universidad de Guadalajara, donde se diferenciaron por su origen en dos grupos; el grupo "H" fueron plantas producidas por organogénesis de hijuelos y el grupo "ES" multiplicados *in vitro* bajo el proceso de embriogénesis somática. Ambos grupos tenían el mismo tiempo de adaptación en invernadero pero presentaban características distintas de desarrollo que fueron medidos al inicio del proyecto.

5.1.1 Adaptación de plántulas "M"

Plántulas micropropagadas de *A. tequilana* Weber de 5 a 7 cm de longitud, se establecieron en charolas de 24 cavidades sin dren con tres repeticiones, siendo un total de 72 plantas por tratamiento. Las plantas fueron lavadas con agua corriente para eliminar el medio de cultivo y sumergidas por 1 min en una suspensión del fungicida Captan Ultra® 50WP. El invernadero se mantuvo bajo condiciones de iluminación disminuida por una malla sombra de 50% tipo israelita y con plástico blanco-lechoso. La humedad del ambiente se mantuvo

del 60-80% mediante el empleo de microaspersión (5 pulsos de 2 min en las horas cálidas del día) y el empleo de una lavadora de aire conectada al extractor. La temperatura osciló de 15 a 30°C. Las plántulas fueron establecidas en arena tamizada por 20<mallat>10, estéril, adicionada de 40 mL por planta de solución nutritiva correspondiente descrita en el Cuadro 3. Las plantas se mantuvieron húmedas por la adición de agua cada 3-5 días. Después de 7 semanas recibieron una segunda dosis de 30 mL de la respectiva solución nutritiva y permanecieron en invernadero por 16 semanas.

Cuadro 3. Composición de las soluciones nutritivas mmol L⁻¹

Fuente	A: NH ₄ NO ₃	B: ØN	C: (NH ₄) ₂ SO ₄	D: xNO ₃
NH ₄ NO ₃	42.863	-	-	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	-	42.871	-
Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	-	-	-	24.964
KNO ₃	-	-	-	24.112
NaNO ₃	-	-	-	11.717
KH ₂ PO ₄	6.458	6.458	6.458	6.458
K ₂ HPO ₄	6.458	6.458	6.458	6.458
K ₂ SO ₄	12.051	12.051	12.051	-
CaCO ₃	24.951	24.951	24.951	-
MgSO ₄ 7H ₂ O	10.282	10.282	10.282	10.282
NaCl	9.993	9.993	9.993	9.993
H ₃ BO ₃	0.367	0.367	0.367	0.367
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.031	0.031	0.031	0.031
EDDHA-Fe (6% Fe)	0.107	0.107	0.107	0.107
EDTA-Mn (7%Mn, 4%S)	0.170	0.170	0.170	0.170
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.018	0.018	0.018	0.018
ZnSO ₄ -7H ₂ O	0.080	0.080	0.080	0.080

5.1.2 Crecimiento de plántulas "H" y "ES"

Las plántulas "H" y "ES" fueron establecidas en macetas de 250 mL, teniendo en total 24 repeticiones por tratamiento. El arreglo factorial (2x4) obedece a 2 orígenes de la plantas y 4 tratamientos. Se utilizó como sustrato agrolita para asegurar la ausencia de nitrógeno en el sustrato y retener humedad.

En esta prueba, se utilizaron soluciones diluidas diez veces a las reportadas en la fase de adaptación (Cuadro 3) denominadas por la misma letra en minúscula (solución a, b, c y d). Se humectó la agrolita con 120 mL de solución nutritiva antes de establecer los agaves. Se aplicaron riegos de 50 mL con la solución correspondiente cada 5 días por 21 semanas y de la semana 22 hasta la 25 se utilizó el mismo volumen de agua para mantener el nivel de humedad y no se fertilizó más.

5.2 Evaluación del crecimiento vegetal

Nobel y Valenzuela (1987) reconocen la medición del número de hojas desenvueltas como una herramienta no destructiva para cuantificar el desarrollo de agaves. En este estudio se consideraron como valores indicativos de desarrollo el número de hojas nuevas desarrolladas después de su establecimiento en invernadero; crecimiento del diámetro del bulbo o tallo, masa radical y aérea después de 16 semanas de adaptación para plántulas "M" y 25 semanas de seguimiento en plantas "H" y "ES".

5.3 Evaluación nutricional del tejido vegetal

El material foliar o radicular fue lavado con jabón libre de fosfatos (dextran), agua corriente y finalmente enjuagado con agua destilada. El material se

deshidrató a 70°C por 2-3 días. Una vez deshidratado, el material fue triturado y tamizado por malla 20 en un molino Tomas-Wiley®. El material fue sometido a la determinación de nitrógeno-nitratos por el método del ácido fenol-disulfónico, nitrógeno-amoniaco método de Nessler (8038 Hach, Co.), ambos determinados en una extracción con agua 1:10. Se determinó fósforo (P) y boro (B) en cenizas por el método de molibdovanadato y azometina H respectivamente en un espectrofotómetro Lambda 25 de Perkin Elmer®. La cuantificación de potasio, calcio, magnesio, sodio, cobre, hierro, manganeso y zinc se determinó por absorción atómica en un equipo AAnalyst300 de Perkin Elmer® como elementos totales después de una digestión nítrica por microondas (MARS5, Falcon, Inc®).

Las determinaciones en tejido foliar se realizaron por planta, permitiendo el análisis estadístico de los datos. La cantidad de tejido radicular sólo permitió realizar una muestra compuesta por tratamiento.

5.3.1 Determinación de nitrógeno-nitratos

Para la cuantificación de nitrógeno nitratos se utilizó el método del ácido fenol-disulfónico:

a. Reactivos

- Carbonato de Calcio 1 %; Se disolvió 1 g de CaCO_3 en agua destilada y aforó a 100 ml
- H_2O_2 al 30 %; con menos de 9 ppm de NO_3 (J.T. Baker 2189-01)

- Ácido fenoldisulfónico: Se colocó en un vaso de precipitado de 1 L, 25 g de fenol exactamente pesados y se adicionaron 225 mL de H_2SO_4 concentrado y se mantuvo por 2 horas a una temperatura de 100 °C en parrilla eléctrica.
- Hidróxido de Amonio 1:1; Se colocaron 500 mL de agua destilada y se adicionaron 500 mL de NH_4OH se agitaron y se mantuvo en un frasco cerrado.
- Estándar de N- NO_3 de 1000 ppm como N; Se pesaron 7.2504 g de KNO_3 (99.6% de pureza) y se aforó a 1 L, se diluyó a 50 ppm y a partir de este estándar se prepararon estándares de 1, 3 y 5 ppm.

b. Procedimiento

- Se pesaron 0.5 g de muestra vegetal deshidratada, molida y tamizada; en un vaso de extracción. Se le adicionaron 25 mL de agua destilada y se agitó por 15 min en agitador oscilatorio. Llevando un blanco de agua destilada. Al concluir la agitación se filtró a través de un papel libre de nitratos de filtración media.
- Se tomó una alícuota de 5 mL y se depositó en un vaso de precipitado de 100mL, donde se añadieron 2 mL de la solución de CaCO_3 al 1 % y 1 mL de H_2O_2 al 30 % y se introdujeron los vasos en estufa a 80 °C y se dejaron hasta sequedad, aproximadamente 5 horas.
- A las muestras deshidratadas y a temperatura ambiente se les añadió lentamente y por las paredes 3 mL de ácido fenoldisulfónico, dejando un periodo de 20 min de reposo. Concluido este tiempo, se agregaron 50 mL de agua destilada.

- Durante los 20 min. de reposo se preparó para cada muestra un matraz volumétrico de 100 mL al que previamente se le adicionaron 20 mL de hidróxido de amonio 1:1; se vertió la muestra y se aforó a 100mL con agua destilada.
- Se realizó la curva de calibración a partir del estándar de nitratos (0.25 a 12 mgL⁻¹), muestras y estándares fueron leídos a 406 nm.

5.3.2 Determinación de nitrógeno-amoniacal

La determinación se realizó siguiendo el método comercial de Nessler (8038 Hach, Co.).

a. Reactivos

- Sulfato de Potasio 0.5 M; se disolvieron 87.13 g de sulfato de potasio (K₂SO₄, 100% pureza) en agua destilada y aforado a 1 L.
- Alcohol Polivinilo HACH®; contiene polivinilalcohol al 5 %
- Estabilizador Mineral HACH®; mezcla de tartrato de sodio y potasio 20-30 % y citrato de sodio 20-30 %
- Reactivo Nessler HACH®; contiene yoduro de mercurio, hidróxido de sodio y yoduro de sodio

b. Procedimiento

- Se utilizó el mismo extracto realizado para la medición del nitrógeno-nitratos. Se pesaron 0.5 g de muestra vegetal deshidratada, molida y tamizada; en un vaso de extracción. Se le adicionaron 25 mL de agua destilada y se agitó por 15 min en agitador oscilatorio. Llevando un blanco

de agua destilada. Al concluir la agitación se filtra a través de un papel libre de nitratos de filtración media.

- Se transfirió 1 mL del extracto a una probeta de 25 mL con tapón, mas 19 mL de agua destilada. Se adicionaron 3 gotas de estabilizador mineral y 3 gotas de alcohol polivinilo, de forma separada y realizando una agitación independiente y suave. Se aforó a 25 mL con agua destilada.
- Se agregó 1 mL de reactivo Nessler y con suavidad se invirtió la probeta para homogenizar su contenido. Reposó por 1 min. La lectura se toma en un espectrofotómetro a 425 nm.
- El resultado se calcula a partir de una curva de calibración de amonio de 0.2 a 2.5 mgL⁻¹

5.3.3 Determinación de sulfatos

Los sulfatos (SO_4^{2-}) determinados en esta prueba, son los sulfatos presentes de forma soluble en el tejido vegetal. Se utiliza el extracto para nitratos y amonio en esta determinación.

Se utiliza el método HACH® 3450.

a. Reactivos

- Sulfaver 4 HACH® (Cloruro de Bario y ácido cítrico.)

b. Procedimiento

- Se usó el mismo extracto realizado para la medición del nitrógeno-nitratos. Se pesaron 0.5 g de muestra vegetal deshidratada, molida y tamizada; en un vaso de extracción. Se le adicionaron 25 mL de agua destilada y se agitó por 15 min en agitador oscilatorio. Llevando un blanco de agua destilada. Al

concluir la agitación se filtra a través de un papel libre de nitratos de filtración media.

- Se utiliza 1 mL del extracto acuoso en una probeta de 25 mL graduada con tapón esmerilado. Se lleva a 25 mL con agua destilada. Se agrega 1 sobre de Sulfaver4®. Agitar por inversión y dejar en reposo 5 min. Cuando la muestra tiene color, se debe utilizar como blanco antes de agregar el sulfaver4.

5.3.4 Determinación de fósforo total

a. Reactivos

- Reactivo de molibdovanadato HACH®; que contiene metavanadato de amonio, molibdato de amonio y ácido sulfúrico

b. Procedimiento

- Para la obtención de cenizas se incineraron 0.25 g de material vegetal seco, molido y tamizado en un crisol de porcelana a 450 °C durante 72 horas. A temperatura ambiente se adicionan 5 mL de H₂SO₄ 1N para disolver las cenizas. Se dejan en reposo por 60 min. El extracto obtenido se utilizó en la determinación de fósforo y boro.
- Se tomó una alícuota de 1 ml y se depositó en una probeta con tapón esmerilado de 25mL. Se aforó a 25 mL con agua destilada. Se adicionó 1 mL de reactivo molibdovanadato. Se mezcló y se dejó en reposo por 5 min. La lectura se realiza a 430 nm.
- Se realizó la curva de calibración 0 a 15 mgL⁻¹ de P.

5.3.5 Determinación de boro total

a. Reactivos

- Solución amortiguadora; se disolvieron 250 g de acetato de amonio más 15 g de EDTA-disódico en 400 mL de agua destilada. Se agregaron suavemente 125 mL de ácido acético glacial.
- Solución de color; se disolvieron 0.9 g de Azometina-H más 2 g de ácido ascórbico y se aforó a 200mL. La solución se preparaba diariamente.
- Solución patrón de boro; como base se utilizó una solución de 100 mgL⁻¹ de boro disolviendo 0.5725 g de ácido bórico (99.9% pureza) en agua y aforando a un litro. La curva de calibración se preparaba en un intervalo de 0 a 5 mgL⁻¹ de boro con incrementos de 0.5 mgL⁻¹.

b. Procedimiento

- Para la obtención de cenizas se incineraron 0.25 g de material vegetal seco, molido y tamizado un crisol de porcelana a 450 °C durante 72 horas. Cuando los crisoles se encontraban a temperatura ambiente se adicionaron 5 mL de H₂SO₄ 1N para disolverlas. Se dejan en reposo por 60 min. El extracto obtenido fue utilizado en la determinación de fósforo y boro.
- A partir de este punto, se utilizó material de plástico para la realización de esta prueba, así se evita una posible contaminación de las muestras por boro-silicato de sodio constituyente del vidrio.
- Con una alícuota de 1mL en un tubo de ensayo, se adicionaron 2 mL de solución buffer y 1 mL de azometina-H. Se agitó en vortex y se dejó reaccionar por 60 min. La cuantificación se realizó en espectrofotómetro a 415 nm contra una curva de B (0.2 a 5.0 mgL⁻¹).

5.3.6 Determinación de minerales por espectrofotometría de absorción atómica: K, Ca, Mg, Na, Cu, Fe, Mn y Zn.

Este procedimiento se lleva a cabo con material preparado por una digestión ácida en horno de microondas, que se describe a continuación:

a. Reactivos

- La mezcla ácida se preparó en proporción 2:8 ácido nítrico-agua destilada.

b. Procedimiento:

- Se pesaron 0.4 g. de la muestra molida, seca y tamizada. Se colocó cada muestra en un vaso de teflón (vaso HP500) del microondas MARS5[®] con 10 mL de la mezcla ácida.
- Se dejó en reposo por 30 min permitiendo la humectación de las partículas antes de cerrar el sistema e introducirlo al equipo de microondas.
- En la rampa utilizada se manejó control de temperatura hasta 170 °C, una rampa de 10 min a 320 psi y mantenimiento de 15 min.

Una vez terminada la digestión, se aforó el material a 50 mL con agua destilada; obteniendo así el material para determinar minerales, los procesos subsecuentes para introducir la muestra en el espectrofotómetro de absorción atómica se describen a continuación:

a. Reactivos

- Cloruro de cesio al 10 %; Se disolvieron 10 g de cloruro de cesio en agua y se aforó a 100 mL.
- Cloruro de lantano al 10 %; Se disolvieron 10 g de cloruro de lantano en agua y se aforó a 100 mL.

- Estándares certificados de 1000 mgL^{-1} de cada elemento a determinar para realizar las curvas de calibración de acuerdo al manual del equipo.

b. Procedimiento

- Determinación de calcio, magnesio y potasio; a partir de la solución mineral se realizaron diluciones de 1:100 adicionadas de cloruro de lantano al 10% hasta obtener una concentración final de 1% de cloruro de lantano en la muestra que fue analizada en el espectrofotómetro de absorción atómica.
- Determinación de sodio; en general la dilución para la lectura de sodio a partir de la muestra resultado de digestión fue de 1:10, para este elemento se adicionó cloruro de cesio como ionizante hasta una concentración final de 1%.
- Determinación de cobre, fierro, manganeso y zinc; Estos elementos se cuantifican directamente del material obtenido de la digestión. No se requiere de elemento ionizante.

5.3.7 Determinación de molibdeno

El molibdeno (Mo) es un elemento presente en concentraciones muy bajas, por lo que fue necesario realizar la digestión nítrica en microondas (apartado 4.3.5.1) de 0.8 a 1.0 g de muestra, evaporar en baño maría hasta un volumen aproximado de 5 mL y realizar el procedimiento descrito a continuación.

a. Reactivos

- Solución de aluminio (Al^{3+}) de 2000 mgL^{-1} ; Se pesaron 17.8246 g (pureza 100%) de cloruro de aluminio ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) y se aforó a 1 L.
- Estándar certificado de molibdeno.

b. Procedimiento

- Los 5 mL producto de las dos digestiones, se aforaron a 10 mL con la solución de Al^{3+} de 2000 mgL^{-1} .
- Se prepararon estándares de 0, 1.50, 2.50, 3.75, 5.00 mgL^{-1} de molibdeno, con Al^{3+} 1000 mgL^{-1} .
- Se estandarizo el equipo de absorción atómica de acuerdo las condiciones establecidas y se midieron las muestras bajo la flama de oxido nitroso-acetileno a 313.3 nm.

5.4 Ensayos para determinación de actividades enzimáticas

Las actividades reportadas se relacionan con la cantidad de proteína extraída cuantificada por el método descrito por Bradford (1976). La cuantificación de las actividades de nitrato reductasa (NR, E.C. 1.7.1.1) y nitrito reductasa (NiR, E.C. 1.7.1.4) se realizó siguiendo los métodos descritos por Wray y Filner (1970). La actividad de la glutamina sintetasa (GS, E.C. 6.3.1.2) se cuantificó como los moles de P_i formados por unidad de tiempo (Sánchez *et al.*, 2004).

Se consideró la hoja recién formada (bien separada del cogollo) como material de análisis.

4.5.1 Extracción de proteínas

a. Reactivos

- Solución stock: PBS 50 mM pH 7.5;
 - Solución 50 mM de K_2HPO_4 ; Pesar 2.17725 g de K_2HPO_4 (99.93% pureza) y disolverlos en 250 mL de agua destilada (solución 1).

- Solución 50 mM de KH_2PO_4 ; Pesar 0.68045 g de KH_2PO_4 (99.1 % pureza) y disolverlos en 100 mL de agua destilada. (solución 2)
 - Se ajusta al pH deseado agregando la cantidad necesaria de la solución 2 a la totalidad de la solución 1 con agitación constante (resultando la solución 3). Una vez ajustado el pH se pasa la solución 3 por una columna de resina Chelex 100 para la eliminación de metales. La solución resultante, se etiquetó y almacenó a temperatura ambiente en envase de plástico.
- Solución stock: HEPES-HCl 0.2 M pH 7.9;
 - Solución 0.2 M de HEPES-Na; Pesar 5.258 g de HEPES sódico (sigma[®]H7006) y se disolvieron en 100 mL de agua destilada.
 - Se ajusta al pH con HCl 0.1 M y agitación constante.
- Solución HCl 0.1 M; se agregan 0.83 mL de HCl (37.1 %) a un matraz aforado de 100 mL con agua destilada, se afora hasta la marca. Una vez ajustado se etiquetó y almacenó a temperatura ambiente en envase de plástico.
- Solución stock: PMSF 0.1 M en etanol absoluto; Se pesaron 0.01742 g de PMSF (fenilmetanosulfonil fluoruro, sigma[®]P7626) en un tubo endoff con 1 mL etanol absoluto. Se disolvió el PMSF y se almacenó en congelador no más de 10 días.
- Solución extractora PBS.
 - Por cada 20 mL requeridos de la solución extractora se adicionaron: 20ml PBS 50 mM pH 7.5, 0.0153 g EDTA-sal disódica, 0.2mL solución stock PMSF y 0.2 g de PVP (polivinil-pirrolidona)

- Solución extractora HEPES ($C_8H_{12}N_2NaO_9S$).
 - Por cada 20 mL requeridos de la solución extractora se adicionaron: 20mL HEPES-HCl 0.2 M pH 7.9, 0.0153 g EDTA-sal disódica, 0.2mL solución stock PMSF y 0.2 g de PVP (polivinil-pirrolidona)

b. Procedimiento

- Se prepara hielo en un recipiente y se colocan tubos de ependoff con 800 μ L de la solución extractora correspondiente a la prueba por realizar. Se mantienen fríos durante todo el ensayo.
- El tejido se maceró con nitrógeno líquido utilizando mortero y pistilo. Sin permitir que se descongelase, fue homogenizado por 1 min en 800 μ L de solución extractora.
- El homogenizado resultante fue centrifugado a 15,000 rpm, 4°C durante 20 min. El sobrenadante fue extraído a un tubo ependoff limpio y frío.
- El sobrenadante fue definido como extracto enzimático para determinar NR (EC 1.7.1.1) y NiR (E.C. 1.7.1.4) cuando se utilizó solución extractora de PBS y para GS (EC 6.3.1.2) se utilizó solución extractora HEPES siguiendo el mismo procedimiento.
- El extracto enzimático se conservó en hielo hasta ser utilizado en la medición de cantidad de proteína para medir la actividad enzimática correspondiente.

5.5.2 Cuantificación de proteína

Para la cuantificación de proteína se siguió el método descrito por Bradford (1976); se realizó una curva de calibración para cada lote de medición. La curva se realizó por triplicado y el promedio de las tres lecturas se utilizó para

efectuar una regresión lineal y evaluar la concentración de proteína en los extractos enzimáticos.

a. Reactivos

- Reactivo Bradford; se disolvieron 100 mg de Azul de Coomasie G-250 en 50 mL de metanol al 95%, se añadieron 100 mL de H_3PO_4 al 85%. Se deja en agitación por 30 min y se diluye a 1 L con agua fría. El reactivo de Bradford resulta ligeramente café. Se almacenó en frasco ámbar y en refrigeración.
- Solución NaOH 0.1 M; se pesaron 0.40 g de NaOH y se aforan a 100 mL con agua destilada.
- Solución de albúmina 1mg mL^{-1} ; se disuelven 10 mg de albúmina en 10 mL de agua destilada utilizando un matraz de aforación de 10mL.

b. Procedimiento

- Se prepara una curva de calibración en tubos de ensayo de 0 a $20\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ como se ilustra en el Cuadro 4.
- Se agitó cada tubo en vortex y se dejaron reposar por 5 min, para después proceder a la lectura en el espectrofotómetro a 590 nm, usando el tubo 1 como blanco.

Cuadro 4. Preparación de la curva de calibración para cuantificación de proteína por el método Bradford.

Tubo	1	2	3	4	5
Concentración de proteína ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0	5	10	15	20
Solución de albúmina 1mg mL^{-1} (μL)	0	5	10	15	20
Solución NaOH 0.1 M (μL)	200	200	200	200	200
Reactivo Bradford (μL)	800	795	790	785	780

- Las muestras se prepararon siguiendo las proporciones del tubo 3; esto es, todos los tubos contenían 790 μL de reactivo Bradford, 200 μL de solución de NaOH 0.1 M y 10 μL del extracto enzimático problema. En los casos donde la absorbancia fue mayor que la obtenida en el tubo 5, se disminuyó la cantidad de muestra y se consideró en el cálculo final.
- Las celdas se lavaron en etanol cada tercer medición para evitar falsos positivos por la acumulación de colorante en la celda.

5.5.3 Actividad de nitrato reductasa (NR, EC 1.7.1.1).

a. Reactivos

- Solución stock PBS 50 mM pH 7.5; ver preparación en apartado 4.5.1
- Solución NADH 0.1 M: pesar 0.07946 g de NADH y agregar 1 mL de agua destilada. Almacenar en congelación
- Solución KNO_3 0.1 M; pesar 1.012 g de KNO_3 y aforar a 100 mL con agua destilada. Almacenar en refrigeración.
- Solución HCl 1.5 N: 6.25 mL de HCl (37.1%) en 50 mL de agua.
- Solución HCL 0.2 N: 0.834 mL de HCl (37.1%) en 50 mL de agua destilada.
- Sulfanilamida 1% en HCl 1.5 N; pesar 0.51 g de sulfanil-amida al 98% y aforar a 50 mL con HCl 1.5 N
- Solución NNEDA 0.02% en HCl 0.2 N; pesar 0.0103 g de NNEDA (N-1-naftil-etilendiamina) y aforar a 50 mL con HCL 0.2 N

b. Procedimiento:

- La mezcla de reacción se preparó en tubos de 5 mL, con los siguientes reactivos: 500 μL de PBS 50 mM pH 7.5, 100 μL NADH 0.1 M, 100 μL de KNO_3 0.1 M y 200 μL de agua destilada.

- Agregar a la mezcla de reacción 100 μL del extracto enzimático e incubar a 35 °C en un baño de agua por 30 min, se incluyó en cada lote un tubo blanco sustituyendo el extracto enzimático por la solución stock de PBS. Se preparó además un tubo control sustituyendo la solución de KNO_3 0.1 M por solución stock de PBS, con este cambio, determinamos la presencia en el extracto de ion nitrito al finalizar la prueba.
- Detener la reacción con 1 mL de 1% sulfanilamida en HCl 1.5 N y 1 mL de 0.02% N-1 naftil-etilendiamina en HCl 0.2 N.
- Se mide la absorbancia a 540 nm, y se compara contra una curva patrón de nitritos (0- 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$)
- La actividad NR se expresó como $\mu\text{M NO}_2$ producidos por mg de proteína en 30 min.

5.5.4 Actividad de nitrito reductasa (NiR, EC 1.7.1.4)

a. Reactivos

- Solución stock PBS 50 mM pH 7.5; ver preparación en apartado 4.5.1
- Solución de KNO_2 10 mM; se pesaron 0.1740 g de KNO_2 y aforaron a 100 mL de agua destilada. Se almacenó en refrigeración en envase de plástico.
- Solución metil-viologeno 10 mM; se pesaron 0.0257 g de metil-viologeno y se aforaron a 10 mL con agua destilada. La solución se almacenó en refrigeración.
- Solución de NaHCO_3 0.29 M; se pesaron 2.43 g de NaHCO_3 , y se diluyeron a 100 mL con agua destilada.

- Solución de ditionito de sodio 10 mg mL^{-1} ; se pesaron 0.2907 g de ditionito de sodio (86% pureza) y se aforaron con 25 mL de la solución de NaHCO_3 0.29 M .
- Sulfanilamida 1% en HCl 1.5 N ; pesar 0.5102 g de sulfanil-amida al 98% y aforar a 50 ml con HCl 1.5 N
- Solución NNEDA 0.02% en HCl 0.2 N ; pesar 0.0103 g de NNEDA (N-1-naftil-etilendiamina) y aforar a 50 mL con HCl 0.2 N

b. Procedimiento

- La mezcla de reacción se preparó en tubos de 5 mL con tapón y se mantuvieron en hielo hasta que se adicionó el ditionito sódico e inicio la reacción a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ en oscuridad (se utilizó estufa de incubación Felisa[®]) por 30 min .
- Los tubos de reacción para la muestra contenían: $300 \text{ }\mu\text{L}$ solución PBS 50 mM pH 7.5 , $100 \text{ }\mu\text{L}$ solución de KNO_2 10 mM , $100 \text{ }\mu\text{L}$ solución metil-viologeno 10 mM , $200 \text{ }\mu\text{L}$ agua destilada y $100 \text{ }\mu\text{L}$ extracto.
- Se preparó por muestra un tubo control, sin la solución de solución de KNO_2 10mM y sustituido en volumen por agua destilada; así se eliminó el factor de presencia de nitrito en el extracto enzimático.
- El blanco fue un tubo por lote constituido por $300 \text{ }\mu\text{L}$ solución PBS 50 mM pH 7.5 , $100 \text{ }\mu\text{L}$ solución metil-viologeno 10 mM y $400 \text{ }\mu\text{L}$ agua destilada. Y también se preparó un tubo por lote denominado estándar con $300 \text{ }\mu\text{L}$ solución PBS 50 mM pH 7.5 , $100 \text{ }\mu\text{L}$ solución de KNO_2 10 mM , $100 \text{ }\mu\text{L}$ solución metil-viologeno 10 mM y $300 \text{ }\mu\text{L}$ agua destilada.

- Se agregó el ditionito sódico con mínima turbulencia (resbalando las gotas por la pared del tubo), se tapó y agitó suavemente por inversión del tubo una o dos veces, se incubó en oscuridad a 30 °C por 30 min.
- La reacción se detiene abriendo los tubos y agitarlos en vortex por lo menos 5 segundos después de que el color azul ha desaparecido.
- Se tomaron 100 µL de cada tubo y se diluyeron con 2.90 mL de agua destilada.
- Del tubo anterior, se tomó una alícuota de 1 mL y se depositó en el reactivo de coloración (1mL de la solución de sulfanilamida, 1 mL de la solución de NNEDA)
- Se dejan reposar los tubos por 20 min y se leyeron en el espectrofotómetro a 540 nm y se compara contra una curva patrón de nitritos.
- Para los cálculos, considerar que en ésta reacción se reportan los µM NO₂ consumidos por mg de proteína en 30 min.

5.5.5 Evaluación de actividad de glutamina sintetasa (GS, EC 6.3.1.2)

El extracto enzimático se obtuvo como se describe en apartado 5.5.1 con la sustitución de la solución PBS 50mM pH 7.5 por la solución amortiguadora de HEPES-Na 0.2 M pH 7.9.

a. Reactivos

- Solución stock: HEPES-HCl 0.2 M pH 7.9; ver 4.5.1
- Solución MgCl₂ 50mM; Se pesaron y disolvieron 1.016 g de MgCl₂ en 100 mL de agua destilada.

- Solución EDTA-Na 5mM; Se pesaron 0.186 g de EDTA disódico y se disolvieron en agua destilada.
- Glutamato potásico 100 mM; Se disolvieron 1.8714 g de glutamato potásico en 100 mL de agua destilada.
- Solución acetato amónico 50 mM; Se disolvieron 0.385 g de acetato amónico en 100 mL de agua destilada.
- Solución ATP 8mM; Se pesaron 0.405 g de ATP y se disolvieron en 100 mL de agua destilada.
- Solución ácido sulfúrico 1N; Se preparó en un matraz aforado de 1 L, con la adición de 26.3 mL de ácido sulfúrico concentrado.
- Reactivo molibdovanadato HACH®; utilizado también en el apartado 4.3.3.

b. Procedimiento

- La mezcla de reacción estuvo conformada por 300 µL de cloruro de magnesio 50 mM, 100 µL EDTA-sódico 5 mM, 200 µL glutamato potásico 100 mM, 75 µL acetato amónico 50 mM, 200 µL extracto enzimático y 125 µL ATP 8 mM. El tubo blanco carecía de extracto enzimático suplido por solución stock HEPES. Por cada tubo de reacción se preparó un tubo control que nos permitió eliminar el fósforo presente en el extracto enzimático, así que los tubos control carecieron de la solución de ATP 8mM y fue suplida por solución stock HEPES.
- Se Incubaron bajo iluminación a 30°C por 15 min. Para detener la reacción se adicionaron 125 µL de ácido sulfúrico 1N para acidificar el medio.
- Mezclar y preparar una dilución 1:10, para cuantificar la concentración de Pi formado usando la reacción de molibdovanadato (HACH®; Sánchez, et al.,

2006). En un tubo limpio se adicionan 1.80 mL de agua destilada, 200 μ L del tubo de reacción correspondiente más 80 μ L de reactivo molibdovanadato.

- La actividad GS se expresa como μ M Pi producido por mg de proteína en 15 min.

5.6 Evaluación de pigmentos fotosintéticos

Se determinó el contenido de pigmentos fotosintéticos con la extracción por metanol de acuerdo a Wellburn (1994).

a. Reactivos.

Metanol.

b. Procedimiento

- Se eligió la segunda hoja desenvuelta y se tomó una alícuota de 4-6 taleolas de 7 mm de diámetro, se obtuvo un peso entre 0.2-0.3 g de material.
- Se determinó el peso exacto en balanza analítica Sartorius® y se introdujeron en un tubo de ensayo con tapón de rosca.
- Se adicionaron 10 mL de metanol y permanecieron 24 h en obscuridad.
- Se midió la absorbancia del extracto metanólico a 470, 653 y 666 nm.
- La concentración de pigmentos se reporta en μgcm^{-2}

$$\text{Clorofila a} = \frac{[15.65 (A_{666}) - 7.34 (A_{653})](V_1)(p_1)}{(p_2)(2\pi r^2)(n)}$$

$$\text{Clorofila b} = \frac{[27.05 (A_{653}) - 11.21 (A_{666})](V_1)(p_1)}{(p_2)(2\pi r^2)(n)}$$

$$\text{Carotenoides} = \frac{\left[\frac{1000 (A_{470}) - 2.86 (\text{Clorof a}) - 129.20(\text{Clorof b})}{221} \right] (V_1)(p_1)}{(p_2)(2\pi r^2)(n)}$$

Donde:

V_1 = Volumen de la extracción, p_1 = peso en g por taleola, p_2 = peso total en g, n = número de taleolas, $\pi = 3.1416$, y r^2 = radio de la taleola al cuadrado.

4.6 Análisis estadístico

Para los tratamientos con las plantas "M" se probaron 4 fórmulas de fertilización.

Para las plántulas "H" y "ES" se siguió el diseño factorial 2 x 4, esto es, el origen de plántulas ("H" y "ES") y los tratamientos establecidos (a, b, c y d) con 24 repeticiones.

Los datos se sometieron a una prueba de ANOVA usando el programa STATGRAPHICS® V 5.1 y se realizaron pruebas de medias LSD 95% de confianza.

VI. Resultados y Discusión

6.1 Adaptación de plántulas "M"

Las plántulas se recibieron en buenas condiciones de desarrollo y con presencia de raíz (Figura 8). Fueron establecidas en arena humectada con 40 ml del tratamiento correspondiente y la humedad relativa se incrementó por aspersión de agua en la superficie e inmediatamente se taparon las charolas con una tapa transparente que se fue levantando gradualmente hasta retirarse totalmente después de siete semanas.

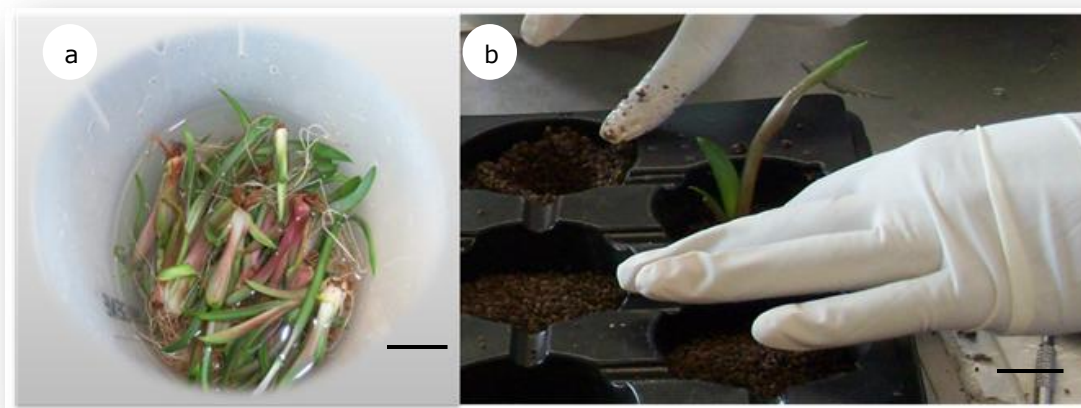


Figura 8. Establecimiento de plántulas de *A. tequilana* "M" para adaptación. a) plántulas en agua para retirar medio de cultivo. b) establecimiento en charolas. Barra = 2cm

Después de cinco semanas se evaluó la adaptación y desarrollo de nuevas hojas a los distintos tratamientos. Se observó el desarrollo de una hoja o más en el 87% de las plantas sometidas al tratamiento A- NH_4NO_3 ; 70% tratamiento B- ØN ; 18% tratamiento C- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y 85% tratamiento D- xNO_3 (Cuadro 5);

fue notable la disminución del crecimiento en el tratamiento C-(NH₄)₂SO₄. El mayor vigor en las plántulas ocurrió bajo los tratamientos con ion nitrato (A-NH₄NO₃ y D-xNO₃). La supervivencia de las plántulas después de 5 semanas fue satisfactoria pues hubo un 100% de plantas vivas en todos los tratamientos en comparación con lo reportado por Cabrera (2003) que reportó supervivencia del 94.8% en aserrín y 97.4% en turba + agrolita como sustratos en el mismo período.

Cuadro 5. Frecuencia de plántulas "M" por número de hojas desarrolladas ex vitro por tratamiento en 5 semanas (n =72).

N° hojas desenvueltas	A-NH ₄ NO ₃	B-ØN	C-(NH ₄) ₂ SO ₄	D-xNO ₃
0	9	22	59	11
1	47	32	13	41
2	15	18	0	19
3	1	0	0	1

6.1.1 Evaluación del crecimiento vegetal

La evaluación del crecimiento se realizó contabilizando el número de hojas desarrolladas *ex vitro* por plántula. La forma y color de las hojas desarrolladas *in vitro* son visualmente distintas a las características de las hojas *ex vitro* (Figura 9). Las hojas producidas bajo condiciones *in vitro* son suculentas, alargadas y visiblemente menos vigorosas que las hojas formadas en el invernadero; éstas se caracterizan por producir cierta cantidad de cera, ser mas anchas y cortas; además se aprecia la formación de espinas laterales y espina apical de mayor tamaño. Las hojas producidas *ex vitro* están constituidas por hojas fotosintéticamente funcionales a diferencia de las hojas

producidas *in vitro*, que obtienen los carbohidratos a partir del medio de cultivo en que se desarrollan.

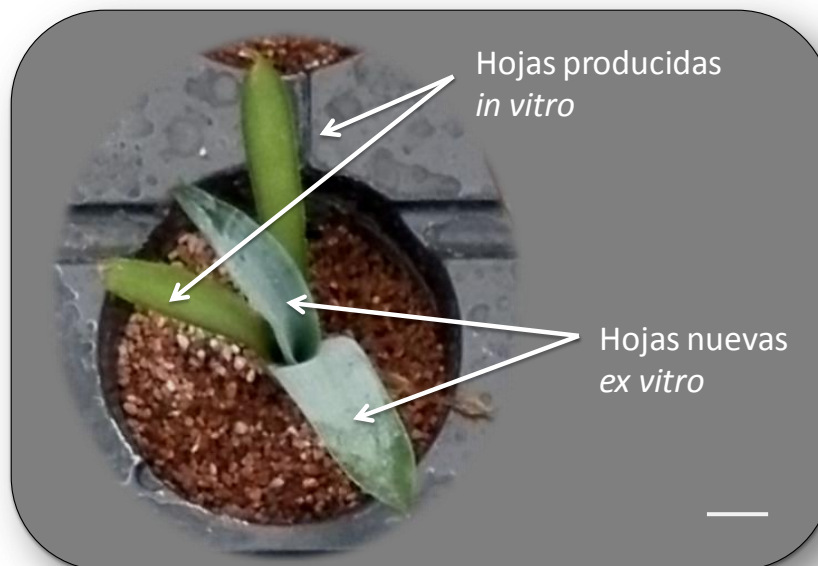


Figura 9. Diferencia visual entre hojas desarrolladas *in vitro* y *ex vitro*. Barra = 1cm.

La segunda evaluación del desarrollo se realizó 10 semanas posteriores al establecimiento de la prueba; se presentó la misma tendencia con un incremento en el porcentaje de plántulas con generación de hojas *ex vitro*; así el 99% de las plantas en el tratamiento A- NH_4NO_3 , 96%, B- ØN , 50% C- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y 97% D- xNO_3 desarrollaron al menos una hoja nueva.

La medición final se realizó después de 16 semanas, el tratamiento C- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ tuvo el mayor porcentaje de plantas muertas (57%). Las plantas que no sobrevivieron presentaron inicialmente un tejido flácido, pero hidratado de color café que se iniciaba en la punta de las hojas desprendidas del cogollo y terminaba con el mismo daño en el cogollo. Este proceso se muestra de izquierda a derecha en la Figura 10, la plántula en el lado izquierdo es una

planta con una hoja nueva desenvuelta y la plántula del centro comienza con los síntomas de flacidez y cambio de color en el tejido, hasta llegar al estado de la planta de la derecha que presenta todo el tejido foliar flácido de color café.



Figura 10. Daño tisular de plántulas de *A. tequilana* bajo tratamiento C- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Izquierda: plántula con una hoja desenvuelta. Centro: inicio de daño. Derecha: planta muerta. Barra = 2cm.

El tratamiento D- xNO_3 presentó el mayor desarrollo evaluado como número de hojas desenvueltas de forma general. Se desarrollaron como máximo 4 hojas por planta en el 7% de la población D- xNO_3 , 2.8% de la población de A- NH_4NO_3 y B- $\emptyset\text{N}$; ninguna planta logró el desarrollo de 4 hojas en el tratamiento C- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. La moda en número de hojas desprendidas fue de 2 al final de las observaciones. Los porcentajes por tratamiento para la moda fueron de 63.8% para A- NH_4NO_3 , 44.4% B- $\emptyset\text{N}$, 20.8% C- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y 30.5% D- xNO_3 (Figura 11) después de 16 semanas bajo las condiciones descritas.

El diámetro del bulbo, longitud aérea y peso fresco del tejido vegetativo, fueron factores significativos que confirman el daño causado por el tratamiento C-(NH₄)₂SO₄ (Cuadro 6). Uvalle-Bueno (comunicación personal) refiere plantaciones establecidas en campo con 3 años de cultivo; que presentaron síntomas similares a los descritos para el tratamiento C-(NH₄)₂SO₄ al aplicar altas concentraciones azufre como control de enfermedades bióticas.

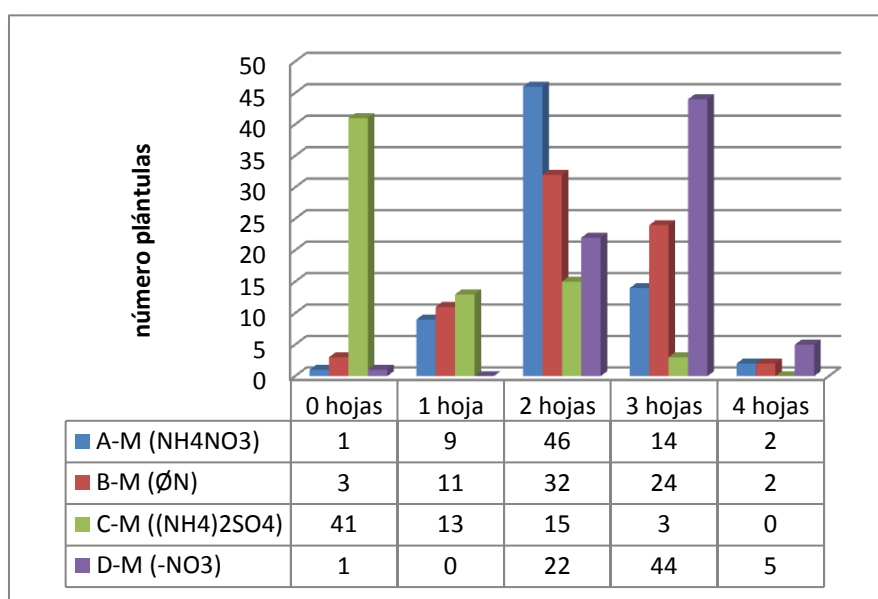


Figura 11. Frecuencia de plántulas de *A. tequilana* "M" de acuerdo al número de hojas desenvueltas en cada tratamiento después de 16 semanas en adaptación (n=72)

Cuadro 6. Evaluación de parámetros de crecimiento de plántulas de *A. tequilana* "M" después de 16 semanas de adaptación

Tratamiento	Diámetro bulbo (cm)	Longitud hoja mayor (cm)	Peso aéreo (gr)	Peso raíz (gr)	Relación aéreo/raíz
A-NH ₄ NO ₃	1.050 b	11.208 c	4.9158 c	0.2681	20.46 bc
B-ØN	1.055 b	8.480 ab	3.7648 b	0.2367	18.68 b
C-(NH ₄) ₂ SO ₄	0.820 a	6.996 a	2.3104 a	0.2236	11.89 a
D-xNO ₃	1.088 b	9.660 bc	4.2958 bc	0.2015	22.31 c

Tratamientos A-NH₄NO₃, B-ØN y C-(NH₄)₂SO₄ n=48; D-xNO₃ n=24. LSD 95.0%.

El diámetro del bulbo o tallo sólo marcó diferencias con el tratamiento C- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, a diferencia de los parámetros de longitud y peso aéreo que resaltan su incremento asociado con la presencia de ion nitrato en los tratamientos A- NH_4NO_3 y D- xNO_3 . La cantidad de raíz medida como peso fresco no presentó diferencia significativa (ANOVA 95%).

De acuerdo a Santacruz-Ruvalcaba *et al.* (2008) es evidente la influencia de la nutrición principalmente nitrógeno y el ambiente, tanto de las plantas madres que proveen el material inicial para una propagación *in vitro*, como las condiciones de de las plántulas antes de ser aclimatadas (adaptadas) en invernadero. Nuestros resultados muestran y apoyan esta aseveración al tener mayor crecimiento en plantas tratadas con nitrógeno nitratos en ambos tratamientos, A- NH_4NO_3 y D- xNO_3 aun cuando no muestran diferencia estadística con el tratamiento B- $\emptyset\text{N}$ (**Figura 12**), carente de nitrógeno en solución.

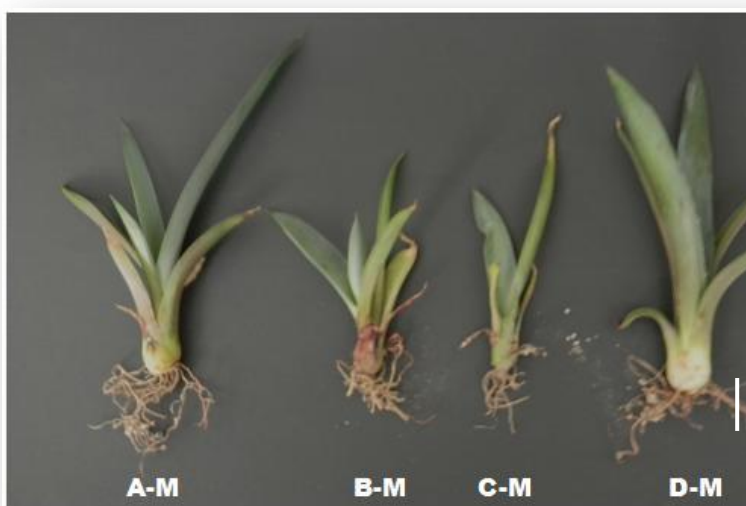


Figura 12. Crecimiento de plántulas de *A. tequilana* "M" bajo distintas fuentes de nitrógeno. A- NH_4NO_3 ; B- $\emptyset\text{N}$; C- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y D- xNO_3 después de 12 semanas *ex vitro*. Barra =2cm.

6.2 Crecimiento de plántulas en invernadero "H" y "ES"

Dos grupos de plantas fueron establecidas de acuerdo a su origen, el primero denominado "ES", es el grupo de plantas obtenidas por cultivo de tejidos vegetales bajo la técnica de "Embriogénesis Somática"; el segundo grupo, fue obtenido mediante "Organogénesis de hijuelos" y se denominó grupo "H". Ambos fueron caracterizados de inicio, pues habían tenido una fase de adaptación previa en el invernadero.

Los grupos establecidos por su origen mostraron diferencias fenológicas siendo las plantas "ES" las de mayor número de hojas, con una hoja desenvuelta más en promedio, sin embargo fueron las de menor porte. El diámetro del bulbo no presenta diferencia significativa.

En cuanto al peso aéreo, las plantas de los tratamientos "H" con 36.23g por planta (base húmeda) fueron de mayor peso que las plantas "ES" con 14.30g. Las plantas "H" presentaron mayor tamaño de bulbo y hojas más grandes en longitud y grosor (Cuadro 7). Las plántulas fueron establecidas sin raíz.

Cuadro 7. Parámetros evaluados al establecimiento del experimento con plántulas de *A. tequilana* "H" y "ES". (n = 96)

Parámetro	No. Hojas	Diámetro del bulbo (cm)	Peso aéreo (gr)
Plantas "H"	2.76 a	1.90 b	36.23 b
Plantas "ES"	3.79 b	1.50 a	14.30 a

Medias con distinta letra en una hilera son estadísticamente diferentes (LSD $p \leq 0.05$)

Los datos tomados en un inicio planta por planta fueron utilizados para evaluar el crecimiento de estos mismos parámetros después de 25 semanas. Se realizó

una resta algebraica entre los valores observados a las 25 semanas y los iniciales en cada una de las plantas para contabilizar el crecimiento.

6.2.1 Evaluación del crecimiento

Después de 25 semanas de tratamiento se evaluaron las plantas en los siguientes parámetros: número de hojas; diámetro del bulbo; peso aéreo y peso de la masa radicular como parámetros de crecimiento (Cuadro 8). Las plantas "H" caracterizadas por mayor tamaño inicial, desarrollaron en promedio una hoja menos, pero formaron mayor masa radicular que las plantas "ES". En cuanto al peso aéreo, ambos grupos de plantas incrementaron el mismo peso, sin embargo, se reflejó con mayor formación de masa aérea en las plantas "ES" pues el crecimiento representa el 167% del peso original y en las plantas "H" fue tan solo el 66% de masa aérea formada.

Cuadro 8. Crecimiento en 25 semanas de plántulas de *A. tequilana* de acuerdo al origen de la plántula "H" y "ES".

Parámetro		No. Hojas	Diámetro del bulbo (cm)	Peso aéreo (gr)	Peso raíz (gr)
Plantas "H"	Inicial	2.67	1.90	36.23	0.00
	25 sem	5.32	2.63	60.15	3.56
	Crecimiento	2.65 a	0.73 a	23.92	3.56 b
Plantas "ES"	Inicial	3.79	1.50	14.30	0.00
	25 sem	6.88	2.35	37.66	2.83
	Crecimiento	3.09 b	0.85 b	23.36	2.83 a

Medias del crecimiento con distinta letra en una hilera son estadísticamente diferentes (LSD $p \leq 0.05$)

Los parámetros medidos fueron diferenciados por tratamiento donde de manera constante se identifica la disminución del crecimiento del tratamiento

con sulfato de amonio como fuente de nitrógeno (tratamiento c-(NH₄)₂SO₄); el número de hojas desenvueltas fue menor en una unidad, el peso aéreo fue 60-80% menor que el resto de los tratamientos en ambos grupos de plántulas (Cuadro 9). La masa radicular en el tratamiento c-(NH₄)₂SO₄ fue la menor producida de todos los tratamientos (Figura 13).

Los tratamientos con amonio (tratamiento a-NH₄NO₃ y c-(NH₄)₂SO₄) presentaron menor desenvolvimiento de hojas aún comparados contra el tratamiento b-ØN, que carecía de la fuente nitrogenada. El tratamiento con sales nítricas presentó similar número de hojas formadas que el tratamiento b-ØN después de 25 semanas de crecimiento para ambos orígenes de las plantas.

Cuadro 9. Evaluación del crecimiento en 25 semanas de plántulas "H" y "ES" de *A. tequilana* por tratamiento (diferencia del valor a las 25 semanas vs valor inicial).

Origen	Tratamiento	Nº de hojas	Diámetro del bulbo (cm)	Peso aéreo (gr)	Peso raíz (gr)	Relación aéreo/raíz
"H"	a (NH ₄ NO ₃)	2.5 b	0.62 a	10.78 a	3.17 ab	3.39 a
	b (Ø N)	3.1 c	0.73 ab	22.76 b	3.36 ab	7.23 b
	c ((NH ₄) ₂ SO ₄)	1.7 a	0.67 a	8.78 a	2.23 a	3.16 a
	d (-NO ₃)	3.3 c	0.91 b	52.86 c	4.46 b	12.55 c
"ES"	a (NH ₄ NO ₃)	3.0 b	0.81 ab	18.80 ab	2.49 ab	7.62 a
	b (Ø N)	3.5 c	0.81 b	26.14 b	3.77 b	7.06 a
	c ((NH ₄) ₂ SO ₄)	2.3 a	0.68 a	10.49 a	1.52 a	7.19 a
	d (-NO ₃)	3.5 c	1.10 c	38.02 c	2.15 a	18.81 b

Medias con distinta letra en una hilera son estadísticamente diferentes (LSD p≤0.05)

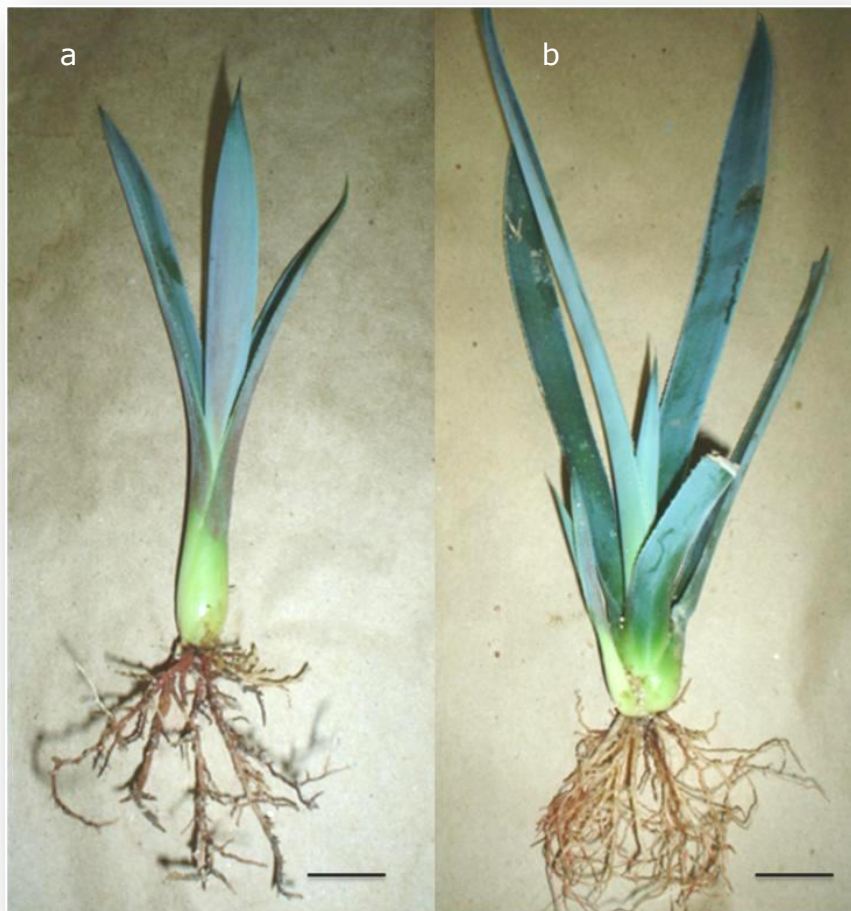


Figura 13. Plántulas de *A. tequilana* "ES" después de 25 semanas en tratamiento nutricional a) $c\text{-(NH}_4\text{)}_2\text{SO}_4$ y b) $d\text{-xNO}_3$. Barra = 1cm.

El tratamiento con mayor crecimiento aéreo medido como peso fresco de masa foliar fue el tratamiento $d\text{-xNO}_3$, notablemente mayor al compararlo con cualquiera de los otros tres tratamientos, 300 % mayor que el tratamiento con nitrato de amonio (tratamiento $a\text{-NH}_4\text{NO}_3$) y 458 % mayor que el suministrado como sulfato de amonio (tratamiento $c\text{-(NH}_4\text{)}_2\text{SO}_4$); estos resultados sugieren un efecto adverso con el suministro de amonio como fuente de nitrógeno para el crecimiento del *A. tequilana*. Otro dato que refuerza la observación es que el

tratamiento d-xNO₃ fue 186% mayor que el tratamiento b-ØN, carente de fuentes de nitrógeno (Figura 14).



Figura 14. Plántulas de *A. tequilana* "H" después de 25 semanas de tratamiento. a) b-ØN (izquierda) y b) c-(NH₄)₂SO₄. Barra=2cm.

El efecto de la fuente de nitrógeno suministrada se manifiesta en general como producción de masa foliar; en el caso del *A. tequilana*, se manifestó en el número y peso de la parte aérea de la planta y tamaño del bulbo. El tratamiento carente de nitrógeno (tratamiento b-ØN) desarrolló el mismo número de hojas que el tratamiento máximo (tratamiento d-xNO₃), siendo menor en cuanto al diámetro del bulbo a las 25 semanas de observación

(Cuadro 9). Estos resultados sugieren la presencia de microorganismos en la base de la hoja (Beltrán y White, comm. personal) o bien, establecidos en el sustrato durante el transcurso de los ensayos.

En general la relación parte aérea:raíz se encuentra entre 5-7:1; sin embargo por efecto de las sales de nitrato esta relación se ve afectada incrementando al 300% esta relación, lo que podría contribuir a un efecto de deshidratación al momento de exponer estas plantas a una humedad relativa menor a la que se conserva en el invernadero.

6.2.2 Color Munsell® tejido foliar

El color del tejido vegetal refleja la influencia de la luz, temperatura y la composición química del suelo, especialmente cuando la planta se enfrenta a deficiencias nutricionales. En ocasiones el color puede reflejar el efecto de sustancias tóxicas o la presencia de organismos dañinos. El color del tejido foliar ayuda a resolver problemas de índole taxonómica, genética, fisiológica, patológica y nutricional de las plantas.

El sistema Munsell de notación de color se describe como una forma científica de describir y analizar el color en término de tres atributos: matiz, valor y croma. El matiz se divide en cinco clases principales: rojo (red), amarillo (yellow), verde (green), azul (blue) y púrpura (purple) y sus combinaciones que generan subclases como amarillo-rojo, verde-amarillo, verde-azul, etcétera. Para cada clasificación de matiz, se divide en diez medidas o valores. La notación Munsell describe el matiz por el número la medida seguido por las iniciales americanas en mayúscula del matiz o color correspondiente y posteriormente la clasificación de valor/croma.

El valor indica el grado de brillantez u oscuridad de un color en relación a una escala gris neutro que se extiende del negro puro simbolizado por 0/, al blanco puro representado por 10/. El croma indica la saturación de color, también en una escala del /0 al /10.

El color de una planta de agave sana corresponde a la notación 5BG 6/2, reportada por Uvalle-Bueno, *et al* (2003).

Se realizó la medición del color en cinco plantas por tratamiento utilizando las tablas de color Munsell® para tejido vegetal (Figura 15). Cada planta evaluada por su color, constituyó una muestra para la determinación de minerales en tejido foliar y de raíz (Cuadro 10).

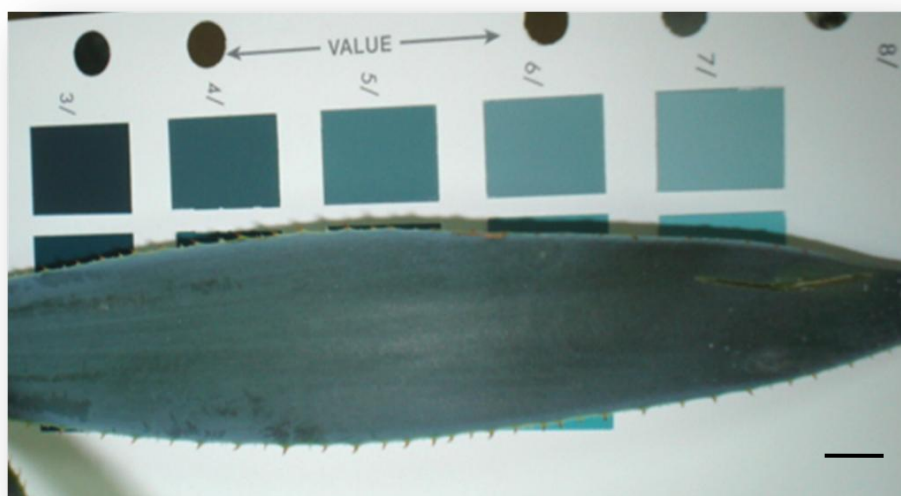


Figura 15. Clasificación de *A. tequilana* en base a las tablas de color de Munsell®. Barra =1cm

En su mayoría, las hojas desarrolladas en invernadero que provenían de la organogénesis de hijuelos denominadas "H" presentaron un color verde intenso que se diferencia del color reportado para agave 5BG 6/2 que tiende a ser azulado.

Cuadro 10. Evaluación del color por el método Munsell® en plantas de *A. tequilana* "H" sometidas a cuatro fuentes de nitrógeno inorgánico distintas por 25 semanas.

Tratamiento	A-NH ₄ NO ₃	B-ØN	C-(NH ₄) ₂ SO ₄	D-xNO ₃
Planta 1	7.5G 4/2	5G 3/2	2.5G 4/4	7.5GY 4/2
Planta 2	5G 5/2	5G 3/2	2.5G 3/2	7.5GY4/2
Planta 3	5BG 5/2	7.5G 4/2	2.5G 4/2	2.5G 4/2
Planta 4	5G 5/2	5G 4/2	7.5GY 3/2	2.5G 4/2
Planta 5	7.5GY 4/4	5G 4/2	7.5GY 4/2	2.5G 4/2

Las plantas "ES" presentaron en los tratamientos b-ØN y d-xNO₃ mayor tendencia a la carta azul-verde (BG por sus siglas en inglés, blue-green) de las tablas de Munsell® (Figura 16 y Cuadro 11), lo que nos sugiere un sistema más cercano al funcionamiento fisiológico de las plantas de agave en campo, y por tanto su proceso de adaptación pudiese ser menor para las plántulas ES comparado con las plántulas H.

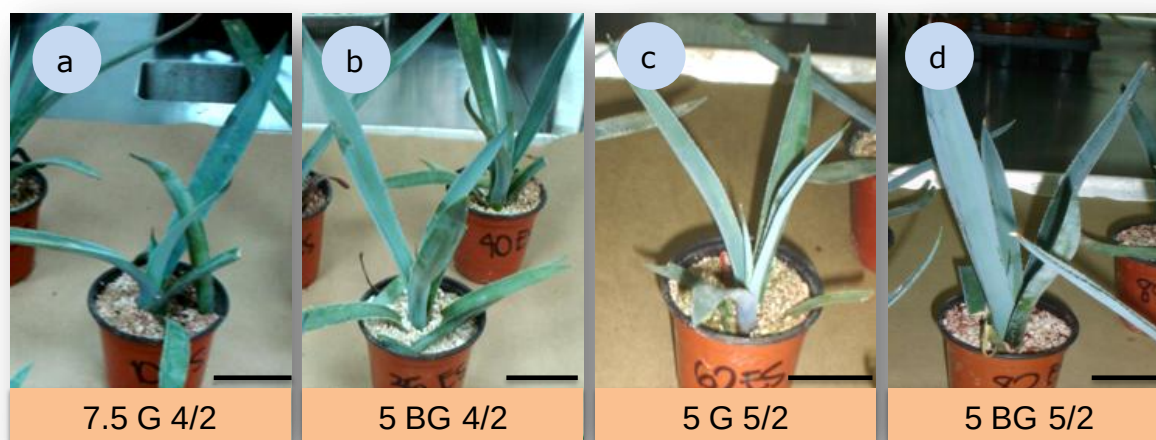


Figura 16. Plántulas de *A. tequilana* "ES" mostraron coloraciones distintas en base a la tabla de color para tejido vegetal de Munsell®. Tratamientos a) a-NH₄NO₃ b) b-ØN c) c-(NH₄)₂SO₄ y d) d-xNO₃ Barra =5cm

Cuadro 11. Evaluación del color por el método Munsell® en plantas de *A. tequilana* "ES" sometidas a cuatro fuentes de nitrógeno inorgánico distintas por 25 semanas.

Tratamiento	A-NH ₄ NO ₃	B-Ø N	C-(NH ₄) ₂ SO ₄	D-xNO ₃
Planta 1	7.5G 4/2	5BG 5/2	7.5G 5/2	5BG 5/2
Planta 2	7.5G 4/2	5BG 5/2	5G 5/2	5BG 5/2
Planta 3	5BG 5/2	5BG 4/2	5G 5/2	5BG 5/2
Planta 4	7.5G 5/2	5BG 5/2	5BG 5/2	5BG 5/2
Planta 5	5BG 5/2	5BG 5/2	7.5G 6/2	5BG 5/2

6.3 Evaluación nutricional del tejido vegetal

Las soluciones nutritivas utilizadas en este tratamiento fueron formuladas con elevadas concentraciones de nutrientes comparadas con las descritas Nikolaeva y Niño (2007) aplicadas bajo un sistema hidropónico (Cuadro 12). La concentración del ion S-SO₄²⁻ se afectó derivado de las fuentes utilizadas, así los tratamientos A-NH₄NO₃ y B-ØN contenían 720 mg L⁻¹ de S, mientras el tratamiento D-xNO₃ solo 333 mg L⁻¹; sin embargo el tratamiento C-(NH₄)₂SO₄ se incrementó hasta 2,095 mg L⁻¹ por la adición de sulfato de amonio como fuente nitrogenada.

Otro elemento que se vio considerablemente afectado por las modificaciones en la fuente nitrogenada fue el Na⁺, en el tratamiento D-xNO₃ se elevó hasta 500 mgL⁻¹ debido a la utilización de nitrato de sodio y el resto de los tratamientos presentaron una concentración de 230 mgL⁻¹.

En el caso de las soluciones utilizadas para el crecimiento de las plántulas de *A. tequilana* "H" y "ES", considerando que fueron un decimo de lo reportado en la tabla 7, se diferenciaron básicamente de la solución descrita por Nikolaeva y Niño (2007) en la cantidad de nitrógeno amoniacal y nítrico, calcio, azufre y los

micronutrientes Cu, Fe, Mn y Zn. No se reporta la adición de Mo, ni la cantidad de Na adicionada. La nomenclatura para estas soluciones se considera con letras minúsculas, indicando que su concentración es un decimo la formulación utilizada en la fase de adaptación.

Cuadro 12. Contenido elemental (mgL^{-1}) de las soluciones nutritivas (A, B, C y D) en comparación con la solución reportada por Nikolaeva y Niño, 2007.

Elemento	Nikolaeva y Niño, 2007	A- NH_4NO_3	B- O N	C- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	D- xNO_3
N – NH_4^+	14.00 – 28.00	600	-	1200	-
N – NO_3^-	90.00 – 100.00	600	-	-	1200
P	30.00 – 40.00	400	400	400	400
K⁺	160.00 – 180.00	1700	1700	1700	1700
Ca²⁺	60.00 – 80.00	1000	1000	1000	1000
Mg²⁺	20.00 – 30.00	250	250	250	250
S – SO_4^{2-}	40.00 – 50.00	720	720	2095	333
Fe²⁺	0.80 – 1.00	6	6	6	6
Mn²⁺	0.15 – 0.20	9	9	9	9
B	0.20 – 0.30	4	4	4	4
Zn²⁺	0.15 – 0.25	5	5	5	5
Cu²⁺	0.03 – 0.05	2	2	2	2
Mo	-	1.7	1.7	1.7	1.7
Na	-	230	230	230	500
C.E. (dS/m)	1.0 - 1.2	9.0 – 11.0	9.0 – 11.0	9.0 – 11.0	9.0 – 11.0

6.3.1 Macronutrientes

Los macronutrientes son aquellos elementos que requieren las plantas en mayores cantidades como lo son, el nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K) y en algunos cultivos como el *A. tequilana*, por la demanda que presenta, podemos considerar el calcio (Ca) y magnesio (Mg) como miembros de éste grupo.

En el caso de las plántulas "M", que se evaluaron durante el proceso de adaptación se colectó el tejido foliar generado *ex vitro* y el total del sistema radicular. La cantidad de tejido vegetal generado en 16 semanas fue muy reducido. Se conjuntó una muestra compuesta por tratamiento a fin de lograr la cantidad adecuada para el análisis mineral. Por tal motivo, no fue posible realizar el análisis estadístico de los datos.

En el caso del tratamiento C-(NH₄)₂SO₄ se colectó una muestra del tejido foliar de las plántulas muertas se deshidrató, molió y tamizó para su análisis. Los resultados de los elementos mayores se presentan en el Cuadro 13.

Las plántulas de *A. tequilana* "H" y "ES" fueron analizadas de forma individual, por lo que fue posible hacer el análisis de varianza y la comparación de medias para el tejido aéreo. En el caso del tejido radicular, también se trabajaron muestras compuestas.

Cuadro 13. Influencia del tratamiento nutricional sobre la cantidad de macronutrientes presentes en tejido foliar de *A. tequilana* "M" después de 16 semanas de adaptación (g Kg⁻¹ base seca).

Tratamiento	N-NO ₃ ⁻	N-NH ₄ ⁺	P	K	Ca	Mg
A-NH ₄ NO ₃	0.18	6.23	3.95	4.52	8.89	2.99
B-ØN	0.23	3.85	4.06	5.35	10.74	3.60
C-(NH ₄) ₂ SO ₄	0.39	4.31	5.00	4.22	9.20	2.87
D-NO ₃)	0.38	5.25	3.00	4.00	12.24	2.60
C-(NH ₄) ₂ SO ₄ muertas	0.35	8.90	2.05	3.02	12.35	3.93

6.3.1.1 Nitrógeno

El nitrógeno es el elemento más limitativo en sistemas naturales de cultivo y es el elemento más importante constituyente esencial de los tejidos. La forma de medirlo en el tejido es como nitrógeno total, nitrógeno en forma de nitratos

o amonio de forma independiente. En el presente reporte se presentan las formas minerales analizadas en el tejido foliar y radicular.

En las plántulas de *A. tequilana* "M" en proceso de adaptación, la cantidad de nitrógeno en forma de ion nitrato se encontró en la misma proporción en los tratamientos D- xNO_3 y C- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en el tejido foliar, aún cuando crecieron bajo distintas fuentes de nitrógeno; de igual forma, no existe diferencia entre la cantidad de nitrógeno amoniacal presente en el tejido foliar de ambos tratamientos; lo que sugiere la alta movilidad del nitrógeno dentro de la planta de *A. tequilana* como en la mayoría de los cultivos. El valor de nitrógeno nitratos en el tejido vegetal de ambos tratamientos es mayor al valor de suficiencia reportado por Uvalle-Bueno y Vélez-Gutiérrez (2007) descrito en el Cuadro 2. El tratamiento B- $\emptyset\text{N}$ presentó valores de suficiencia en nitrógeno nitratos; el tratamiento A- NH_4NO_3 adicionado con nitrato de amonio como fuente de nitrógeno reportó valores inferiores a la suficiencia en el tejido foliar, más en raíz presenta 1.165 gKg^{-1} de N-NO_3^- muy cercano a los valores del tratamiento B- $\emptyset\text{N}$. La cantidad de N-NO_3^- en la raíz fue de 4.621 gKg^{-1} en el tratamiento D- xNO_3 . Cabe señalar que la cantidad de N-NO_3^- presente en la raíz de las plántulas expuestas al tratamiento C- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fue muy inferior a estos valores (0.207 gKg^{-1}) en respuesta a la dosificación de sulfato de amonio como fuente nitrogenada (Figura 17).

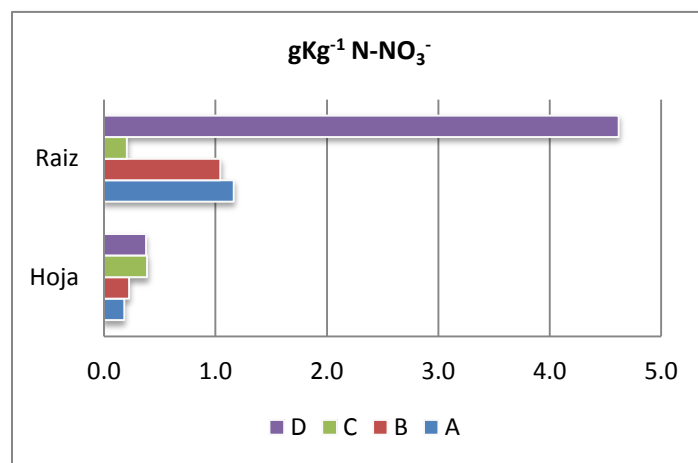


Figura 17. Acumulación de N-NO₃⁻ en hojas y raíces de *A. tequilana* "M" en respuesta a 16 semanas de exposición a distintas fuentes de nitrógeno inorgánico. A-NH₄NO₃, B-ØN, C-(NH₄)₂SO₄ y D-xNO₃.

Para las plántulas de *A. tequilana* "H" y "ES" en etapa de crecimiento, la acumulación de N en el tejido foliar alcanzó de 0.32 a 0.44 gKg⁻¹ de tejido seco (Figura 18). Las plantas "H" retuvieron mayor cantidad de N-NO₃ 0.42 mgKg⁻¹ en comparación con el grupo de plantas "ES" que en promedio presentó 0.34 mgKg⁻¹ de N-NO₃.

Independientemente del origen, las plantas se comportaron de forma distinta por tratamiento. El tratamiento d-xNO₃ contenía la menor cantidad de ion nitrato en el grupo "H", mientras que resultó similar al tratamiento b-ØN y c-(NH₄)₂SO₄ en las plantas "ES".

La introducción y acumulación de N-NO₃ en la raíz se aprecia en el tratamiento D que tiene ésta fuente oxidada de N como única fuente de N, el mismo efecto se reportó en las plántulas en adaptación del tratamiento d-xNO₃ (Figura 17).

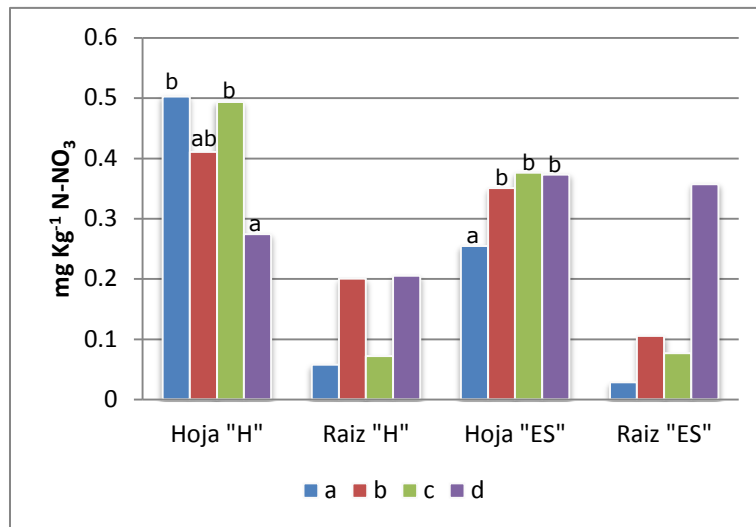


Figura 18. Grafica de medias para contenido de $N-NO_3$ ($mg\ Kg^{-1}$) en tejido foliar y radicular base seca de *A. tequilana* "H" y "ES" por tratamiento ($n=10$). Barras con distinta letra en un grupo son estadísticamente diferentes ($LSD\ p \leq 0.05$). Medias de hojas $n=5$. Se formó una muestra compuesta con la raíz de cada tratamiento.

Se conoce la baja actividad que presentan otras plantas como el tabaco para la asimilación de nitratos por la nitrato reductasa en raíz, con una actividad de NR diez veces menor en raíz que en hojas (Hänsch *et al.*, 2001), el ion nitrato se transporta hasta las hojas para ser rápidamente asimilado desde nitrato hasta glutamina siguiendo NR-NiR-GS-GOGAT y metabolizar rápidamente los productos que pudiesen ser tóxicos para los tejidos.

La otra forma nitrogenada inorgánica que puede ser absorbida y asimilada por las plantas es el NH_4^+ y fue suministrada en el tratamiento a- NH_4NO_3 en la misma molécula que el ion nitrato y en el tratamiento c- $(NH_4)_2SO_4$.

Cuadro 14. Concentración de nitratos (gKg^{-1}) en tejido de hoja y raíz de plántulas "H" y "ES"

Origen	Tratamiento	Hoja	Raíz
"H"	a- NH_4NO_3	0.50 a	0.057
	b- ØN	0.41 ab	0.200
	c- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.49 a	0.071
	d- xNO_3	0.27 b	0.205
"ES"	a- NH_4NO_3	0.254 a	0.028
	b- ØN	0.350 b	0.105
	c- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.376 b	0.076
	d- xNO_3	0.373 b	0.357

Medias con distinta letra en una hilera son estadísticamente diferentes (LSD $p \leq 0.05$). En hoja $n = 5$. Se formó una muestra compuesta con la raíz.

Se ha demostrado en varios estudios que un elevado aporte de amonio en el medio perjudica el crecimiento y producción de las plantas en comparación con plantas que han sido fertilizadas con ion nitrato; más esto depende de cada especie vegetal (Van Beusichem *et al*; 1988). En el caso de la planta del Té (*Camellia sinensis*) cultivada en China, se reporta que la aplicación de nitrógeno en forma de nitratos provoca síntomas de deficiencia de nitrógeno al inicio del experimento, con hojas amarillentas con bajo contenido de clorofilas así como una disminución considerable en la cantidad de biomasa comparada con el suministro de nitrógeno amoniacal o la adición de nitrato de amonio, que al tener ambas fuentes de nitrógeno, no se reporta diferencia significativa con la aplicación de amonio solamente. Se muestra además el incremento en la suma de cationes (K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} y Na^+) y la suma de aniones orgánicos (malato $^{2-}$, oxalato $^{2-}$ y citrato $^{2-}$) en relación al incremento de pH en presencia de

nitratos, lo cual es opuesto a lo que sucede con amonio, o la combinación de ambas fuentes (Ruan *et al.*, 2007).

Kalanchoë blossfeldiana, una planta con metabolismo CAM, similar al agave, responde mayormente a la aplicación de nitrato en comparación de la presencia de ion amonio, en ambos casos, el estrés por sequía incrementa el rendimiento CAM, pero la discrepancia entre los iones se incrementa (Ota *et al.*, 1988 y Ota, 1988).

En el caso de *A. tequilana* no existen reportes sobre la forma nitrogenada que favorece su desarrollo; los resultados mostrados en este trabajo sugieren que la aplicación de fuentes de N-NO_3 favorecen la absorción y asimilación de nitrógeno para el desarrollo de la planta en invernadero; se favorece la acumulación de ambas formas de nitrógeno, nitratos y amonio en la raíz estadísticamente mayores en el tratamiento D- xNO_3 , que en el resto de los tratamientos (Figura 18)

En cuanto a la presencia de N-NH_4^+ en hojas y raíces se observan condiciones de acumulación mayores en el tratamiento D- xNO_3 que el tratamiento C- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Figura 19), lo que sugiere una alta actividad de las enzimas NR y NiR responsables de la reducción del ion nitrato.

En lo que respecta a las plántulas "H" y "ES", no presentan diferencia significativa en la concentración al ion amonio en tejido foliar y de raíz. La ausencia de N en la formulación (tratamiento b- $\emptyset\text{N}$), presentó una concentración similar a la encontrada en el resto de los tratamientos, excepto en el tratamiento a- NH_4NO_3 , donde la concentración fue menor al resto, de forma similar lo reportado para la adaptación de las plántulas "M".

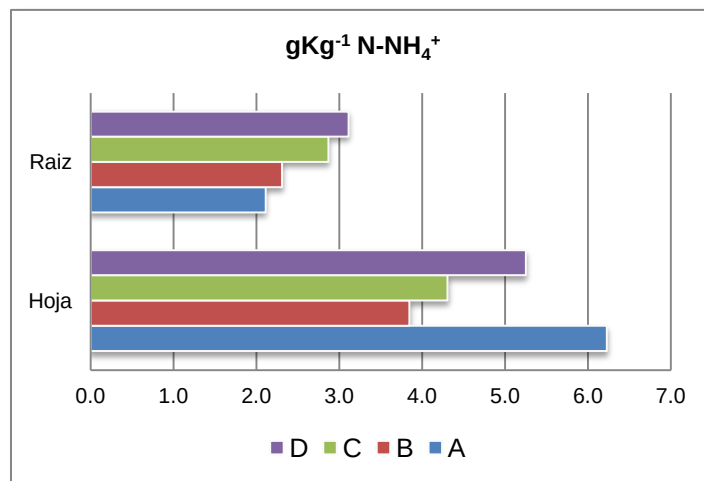


Figura 19. Presencia de $N-NH_4^+$ en raíces y hojas de *A. tequilana* "M" después de 16 semanas de exposición a distintas fuentes de nitrógeno inorgánico.

La presencia del ion amonio en hojas y raíces, no solo obedece a la introducción del nitrógeno suministrado, sino también, al NH_4^+ producto de la fotorespiración; que no fue medida en nuestros ensayos.

La aplicación de nitrógeno en forma de amonio causa sinergismo en la toma de sulfatos en comparación a la aplicación de nitratos que causa antagonismo con el ion sulfato (Büning-Pfaue u Dick-Hennes 1994); aunado a este conocimiento, la cantidad de sulfato en la solución del tratamiento C- $(NH_4)_2SO_4$ fue mayor que en el resto de las soluciones (Cuadro 12).

Las plantas de *A. tequilana* pueden tolerar un exceso de nitrato en mucho mayor grado que el exceso de amonio de acuerdo a lo reportado en este documento. Las plantas muertas mostraron una alta acumulación de $N-NH_4^+$ y ion sulfato (datos no reportados). Hodges (2002) menciona que los niveles altos de amonio pueden ser tóxicos para las plantas si no son incorporados a compuestos carbono-nitrógeno mediante la ruta de glutamina sintasa-

glutamato deshidrogenasa (GS/GOGAT) regulándose este sistema a través del crecimiento y desarrollo de las plantas.

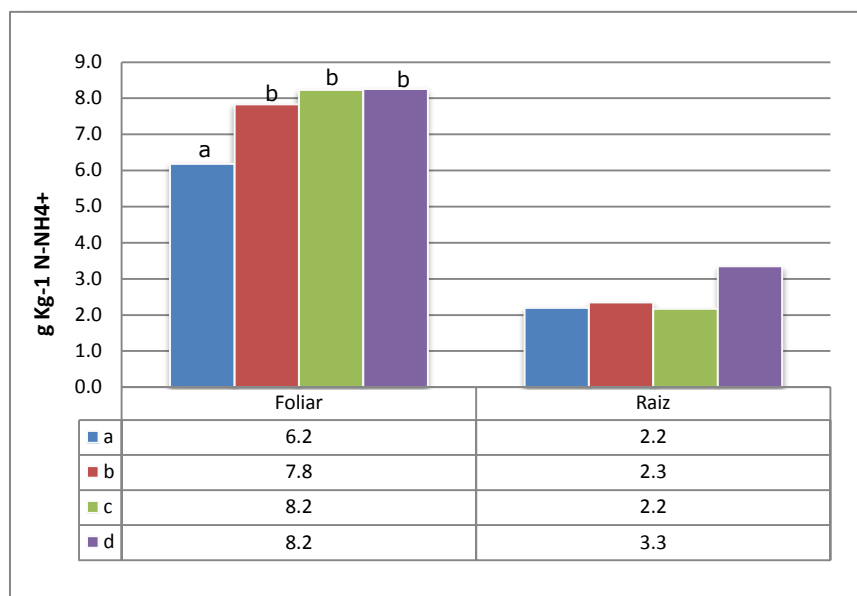


Figura 20. Acumulación de NH_4^+ en hojas y raíces de plantas de *A. tequilana* "H" y "ES" como respuesta a diferentes fuentes de nitrógeno inorgánico. Barras con distinta letra en un grupo son estadísticamente diferentes (LSD $p \leq 0.05$). Medias de hojas $n=5$. formó una muestra compuesta con la raíz de cada tratamiento.

Con respecto al ion amonio se ha demostrado en diversos estudios que un elevado aporte de este catión al medio, perjudica el crecimiento y producción de las plantas en comparación con plantas que han sido fertilizadas con nitratos (Sánchez-Chavez, 2006). La toxicidad del amonio puede deberse a la inducción de deficiencias por acción antagónica con otros nutrientes, especialmente cationes; la inhibición del crecimiento secundario originado por la acidificación del medio radicular; alteraciones en el pH intracelular y balance osmótico; desacoplamiento del transporte de electrones en la fotofosforilación;

y finalmente, la alteración del metabolismo de las poliaminas y fitohormonas (Gerendás *et al.*, 1997, citado por Sánchez-Chavez, 2006).

Se reporta un valor de suficiencia para el azufre en hojas de 0.169 a 0.238 gKg^{-1} y toxicidad en plantas en cultivo comercial con concentraciones mayores a 0.400 gKg^{-1} , lo que equivale a una concentración de 1.20 gKg^{-1} de ion sulfato (SO_4^{2-}) en tejido foliar (Uvalle-Bueno y Vélez-Gutiérrez, 2010); este valor es superado más de 10 veces en el tejido de hojas de plantas sometidas al tratamiento C- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Figura 21). En el resto de los tratamientos la concentración de ion sulfato en el tejido foliar fue menor al límite de detección (0.13 mgKg^{-1}); valor que se puede sugerir se produce por la contraposición electrostática que pudiesen tener el SO_4^{2-} con el nitrato NO_3^- por estar ambos cargados negativamente. Además de este efecto, no se debe perder de vista la elevada concentración de SO_4^{2-} adicionado en el tratamiento C- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (aprox. 2000 mg l^{-1}) contra menos de la tercera parte en el resto de los tratamientos.

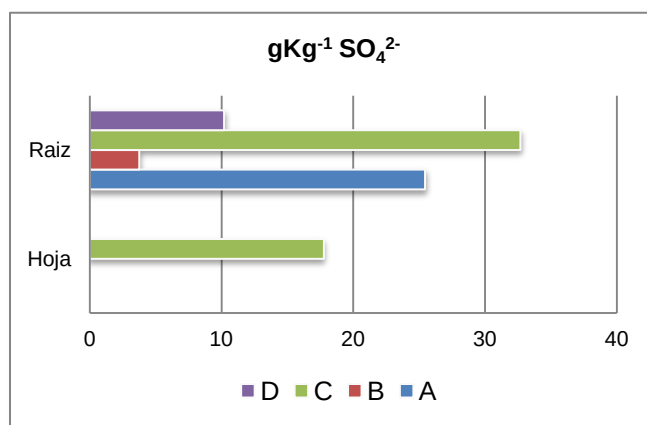


Figura 21. Acumulación de sulfatos (SO_4^{2-}) en hojas y raíces de *A. tequilana* "M" expuesto por 16 semanas a distintos tratamientos nutricionales.

6.3.1.2 Fósforo

El fósforo después del nitrógeno, es el segundo elemento nutricional limitante para el crecimiento de las plantas, en el caso de *A. tequilana* el nivel de suficiencia se reporta entre 2.5 y 3.6 gKg⁻¹ de P total en plantas establecidas en cultivo comercial (Uvalle-Bueno y Vélez-Gutiérrez, 2007); sin embargo, Nikolaeva y Niño (2007) reporta en plántulas con 7 semanas en fase de adaptación 4.5 gKg⁻¹, por lo que podemos decir que las plántulas "M" después de 16 semanas de adaptación se encuentran en niveles de P total foliar aceptables para esta fase de desarrollo (Figura 22).

El fósforo es un componente clave para muchas moléculas que participan en procesos básicos para las plantas, como lo son, ácidos nucleicos, fosfolípidos y ATP que provee de energía a una cantidad importante de reacciones enzimáticas. En nuestro experimento con plántulas en fase de adaptación la aplicación de N-NO₃⁻ favorecieron los niveles de P total en la raíz y en la hoja, lo que se asocia con un mayor crecimiento del tejido aéreo. La cantidad de fósforo total en la hoja tratada con sulfato de amonio mostró la mayor concentración de P; éste resultado en *A. tequilana* coincide con resultados similares en diversos cereales, lo que indujo la aparición de fertilizantes en el mercado de fosfato monoamónico (MAP) y fosfato diamónico (DAP), así con un producto proveen ambos elementos esenciales sirviéndose del sinergismo para su asimilación por las plantas (Yúfera y Carrasco, 1981).

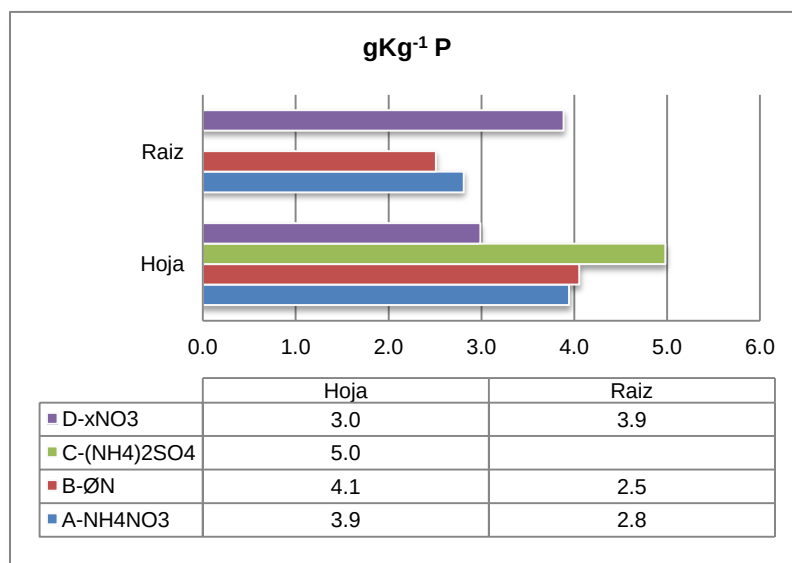


Figura 22. Efecto de tratamientos con nitrógeno inorgánico sobre la cantidad de fósforo total presente en hojas y raíces de *A. tequilana* "M" después de 16 semanas de exposición

No se reportan datos de raíz del tratamiento C-(NH₄)₂SO₄, pues el material obtenido fue insuficiente para realizar todas las pruebas. La concentración de P en el tejido foliar del tratamiento C-(NH₄)₂SO₄ fue mayor al resto de los tratamientos (Figura 22), sin embargo, en la etapa de crecimiento, el tratamiento c-(NH₄)₂SO₄ fue el que presentó la menor concentración de éste ion en tejido foliar (Figura 23), lo que sugiere una mayor sensibilidad de las plántulas de *A. tequilana* "M" que se encontraban en la fase de adaptación *ex vitro* en comparación con plántulas ya en invernadero con todas sus hojas verdaderas.

Las plantas toman el fósforo principalmente en forma de H₂PO₄⁻ y HPO₄²⁻. Las plantas deficientes en fósforo presentan detención en su desarrollo y sus hojas son de color verde oscuro y se muestra la tendencia a formar antocianinas de color rojo o púrpura. La presencia de fósforo total en ambos tejidos (hoja y

raíz) fue similar para las plántulas "H" y "ES", pero se vio influenciada por las distintas fuentes de nitrógeno suministradas.

El sulfato de amonio fue la fuente nitrogenada que afectó significativamente la cantidad de fósforo en el tejido foliar de las plántulas en crecimiento, su concentración se vio disminuida de un 75-80% del resto de los tratamientos. En comparación con las plántulas en desarrollo (Figura 22), las plántulas en crecimiento (Figura 23) mostraron menor variabilidad entre tratamientos, y todos estuvieron dentro del rango de suficiencia descrito por Uvalle-Bueno y Vélez-Gutierrez (2007) para *A. tequilana* en producción comercial.

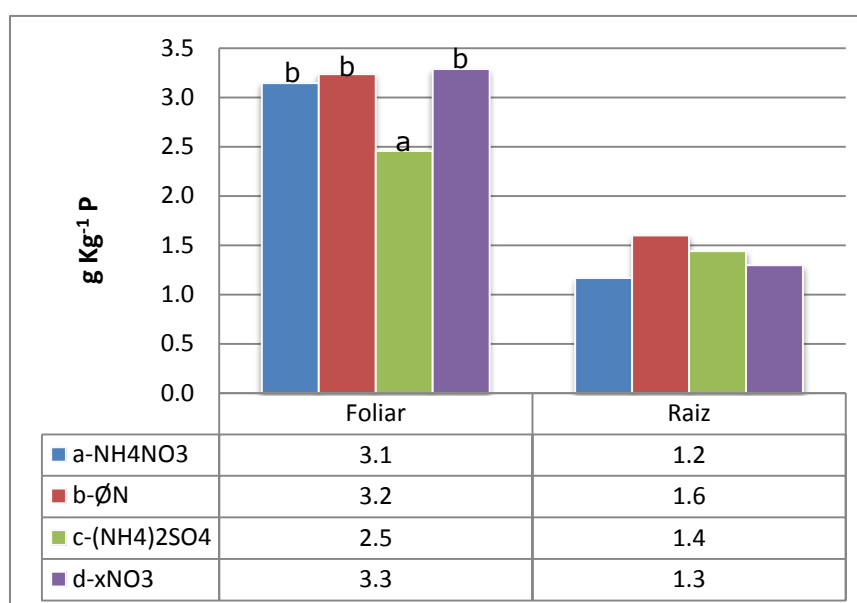


Figura 23. Acumulación de fósforo hojas y raíces de plantas de *A. tequilana* "H" y "ES" como respuesta a diferentes fuentes de nitrógeno inorgánico. Barras con distinta letra en un grupo son estadísticamente diferentes (LSD $p \leq 0.05$). Medias de hojas $n=5$. Se formó una muestra compuesta con la raíz de cada tratamiento.

6.3.1.3 Potasio

El potasio, al igual que el nitrógeno y el fósforo es un nutriente esencial para las plantas; su comportamiento es muy similar al que presentan estos elementos, se redistribuye con suma facilidad de los órganos maduros a los juveniles dada su movilidad y baja afinidad por los ligandos orgánicos de los que fácilmente se intercambia.

El NH_4^+ puede restringir la absorción de K^+ al competir por los lugares de absorción en la raíz (Benton Jones, 1999). En nuestro estudio no fue notorio este efecto y se obtuvieron niveles de potasio total superiores a los reportados como suficiencia para plantas establecidas en cultivo comercial ($25.2\text{-}35.7 \text{ gKg}^{-1} \text{ K}$) y más cercano al valor reportado en plántulas en desarrollo $48.0 \text{ gKg}^{-1} \text{ K}$ total en tejido foliar. Se menciona que el ion nitrato es sinérgico con potasio (Bergmann y Neubert, 1976). En nuestros resultados con *A. tequilana* en el proceso de adaptación existe un incremento promedio del 18% en la cantidad de K total en el tratamiento B-ØN, carente de N en comparación con los otros tres tratamientos (Figura 24). El potasio participa en la activación de muchas enzimas, la regulación de las relaciones hídricas, la transpiración, las relaciones energéticas, la absorción de nitrógeno, la síntesis de proteínas y sistemas de defensa en las plantas. Así pues, se sugiere que el incremento en la concentración del potasio en el tratamiento carente de nitrógeno se asocia con la necesidad de obtener nitrógeno para el desarrollo de la planta.

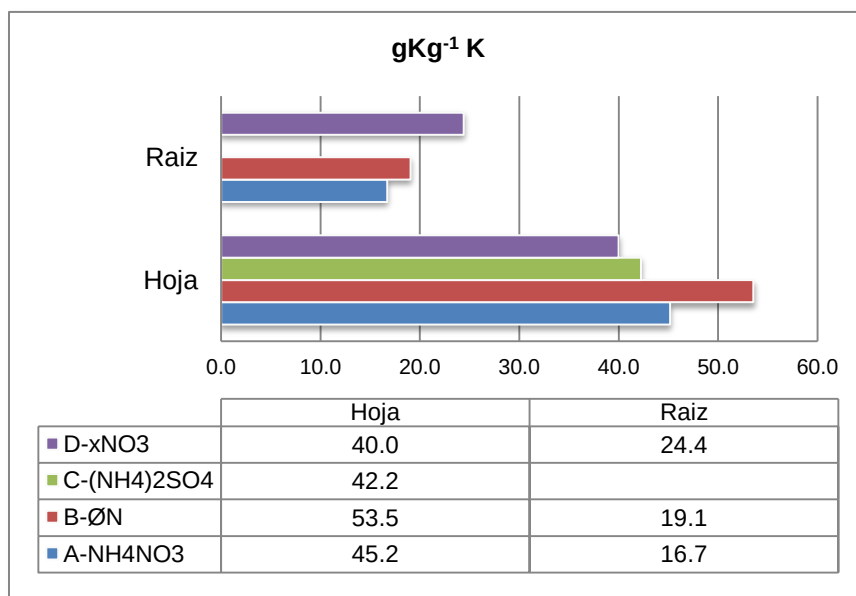


Figura 24. Potasio total en tejido de hojas y raíces de plántulas de *A. tequilana* "M" bajo distintas fuentes de nitrógeno inorgánico por 16 semanas.

El potasio es un elemento importante para la translocación y apertura estomática y se ha reportado como influenciado por la fuente nitrogenada suministrada como sustrato para la planta. Se incrementa su contenido en el tejido vegetal en presencia de ion nitrato y disminuye cuando está presente el ion amonio (Bergmann y Neubert, 1976). En nuestra experiencia se confirmó esta respuesta en las plántulas de *A. tequilana* "H" y "ES", pues el tratamiento d-xNO₃ que contiene únicamente como fuente nitrogenada NO₃⁻ fue 40% mayor en contenido de K que el tratamiento con NH₄⁺ como fuente nitrogenada (c-(NH₄)₂SO₄). El tratamiento con nitrato de amonio y el carente de fuente de nitrógeno tuvieron un nivel similar al tratamiento d-xNO₃. En el sistema radicular no se presentó este comportamiento (Figura 25).

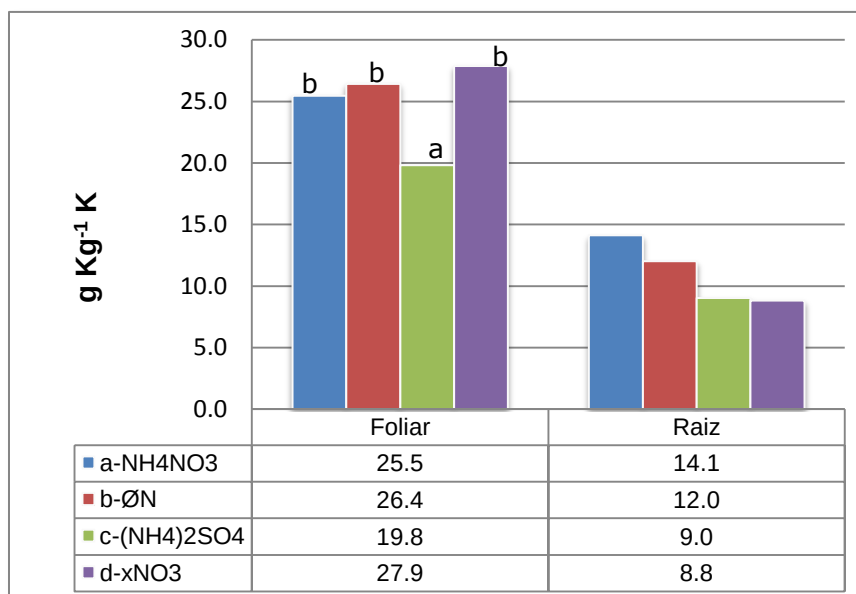


Figura 25. Acumulación de potasio en hojas y raíces de plantas de *A. tequilana* "H" y "ES" como respuesta a diferentes fuentes de nitrógeno inorgánico. Barras con distinta letra en un grupo son estadísticamente diferentes (LSD $p \leq 0.05$). En hoja media con $n = 5$. formó una muestra compuesta con la raíz de cada tratamiento.

Al considerar el origen del material en crecimiento, no se presentó diferencia significativa entre las plántulas "H" y "ES" de *A. tequilana*.

6.3.1.4. Calcio

La falta de calcio da lugar en muchas especies vegetales a una rápida y espectacular desintegración total de los meristemos terminales del tallo y de la raíz, apareciendo como primer síntoma deformaciones en las nuevas hojas. Este elemento participa en el funcionamiento interno de la planta y como regulador radicular en la absorción de otros iones, por ejemplo el magnesio.

El calcio y el magnesio, cationes divalentes considerados antagónicos entre sí, ven favorecida su absorción con la presencia de ion nitrato (Bergmann y Neubert, 1976); en nuestro estudio, se confirmó este hecho pues las plántulas

de *A. tequilana* en adaptación presentaron mayor concentración de Ca en el tratamiento D-xNO₃ tanto en tejido foliar y radicular (Figura 26).

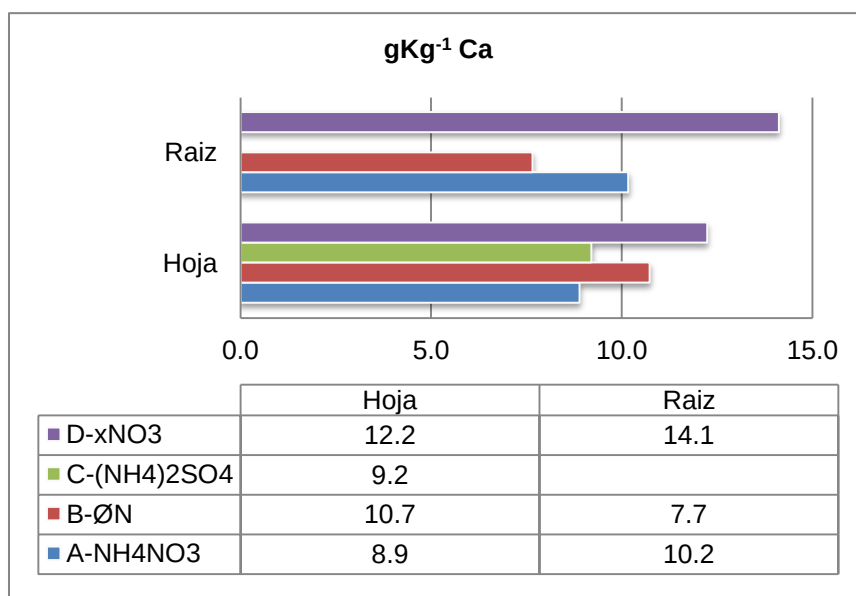


Figura 26. Efecto de tratamientos con nitrógeno inorgánico sobre la cantidad de calcio total presente en hojas y raíces de *A. tequilana* "M" después de 16 semanas de exposición

En general, las plántulas de *A. tequilana* expuestas a los tratamientos descritos presentaron condiciones deficientes de Ca²⁺ aún comparadas con las plántulas reportadas por Nikolaeva y Niño, 2007. Se sugiere que este resultado se originó en respuesta a las elevadas concentraciones de nutrientes antagónicos de estos cationes como K⁺ y Na⁺ presentes en los tratamientos.

Las plántulas "H" y "ES" en crecimiento con ión nitrato presentaron incremento en la concentración foliar de Ca²⁺ comparado con los tratamientos b-ØN y c-(NH₄)₂SO₄ confirmando nuevamente el efecto de éste ión sobre la absorción de Ca²⁺ en *A. tequilana* (Figura 27).

Conforme a los resultados obtenidos, las plantas provenientes de ambos procesos de cultivo de tejidos vegetales ("H" y "ES") fueron estadísticamente similares en cuanto a la concentración de Ca^{2+} en tejido foliar.

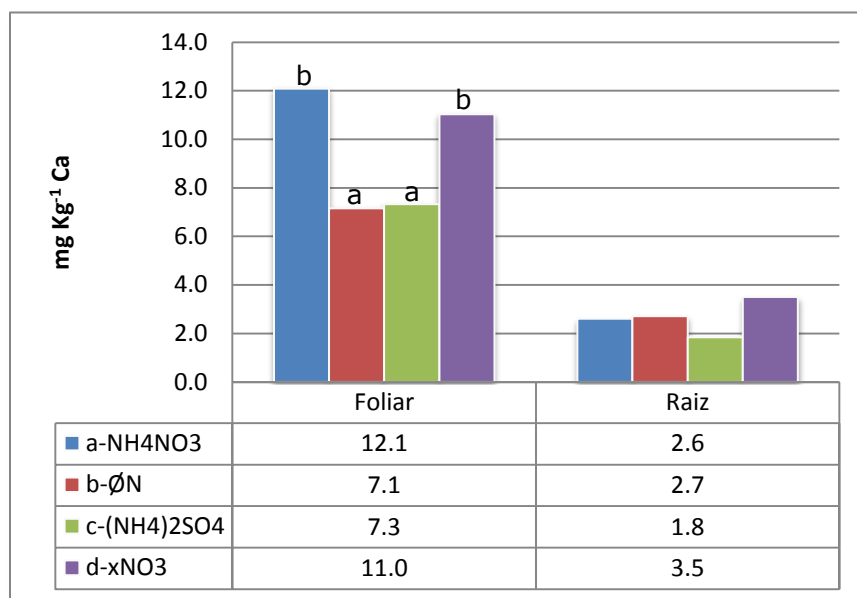


Figura 27. Acumulación de calcio en hojas y raíces de plantas de *A. tequilana* "H" y "ES" como respuesta a diferentes fuentes de nitrógeno inorgánico. Barras con distinta letra en un grupo son estadísticamente diferentes (LSD $p \leq 0.05$). En hoja media con $n=10$. Se formó una muestra compuesta con la raíz de cada tratamiento.

6.3.1.5 Magnesio

El magnesio es necesario en la biosíntesis de la clorofila, por lo tanto su deficiencia se manifiesta como una clorosis ascendente desde la base de la planta. Es similar al calcio en su respuesta a la fuente nitrogenada presente. En nuestra experiencia con *A. tequilana* fue marcada la diferencia en cuanto a la concentración foliar de Mg y la fuente nitrogenada suministrada. En ausencia de N se incrementó la presencia de Mg en el tejido aéreo de las plántulas "M" (Figura 28), sin embargo, la presencia de ión nitrato en el tratamiento a-

NH_4NO_3 y d-xNO_3 en las hojas de las plántulas "H" y "ES" favorecieron el incremento significativo en la concentración de Mg^{2+} (Figura 29).

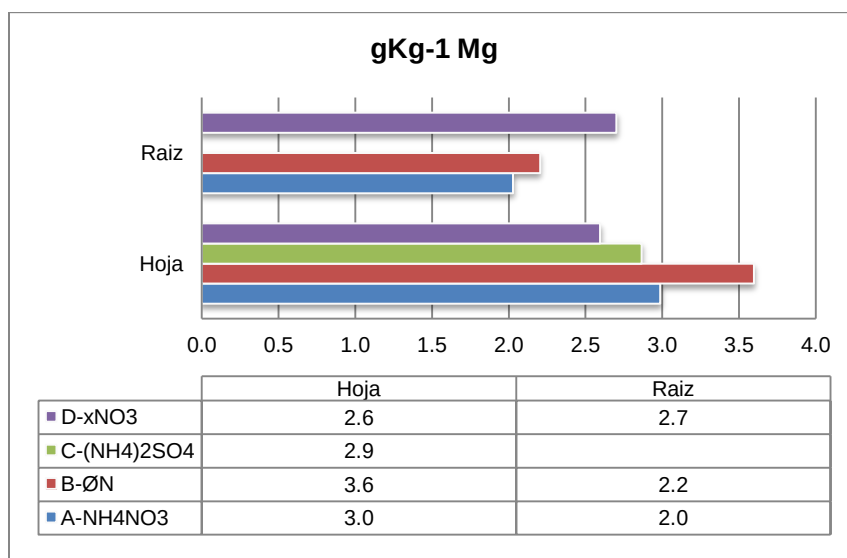


Figura 28. Efecto de tratamientos con nitrógeno inorgánico sobre la cantidad de magnesio total presente en hojas y raíces de *A. tequilana*"M" después de 16 semanas de exposición

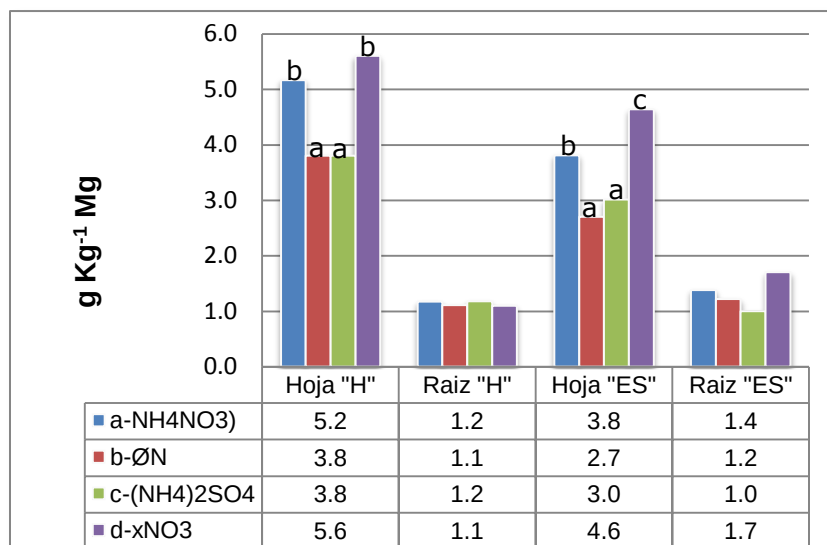


Figura 29. Acumulación de magnesio en hojas y raíces de plantas de *A. tequilana*"H" y "ES" como respuesta a diferentes fuentes de nitrógeno inorgánico. Barras con distinta letra en un grupo son estadísticamente diferentes (LSD $p \leq 0.05$). En hoja media con $n = 5$. Se formó una muestra compuesta con la raíz de cada tratamiento.

El origen de las plántulas influyó significativamente en el contenido de Mg en los tejidos y se observa la relación presente entre el contenido de Mg, constituyente de la clorofila y el color de las hojas de *A. tequilana*, aún cuando no se presenta un efecto contundente, se sugiere que las plántulas "ES" con una concentración foliar promedio de Mg de 3.5 gKg⁻¹ presentó coloraciones dentro de la carta 5BG de la tabla de Munsell® y mayor contenido de clorofila que las plántulas "H", fenotípicamente se asemejan más a la plántula de *A. tequilana* que se comercializa para su producción. Sin embargo, en ninguno de los tratamientos se alcanzó el nivel de suficiencia en el tejido foliar de acuerdo a lo reportado por Uvalle-Bueno y Vélez-Gutierrez (2007) que va de 8.6-12.2 gKg⁻¹ para plantas de *A. tequilana* en procesos productivos.

Cuadro 15. Concentración de magnesio (g Kg⁻¹) en tejido de hoja y raíz de plántulas de *A. tequilana* "H" y "ES" por tratamiento

Origen	Tratamiento	Hoja	Raíz
"H"	a-NH ₄ NO ₃	5.16 b	1.17
	b-ØN	3.80 a	1.11
	c-(NH ₄) ₂ SO ₄	3.81 a	1.18
	d-xNO ₃	5.61 b	1.10
"ES"	a-NH ₄ NO ₃	3.81 b	1.38
	b-ØN	2.70 a	1.22
	c-(NH ₄) ₂ SO ₄	3.01 a	1.00
	d-xNO ₃	4.64 c	1.70

Medias con distinta letra en una hilera son estadísticamente diferentes (LSD p≤0.05). Medias de hojas n=5. Se formó una muestra compuesta con la raíz de cada tratamiento.

6.3.1.6 Sodio

El sodio, no es considerado un elemento esencial pues puede ser sustituido parcial o totalmente por K^+ al interior de la planta. Se dice que es un elemento funcional, y no existen niveles de referencia reportados para sodio en *A. tequilana*. En la hoja se observa un incremento en su contenido en el tratamiento A- NH_4NO_3 (Figura 30), más no existe una correlación negativa con el contenido de K^+ . Es necesario hacer más estudios para definir la función del sodio en el *A. tequilana* y sus niveles de suficiencia.

Existen cultivos que no toman Na^+ aunque existan elevadas cantidades en el sustrato como el maíz, frijol y girasol, denominados cultivos natrofobos; por otra parte las plantas que si lo absorben como la remolacha, espinaca y alfalfa se nombran natrófilas. El *A. tequilana* absorbe el sodio y lo acumula en la raíz de acuerdo a nuestras observaciones. Con la presencia de ion nitrato como única fuente de nitrógeno se incrementa considerablemente la cantidad de sodio presente en el tejido foliar, lo que sugiere un efecto sinérgico, en cambio, con la presencia de ion amonio, cargado positivamente, se disminuye su absorción (Figura 31); éste comportamiento se presentó de forma similar en las plántulas de origen "H" como "ES".

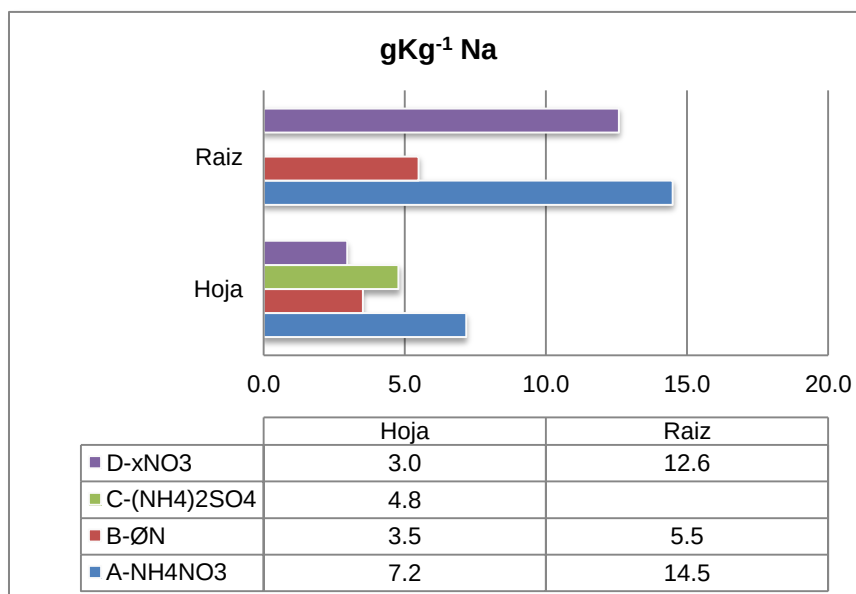


Figura 30. Efecto de tratamientos con nitrógeno inorgánico sobre la cantidad de sodio total presente en hojas y raíces de *A. tequilana* "M" después de 16 semanas de exposición. No presenta diferencia estadística ($LSD \leq 0.05$).

Es importante resaltar que las plantas de *A. tequilana* en el tratamiento d-xNO₃ fueron regadas con una solución que contenía nitrato de sodio y por tanto la concentración elemental de sodio se vio incrementada con respecto a los demás tratamientos en un 100%; esto es, las soluciones correspondientes a los tratamientos a-NH₄NO₃, b-ØN y c-(NH₄)₂SO₄ contenían 22.5 mgL⁻¹ y la solución del tratamiento d-xNO₃ 50 mgL⁻¹ de Na. Esto abre una incógnita sobre la tolerancia del *A. tequilana* a suelos sódicos, que debería ser resuelta a fin de aprovechar su cultivo en tierras restringidas para otros cultivos, si ése fuera el caso, por lo que se deberá profundizar en este aspecto a fin de confirmar la posibilidad de establecer agave tequilero en suelos sódicos.

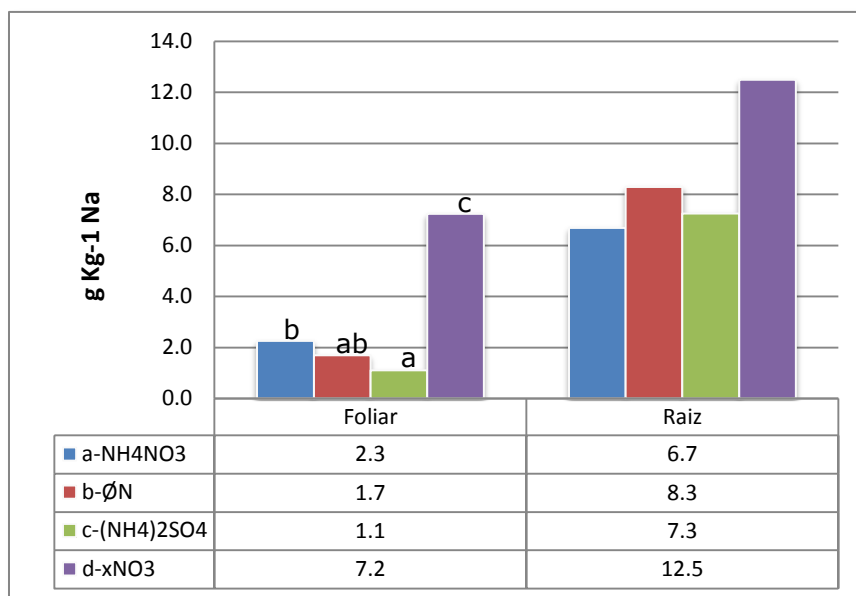


Figura 31. Acumulación de sodio en hojas y raíces de plantas de *A. tequilana* "H" y "ES" como respuesta a diferentes fuentes de nitrógeno inorgánico. Barras con distinta letra en un grupo son estadísticamente diferentes (LSD $p \leq 0.05$). En hoja media con $n = 5$. Se formó una muestra compuesta con la raíz de cada tratamiento.

6.3.2 Elementos menores o micronutrientes

Se les denomina así a los elementos que requiere la planta en pequeñas cantidades, más no son menos importantes que los macronutrientes, pues deficiencias en éstos, por ejemplo hierro o manganeso han provocado fuertes problemas de clorosis en diversos cultivos. En nuestra experiencia durante la etapa de adaptación *ex vitro* de las plántulas "M", los micronutrientes cobre y hierro se mantuvieron en niveles inferiores a la suficiencia; boro, manganeso y zinc fueron absorbidos en exceso por el tejido foliar (Cuadro 16).

Cuadro 16. Influencia del tratamiento nutricional sobre la cantidad de micronutrientes en tejido foliar del *A. tequilana* "M" después de 16 semanas de adaptación. (mg Kg⁻¹ base seca)

Tratamiento	B	Cu	Fe	Mn	Zn
A-NH₄NO₃	81.7	6.3	107.7	300.4	63.3
B-ØN	101.9	7.3	112.5	214.4	72.0
C-(NH₄)₂SO₄	110.6	9.1	141.9	256.1	250.9
D-xNO₃	75.8	6.2	117.8	105.1	39.5

Los grupos de plántulas en fase de crecimiento, *A. tequilana* "H" y "ES", no presentaron una diferencia significativa en la respuesta de absorción a micronutrientes entre grupos, más si se presentó diferencia al suministrar distintas fuentes de nitrógeno por tratamiento (Cuadro 17).

Cuadro 17. Influencia del tratamiento nutricional sobre la cantidad de micronutrientes en tejido foliar del *A. tequilana* "H" y "ES" después de 25 semanas de crecimiento. (mg Kg⁻¹ base seca)

Tratamiento	B	Cu	Fe	Mn	Zn
a-NH₄NO₃	46.79 b	6.34	298.96	61.13 b	43.28 b
b-ØN	48.89 b	3.12	183.16	52.05 ab	38.04 b
c-(NH₄)₂SO₄	36.30 a	2.93	232.22	32.77 a	21.52 a
d-xNO₃	47.35 b	3.03	148.39	63.54 b	39.13 b

6.3.2.1 Boro

En *A. tequilana* la deficiencia de boro se asocia con la deficiencia de calcio, que se manifiesta con exudados a partir de la base de la espina terminal en hojas jóvenes y en casos más severos la secreción es de color rojizo también en las espinas laterales formándose un anillo en la parte superior de hojas jóvenes que se extiende al cogollo; conocido popularmente como "anillo rojo", este síntoma se produce mayormente en suelos ácidos. El valor de suficiencia

para boro oscila entre 41 y 58 mgKg⁻¹ en tejido foliar. Las hojas presentaron valores altos para este micronutriente en todos los tratamientos con las plántulas "M" (Figura 32), aún fueron superiores a lo reportado por Nikolaeva y Niño (2007) para plántulas de 7 semanas en adaptación (14.4 mgKg⁻¹); no fueron detectados síntomas de toxicidad por boro.

El ion amonio incrementa la cantidad de boro en el tejido foliar; presentando un 8% mas boro el tratamiento C-(NH₄)₂SO₄ contra el tratamiento D-xNO₃ que fue adicionado con ion nitrato como única fuente de nitrógeno. Lo que obedece a un efecto de sinergismo debido al equilibrio electrostático que se produce con el incremento de iones positivos del sulfato de amonio (C-(NH₄)₂SO₄). Uvalle-Bueno *et al.* (2003) reportan el sinergismo de B con el ion nitrato y fosforo en *A. tequilana* en plántulas micropropagadas crecidas en invernadero, asociación que observamos en el tratamiento D-xNO₃; donde la presencia de estos tres elementos en raíz se ve incrementada en relación a los otros tratamientos.

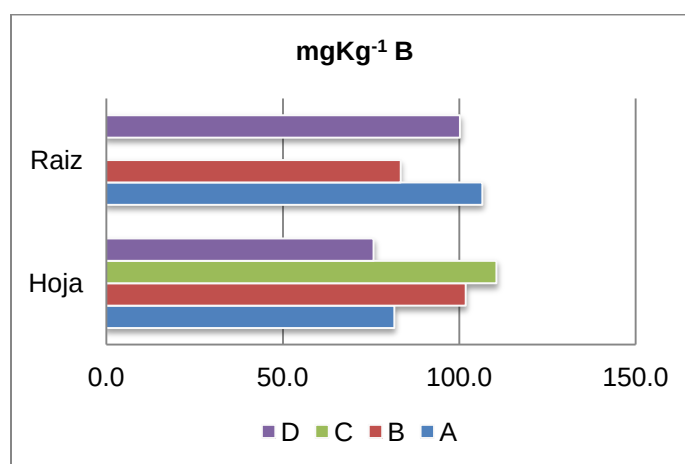


Figura 32. Efecto de tratamientos con nitrógeno inorgánico sobre la cantidad de boro total presente en hojas y raíces de *A. tequilana* "M" después de 16 semanas de exposición

En las plántulas "H" y "ES" donde la adición de las soluciones diluidas fue de forma continua, se detectó el efecto significativo al disminuir la concentración foliar en el tratamiento C- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ respecto al resto de los tratamientos (Figura 33). Bajo estas condiciones de cultivo, las plántulas presentan valores de boro dentro del rango de suficiencia (Uvalle-Bueno y Vélez-Gutiérrez, 2010).

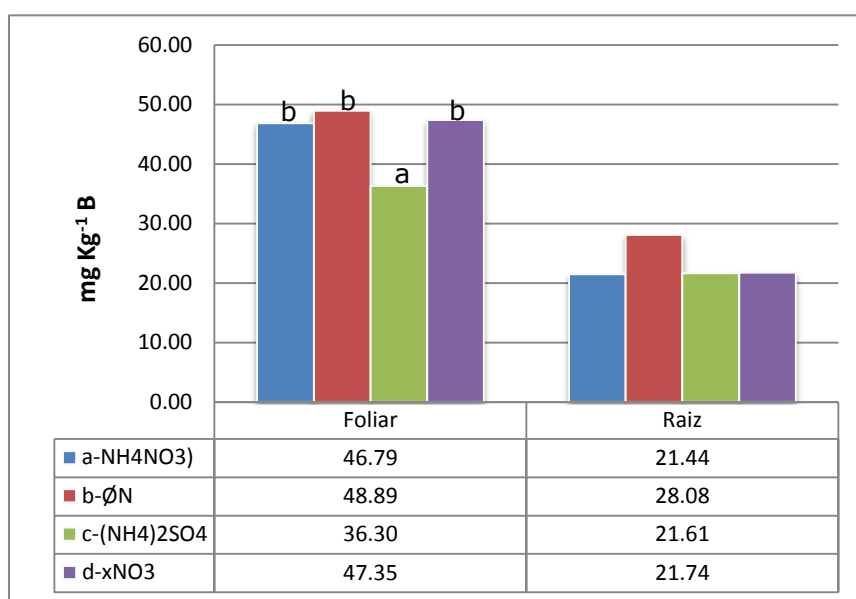


Figura 33. Acumulación de boro en hojas y raíces de plantas de *A. tequilana* "H" y "ES" como respuesta a diferentes fuentes de nitrógeno inorgánico. Barras con distinta letra en un grupo son estadísticamente diferentes (LSD $p \leq 0.05$). En hoja media con $n = 5$. formó una muestra compuesta con la raíz de cada tratamiento.

6.3.2.2 Cobre

El Cobre participa como coenzima para varios sistemas enzimáticos involucrados en formar y convertir aminoácidos; también es componente de los cloroplastos y participa activamente en la síntesis de clorofila, proteínas y peroxidasas. Tiene una movilidad media dentro de las plantas. El Cobre es un

elemento que frecuentemente se reporta por debajo los límites de detección analítica en el cultivo de *A. tequilana* (datos no reportados); se sugiere que este comportamiento se debe a deficiencia de éste elemento en los suelos de cultivo, además se ha observado la capacidad de acumulación en las raíces de agave para este elemento (Figura 34 y Figura 35).

Uvalle-Bueno *et al.* (2003) reportaron el incremento en el contenido de Cu en la raíz de *A. tequilana* de forma proporcional a los incrementos de Cu aplicados al suelo. Bajo nuestra experiencia, la dosis de Cu fue similar en todos los tratamientos y se observa mayor acumulación de Cu en el tejido radicular expuesto al tratamiento D-xNO₃ para la etapa de adaptación y d-xNO₃ de las plantas en crecimiento. En las plántulas "M" se distingue la cantidad de Cu en el tejido foliar del tratamiento C-(NH₄)₂SO₄, pues fue más de 40% superior al resto de los tratamientos adicionados con alguna forma de nitrógeno A-NH₄NO₃ y D-xNO₃ y 25% mayor al tratamiento B-ØN (Cuadro 16). Sin embargo, la cantidad de Cu fue deficiente comparada con los valores de suficiencia reportados por Uvalle-Bueno y Vélez-Gutiérrez (2007).

En los grupos "H" y "ES" de *A. tequilana*, no se presentó diferencia significativa de la concentración de Cu con respecto al origen o al tratamiento nitrogenado, sin embargo los datos sugieren una mayor presencia de Cu foliar en las plántulas del tratamiento a-NH₄NO₃ que presentaron un desarrollo aceptable, sin ser las plántulas de mayor tamaño.

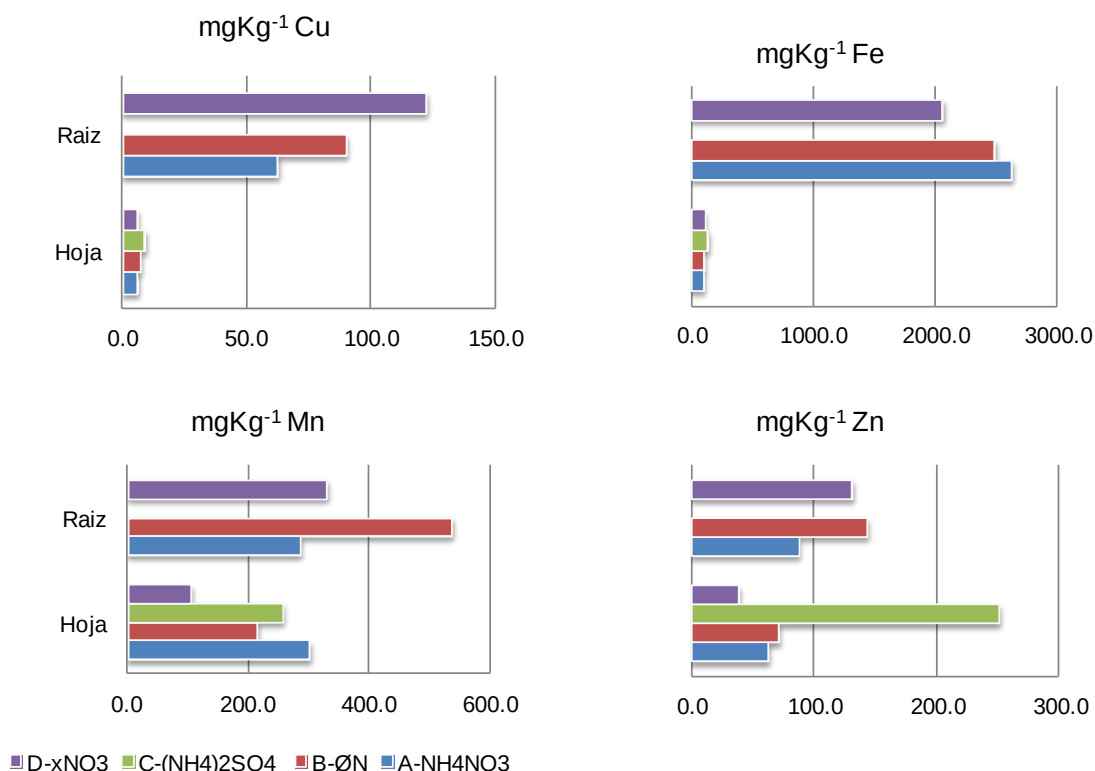


Figura 34. Cu, Fe, Mn y Zn total evaluado en tejido de hojas y raíces de plántulas de *A. tequilana* "M" en proceso de adaptación por 16 semanas bajo distintas fuentes de N inorgánico.

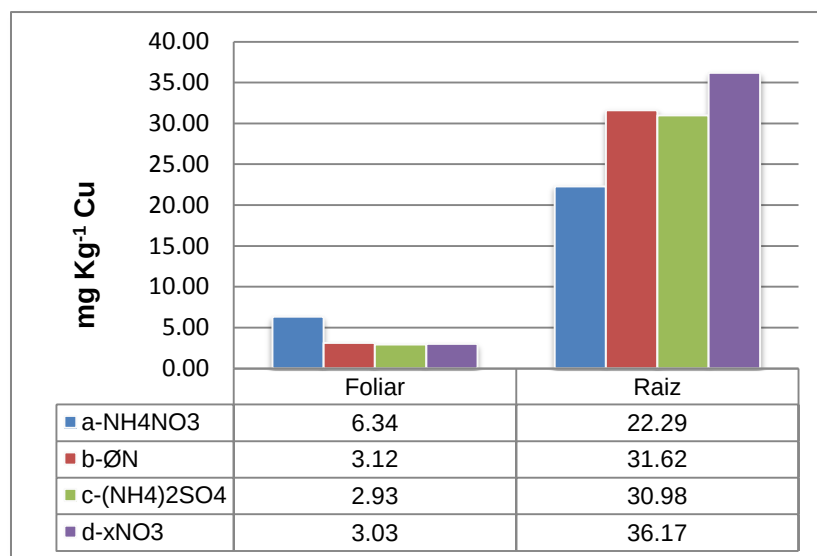


Figura 35. Acumulación de cobre en hojas y raíces de plantas de *A. tequilana* "H" y "ES" como respuesta a diferentes fuentes de nitrógeno inorgánico. Para tejido foliar, n=10. Se formó una muestra compuesta con la raíz de cada tratamiento.

6.3.2.1 Fierro

El fierro ocupa el cuarto lugar en la composición de la corteza terrestre, representa el 5% de ésta. El Fe en forma disponible para las plantas se encuentra formando compuestos como sulfatos, sulfuros, y carbonatos de Fe. En los procesos de producción agrícola se suministra en forma de sulfatos o quelatos como fertilizante sólido ó líquido.

El Fe, es un elemento necesario en la síntesis de clorofila y forma parte esencial del citocromo, el cual actúa como portador de electrones en la fotosíntesis y en la respiración mitocondrial. Sirve como un catalizador en la división celular y en los procesos de crecimiento. Forma parte esencial de la ferredoxina, la nitrato reductasa y de la nitrogenasa durante la fijación biológica de nitrógeno. El Fe es un elemento de muy baja movilidad. En general, se considera un rango de 50 a 300 mgKg⁻¹ de Fe total como un rango adecuado para los cultivos (Castellanos *et al*, 2000); en el caso del agave se reportan niveles de suficiencia de 126-178 mgKg⁻¹ (Uvalle-Bueno y Vélez-Gutiérrez, 2007)

Cuando falta fierro, se produce amarillamiento en las hojas jóvenes y se presenta repentinamente, pues no puede ser extraído de las hojas maduras para ser utilizado en las nuevas hojas. El amarillamiento se produce mayormente en las nervaduras de las hojas, éste síntoma puede prevalecer por mucho tiempo sin que la planta muera debido a la deficiencia de Fe. En *A. tequilana*, el Fe se acumuló en la raíz, al igual que el Cu, Mn y Zn. Los cuatro micronutrientes esenciales se retienen en la raíz y son translocados en relación a la demanda del tejido foliar. De igual manera que para Cu, un incremento en

la concentración foliar de Fe, origina una disminución en la concentración del elemento en el tejido radicular (Figura 34 y Figura 36).

6.3.2.4 Manganese

El manganeso es absorbido en forma de Mn^{2+} o como quelato. Se transporta como catión bivalente y se almacena como óxido de manganeso. Se considera un elemento de movilidad media. El Mn^{2+} participa en la síntesis de clorofila, asimilación de nitratos, en la síntesis de vitaminas como riboflavina y ácido ascórbico. También participa en la fotosíntesis, en la fotólisis del agua, en la asimilación de CO_2 , en reacciones oxido-reducción, así como en la toma y transporte de N, P, Ca^{2+} y Mg^{2+} .

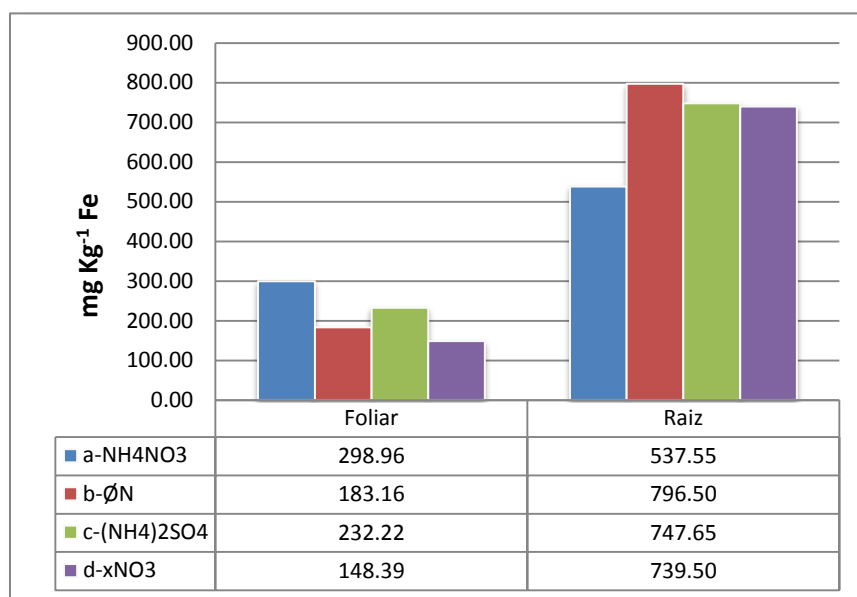


Figura 36. Acumulación de fierro en hojas y raíces de plantas de *A. tequilana* "H" y "ES" como respuesta a diferentes fuentes de nitrógeno inorgánico. En hoja $n=10$. Se formó una muestra compuesta con la raíz de cada tratamiento.

El manganeso fue absorbido en mayor proporción en los tratamientos A- NH_4NO_3 y C- $(NH_4)_2SO_4$ (Figura 34) durante la etapa de adaptación de las

plantas "M", ambos conteniendo la forma reducida de nitrógeno, lo cual coincide con lo reportado por Castellanos *et al.* (2000), quienes afirman que la fuente de N afecta la asimilación de Mn, siendo favorecida por el amonio. Sin embargo, en las plántulas de mayor tamaño, tanto el grupo "H" como el "ES" presentaron una mayor absorción con los tratamientos a-NH₄NO₃ y d-xNO₃, que si bien el tratamiento d-xNO₃ no fue contenía ion amonio, fue adicionado con KNO₃, compuesto reportado por favorecer la asimilación de Mn (Castellanos *et al.*, 2000). El tratamiento significativamente menor fue el tratamiento c-(NH₄)₂SO₄ (Figura 37).

Al igual que Cu y Fe; el Mg²⁺ se acumula en mayor proporción en la zona radicular de plántulas de *A. tequilana*.

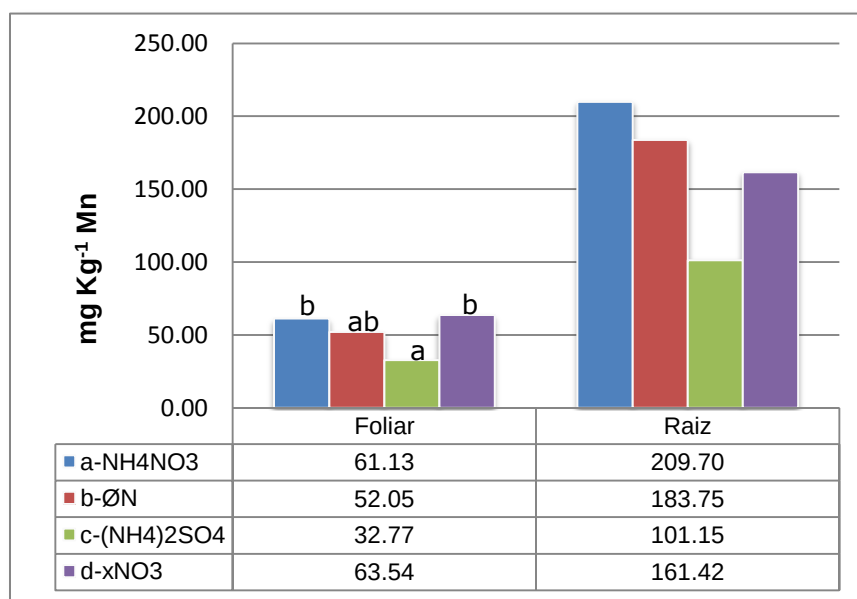


Figura 37. Acumulación de manganeso en hojas y raíces de plantas de *A. tequilana* "H" y "ES" como respuesta a diferentes fuentes de nitrógeno inorgánico. Barras con distinta letra en un grupo son estadísticamente diferentes (LSD $p \leq 0.05$). En hoja media con $n=10$. Se formó una muestra compuesta con la raíz de cada tratamiento.

6.3.2.5 Zinc

El zinc es un elemento esencial para la síntesis de proteínas y participa activamente en la formación de almidones, promueve la maduración y producción de las semillas. Forma parte de muchas enzimas y activa la alcohol deshidrogenasa, la ácido glutámico deshidrogenasa y carbopeptidasa. Es un precursor de auxinas y es esencial en la formación del ácido indolacético. Es un elemento ligeramente móvil y su deficiencia retarda el crecimiento provocando acortamiento de los entrenudos de maíz y arrosetamiento en algunos cultivos frutales como durazno y nogal (Castellanos et al., 2000). En el caso de *A. tequilana*, Uvalle-Bueno y Vélez-Gutiérrez (2007) reportan la deficiencia de Zn que se presenta en las hojas viejas asociada con la carencia de potasio. Las hojas sufren clorosis que rápidamente pasa a necrosis y avanza uniformemente de la punta hacia la base de las hojas, estos síntomas se presentan mayormente en pH's alcalinos.

Las plantas "M" presentaron una elevada concentración de Zn, cuando se adaptaron bajo el tratamiento C-(NH₄)₂SO₄, sin embargo no se confirmaron estos resultados en las plántulas "H" y "ES", donde la concentración de Zn se vio afectada a la baja de forma significativa con el tratamiento c-(NH₄)₂SO₄ refutando en 10 muestras lo observado con las plántulas "M" en el tratamiento similar (Figura 34 y Figura 38).

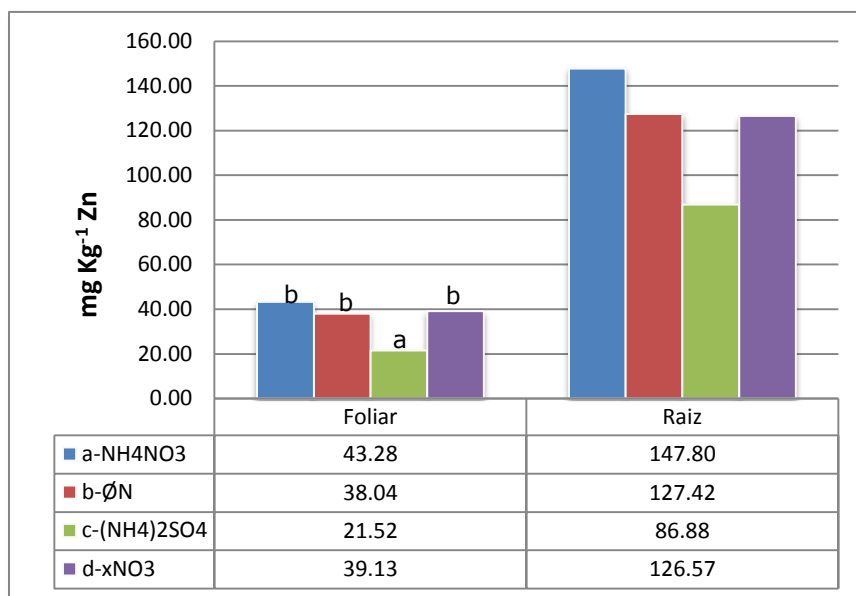


Figura 38. Acumulación de zinc en hojas y raíces de plantas de *A. tequilana* "H" y "ES" como respuesta a diferentes fuentes de nitrógeno inorgánico. Barras con distinta letra en un grupo son estadísticamente diferentes (LSD $p \leq 0.05$). En hoja media con $n=10$. Se formó una muestra compuesta con la raíz de cada tratamiento.

No fueron detectados síntomas de toxicidad por micronutrientes, sin embargo, se destaca la presencia de altas cantidades de micronutrientes concentrados en la parte radicular de las plántulas de *A. tequilana*.

Se sugiere que la absorción de micronutrientes por la raíz de *A. tequilana* y su translocación hacia la parte aérea depende directamente de la demanda del elemento a nivel foliar, datos que reafirman lo reportado por Uvalle-Bueno *et al.* (2003).

El *A. tequilana* es una planta CAM facultativa y mucho se ha comparado con las plantas C_4 como el sorgo, el maíz y/o la caña de azúcar; haciendo una similitud de los sideróforos que producen estas tres plantas con la respuesta obtenida en este ensayo; sugerimos que el *A. tequilana* presenta mayor facilidad para la absorción de Zn en presencia de sulfato de amonio, tal y como ocurre con maíz

y caña, donde se puede corregir una deficiencia de Zn aprovechando el sinergismo que se produce con la presencia de sulfato de amonio en el sustrato. Situación distinta se observa en sorgo, donde el cultivo incrementa su absorción de Fe en presencia de sulfato de amonio y no expresa incremento en la absorción de Zn.

6.3.2.6. Molibdeno

El molibdeno es un elemento escaso, su estado de oxidación en suelo varía de II a VI, pero la forma soluble y disponible para las plantas es Mo (VI). El requerimiento de Mo por las plantas es muy bajo, sin embargo, la ausencia de este elemento ha provocado deficiencias en tejido de hierbas, cultivos y árboles debido a la falta de actividad de NR necesaria en el primer paso de asimilación de nitratos. Los síntomas de deficiencia de molibdeno varían de acuerdo a la especie siendo los más frecuentes el amarillamiento de las hojas o clorosis. Con la disminución del pH el Mo se adsorbe en los coloides del suelo, así pues con el incremento de pH el Mo queda disponible para las plantas en mayor proporción. (Mendel y Hänsch, 2002). Bajo nuestras condiciones de cultivo y análisis no fue posible la determinación de Mo en las plántulas "M" ni en tejido de raíz de los grupos "H" y "ES", sólo se determinó en tejido foliar de éstos últimos grupos. Fue sobresaliente y significativo el incremento en la concentración de Mo del tratamiento d-xNO₃ (Figura 39). El molibdeno, como se enuncia arriba, tiene como principal función participar en la actividad enzimática de la nitrato reductasa y en nuestra experiencia, el tratamiento suministrado con nitrato como única fuente de nitrógeno mostró una menor concentración de ion nitrato con respecto a los demás tratamientos y una

elevada concentración de molibdeno, lo que sugiere una asimilación eficiente del ion nitrato con elevada actividad de la enzima nitrato reductasa *in vivo*.

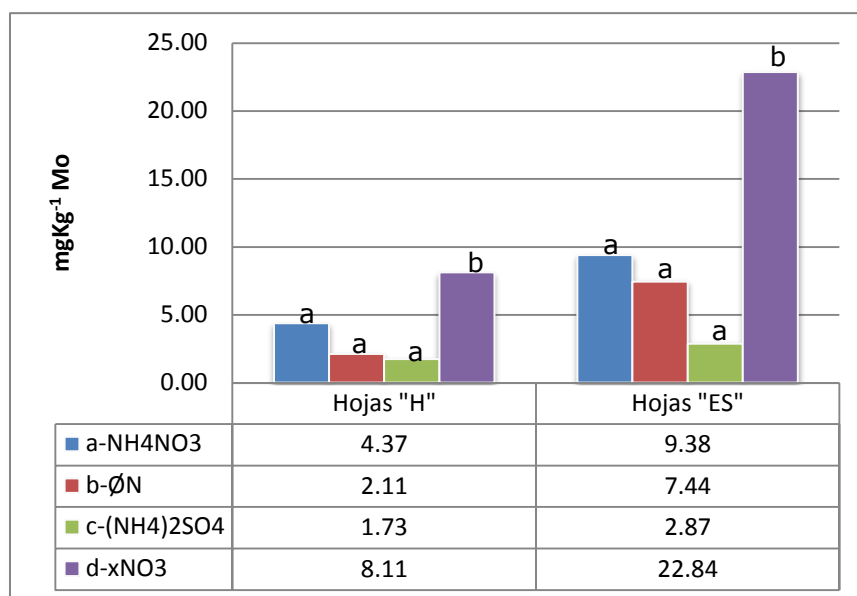


Figura 39. Acumulación de molibdeno en hojas y raíces de plantas de *A. tequilana* "H" y "ES" como respuesta a diferentes fuentes de nitrógeno inorgánico. Barras con distinta letra en un grupo son estadísticamente diferentes (LSD $p \leq 0.05$). Media con $n=5$.

6.4 Medición de actividad enzimática

La determinación de la actividad enzimática de NR (EC 1.7.1.1), NiR (EC 1.7.1.4) y GS (EC 6.3.1.2) realizada en hojas de *A. tequilana* presentó actividades muy similares entre tratamientos (Cuadro 18). La actividad de la NR fue de 0.5 $\mu\text{M NO}_2$ producido por mg^{-1} proteína en 30 min sin mostrar diferencia estadística al realizar la prueba LSD con 90% de confianza. Se utilizó una enzima purificada de *Arabidopsis thaliana* (NR, sigma[®] N0163) como estándar y verificación del método. Para *A. tequilana* no existe bibliografía que refiera la actividad de ésta u otras enzimas, por ello se sugiere la

determinación de NR in vitro por períodos mayores de tiempo y bajo distintas intensidades de iluminación a fin de encontrar el tiempo y la intensidad lumínica en que se presenta la mayor actividad para esta especie, como ha sido reportado para arroz por Ali, *et al.* (2007).

Cuadro 18. Promedio de la actividad enzimática por tratamiento de *A. tequilana* en período de adaptación.

Tratamiento	NR	NiR	GS
A-NH₄NO₃	0.58 a	2278 a	88.7 b
B-ØN	0.54 a	2457 a	79.9 ab
C-(NH₄)₂SO₄	0.57 a	2246 a	97.8 b
D-xNO₃	0.53 a	2618 a	45.3 a

NR= $\mu\text{M NO}_2$ producido mg^{-1} proteína en 30 min. **NiR**= $\mu\text{M NO}_2$ consumidos mg^{-1} proteína en 30 min. **GS**= $\mu\text{M Pi}$ producido mg^{-1} proteína en 15 min. (n=10). Medias con distinta letra en una hilera son estadísticamente diferentes (LSD $p \leq 0.10$)

La actividad de GS mostró una disminución del 40 al 55% cuando se suministraron como única fuente de N iones nitratos (tratamiento D-xNO₃) y presenta diferencia estadística (LSD 90%) con los tratamientos A-NH₄NO₃ y C-(NH₄)₂SO₄, conteniendo ambos tratamientos ion amonio en su formulación. El tratamiento B-ØN carente de fuente nitrogenada no presenta diferencia estadística con el resto de los tratamientos (Cuadro 18). De acuerdo a lo reportado por Rathnam y Edwars (1976) este comportamiento está relacionado con el metabolismo de enzimas málicas-NADP de plantas C₄ como Sorghum bicolor, Zea mays y Digitaria singuinalis. Es recomendable hacer un seguimiento con nitratos-nitrógeno marcado (¹⁵N) a fin de definir la ruta de incorporación de nitrógeno y evaluar si la disminución de actividad de GS está

asociada con la asimilación de nitrógeno (Kindl, 1995) o con la reducción de la fotorespiración (Hodges, 2002).

En el A. tequilana la actividad enzimática de la nitrato reductasa (NR EC 1.7.1.1), se relacionó directamente con el área foliar, pues las plantas "M" y "H" con una hoja menos en promedio que las plantas "ES" presentaron menor actividad enzimática de NR (Cuadro 18 y Cuadro 19). La actividad de la enzima NR se vio afectada por el tipo de fuente nitrogenada después de 25 semanas de crecimiento; en el caso del tratamiento con nitrato ($d\text{-xNO}_3$), se sugiere una saturación por sustrato y de ahí su disminución en actividad, en comparación con los demás tratamientos. El tratamiento con sulfato de amonio ($c\text{-(NH}_4)_2\text{SO}_4$) presentó mayor actividad enzimática sin ser estadísticamente distinto del tratamiento con nitrato de amonio ($a\text{-NH}_4\text{NO}_3$) y el carente de nitrógeno ($b\text{-}\emptyset\text{N}$).

La actividad de la nitrito reductasa (NiR, EC 1.7.1.4) disminuyó con respecto a las plantas en adaptación, plántulas "M" (Cuadro 18), presentándose un gradiente descendente de plántulas "M" > "H" > "ES" con relación directa con el número de hojas que se incrementa en este mismo orden (Cuadro 20).

Cuadro 19. Evaluación de la actividad enzimática por origen del material

Parámetro	NR	NiR	GS
Plantas "H"	0.5461 a	1555.43 a	86.08
Plantas "ES"	1.2974 b	982.02 b	132.20

NR= $\mu\text{M NO}_2$ producido mg^{-1} proteína en 30 min. **NiR**= $\mu\text{M NO}_2$ consumidos mg^{-1} proteína en 30 min. **GS**= $\mu\text{M Pi}$ producido mg^{-1} proteína en 15 min.

En relación a la fuente nitrogenada, en las plántulas "M" no se presentó diferencia entre tratamientos, más en las plántulas "H" y "ES" se presenta

mayor actividad en presencia de nitrato de amonio ligado a una mayor concentración de micronutrientes, principalmente Fe.

Cuadro 20. Evaluación de la actividad enzimática por tratamiento

Origen	Tratamiento	NR	NiR	GS
"H"	a-NH ₄ NO ₃	0.83 a	2585.49 a	141.65 a
	b-ØN	0.35 b	1120.94 b	68.62 bc
	c-(NH ₄) ₂ SO ₄	0.45 b	1057.91 b	47.16 c
	d-xNO ₃	0.38 b	1255.35 b	110.59 ab
"ES"	a-NH ₄ NO ₃	0.94 ab	1383.74 a	126.96
	b-ØN	1.79 bc	915.87 b	208.56
	c-(NH ₄) ₂ SO ₄	2.03 c	723.59 b	120.76
	d-xNO ₃	0.36 a	889.13 b	70.47

NR= µM NO₂ producido mg⁻¹ proteína en 30 min. **NiR**= µM NO₂ consumidos mg⁻¹ proteína en 30 min. **GS**= µM Pi producido mg⁻¹ proteína en 15 min

La enzima glutamina sintetasa, es la responsable de asimilar a compuestos C-N el nitrógeno reducido dentro de la planta hasta amonio. Así, cuando se provee a la planta con nitrógeno (a-NH₄NO₃, c-(NH₄)₂SO₄ y d-xNO₃) se presenta una correlación directa con una r=0.9926 entre la actividad de las enzimas nitrato reductasa y la glutamato sintasa. En el caso del tratamiento b-ØN la actividad de la glutamato sintasa se ve incrementada por el amonio procedente de la respiración que es incorporado a las nuevas hojas.

6.5 Evaluación de pigmentos fotosintéticos

De manera constante la cantidad de clorofila se incrementó con el suministro de ion nitrato al medio de cultivo como única fuente de nitrógeno. Las determinaciones de clorofila a y b denotan este comportamiento (Figura 40),

dado que el ion nitrato influye mayormente en la síntesis del ácido alfa-amino-levulínico precursor de los anillos pirrólicos que conforman la estructura de la clorofila a diferencia del ion amonio.

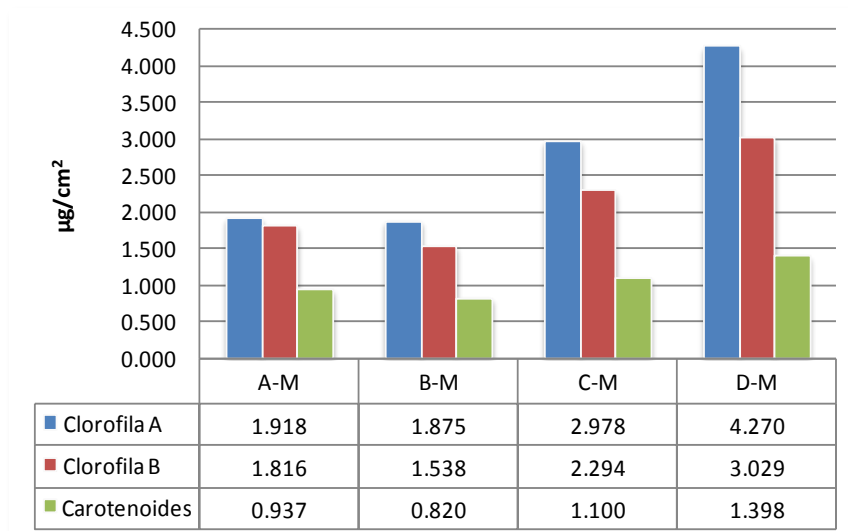


Figura 40. Pigmentos fotosintéticos ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) presentes por tratamiento en plántulas de *A. tequilana* "M".

Ecofisiológicamente es importante considerar la presencia de N en relación a la acción de otros factores, especialmente luz y agua. Generalmente el contenido de clorofila, la tasa de fotosíntesis y el rendimiento disminuyen con una limitación de N y se han probado las interacciones de sequia e intensidad de luz en *Bromelia humilis* y *N. cruenta* (Lüttge, 2004). En nuestra experiencia, se mantuvieron todas las plantas bajo las mismas condiciones de luz y temperatura siendo distintas en la cantidad de clorofila presente en cada grupo de muestras. Las plantas "ES" con menor cantidad de magnesio y mayor presencia en tejido de fierro y manganeso presentaron mayor cantidad de clorofila y una coloración muy similar al de agave azul (Cuadro 21).

Cuadro 21. Cantidad de clorofila promedio dependiendo del origen de la plántula

Parámetro	Clorofila A $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	Clorofila B $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	Carotenoides $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	Relación Clor. A/B
Plantas "H"	4.45 a	2.79 a	1.30 a	1.66 a
Plantas "ES"	6.20 b	3.49 b	1.68 b	1.86 b

Se marcó la diferencia entre los tratamientos dependiendo de la fuente nitrogenada (Cuadro 22), así, los tratamientos a- NH_4NO_3 y c- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ con amonio fueron similares en cuanto a la cantidad de clorofila a y b así como compuestos carotenoides.

Cuadro 22. Cantidad de pigmentos fotosintéticos por tratamiento en plantas "H" y "ES"

Origen	Tratamiento	Clorofila A ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Clorofila B ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Carotenoides ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Relación Clor. a/b
"H"	a- NH_4NO_3	2.77 a	1.67 a	0.78 a	1.65
	b- $\emptyset\text{N}$	5.57 c	3.64 c	1.68 c	1.53
	c- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	4.22 b	2.44 b	1.16 b	1.73
	d- xNO_3	5.27 bc	3.41 c	1.60 c	1.55
"ES"	a- NH_4NO_3	5.60 a	2.98 a	1.46 a	1.88
	b- $\emptyset\text{N}$	6.76 a	4.03 b	2.02 b	1.68
	c- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5.38 a	2.77 a	1.24 a	1.94
	d- xNO_3	7.08 a	4.18 b	1.98 b	1.69

Estos datos sugieren la preferencia del *A. tequilana* por ion nitrato como fuente nitrogenada en comparación con el ion amonio considerando el desarrollo de la planta, la cantidad de clorofila y el color del tejido foliar. En general se han publicado varios estudios relacionados con la cantidad y tipo de fuente nitrogenada en otros cultivos y su requerimiento varía entre especies, así el pepino, tomate, berenjena, maíz, cebada, trigo y frijol que prefieren nitrato en

vez de amonio mientras que otras especies incrementan su desarrollo en presencia de ambas fuentes nitrogenadas o con amonio únicamente. En hojas de pepino se muestra una ligera foto-inhibición cultivadas con amonio en comparación del cultivo con ion nitrato; en arroz la variación fue no significativa (Zhou *et al.*, 2011).

6.6 Demanda nutricional de plántulas de *A. tequilana*

Hasta este punto se ha discutido sobre la concentración de los elementos en el tejido foliar y la raíz. En este apartado, se expresan los resultados como demanda ó extracción de nutrimentos en la etapa de crecimiento de las plántulas "H" y "ES", pues no existe diferencia estadística del origen del material.

La demanda o extracción de nutrientes se calcula a partir de la producción de materia seca y la concentración de cada elemento en el tejido vegetal, por tanto, existe una correlación positiva directa entre la producción de biomasa y la demanda de nutrimentos. Es por ello, que el tratamiento D constantemente es el de mayor demanda relacionada con la mayor longitud y peso fresco de planta (Cuadro 23).

Cuadro 23. Relación de longitud, peso fresco y demanda de macronutrientes en plántulas de *A. tequilana*. (n=5).

TRATAMIENTO	LONGITUD (cm)	PESO FRESCO (gr)	N-NO ₃ (mg)	NH ₄ ⁺ (mg)	P (mg)	K (mg)
a-NH ₄ NO ₃	18.55	42.03	1.32	0.82	9.36	72.64
b-ØN	19.88	49.84	1.48	1.07	12.42	100.43
c-(NH ₄) ₂ SO ₄	15.75	29.47	1.44	0.54	7.48	59.60
d-xNO ₃	25.66	74.37	1.70	1.82	16.70	140.54

En consecuencia se aprecia una demanda de nutrimentos en sentido descendente de tratamientos $D > B > A > C$; y se sugiere que en la etapa de adaptación y crecimiento en invernadero es mejor la utilización de nitratos como fuente de nitrógeno debido al incremento de biomasa.

El sinergismo reportado del ion nitrato con los cationes divalentes (Ca^{2+} y Mg^{2+}) se vio capitalizado en las plántulas de *A. tequilana* que presentaron en general mayores concentraciones en el tratamiento D que resulta del producto de la concentración por la materia seca producida por planta en dicho tratamiento (Figura 41). Aunado a esta aseveración, se ha reportado que las plantas CAM requieren mayores concentraciones de calcio, magnesio y manganeso que el resto de las plantas (Lüttge, 2004)

La cantidad extraída de sodio por planta en el tratamiento D fue más de cuatro veces el sodio demandado en los demás tratamientos (Figura 41), sin embargo, las plantas no mostraron efectos adversos por el incremento de la concentración de sodio en el tejido, se sugiere la necesidad de este elemento para contribuir con el equilibrio electrostático y osmótico de la planta.

La extracción de fierro (Cuadro 24) a diferencia de los otros micronutrimentos no presentó diferencia estadística entre tratamientos.

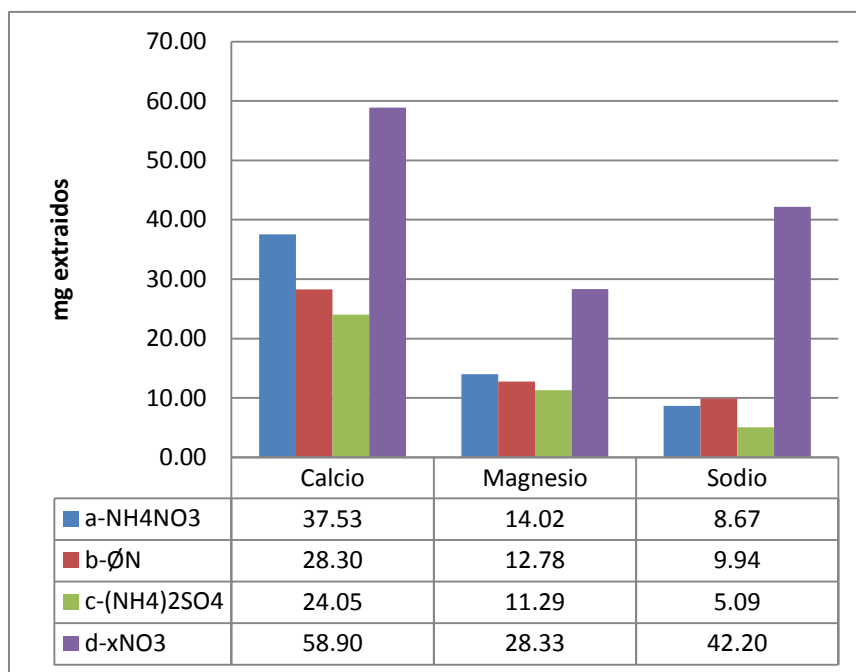


Figura 41. Extracción de elementos secundarios (Ca, Mg y Na) por plantas de *A. tequilana* tratamientos "H" y "ES". Barras con distinta letra en un grupo son estadísticamente diferentes (LSD $p \leq 0.05$). En hoja media con $n = 5$. Se formó una muestra compuesta con la raíz

Los micronutrientes B, Cu, Mn y Zn tuvieron una demanda significativamente mayor en el tratamiento con nitrato (D) influenciado a demás por la mayor producción de materia seca (Figura 42). De los cinco microelementos, el Cu fue el que presentó menor demanda por las plántulas de *A. tequilana*.

Cuadro 24. Extracción de fierro por *A. tequilana* y su relación con la fuente inorgánica nitrogenada

TRATAMIENTO	LONGITUD (cm)	PESO FRESCO (gr)	Fe (mg)
a-NH ₄ NO ₃	18.55	42.03	0.91
b-ØN	19.88	49.84	1.02
c-(NH ₄) ₂ SO ₄	15.75	29.47	0.87
d-xNO ₃	25.66	74.37	1.16

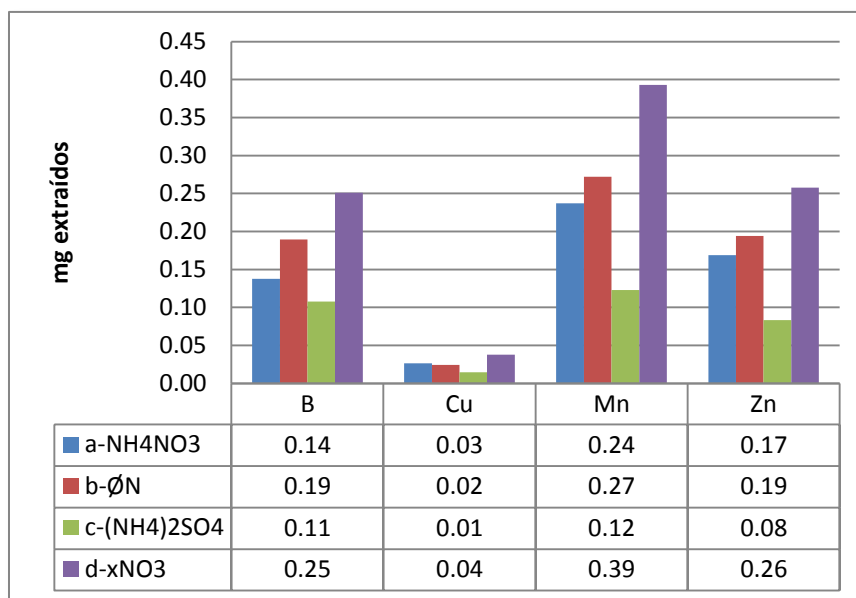


Figura 42. Micronutrientes extraídos por plántulas de *A. tequilana* bajo diferentes fuentes de nitrógeno inorgánico.

La demanda de molibdeno fue más de tres veces mayor en presencia de ion nitrato como fuente nitrogenada (Cuadro 25) lo que se relaciona con la necesidad de éste elemento para metabolizar el NO_3^- dentro de la planta hasta la formación de compuestos orgánicos.

Cuadro 25. Requerimiento de molibdeno por plántulas de *A. tequilana* bajo distintas fuentes inorgánicas nitrogenadas

TRATAMIENTO	LONGITUD (cm)	PESO FRESCO (gr)	Mo (mg)
a-NH ₄ NO ₃	18.55	42.03	0.02
b-ØN	19.88	49.84	0.02
c-(NH ₄) ₂ SO ₄	15.75	29.47	0.01
d-xNO ₃	25.66	74.37	0.07

Los resultados de nuestra experiencia con *A. tequilana* fueron similares a los reportados por Van Beusichem *et al.* (1988), en *Ricinus communis*, planta que reporta un incremento en materia seca y mayor acumulación de K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} con ion nitrato como fuente de nitrógeno en comparación con el suministro de sulfato de amonio como única fuente nitrogenada.

VII. CONCLUSIONES

Los resultados muestran una clara evidencia de la susceptibilidad de *A. tequilana* a la fuente de nitrógeno aplicada.

Las plántulas de *A. tequilana* responden con mayor producción de área foliar y masa aérea usando NO_3^- como única fuente de nitrógeno, en comparación de NH_4^+ sólo o la combinación en forma de NH_4NO_3 .

La plántula de *A. tequilana* es más tolerante a exceso de ion nitrato que de ion amonio.

El suministro de amonio en forma de sulfato de amonio debe limitarse por los niveles de susceptibilidad del *A. tequilana* a ambos iones: SO_4^{2-} y NH_4^+ . Aún falta definir los niveles de tolerancia y toxicidad.

En la fase de adaptación después de un proceso *in vitro*, se tuvo una respuesta positiva al fertilizar el sustrato con la solución del tratamiento D-M antes de recibir la plántula y mantener el riego con agua.

En la fase de mantenimiento se puede utilizar para riego la solución del tratamiento D, que generó plantas de mayor tamaño y condiciones saludables.

La planta producida bajo el esquema de multiplicación por embriones somáticos "ES", presentó una mayor tasa de crecimiento aéreo que la planta generada por organogénesis de hijuelos "H", pero un menor desarrollo de raíces.

La plántula del grupo "ES" presentó mayor uniformidad en cuanto a la coloración, siendo más similar al color reportado para plantas saludables de *A. tequilana*

El *A. tequilana* no presentó daño foliar a concentraciones de 7.2 gKg^{-1} de Na.

Se debe considerar la concentración de molibdeno en el sustrato cuando se suministre nitrato como única fuente de nitrógeno, su demanda es muy elevada.

El definir una respuesta positiva del *A. tequilana* al aporte de nitratos, nos permite considerar su cultivo en terrenos con niveles elevados de nitratos o con fuentes de agua que lo contengan, esto se debe validar en campo con cultivos comerciales.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Ali, A., S. Sivakami y N. Raghuram. 2007. Effect of nitrate, nitrite, ammonium, glutamate, glutamine and 2-oxoglutarate on the RNA levels and enzyme activities of nitrate reductase and nitrite reductase in rice. *Physiol. Mol. Biol. Plants*. 13(1): 17-25.
- Benton-Jones, J Jr. 1999. Plant nutrition manual. CRC Press Boca Raton. Washington. P 33-54.
- Bergmann, W. y P. Neubert. 1976. Pflanzendiagnose and Pflanzenanalyse. Veb Gustav Fischer Verlag Jena. 91-129p.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 246-254.
- Britto D. T. y H. J. Konzucker. 2002. NH_4^+ toxicity in higher plants: a critical review. *Journal of Plant Physiology*. 159: 567-584
- Büning-Pfaue, H. u Dick-Hennes. 1994. Untersuchungen zur Glucosinolatbildung in Gemüse in Abhängigkeit zur Düngung mit Ammonium oder Nitrat. In: N-Düngungskonzepte für den intensiven Gemüse- und Obstbau. Forschungsberichte Heft Nr. 14, Landwirtschaftlichen Fakultät der Rheinischen-Wilhelms-Universität. Bonn, Deutschland. 43-49 p.
- Cabrera-Muñoz, T. 2003. Aclimatación de *Agave tequilana* Weber var. Azul con diferentes condiciones de nitrógeno, fósforo y potasio. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Edo. de México. México. 84pp.

- Campbell, W. H. 1996. Nitrate reductase biochemistry comes of age. *Plant Physiol.* 111:355-361.
- Castellanos, J. Z., J. X. Uvalle-Bueno, A. Aguilar-Santelises. 2000. Manual de interpretación de análisis de suelos y aguas. 2ª ed. INCAPA. México. 66-85 pp.
- Castro-Concha, L. V. M. Loyola-Vargas, J. L. Chan y M. L. Robert. 1990. Glutamate dehydrogenase activity in normal and vitrified plants of Agave tequilana Weber propagated in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 22: 147-151.
- Consejo Regulador del Tequila (CRT). 2011. [www//crt.org.mx](http://www.crt.org.mx). Revisión del 15 de agosto de 2011.
- Diario Oficial de la federación (DOF). 28 noviembre de 1994. Protección prevista a la denominación de origen Mezcal.-Resolución mediante la cual se otorga la que se indica, para ser aplicada a la bebida alcohólica del mismo nombre.
- Gentry, H. S. 1982. Agaves of Continental North America. Tucson, Arizona. University of Arizona Press. Arizona, USA.
- Hänsch, R. D. Gómez-Fessel, C. Witt, C. Hesberg, G. Hoffmann, P Walch-Liu, C. Engels, J. Kruse, H. Rennenberg, W. M. Kaiser y R. R. Mendel. 2001. Tobacco plants that lack expression of functional nitrate reductase in roots show changes in growth rates and metabolite accumulation. *Journal of Experimental Botany.* 52(359) 1251-1258.

- Hodges, M. 2002. Enzyme redundancy and the importance of 2-glutarate in plant ammonium assimilation. *Journal of Experimental Botany*. 53(370): 905-916.
- Kaiser, W. M., H. Weiner, A. Kandlbinder, C. Tsai, P. Rockel, M. Sonoda y E. Plnachet. 2002. Modulation of nitrate reductase: some new insights, an unusual case and a potentially important side reaction. *Journal of experimental Botany*. 53 (370): 875-882.
- Kindl, H. 1995. *Biochemie der Pflanzen*. 4. Auflage. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York. 172-188p
- Lüttge, U. 2004. Ecophysiology of crassulacean acid metabolism (CAM). *Annals of Botany*. 93: 629-652.
- Ma L.F., Y. Z. Shi, J. Y. Ruan. 2000. Soil pHs in the tea gardens in Jiangsu, Zhejiang, and Anhui provinces and changes of soil pH in the past decade. *Chinese Journal of Soil Science*. 31: 205-207
- Maldonado, J. M. 1996. Asimilación del nitrógeno y del azufre. En: Azcon-Bieto J. y M. Talon. *Fisiología y bioquímica vegetal*. Interamericana McGraw-Hill. España. 215-236 pp.
- Mancera-López, M.M., J.M. Soto-Parra, E. Sanchez-Chávez, R. M. Yáñez-Muñoz, F. Montes-Dominguez y R. R. Balandran-Quintana. 2007. Caracterización mineral de manzana Red Delicious y Golden Delicious de dos países productores. *Tecnociencia Chihuahua*. 1:6-17.
- Mendel R. R. y R. Hänsch. 2002. Molibdoenzymes and molybdenum cofactor in plants. *Journal of Experimental Botany*. 53 (375) 1689-1698.

Munsell® color charts for plant tissues. New Winsor, New York.

Nikolaeva V. y V. Niño de la Cruz, 2007. Deficiencia inducida de elementos nutritivos en el cultivo del agave. En Pérez, D., J. F. y J. I. Del Real-Laborde. Conocimiento y prácticas agronómicas para la producción de *Agave tequilana* Weber en la zona de denominación de origen del tequila. México. INIFAP. Centro de Investigación Regional Pacífico-Centro. 89-116 pp.

Novel, P. S. 2010. Desert wisdom agaves and cacti CO₂, water, climate change. USA. iUniverse, Inc. 175 p.

Ota, K., T. Tezuka y Y. Yamamoto. 1988. Changes in crassulacean acid metabolism of *Kalanchoe blossfeldiana* by different nitrogen sources. Plant Cell Physiology. 29(4): 533-537.

Ota, K. 1988. CAM photosynthesis under drought conditions in *Kalanchoe blossfeldiana* grown with nitrate or ammonium as the sole nitrogen source. Plant Cell Physiology. 29(5): 801-806.

Pimienta-Barrios, E., J. Zañudo-Hernandez y J. García-Galindo. 2006. Fotosíntesis estacional en plantas jóvenes de *Agave tequilana*. Agrociencia. 40:699-709.

Porra, R. J., W. A. Thompson y P. E. Kriedemann. 1989. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. Biochimica et Biophysica Acta. 975: 384-394.

- Portillo-Martinez, L. 1997. El agave azul tequilero: un cultivar de *Agave tequilana* Weber. NAKARI. 8: 22-23.
- Rathnam, C. K. M. y G. E. Edwards. 1976. Distribution of nitrate-assimilating enzymes between mesophyll protoplast and bundle sheath cells in leaves of three groups of C₄ plants. Plant Physiol. 57: 881-885
- Ruan, J., J. Gerendás, R. Härdter y B. Sattelmacher. 2007. Effect of nitrogen form and root-zone pH on growth and nitrogen uptake of tea (*Camellia sinensis*) plants. Annals of Botany. 99:301-310.
- Ruiz-Corral, J., E. Pimienta-Barrios y J. Zañudo-Hernandez. 2002. Regiones térmicas óptimas y marginales para el cultivo de *Agave tequilana* en el estado de Jalisco. Agrociencia. 36: 41-53.
- Sanchez, E., R. M. Rivero, J. M. Ruiz y L. Romero. 2004. Changes in biomass, enzymatic activity and protein concentration in roots and leaves of green bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Strike) under high NH₄NO₃ application rates. 99: 237-248.
- Sánchez-Chavez, E. 2006. Caracterización del estado nutricional y fisiológico en plantas de judía (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Strike) sometidas a un estrés por nitrógeno. Tesis Doctorado. U. de Granada. España.
- Santacruz-Ruvalcaba, F., M.I. Torres-Morán y L. Portillo. 2008. Micropropagación de *Agave tequilana* Weber cv. Azul: problemas y perspectivas. Scientia-CUCBA. 10: 7-20.

- Suzuki, A., A. Oaks, J-P Jacquot, J. Vidal, y P. Gadal. 1985. An electron transport system in maize roots for reactions of glutamate synthase and nitrite reductase. *Plant Physiology*. 78: 372-378.
- Uvalle-Bueno, J. X., C. Vélez-Gutiérrez y A. Balcazar-Arízaga. 2003. Tolerancia a la toxicidad de microelementos-Agave tequilana Weber, var. azul. División Agrícola de Casa Cuervo. México. 49p.
- Uvalle-Bueno, J. X. y C. Vélez-Gutiérrez. 2007. Nutrición del agave tequilero (*Agave tequilana* Weber, var. azul). En Pérez, D., J. F. y J. I. Del Real-Laborde. Conocimiento y prácticas agronómicas para la producción de *Agave tequilana* Weber en la zona de denominación de origen del tequila. México. INIFAP. Centro de Investigación Regional Pacífico-Centro. 69-88 pp.
- Uvalle-Bueno, J.X. y C. Vélez Gutiérrez. 2010. Manejo integral de la nutrición. En División Agrícola de Casa Cuervo S. A. de C. V. Manejo integral del cultivo del agave tequilana Weber, cv. azul. 2º ed. México. 47-62pp.
- Van Beusichem, M. L. E. A. Kirkby y R. Baas. 1988. Influence of nitrate and ammonium nutrition on the uptake, assimilation, y distribution of nutrients in *Ricinus communis*. *Plant Physiology*. 86:914-921.
- Wellburn, A. R. 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Physiol*. 144: 307-313
- Wray J. L. y P. Filner. 1970. Structural and functional relationships of enzyme activities induced by nitrate in barley. *Biochemistry. J.* 119, 715-725.

Yúfera, P. E. y D. J. M. Carrasco. 1981. Química agrícola I. Suelos y Fertilizantes. Editorial Alhambra Mexicana, S.A. Reimpresión México. 141-174 p.

Zhou, Y, Y. Zhang, X. Wang, J. Cui, X. Xia, K. Shi y J. Yu. 2011. Effects of nitrogen form on growth, CO₂ assimilation, chlorophyll fluorescence, and photosynthetic electron allocation in cucumber and rice plants. J. of Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol) 12(2): 126-134.

ANEXOS:

Aportaciones de Cecilia Vélez Gutierrez al documento interno de la compañía Casa Cuervo titulado: "Manejo Integral del cultivo del *Agave tequilana* Weber cv azul. Edición 2010.

- ✓ Manejo Integral de la Nutrición
- ✓ Manejo Integral de Enfermedades
- ✓ Manejo Integral de Residuos de la Industria Tequilera