

1997 - A

CÓDIGO 090063405

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES**



BIBLIOTECA CENT

**EFECTO DE LA INOCULACIÓN DEL HONGO
Fusarium sp AISLADO DE *Agave victoria-reginae*
Moore, EN CUATRO ESPECIES DEL GENERO
Agave PROPAGADAS *in vitro*.**

**T E S I S P R O F E S I O N A L
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA
P R E S E N T A
LILIA BERTHA BARRAGÁN BARRAGÁN
LAS AGUJAS, ZAPOPAN, JALISCO. DICIEMBRE 2001**



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

COORDINACIÓN DE CARRERA DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

COMITÉ DE TITULACIÓN

**C. LILIA BERTHA BARRAGAN BARRAGAN
PRESENTE.**

Manifestamos a Usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de TESIS con el título "EFECTO DE LA INOCULACION DEL HONGO *Fusarium sp* AISLADO DE AGAVE *Victoria-reginae Moore*, EN CUATRO ESPECIES DEL GENERO AGAVE PROPAGADAS IN VITRO", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptada como Director de dicho trabajo a la M.C. EVA NOEMI OBLEDO VAZQUEZ, y como asesor a la M.C. BLANCA CATALINA RAMIREZ HERNANDEZ y LIC. EN MAT. PORFIRIO GUTIERREZ GONZALEZ.

**ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"
LAS AGUJAS, ZAPOPAN, JAL., ENERO 13 DE 1999**


**DR. ARTURO OROZCO BAROCIO
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

COMITE DE
TITULACION




**M. EN C. MARTHA GEORGINA OROZCO MEDINA
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACION**

c.c.p. M.C. EVA HOEMI OBLEDO VAZQUEZ.- Director del Trabajo.
c.c.p. M.C. BLANCA CATALINA RAMIREZ HERNANDEZ- Asesor del Trabajo.
c.c.p. LIC. EN MAT. PORFIRIO GUTIERREZ GONZALEZ.- Asesor del Trabajo.
c.c.p. Expediente del alumno

AOB/MGOM/bacg*

C. DRA. MÓNICA ELIZABETH RIOJAS LÓPEZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN
DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES
DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
PRESENTE.

Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted, que habiendo revisado el trabajo de tesis que realizó la pasante:

Lilia Bertha Barragán Barragán

con el título:

"EFECTO DE LA INOCULACIÓN DEL HONGO *Fusarium sp* AISLADO DE *Agave victoria-reginae* Moore, EN CUATRO ESPECIES DEL GENERO AGAVE PROPAGADAS IN VITRO", consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorización de impresión y en su caso programación de fecha de exámenes de tesis y profesional respectivos.

Sin otro particular, agradecemos de antemano la atención que se sirva brindar a la presente y aprovechamos la ocasión para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Las agujas, Zapopan, Jal., 22 de noviembre de 2001

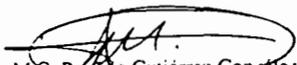
Director de tesis

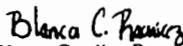

M.C. Eva Noemí Oblado Vázquez



COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

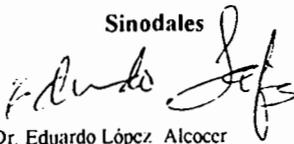
Asesores de tesis

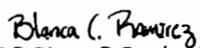

M.C. Porfirio Gutiérrez González


M.C. Blanca Catalina Ramírez Hernández

Sinodales


M.C. Rafael Soltero Quintana


Dr. Eduardo López Alcocer


M.C. Blanca C. Ramírez Hernández

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis agradecimientos al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco por el apoyo otorgado para la realización de este trabajo de Investigación.

Agradezco de una manera muy especial a mi Dra. de Tesis la M. en C. Eva Noemí Obledo V. por el apoyo en la realización de este trabajo, de igual manera a mis asesores la M. en C. Blanca Catalina Ramírez H. y el M. en C. Porfirio Gutiérrez G. Extiendo de igual modo un reconocimiento a todas aquellas personas que de una u otra forma contribuyeron en la elaboración de este trabajo, en especial a nuestra "alma mater" la Universidad de Guadalajara.

INDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Familia agavaceae.....	3
2.1.1 Reproducción de las agavaceas.....	3
2.1.2 Metabolismo ácido de las crasuláceas.....	4
2.2 Género Agave.....	5
2.2.1. Taxonomía.....	6
2.2.2 Características botánicas del género.....	6
2.2.3 Distribución geográfica.....	7
2.2.4 Características botánicas de cuatro especies del género <i>Agave</i>	7
2.2.5 Usos del Agave.....	8
2.3 Micropropagación vegetal.....	9
2.3.1 Métodos de micropropagación.....	10
2.3.2 Etapas del cultivo <i>in vitro</i>	10
2.3.3 Cultivo <i>in vitro</i> en el género <i>Agave</i>	12
2.4 Interacciones simbióticas.....	14
2.4.1 Simbiosis entre plantas y microorganismos.....	14
2.4.2 Importancia de los hongos.....	15
III. JUSTIFICACION.....	18
IV. OBJETIVO.....	19
V. HIPOTESIS.....	20
VI. MATERIAL Y METODOS.....	21
6.1 Propagación <i>in vitro</i> de las plantas de Agave.....	21
6.1.1 Propagación y enraizamiento de las plantas de Agave.....	21
6.1.2 Condiciones ambientales de incubación.....	21
6.1.3 Adaptación de plantas al suelo.....	22
6.2 Aislamiento del hongo.....	22
6.2.1 Obtención de la cepa a partir de plantas de invernadero.....	22
6.2.2 Medios de cultivo y condiciones de cultivo.....	23
6.2.3 Inoculación de las plantas.....	23
6.2.4 Determinación del peso seco y fresco del inóculo.....	23
6.2.5 Identificación de la especie.....	24
6.3 Experimentos en invernadero.....	24
6.3.1 Tratamientos.....	24
6.3.2 Variables.....	24
6.3.2.1 Variables que sirvieron de referencia para el establecimiento de las plantas.....	24

6.3.2.2 Variables de respuesta cuantificadas en plantas inoculadas y no inoculadas.....	25
6.3.2.2.1 Crecimiento de la raíz.....	25
6.3.2.2.2 Incremento de las ramificaciones de la raíz.....	25
6.3.2.2.3 Crecimiento vegetativo.....	26
6.3.2.2.4 Densidad estomática.....	26
6.3.2.2.5 Incremento en biomasa.....	26
6.3.2.2.6 Determinación del pH, porcentaje de ácido málico y acidez nocturna.....	27
6.3.2.2.7 Determinación de clorofila.....	28
6.3.2.2.8 Determinación de azúcares directos.....	29
6.3.3 Verificación de la presencia de <i>F. oxysporum</i> en las plantas evaluadas.....	30
6.3.4 Diseño estadístico.....	30
 VII. RESULTADOS.....	 31
7.1 Propagación de las plantas de Agave.....	31
7.2 Crecimiento de la raíz.....	31
7.3 Incremento de las ramificaciones de la raíz.....	32
7.4 Crecimiento vegetativo.....	33
7.5 Densidad estomática.....	35
7.6 Incremento en biomasa.....	35
7.7 Determinación del pH, porcentaje de ácido málico y acidez nocturna.....	37
7.8 Determinación de clorofila.....	40
7.9 Determinación de azúcares directos.....	44
 VIII. DISCUSION.....	 46
 IX. CONCLUSIONES.....	 51
 X. BIBLIOGRAFIA.....	 52

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Clasificación taxonómica del Agave.....	6
Figura 2.	Efecto de la inoculación de <i>Fusarium oxysporum</i> sobre el número de ramificaciones de la raíz en <i>Agave tequilana</i>	32
Figura 3.	Efecto de la inoculación de <i>Fusarium oxysporum</i> sobre el número de ramificaciones de la raíz en <i>Agave parrasana</i>	32
Figura 4.	Efecto de la inoculación de <i>Fusarium oxysporum</i> sobre el número de ramificaciones de la raíz en <i>Agave vilmoriniana</i>	33
Figura 5.	Efecto de la inoculación de <i>Fusarium oxysporum</i> sobre el número de ramificaciones de la raíz en <i>Agave victoria-reginae</i>	33
Figura 6.	Relación del incremento en biomasa entre plantas inoculadas y no inoculadas en cuatro especies del género <i>Agave</i>	37
Figura 7.	Relación del incremento del pH entre plantas inoculadas y no inoculadas en cuatro especies del género <i>Agave</i>	38
Figura 8.	Relación del incremento en el porcentaje de ácido málico entre plantas inoculadas y no inoculadas en cuatro especies del género <i>Agave</i>	39
Figura 9.	Relación del incremento de la acidez nocturna entre plantas inoculadas y no inoculadas en cuatro especies del género <i>Agave</i>	40
Figura 10.	Relación del incremento de clorofila total entre plantas inoculadas y no inoculadas en cuatro especies del género <i>Agave</i>	41
Figura 11.	Relación del incremento de clorofila "a" entre plantas inoculadas y no inoculadas en cuatro especies del género <i>Agave</i>	42
Figura 12.	Relación del incremento de clorofila "b" entre plantas inoculadas y no inoculadas en cuatro especies del género <i>Agave</i>	43
Figura 13.	Relación del contenido de azúcares entre plantas inoculadas y no inoculadas en cuatro especies del género <i>Agave</i>	44

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Principales usos de diferentes especies del género <i>Agave</i>	9
Tabla 2.	Principales características distintivas de las plantas bajo condiciones de laboratorio respecto a las mismas bajo condiciones de invernadero.....	11
Tabla 3.	Trabajos <i>in vitro</i> realizados con diversas especies del género <i>Agave</i>	13
Tabla 4.	Efecto de la inoculación de <i>Fusarium oxysporum</i> sobre el crecimiento de la raíz principal en las cuatro especies de agave propagadas <i>in vitro</i>	31
Tabla 5.	Efecto de la inoculación de <i>Fusarium oxysporum</i> sobre el número de ramificaciones de la raíz en las cuatro especies de agave propagadas <i>in vitro</i>	32
Tabla 6.	Efecto de la inoculación de <i>Fusarium oxysporum</i> en el crecimiento vegetativo (longitud axial, apical y número de hojas) de <i>Agave tequilana</i> .	34
Tabla 7.	Efecto de la inoculación de <i>Fusarium oxysporum</i> en la longitud axial, apical y número de hojas de <i>Agave parrasana</i>	34
Tabla 8.	Efecto de la inoculación de <i>Fusarium oxysporum</i> en la longitud axial, apical y número de hojas de <i>Agave vilmoriniana</i>	34
Tabla 9.	Efecto de la inoculación de <i>Fusarium oxysporum</i> en la longitud axial, apical y número de hojas de <i>Agave victoria-reginae</i>	35
Tabla 10.	Efecto de la inoculación de <i>Fusarium oxysporum</i> sobre el incremento del número de estomas de la parte axial.....	36
Tabla 11.	Efecto de la inoculación de <i>Fusarium oxysporum</i> sobre el incremento del número de estomas de la parte abaxial.....	36
Tabla 12.	Efecto de la inoculación de <i>Fusarium oxysporum</i> sobre el incremento de la biomasa en las cuatro especies de agave propagadas <i>in vitro</i>	36
Tabla 13.	Efecto de la inoculación de <i>Fusarium oxysporum</i> sobre el incremento del pH en las cuatro especies de agave propagadas <i>in vitro</i>	38
Tabla 14.	Efecto de la inoculación de <i>Fusarium oxysporum</i> sobre el incremento del ácido málico en las cuatro especies de agave propagadas <i>in vitro</i>	39
Tabla 15.	Efecto de la inoculación de <i>Fusarium oxysporum</i> sobre el incremento de la acidez nocturna en las cuatro especies de agave propagadas <i>in vitro</i> ...	40

Tabla 16. Efecto de la inoculación de <i>Fusarium oxysporum</i> sobre el incremento de clorofila total en las cuatro especies de agave propagadas <i>in vitro</i>	41
Tabla 17. Efecto de la inoculación de <i>Fusarium oxysporum</i> sobre el incremento de clorofila “a” en las cuatro especies de agave propagadas <i>in vitro</i>	42
Tabla 18. Efecto de la inoculación de <i>Fusarium oxysporum</i> sobre el incremento de clorofila “b” en las cuatro especies de agave propagadas <i>in vitro</i>	43
Tabla 19. Efecto de la inoculación de <i>Fusarium oxysporum</i> sobre el incremento de azúcares reductores totales en las cuatro especies de Agave propagadas <i>in vitro</i>	44
Tabla 20. Parámetros evaluados en las cuatro especies de Agave.....	45

I. INTRODUCCION

Los microorganismos realizan una serie de funciones que repercuten en la productividad y el mantenimiento de los agroecosistemas. Las funciones que más se perciben son aquellas que afectan directamente a las plantas. Sin embargo las plantas se pueden ver dañadas o beneficiadas por su asociación con los microorganismos. Desde el punto de vista benéfico pueden incrementar el desarrollo y la productividad de las plantas, lo cual puede deberse, entre otras causas, a que los microorganismos tienen la capacidad de facilitar la absorción de nutrientes, controlar a los enemigos naturales, hacer disponibles algunos elementos del suelo que normalmente se encuentran de manera insoluble, mejorar las relaciones hídricas e incrementar en la planta tolerancia a condiciones adversas, entre otras (Bailey y col., 1997).

Conforme se avanza en el conocimiento de los factores que intervienen para el establecimiento de cultivos y las desventajas del uso excesivo de insumos químicos, se ha dado mayor importancia a las interacciones que se presentan en los ambientes circundantes a las plantas especialmente a las de mayor importancia económica. Debido a esto, actualmente se dedican considerables esfuerzos a la investigación de algunas interacciones simbióticas, tales como la conocida asociación *Rhizobium-leguminosa* y las asociaciones endomicorrizas como una buena alternativa en el mantenimiento del equilibrio de los ecosistemas naturales (Kliromonos y Kendrick, 1993).

En la naturaleza existen innumerables interacciones simbióticas entre las plantas y los microorganismos que son vitales para mantener el desarrollo de quienes la integran. Sin embargo, muchas de estas interacciones pueden perderse cuando la planta es propagada *in vitro* debido a que para su establecimiento es indispensable eliminar todo microorganismo que la acompaña independientemente de la función que pueda desempeñar en la planta. El presente trabajo está orientado a generar información acerca de la reincorporación de microorganismos a



BIBLIOTE

las plantas de *Agave* provenientes del cultivo *in vitro*, ya que su interacción pudiera favorecer procesos fisiológicos, anatómicos y morfológicos en el desarrollo de éstas.

II. ANTECEDENTES

2.1 FAMILIA AGAVACEAE

La familia Agavaceae está constituida aproximadamente por 273 especies agrupadas en 8 género. De estas 205 (75%) del total crecen en México, siendo 151 (55%) endémicas (García-Mendoza y Galván, 1994). Así mismo, el género *Agave* está constituido por 155 especies, de las cuales existen 116 en México, cifra que corresponde al 75% del total (Vázquez-González, 1983). Por otro lado, el aprovechamiento de los agaves o "magueyes" ha sido importante para el desarrollo de las comunidades ubicadas en zonas áridas y semiáridas de México (Madrigal-Lugo y col., 1989).

2.1.1 REPRODUCCION DE LAS AGAVACEAS

Los Agaves presentan dos tipos de reproducción: sexual y asexual. La reproducción sexual se realiza por medio de la propagación por semilla, mediante la cual se logran nuevas plantas individuales con las características que reflejan la contribución genética de ambos progenitores (Hartmann y Kester, 1980). Sin embargo, en la mayoría de las especies este tipo de propagación es poco eficiente debido a que además de producir semilla una sola vez en su ciclo de vida, esta producción es muy baja, con poca viabilidad y largos periodos de germinación y crecimiento de las plantas. Por otra parte, el ciclo de maduración de la planta y por ende de producción de semillas es relativamente largo llegando a ser en algunas especies de aproximadamente 8 años, como es el caso del *Agave sisalana* (Das, 1992) y en otras especies aún más largos como en el *Agave victoria-reginae* Moore que es de 20 a 30 años (Rodríguez-Garay, y col., 1996 a). La reproducción asexual o vegetativa es aquella que no implica el proceso sexual, tanto los rizomas como el escape pueden llevar a cabo este tipo de reproducción, los individuos obtenidos de esta manera constituyen un clon, que se define como un individuo formado por un proceso asexual, por lo tanto genéticamente idéntico al individuo

original (Novitski, 1982). Los procesos de reproducción asexual de los agaves son los bulbillos y los hijuelos de rizomas. Los bulbillos son hijuelos que se producen sólo cuando aparece el escapo y se originan en los meristemas axilares de la inflorescencia, en la base de las flores (Binh y col., 1990). Los rizomas en cambio, crecen generalmente en un plano horizontal, paralelo a la superficie del terreno. A diferencia de las raíces, los rizomas poseen yemas en la cara superior de donde se originan ramas, hojas y flores aéreas y en la cara inferior generan raíces adventicias (Ruiz-Oronoz y col., 1989).

2.1.2 METABOLISMO ACIDO DE LAS CRASULACEAS (MAC)

Las agavaceas presentan el Metabolismo Acido de las Crasulaceas (MAC), con este término se describe el metabolismo vegetal que se caracteriza por la acumulación nocturna de ácidos orgánicos, (Martínez-Gil, 1995). Las plantas con metabolismo MAC son suculentas y pertenecen a las familias Cactaceae, Crassulaceae, Euphorbiaceae, Liliaceae, Agavaceae y Airoaceae, también incluye miembros epífitos de las familias Orquidaceae y Bromeliaceae (Pimienta-Barrios, 1990).

En este tipo de metabolismo los estomas realizan una función muy importante, ya que se encargan de la fijación del CO₂ manteniéndose cerrados durante el día y abiertos durante la noche cuando la temperatura y el déficit de presión de vapor son ordinariamente bajos, éstos se localizan en la parte abaxial de la hoja, sin embargo un gran número de especies presenta estomas en ambas caras (Salisbury y Ross, 1994). La frecuencia estomática y el área de los poros son características de gran valor fisiológico a través de los cuales la planta logra la regulación de la fotosíntesis y la transpiración (Tallman, 1992). Existen dos factores ambientales que influyen de manera importante en la frecuencia estomática. Estos son: la luz y la disponibilidad del agua, encontrándose que las plantas que crecen con gran intensidad de luz y poca disponibilidad de agua, presentan mayor frecuencia de estomas (Loera-Quezada, 1990), siendo la parte inferior de la hoja, la que presenta mayor cantidad de estomas en casi todas las

especies (Wilson y Loomis, 1980). En la fotosíntesis MAC, el CO_2 del aire es fijado a ácido málico por acción de la enzima fosfoenol piruvato carboxilasa (PEPC); el ácido málico se almacena en las vacuolas de las células de la corteza. Durante el siguiente periodo de luz, el ácido málico es liberado de la vacuola y descarboxilado en el citoplasma para liberar CO_2 , el cual es finalmente refijado y reducido en los cloroplastos por medio del ciclo de Calvin para la producción de carbohidratos (García-Sagún, 1991). Los principales carbohidratos formados en la planta son monosacáridos: pentosas (arabinosa y ribosa), disacáridos: sacarosa (fructosa y glucosa), trisacáridos: (rafinosa), polisacáridos: pentosas (xilano), hexosas (almidón, inulina y celulosa) e hidratos de carbono compuestos: (pectina, gomas, mucilagos, taninos y glucósidos) (Rojas-Garcidueñas, 1984). La producción de azúcares en una planta es el producto de la eficiencia fotosintética que esta tiene (Cushman y Bohner, 1997) y se estima por la variación en la acidificación nocturna que presenta (Gibson y Nobel, 1986). El ciclo inicia cuando la luz solar incide sobre las hojas y excita los sistemas de pigmentos 1 (SPI) formado por clorofila "a" y carotenoides y el sistema de pigmentos 2 (SPII) compuesto por clorofila "b" y ficobilinas. La clorofila actúa como una trampa de energía ya que captura la energía radiante del sol y la hace disponible para la producción de alimentos (Miller, 1998). El contenido de clorofila en una planta se puede ver afectado al ser atacada por patógenos (Epple y col., 1997).

La ruta de las plantas CAM se divide en cuatro fases:

Fase 1: fijación nocturna de CO_2

Fase 2: descarboxilación diurna de malato

Fase 3: incorporación del CO_2 al ciclo de Calvin

Fase 4: cierre estomático diurno (Cushman y Bohner, 1997).

2.2 GENERO *Agave*

El género *Agave*, cuya palabra proviene del griego y significa "admirable", es originario de América, específicamente de México, de donde fue introducido a otros países (Gentry, 1982). Taxonómicamente este género se ubica dentro de las Agavaceas y es el más importante de la familia, debido a que posee el mayor número de especies.

2.2.1 TAXONOMIA

Granados-Sánchez en 1993, clasificó taxonómicamente a los agaves dentro de la división de las angiospermas (Figura 1).

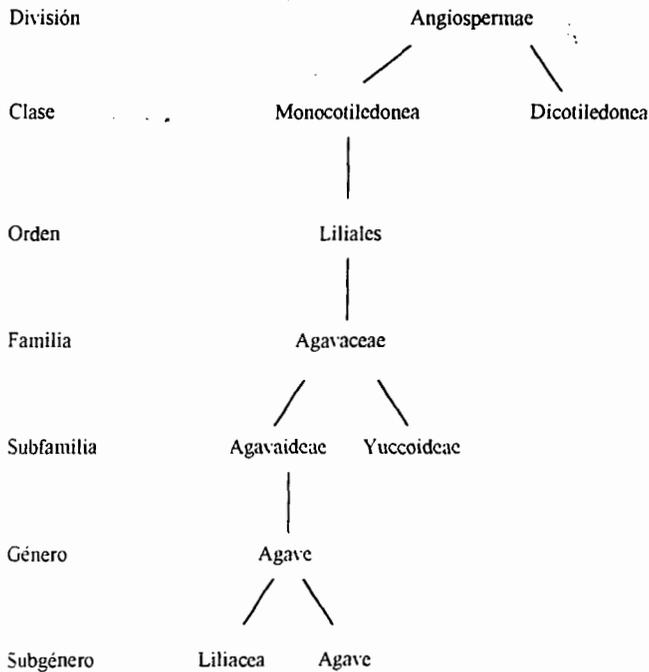


Figura 1. Clasificación taxonómica del *Agave*, tomada de Granados-Sánchez (1993).

2.2.2 CARACTERISTICAS BOTANICAS DEL GENERO

Plantas perennes, robustas, con el tronco reducido o nulo, hojas arrosetadas carnosas-fibrosas con púa terminal y borde frecuentemente armado de espinas rectas o ganchudas, flores agrupadas en una espiga o panoja, en un escapo cilíndrico, largo y macizo; ocasionalmente presentan bulbillos en la inflorescencia, fruto capsular coronado por el perigonio persistente, con numerosas semillas planas, negras y comprimidas (Sánchez-Sánchez, 1980). Son semélparos, es decir, que sólo tienen una floración durante su ciclo de vida, al cabo de la cual la planta muere (Gentry, 1982).

Algunos de los atributos que posee este género para hacer frente a la falta de agua son: raíces superficiales y ramificadas, cutícula gruesa, estomas hundidos y el metabolismo ácido de las crasuláceas (Ruiz-Oronoz y col., 1983).

2.2.3 DISTRIBUCION GEOGRAFICA

La mayoría de las especies del género *Agave* se distribuyen en zonas semidesérticas en regiones tropicales y subtropicales de ambos hemisferios del Continente Americano (Madrigal-Lugo y col., 1989). Sin embargo, México es el país que presenta el mayor número de especies, su principal centro de distribución es la altiplanicie Mexicana especialmente en las llanuras centrales y la subregión caliente del sur de la meseta central y el Norte de México (Granados-Sánchez, 1993).

2.2.4 CARACTERISTICAS BOTANICAS DE LAS CUATRO ESPECIES DE AGAVE

Agave tequilana Weber: cortamente caulescente, de hoja azulado-verdosa o glaucas delgadas y casi planas, de 125 cm o más de largo por 8 ó 10 de ancho, provistas de una espina rojo oscuro, de 2 cm de largo, dientes rojizos, ganchudos y triangulares, de 3 ó 4 mm de largo, con

una separación de 0.5 a 1 cm uno de otro, margen blanquizco, ligeramente cóncavo. Es originario de Tequila, Jalisco y se le conoce como Chino Azul.

Agave parrasana Berger: hojas verdes, ligeramente glaucas, transovaladas, largamente acuminadas, de 10 cm o más de largo por 8 cm ó menos de ancho, provistas de una espina aguzada de 5 cm de largo y de dientes triangulares más o menos encorvados, sobreprominencias carnosas de 5 mm de largo por una separación de 1 cm entre uno y otro. Se localiza principalmente en la Sierra de Parras, Coahuila.

Agave vilmoriniana Berger: hojas verdes glaucas o azuladas, blandamente carnosas, acuminadas lanceoladas-lineales, sin dientes, con una espina aleonada cortamente decurrente de 3 a 4 mm de largo, es endémico de Jalisco.

Agave victoria-reginae Moore: hojas numerosas, muy firmes y dispuestas en un rosetón, verde oscuras, triangulares en sección transversal de 18 cm por 5 cm como promedio, terminadas en 1, 2 ó 3 espinas negras de 1 cm o menos de largo, decurrentes, con los bordes callosos desprendibles, pero con una fibra corta y muy fuerte. Endémico de Durango, Coahuila y Nuevo León (Conzatti, 1981).

2.2.5 USOS DEL AGAVE

Desde tiempos anteriores a la conquista y hasta nuestros días el agave ha sido considerado "el árbol de las maravillas" debido a los diferentes usos que se le pueden dar (Rodríguez-Garay y col., 1996 b). El uso que se le daba al maguey dependía de las regiones donde se localizaban los grupos étnicos de las zonas áridas y semiáridas. cabe resaltar que de esta planta se obtenían bebidas embriagantes, dentro de las cuales sobresale el pulque, con un importante papel social y religioso, debido a que se creía que contenía fuerzas espirituales asociadas a una gran cantidad de dioses como la diosa Mayahuel (Granados-Sánchez, 1993). También existen numerosos indicios de su uso como fuente de alimentos en diversas culturas como la de los Aztecas, Mayas, Olmecas, Tarascos y Zapotecas entre otras (Madrigal-Lugo y col., 1989).

Prácticamente todas las partes de la planta eran utilizadas, las flores se preparaban en diferentes guisos, de las raíces se elaboraban cepillos escobas y canastas tejidas, las semillas se utilizaban para elaborar adornos corporales, sonajas y juguetes, las púas terminales de las hojas eran usadas como instrumentos de autosacrificio y las pencas y piñas secas se utilizaban como abono para la tierra (Valenzuela-Zapata, 1997). En la actualidad los agaves se utilizan en la producción de bebidas, fibras, forrajes y con fines ornamentales (Tabla 1), entre las propiedades no explotadas se encuentran reportes de la actividad antimicrobiana de sus extractos y su potencial uso en la fabricación de papel (Verastegui y col., 1996).

Tabla 1. Principales usos de diferentes especies del género *Agave*.

USOS DEL AGAVE	ESPECIE EMPLEADA
PRODUCCION DE BEBIDAS	<i>Agave tequilana</i> Weber
	<i>Agave salmiana</i> Ottoex Salm-Dic
	<i>Agave americana</i> L.
	<i>Agave karwinskii</i> Zucc
PRODUCCION DE FIBRAS	<i>Agave fourcroydes</i> Lem
	<i>Agave sisalana</i> Perine
	<i>Agave lechuguilla</i> Torrey
FUENTE DE FORRAJES	<i>Agave mapisaga</i> Trel
	<i>Agave angustifolia</i> Haw
	<i>Agave palmeri</i> Engelm.
	<i>Agave potatorum</i> Zucc
PLANTAS ORNAMENTALES	<i>Agave victoria-reginae</i> Moore
	<i>Agave parrasana</i> A. Berger



2.3 MICROPOPAGACION VEGETAL

A partir del descubrimiento de la totipotencia de las células vegetales para regenerar un organismo completo, se empezaron a realizar trabajos cultivando células en medios artificiales hasta llegar a la propagación de plantas *in vitro*. De manera general, las plantas propagadas *in vitro* presentan un crecimiento más vigoroso que el de las plantas propagadas *in vivo*, lo cual se debe principalmente al rejuvenecimiento de la planta y a la obtención de plantas libres de enfermedades. Otra ventaja es que con poco material y en menor tiempo, es posible obtener una cantidad mayor de individuos a diferencia de la propagación convencional (George, 1993).

Para la propagación *in vitro* es necesario que las plantas sean capaces de regenerarse; la habilidad de la regeneración está determinada por características genéticas (familia, género, especie, genotipo), condiciones ambientales (fuente de nutrimentos, reguladores de crecimiento y condiciones físicas) y el estado de desarrollo del material inicial, ya que las plantas jóvenes tienen una mayor capacidad de regeneración que las plantas adultas (Pierik, 1987).

2.3.1 METODOS DE MICROPROPAGACION

En el cultivo *in vitro* existen tres métodos de micropropagación que son: proliferación de yemas axilares, organogénesis y embriogénesis somática. La proliferación de yemas axilares es el más importante, ya que ha mostrado ser el más aplicable y rentable (George, 1993) y tiene una ventaja muy importante comparada con la embriogénesis somática y la organogénesis, debido a que mantiene mayor fidelidad genética en los clones. (Rodríguez-Garay, comunicación personal). Además de ser un método relativamente fácil y rápido, su procedimiento es más simple que en los otros dos métodos de micropropagación (Pierik, 1987).

2.3.2 ETAPAS DEL CULTIVO *in vitro*

El proceso de cultivo *in vitro* de acuerdo a Murashige (1974) se divide en 5 etapas:

- Etapa 0 Preparación y mantenimiento de la planta madre: esta etapa incluye desde la selección del material parental para iniciar la micropropagación, hasta los tratamientos aplicados a dicho material antes de iniciar su micropropagación.
- Etapa 1 Establecimiento del cultivo: es la desinfección de los explantes y adaptación del material vegetativo a condiciones *in vitro*; así como la regulación hormonal en el medio de cultivo para la especie a propagar.
- Etapa 2 Producción de brotes: esta se da manteniendo una mayor concentración de citocininas respecto a las auxinas en el medio de cultivo.
- Etapa 3 Enraizamiento: en esta etapa se mantienen los explantes individualizados en un medio de cultivo con mayor proporción de auxinas.
- Etapa 4 Adaptación a condiciones de invernadero: es una de las etapas más importantes, debido a que los factores como nutrición, iluminación, humedad relativa e interacción con otros microorganismos, son diferentes cuando las plantas se encuentran creciendo *in vitro* y en invernadero, ya que el hecho de enfrentar un nuevo ambiente, puede ocasionar su muerte durante esta etapa de adaptación (Tabla 2).

Tabla 2. Principales características distintivas de las plantas bajo condiciones de laboratorio respecto a las mismas bajo condiciones de invernadero (Obledo-Vázquez, 1995). Cabe señalar que los valores de estas características pueden variar dependiendo la especie.

CARACTERISTICAS	EN LABORATORIO	EN INVERNADERO
-Nutrición	Mixótrofa	Autótrofa
-Iluminación	1,500 - 3,000 luxes	8,000 luxes
-Humedad relativa	100%	70 - 90%
-Interacción con otros microorganismos	Ausente	Presente

Las plantas que se encuentran en condiciones de cultivo *in vitro* presentan generalmente nutrición mixta, por lo que se denominan organismos mixótrofos (Obledo-Vázquez, 1995) ya que utilizan azúcares presentes en el medio de cultivo como fuente de carbono y por lo general presentan una mínima actividad fotosintética, debido a esto, sus requerimientos de luz para llevar a cabo la fotosíntesis son reducidos (George, 1993). La humedad relativa es otro factor a considerar, pues la planta cuando se encuentra *in vitro* se ha desarrollado en presencia de humedad relativa alta, aproximadamente del 100%. Debido a esto, las hojas presentan poca cantidad de estomas y la planta no tiene la capacidad de regular de manera adecuada la apertura y el cierre estomático (Cassells y col., 1980).

En el cultivo *in vitro* la interacción de las plantas con otros microorganismos es nula, ya que se deben eliminar a los microorganismos superficiales como sistémicos que estén interactuando con las plantas, debido a que el medio de cultivo contiene una gran cantidad de nutrimentos que requieren las plantas y que son muy similares a los que requieren los microorganismos, de tal manera que la proliferación de éstos es muy rápida y en estas condiciones se vuelven agresivos, causando la muerte a la planta (Jofre, 1987).

2.3.3 CULTIVO *in vitro* EN EL GENERO *Agave*

Existen numerosos reportes del género *Agave* utilizando el cultivo de tejidos vegetales, la mayoría en especies de importancia económica o en aquellas que se encuentran en peligro de extinción. En la Tabla 3 se muestran las especies en las cuales se han realizado trabajos con cultivo de tejidos, los explantes utilizados y los resultados obtenidos.

Tabla 3. Trabajos *in vitro* realizados con diversas especies del género *Agave*.

ESPECIE	EXPLANTE	RESPUESTA MORFOGENICA	REFERENCIA
<i>Agave airizonica</i> Gentry & Weber	Bulbillo	Callo	Powers y Backhaus, 1989
<i>Agave atrovirens</i> Karw	Yemas axilares	Organogénesis	Madrigal-Lugo y col., 1989
<i>Agave catalana</i> Robx	Rizomas	Organogénesis	Binh y col., 1990
<i>Agave fourcroydes</i> Lem	Rizomas	Proliferación de yemas axilares y Organogénesis	Robert y col., 1987
	Tallos	Organogénesis	Madrigal-Lugo y col., 1989
<i>Agave schidigera</i> Lem	Rizomas	Organogénesis	Binh y col., 1990
	Hijuelos	Proliferación de yemas axilares	Rodríguez-Garay y col., 1996
<i>Agave sisalana</i> Perrine	Rizomas	Organogénesis	Binh y col., 1990
	Rizomas	Proliferación de yemas axilares	Das, 1992
<i>Agave spp.</i>	Semillas	Organogénesis	Groenwuald y col., 1977
<i>Agave tequilana</i> Weber	Tallos	Organogénesis	Castro-Concha y col., 1990
	Hojas	Embriogénesis somática	Santacruz-Ruvalcaba, F. 1997
	Hojas	Embriogénesis somática	Soltero y col., 1999
	Hojas	Embriogénesis somática	Portillo-Martínez L. 1997
	Rizomas	Proliferación de yemas axilares	Robert y col., 1987
<i>Agave parrasana</i> Berger	Semillas	Proliferación de yemas axilares	Santacruz-Ruvalcaba y col. 1999
<i>Agave victoria-reginae</i> Moore	Embriones somáticos	Proliferación de yemas axilares	Rodríguez-Garay y col., 1996 a.

2.4 INTERACCIONES SIMBIOTICAS

2.4.1 SIMBIOSIS ENTRE PLANTAS Y MICROORGANISMOS

Existen diversas interacciones biológicas entre las plantas y los microorganismos, que pueden ser benéficas (simbiosis), neutras (comensalismo) o perjudiciales (parasitismo). La especificidad de la asociación varía desde muy leve, como en el caso de algunas plantas epífitas, hasta muy fuerte como en el caso de bacterias fijadoras de nitrógeno, cuya especificidad depende de la capacidad de las proteínas de ambos miembros de la simbiosis para reconocer los sitios de enlace en la superficie celular del otro miembro (Bidwell, 1990).

Actualmente se conoce una gran cantidad de plantas que de manera natural se encuentran interactuando benéficamente con alguna especie de microorganismo, la simbiosis es un tipo de interacción donde el beneficio es mutuo aunque no siempre imprescindible. En algunas plantas la asociación es determinante para su buen desarrollo, tal es el caso de los pinos asociados a algunas especies de hongos ectomicorrizicos en donde ambos organismos obtienen beneficios nutrimentales (Orozco-García, 1985).

a) Asociación planta - bacteria: hay varias especies de la familia Rhizobiaceae que se infectan a ciertas leguminosas a través de los pelos absorbentes de sus raíces y cuando llegan a los tejidos de la raíz, se distribuyen por todas las células a las cuales hipertrofian, así mismo estimulan su multiplicación, de esta manera se forman los nódulos que pronto se llenan de gran cantidad de bacterias, transformándose en bacteroides, que tienen la capacidad de fijar el nitrógeno libre del aire (Jordan, 1984); las bacterias ayudan a la planta a fijar el nitrógeno atmosférico y ellas se ven beneficiadas habitando en sitios en donde encuentran su fuente de alimento que en este caso son compuestos flavonoides, que se localizan en las raíces de las leguminosas (Kondorosi y Kondorosi, 1986).

b) Asociación planta - hongo: en las raíces de numerosas fanerógamas se establecen hongos filamentosos, que dan lugar a la formación de micorrizas, éstas pueden ser ectomicorrizas o

endomycorrizas. Se les llama endomycorrizas, cuando los filamentos del hongo llegan hasta los tejidos internos de la planta como en las orquídeas, gramíneas y otras. Por el contrario en las ectomycorrizas las hifas de los hongos sólo se introducen a las células más superficiales de las raíces como el género *Pinus*, *Fraxinus* y *Quercus* (Ruiz-Oronoz y col., 1983). Las micorrizas ayudan a la planta incrementando la tolerancia a la sequía, a altas temperaturas, a la invasión de patógenos de la raíz y al pH extremo ocasionado por la acumulación de azufre y amonio (Dood, 2000). Por su parte el hongo se ve beneficiado utilizando los hidratos de carbono elaborados por la planta (sacarosa, glucosa y fructosa) transformándolos en glucano y manitol (Orozco-García, 1991). Existen algunas referencias en donde las micorrizas incrementan la biomasa de las plantas (Bhatia y col., 1998).

2.4.2 IMPORTANCIA DE LOS HONGOS

Los hongos realizan una labor de primera importancia en los ecosistemas donde viven, ya que representan un eslabón en la cadena alimenticia, la mayoría de estos se encargan de destruir los restos vegetales y animales que hay en el suelo, degradando la materia orgánica e incorporando al medio los elementos que luego serán la base para la nutrición de las plantas, contribuyendo al mantenimiento del delicado equilibrio del ciclo materia-energía (Díaz-Barriga, 1992). La importancia de los hongos en la naturaleza difícilmente puede ser valorada. Dentro de las aplicaciones y relaciones que establecen con el medio ambiente se pueden señalar las siguientes:

- * Biodegradación: los hongos son desintegradores de todo tipo de materia orgánica, interviniendo en los ciclos de C y N, Braun y col., (1999) reportaron la biodegradación de un hidrocarburo aromático por un grupo de hongos ectomicorrízicos.

* Colonización: estos son los colonizadores más eficientes, invaden destruyen y afectan a semillas y frutos. Por otro lado se asocian con raíces de diversas plantas favoreciendo su desarrollo (Castillo-Tovar, 1987).

* Producción de toxinas: la mayoría de los hongos producen una gran variedad de toxinas, una de las más peligrosas son las aflatoxinas por su gran acción mutagénica y carcinogénica, por ello causan severas pérdidas en la agricultura, ya que los productos contaminados no deben ser utilizados como fuente de alimento para ningún organismo debido a su alta toxicidad (Hernández-Orozco, 1995).

* Control biológico: existen numerosas especies de hongos que por su capacidad de atacar y destruir nemátodos e insectos son utilizados como control biológico, incluso dentro del género *Fusarium* existen algunas especies que son utilizados como armas en el control biológico de cepas patógenas de *Fusarium* (Herrera y Carsolio, 1997), constituyendo una alternativa ecológica para la agricultura.

* Patogénesis en plantas: los hongos son importantes patógenos en las plantas, atacan a poblaciones silvestres y cultivadas, su incidencia y persistencia dificultan su control, debido a esta capacidad son causantes de severas pérdidas económicas (Bailey-Moreno y col., 1997).

Gastón-Guzman, (1978) reportó que la mayoría de las enfermedades de las plantas de importancia económica (plátano, trigo, frijol, vid y maíz) son ocasionadas por hongos. Los hongos pertenecientes al género *Fusarium* son considerados como importantes, por ser altamente tóxicos y causar severos daños a la agricultura (Luna-Hernández, 1996). Entre las especies más conocidas, se encuentran *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum* y *F. oxysporum* (Castro-Sotelo, 1997). Incluso los hongos de este género se incluyen en el grupo de los patógenos de la raíz (Garbaye, 1991). La especie *Fusarium moniliforme* es responsable de pérdidas de hasta el 60% de la producción en zonas sorgueras ya que provoca la pudrición del tallo o panoja (Sierra-Olguín, 1989). Otra especie económicamente importante afectada por

esté género es el trigo, ya que *Fusarium graminearum* provoca la enfermedad llamada sarna blanca o tizón de la espiga (Montoya-Heredia, 1991). Los factores ambientales tales como el clima, suelo, humedad y tipo de cultivo son determinantes para el buen desarrollo de algunos patógenos como *Fusarium* (Agrios, 1995).

* Patogénesis en animales: los hongos causan enfermedades superficiales y profundas en el reino animal y vegetal, lo que ocasiona serios daños tanto en el sector productivo como en el sector salud (Casas-Rincón, 1989). Existe un gran número de especies de hongos que causan enfermedades de la piel en el ser humano donde destacan los géneros *Microsporium* y *Trichophyton* (Puig-Arevalos, 1983), entre otros.

* Producción de metabolitos y derivados de importancia económica: los hongos presentan una gran diversidad de usos: algunos son comestibles (Cedano-Maldonado, 1989) otros se utilizan para la producción de bebidas alcohólicas y destilados obtenidos mediante su capacidad fermentativa (Hagelsieb-Caballero, 1991). Son utilizados en procesos industriales para la obtención de ácidos orgánicos, vitaminas, antibióticos, enzimas y reguladores de crecimiento (Narváez-Nieto, 1989).

III. JUSTIFICACION

Uno de los problemas que se presentan en las plantas provenientes de la micropropagación es la ausencia de microorganismos que favorezcan el desarrollo de la planta cuando ésta se encuentra en condiciones *ex vitro*. Se ha visto que en *Agave victoria-reginae* Moore el hongo *Fusarium oxysporum* cumple esta función, favoreciendo el establecimiento y desarrollo de las plantas que son llevadas de condiciones *in vitro* a condiciones de invernadero (Obledo-Vázquez, 1995). Una manera de determinar si la inoculación del hongo *Fusarium oxysporum* favorece el desarrollo de las plantas, es inoculándolo en *Agave victoria-reginae* Moore y otras especies del género *Agave* de importancia ecológica y económica producidas *in vitro* como son: *A. tequilana*, *A. parrasana* y *A. vilmoriniana*.

IV. OBJETIVO

Evaluar el efecto de la inoculación de una cepa no patógena de *Fusarium oxysporum* aislada de *Agave victoria-reginae* Moore en cuatro especies del género *Agave*: *A. tequilana* Weber, *A. parrasana* Berger, *A. vilmoriniana* Berger y *A. victoria-reginae* Moore propagadas *in vitro* y adaptadas a condiciones de invernadero.

V. HIPÓTESIS

La inoculación de una cepa no patógena de *Fusarium oxysporum* aislada de plantas sanas de *Agave victoria-reginae* Moore en plantas de *A. tequilana* Weber, *A. parrasana* Berger, *A. vilmoriniana* Berger y *A. victoria-reginae* Moore propagadas *in vitro* influye de manera positiva en su desarrollo *ex vitro*, lo cual se verá reflejado en parámetros anatómicos y fisiológicos de las plantas.

VI. MATERIALES Y METODOS

6.1 PROPAGACION *in vitro* DE LAS PLANTAS DE AGAVE

6.1.1 PROPAGACION Y ENRAIZAMIENTO DE LAS PLANTAS DE AGAVE

La etapa experimental se llevó a cabo en el Laboratorio de Micropropagación y Mejoramiento Genético Vegetal del CIATEJ. Como material vegetal se utilizaron plantas de cuatro especies del género *Agave* producidas *in vitro*. La propagación se inició a partir de brotes mantenidos *in vitro*, utilizando protocolos para la proliferación de yemas axilares de cada especie de agave. En todos los casos se utilizó el medio basal MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con la mezcla de vitaminas L2 (Phillips y Collins, 1979) y reguladores de crecimiento. Las concentraciones fueron diferentes para cada especie, en *Agave tequilana* se utilizaron 0.025 mg/l de ácido 2,4-diclorofenoxiacético y 10 mg/l de benciladenina (Robert, M.L. y col., 1987), en *Agave parrasana* se utilizaron 0.01 mg /l de ácido 2,4-diclorofenoxiacético y 10 mg/l de benciladenina (Castro-Concha y col., 1990), en *Agave vilmoriniana* se utilizaron 0.0125 mg/l de ácido 2,4-diclorofenoxiacético y 10 mg/l de benciladenina (modificación del medio de cultivo reportado por Robert, M.L y col., 1987) y en *Agave victoria-reginae* se utilizaron 0.3 mg/l de ácido indolacético y 1 mg/l de cinetina (modificación del medio de cultivo reportado por Rodríguez-Garay y col., 1996 a). Para el enraizamiento de todas las plantas se utilizó el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con vitaminas L2 (Phillips y Collins, 1979), sin reguladores de crecimiento.

6.1.2 CONDICIONES AMBIENTALES DE INCUBACION:

Los brotes fueron incubados durante cuatro meses a $27^{\circ}\text{C} \pm 2$, con un fotoperíodo de 16 h. y una intensidad luminosa de 1,500 lux aproximadamente.

6.1.3 ADAPTACION DE LAS PLANTAS AL SUELO

Las plantas se lavaron con agua corriente para eliminar los restos de medio de cultivo y sus raíces se impregnaron con enraizador comercial Radix[®] (Acido indol 1-3 butirico 1,500 ppm) posteriormente se colocó una planta en cada maceta de 6 x 6 cm con sustrato compuesto por turba previamente esterilizada en autoclave marca Market forge por 30 min a 121°C durante tres días consecutivos (Obledo-Vazquez, 1995). Las macetas se colocaron en un cuarto de adaptación de aproximadamente 2 x 2 m en condiciones similares a las del incubador, las macetas fueron cubiertas de manera individual con una bolsa de plástico transparente de 12 x 8 cm y fueron selladas con el fin de conservar la humedad relativa, después de una semana se le hizo un orificio en la parte superior de la bolsa y así sucesivamente durante cuatro semanas, después de ese tiempo se eliminó la bolsa para completar su etapa de adaptación, posteriormente fueron llevadas al invernadero e inoculadas con el hongo donde permanecieron dos meses en desarrollo, después de los cuales se evaluó el efecto sobre la fisiología y anatomía de las plantas.

6.2 AISLAMIENTO DEL HONGO *Fusarium oxysporum*

6.2.1 OBTENCION DE LA CEPA A PARTIR DE PLANTAS DEL INVERNADERO

Se cortaron hijuelos de plantas de *Agave victoria-reginae* Moore provenientes de invernadero, los cuales fueron lavados con agua corriente, posteriormente se introdujeron durante 10 min en una solución con 50% de hipoclorito de sodio (v/v) y 3 gotas de humectante "tween 20" (Polioxiethyleno-sorbitan monolaurato), luego se aplicaron tres enjuagues consecutivos de agua destilada estéril, y por último los hijuelos fueron colocados en un medio de cultivo MS con la fuente de nitrógeno modificada (Castro-Concha y col., 1990) y vitaminas L2 (Phillips y Collins, 1979) sin reguladores de crecimiento.

Una vez que se observó el crecimiento del hongo, se aisló en un medio de cultivo para hongos PDA (agar papa dextrosa) utilizando la técnica de inoculación por picadura fue incubado a 28°C hasta que el hongo se desarrolló.

6.2.2 MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DEL CULTIVO

Se preparó 1 L de caldo de cultivo PDB (papa dextrosa sin agar) y se dividió en 10 matraces (100 ml a cada uno), los cuales se esterilizaron en autoclave. Uno de los matraces se inoculó tomando una muestra del micelio con asa de nicromo esterilizada y se incubó a 27°C en un agitador orbital a 121 rpm durante 48 h. Este cultivo sirvió como preinóculo, de este se tomaron alícuotas de 10 ml para inocular cada uno de los nueve matraces restantes, los cuales se incubaron por 24 h bajo las mismas condiciones que el preinóculo. Se filtró el contenido de cinco de los matraces utilizando filtros de velocidad media, y se enjuagaron con solución fisiológica (8.5 gr de NaCl/L de agua destilada). Se aforó a 80 ml (esta fue la solución “stock” del hongo).

6.2.3 INOCULACION DE LAS PLANTAS

De la solución “stock” del hongo se tomó 1 ml y se aforó a 10 ml con agua destilada, añadiéndose lentamente a cada planta en la base del tallo.

6.2.4 DETERMINACION DEL PESO FRESCO Y SECO DEL INOCULO

Para esta determinación se utilizó el contenido de tres de los cuatro matraces restantes, para el peso fresco se registró el peso del filtro y el peso del filtro con el micelio, se obtuvo la diferencia en base a los cinco matraces utilizados y se sacó la proporción de inóculo por planta

(0.31 gr). Para determinar el peso seco se pusieron a desecar filtros de papel de velocidad media en una estufa durante 24 h a 70°C se registró su peso y de la misma manera se colocó el micelio a desecar, se sacó la diferencia y se obtuvo la proporción por planta (0.18 gr).

6.2.5 IDENTIFICACION DE LA ESPECIE

La cepa del hongo utilizado se identificó a nivel de género en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N. y a nivel de especie en el Fusarium Research Center (Pensilvania State University) donde se determinó que pertenece al género *Fusarium* y a la especie *oxysporum*.

6.3 EXPERIMENTOS EN INVERNADERO

6.3.1 TRATAMIENTOS

Se utilizaron 36 plantas por especie, de las cuales 18 fueron inoculadas y 18 sirvieron como control.

6.3.2 VARIABLES

6.3.2.1 VARIABLES QUE SIRVIERON DE REFERENCIA PARA EL ESTABLECIMIENTO DE LAS PLANTAS.

La medición de estas variables sirvió para determinar las condiciones en que se desarrollaron las plantas y de esta manera descartar o en su caso relacionar alguna respuesta con los factores de temperatura, porcentaje de humedad y pH del sustrato.

1. TEMPERATURA: esta se midió en todas las plantas de cada una de las especies introduciendo en el sustrato un termómetro a 5 cm de profundidad y 1 cm de distancia del tallo de la planta, la medición se realizó en cuatro horarios, a las 9:00, 12:00, 15:00 y 18:00 h.

2. PORCENTAJE DE HUMEDAD: para medir el porcentaje de humedad se empleó el método utilizado por Torres (1988), el cual consiste en registrar el peso del sustrato de 10 plantas por especie tomadas al azar, desecarlas en una estufa durante 48 h a 80°C, sacar la muestra y colocarla en charolas de papel previamente secadas en una estufa durante 48 h a 60°C. Mantenerlas en un desecador con sílica gel hasta que la tierra se enfríe para luego registrar nuevamente el peso. La fórmula para calcular el porcentaje de humedad fue la siguiente:

$$\text{Porcentaje de humedad} = \frac{\text{Peso húmedo} - \text{Peso seco}}{\text{Peso seco}} \times 100$$

6.3.2.2 VARIABLES DE RESPUESTA CUANTIFICADAS EN PLANTAS INOCULADAS Y NO INOCULADAS .

6.3.2.2.1 CRECIMIENTO DE LA RAIZ: esta medición incluyó el tamaño de la raíz principal. Inicialmente a todas las plantas se les cortó la raíz con una navaja dejándolas de 1 cm de largo a fin de ver el incremento que se tendría a los dos meses de su inoculación.

6.3.2.2.2 INCREMENTO DE LAS RAMIFICACIONES DE LA RAIZ: la determinación se llevó a cabo en cada una de las plantas dos meses después de su inoculación, cuantificando el número de raíces secundarias con un mínimo de cuatro ramificaciones.

6.3.2.2.3 CRECIMIENTO VEGETATIVO: esta evaluación se realizó en cada una de las plantas dos meses después de su inoculación, para lo cual se tomó en cuenta el tamaño y el ancho de la hoja más larga de la planta y la cantidad de hojas por planta. El ancho de la hoja se midió con vernier, tomando como referencia la porción más amplia y marcando el sitio con tinta indeleble, el tamaño de la hoja también se midió con vernier desde la base hasta el ápice de la misma, identificándose con tinta indeleble.

6.3.2.2.4 DENSIDAD ESTOMÁTICA: para medir la densidad estomática se tomaron al azar 10 plantas por especie a cada una de las cuales se les cortaron 3 hojas. Se utilizó la parte central cortándose en trozos de 1 cm^2 , en el portaobjetos se puso una capa de esmalte de uñas transparente y sobre este se pegaron los trozos de hoja. Para obtener el montaje de estomas axial y abaxial, se presionaron con un cubreobjetos y se dejaron secar a temperatura ambiente durante 24 h, posteriormente se despegaron los trozos de hoja y sobre la huella marcada se hizo la cuantificación de 10 campos por la parte axial y 10 campos por la parte abaxial, utilizando un microscopio con objetivo de 10X, esta medición se realizó dos meses después de su inoculación.

6.3.2.2.5 INCREMENTO EN BIOMASA: a fin de obtener el incremento en biomasa se tomaron dos muestras, la primera a las 5 p.m. (peso inicial) y la segunda a las 8 a.m. (peso final), esta determinación se llevo a cabo dos meses después de la inoculación de las plantas, para lo cual se obtuvieron al azar 10 hojas por especie y se cortaron 10 trozos de 1 cm^2 los cuales se pesaron para registrar el peso fresco, se secaron en una estufa a 70°C durante 24 h, y se dejaron enfriar en desecador durante 1 h a fin de registrar el peso seco. El incremento en biomasa se calculó mediante la siguiente formula:

$$\text{INCREMENTO EN BIOMASA} = \frac{(\text{peso inicial} - \text{peso final}) / \text{área total}}{\text{peso seco}} = \text{g/m}^2\text{s}$$

m² = metro cuadrado

s = segundo

g = gramo

6.3.2.2.6 DETERMINACION DEL pH, PORCENTAJE DE ACIDO MALICO y ACIDEZ NOCTURNA: el porcentaje de ácido málico, pH y acidez nocturna se cuantificaron de acuerdo a la metodología descrita por Nobel y Hartsock, 1983. Esta evaluación se llevó a cabo dos meses después de la inoculación de las plantas, determinándose al atardecer y a la mañana siguiente, a fin de percibir los cambios en acidez y contenidos de ácido málico. Para esta determinación se extrajeron 30 mg de tejido con un sacabocados de 5 mm de diámetro, el cual fue colectado de 10 plantas tomadas al azar, homogeneizándose con 2 ml de agua destilada mezclándose con una varilla de vidrio (López-Amezcuca, 1991). La medición del pH se realizó utilizando un potenciómetro. Para la determinación de ácido málico se adicionó hidróxido de sodio 0.01N a la muestra anterior, a fin de llevar la muestra a un pH de 7.2, la cantidad en ml de NaOH utilizada en la muestra sirvió para calcular el % de ácido málico de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{PORCENTAJE DE ACIDO MALICO} = \frac{\text{ml utilizados de NaOH (N de NaOH)}}{\text{gramos de tejido}}$$

N = normalidad

La evaluación de la acidificación nocturna se efectuó en base a la siguiente fórmula:

$$\mu\text{moles} / \text{cm}^2 = \frac{\text{ml utilizados de NaOH (M de NaOH)}}{\text{área del tejido}}$$

M = molaridad

6.3.2.2.7 DETERMINACION DE CLOROFILA: Esta determinación se realizó dos meses después de la inoculación de las plantas, empleándose el método de análisis de clorofila Castel-Franco (1977), el cual es una adaptación del método descrito por Arnon en 1949. Se tomaron al azar 10 plantas por especie, se pesaron 2 g de tejido, a los cuales se adicionaron 8 ml de acetona fría (80%) y se homogeneizó con una varilla de vidrio, posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm en una centrífuga refrigerada durante 10 min a -4°C . El sobrenadante fue colectado en un tubo de ensaye precongelado y envuelto en papel aluminio, al precipitado se le agregaron 8 ml de acetona fría (80%) y se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min a -4°C . El segundo sobrenadante se combinó con el anteriormente obtenido. De la mezcla de sobrenadantes se tomaron 4 ml tomando como blanco de referencia 4 ml de acetona (80%), se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 645 y 663 nm. En base a las lecturas obtenidas en ambas longitudes de onda, fue posible estimar la concentración tanto de clorofila total, como “a” y “b”, empleando las siguientes fórmulas:

$$\begin{aligned}\text{CLOROFILA TOTAL} &= 8.02 \text{ (A 663 nm)} + 20.2 \text{ (A 645 nm)} = \mu\text{g/ ml} \\ \text{CLOROFILA a} &= 12.7 \text{ (A 663 nm)} - 2.59 \text{ (A 645 nm)} = \mu\text{g/ ml} \\ \text{CLOROFILA b} &= 22.9 \text{ (A 645 nm)} - 4.68 \text{ (A 663 nm)} = \mu\text{g/ ml}\end{aligned}$$

6.3.2.2.8 DETERMINACION DE AZUCARES DIRECTOS: se preparó el reactivo DNS (ácido dinitrosalicílico), de acuerdo al protocolo de Gail (1959), el cual consiste en disolver 10 g de hidróxido de Sodio, 200 g de tartrato de sodio y potasio, 0.5 g de metabisulfito de sodio y 2.0 g de fenol, en aproximadamente 600 ml de agua destilada, una vez disueltos los anteriores se agregaron 10 g de ácido 3,5 dinitrosalicílico adicionándolo lentamente hasta lograr su completa disolución. Se aforó a 1 L con agua destilada. Para la determinación de azúcares directos se siguió la metodología descrita por Warwick (1982). Se preparó una solución patrón de glucosa, secándola previamente a una temperatura de 60°C durante 3 h y se mantuvo en el desecador. Se pesó 1g de glucosa anhidra, se diluyó en 700 ml de agua destilada y se aforó a 1,000 ml. Se elaboró una curva de calibración con concentraciones de 0.1, 0.2, 0.3 hasta 1.0 g/L de glucosa en agua destilada. Esta curva sirvió como referencia en la determinación de los azúcares en la muestra. La preparación de la muestra se realizó pesando 100 mg de hoja, los cuales se machacaron y disolvieron con 2 ml de agua destilada. Posteriormente se adicionó en tubos de ensayo 0.5 ml de muestra y 1.5 ml del reactivo DNS, se agitaron, se colocaron en baño maría durante 15 min, y se dejaron enfriar. Se adicionaron 8 ml de agua destilada y se agitaron.

Con los resultados de la curva de calibración se realizó un análisis de regresión lineal, obteniéndose la siguiente ecuación:

$$y = -0.015556 + 0.936x \quad R = 0.99732$$

La ecuación predice las concentraciones de azúcares reductores libres en una muestra, a partir de soluciones con una concentración conocida. Con los resultados de absorbancia obtenidos en las muestras y la ecuación, se calculó la concentración de azúcares directos.

6.3.3 VERIFICACION DE LA PRESENCIA DE *Fusarium oxysporum* EN LAS PLANTAS EVALUADAS: la verificación se realizó dos meses después de haberse inoculado las plantas con el hongo, para lo cual se tomaron muestras representativas de cada especie. La metodología utilizada fue la misma que se siguió para la obtención de la cepa a partir de plantas de invernadero.

6.3.4 DISEÑO ESTADISTICO:

Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y a una diferencia de las medias. Todas las pruebas se realizaron con un nivel de significancia del 95%. Los análisis que arrojaron diferencias significativas se sometieron a una prueba de rangos múltiples LSD y un resumen de estadísticos básicos (Douglas, 1991).

VII. RESULTADOS

7.1 PROPAGACION DE LAS PLANTAS DE AGAVE

De la propagación se obtuvieron un total de 36 plantas por especie, de las cuales se utilizaron 18 para la inoculación y 18 como control. Las variables que sirvieron de referencia para el establecimiento del cultivo, se sometieron a un análisis estadístico y no se encontró ningún tipo de correlación con el desarrollo de la planta (ver anexo 1).

7.2 CRECIMIENTO DE LA RAIZ

En la Tabla 4 se muestra la diferencia de medias entre las plantas inoculadas y las no inoculadas (control). En tres de las cuatro especies estudiadas se encontró incremento estadísticamente significativo en el crecimiento de la raíz de las plantas inoculadas respecto a las no inoculadas. La especie que no mostró incremento significativo fue *A. tequilana* (Tabla 4), *Agave parrasana* duplicó el tamaño de raíz al inocularse con el hongo, mientras que *A. victoria-reginae*, lo triplicó. La especie que tuvo mayor respuesta a la inoculación del hongo en lo que respecta a esta variable fue *Agave vilmorinana* la cual incrementó aproximadamente 10 veces la longitud de su raíz (Tabla 4).

Tabla 4. Efecto de la inoculación de *Fusarium oxysporum* sobre el crecimiento de la raíz principal en las cuatro especies de Agave a los dos meses de su inoculación.

Especie	Valores promedio de la raíz principal en plantas no inoculadas (cm)	Valores promedio de la raíz principal en plantas inoculadas (cm)
<i>Agave tequilana</i>	0.10 ^a	0.08 ^a
<i>Agave parrasana</i>	0.15 ^b	0.37 ^c
<i>Agave vilmoriniana</i>	0.02 ^d	0.18 ^e
<i>Agave victoria-reginae</i>	0.08 ^f	0.26 ^g

nota: letras iguales corresponden al mismo grupo estadístico determinado por intervalos de mínimasignificancia al 95%. Los datos del análisis de varianza se encuentran en el anexo 2 Tablas 1-4.



BIBLIOTE

7.3 INCREMENTO DE LAS RAMIFICACIONES DE LA RAIZ

Al igual que en el parámetro de longitud de la raíz, la especie *A. vilmoriniana* fue en la que se indujo mayor respuesta con la inoculación del hongo, ya que duplicó el número de ramificaciones de la raíz (Tabla 5, Figuras 2, 3, 4 y 5).

Tabla 5. Efecto de la inoculación de *Fusarium oxysporum* sobre el número de ramificaciones de la raíz en las cuatro especies de *Agave* a los dos meses de su inoculación.

Especie	Valores promedio de las ramificaciones de la raíz en plantas no inoculadas	Valores promedio de las ramificaciones de la raíz en plantas inoculadas
<i>Agave tequilana</i>	5 ^a	8 ^b
<i>Agave parrasana</i>	4 ^c	7 ^d
<i>Agave vilmoriniana</i>	4 ^e	8 ^f
<i>Agave victoria-reginae</i>	4 ^b	6 ^b

nota: letras iguales corresponden al mismo grupo estadístico determinado por intervalos de mínima significancia al 95%. Los datos del análisis de varianza se encuentran en el anexo 2 Tablas 5-8.

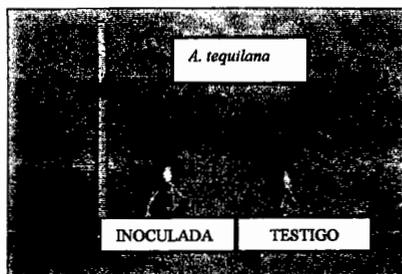


Fig. 2 Efecto de la inoculación de *Fusarium oxysporum* sobre el número de ramificaciones de la raíz en *A. tequilana*.

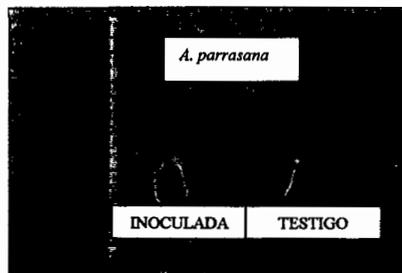


Fig. 3 Efecto de la inoculación de *Fusarium oxysporum* sobre el número de ramificaciones de la raíz en *A. parrasana*.



Fig. 4 Efecto de la inoculación de *Fusarium oxysporum* sobre el número de ramificaciones de la raíz en *A. vilmoriniana*.

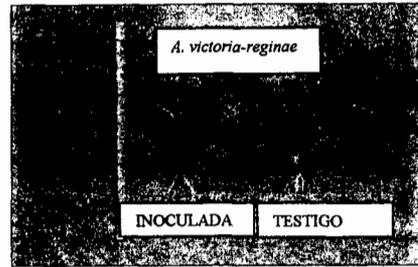


Fig. 5 Efecto de la inoculación de *Fusarium oxysporum* sobre el número de ramificaciones de la raíz en *A. victoria-reginae*.

7.4 CRECIMIENTO VEGETATIVO

Al igual que en los dos parámetros anteriores, tres de las cuatro especies respondieron a la inoculación del hongo en esta variable compuesta por número de hojas, longitud axial y longitud apical. *A. tequilana* no incrementó su crecimiento vegetativo de manera estadísticamente significativa al ser inoculada con *F. oxysporum* (Tabla 6).

A. vilmoriniana mostró diferencia significativa en uno de los parámetros evaluados en esta variable compuesta. Este parámetro fue la longitud apical donde se encontró un incremento mayor al 500% en las plantas inoculadas (Tabla 8).

Agave victoria-reginae mostró diferencia estadísticamente significativa en otro de los tres parámetros evaluados. En las plantas inoculadas la longitud axial se incrementó al doble respecto a las plantas no inoculadas (Tabla 9).

La especie que mostró mayor efecto con la inoculación del hongo en esta variable compuesta fue *A. parrasana* la cual mostró diferencia estadísticamente significativa en los tres parámetros que conforman la variable. El número de hojas y la longitud apical se incrementaron a más del doble y la longitud axial mostró un incremento mayor al 60% (Tabla 7).

Tabla 6. Efecto de la inoculación de *Fusarium oxysporum* en el crecimiento vegetativo (longitud axial, apical y número de hojas) de *Agave tequilana* a los dos meses de su inoculación.

Parámetro	Valores promedio del crecimiento vegetativo en plantas no inoculadas	Valores promedio del crecimiento vegetativo en plantas inoculadas
número de hojas	0.77 ^a	0.72 ^a
longitud axial (cm)	5.77 ^b	6.05 ^b
longitud apical (cm)	1.30 ^c	1.03 ^c

nota: letras iguales corresponden al mismo grupo estadístico determinado por intervalos de mínima significancia al 95%. Los datos del análisis de varianza se encuentran en el anexo 2, Tablas 9,13 y 17.

Tabla 7. Efecto de la inoculación de *Fusarium oxysporum* en la longitud axial, apical y número de hojas de *Agave parrasana* a los dos meses de su inoculación.

Parámetro	Valores promedio del crecimiento vegetativo en plantas no inoculadas	Valores promedio del crecimiento vegetativo en plantas inoculadas
número de hojas	0.76 ^a	1.84 ^b
longitud axial (cm)	2.76 ^c	4.47 ^d
longitud apical (cm)	0.31 ^e	0.72 ^f

nota: letras iguales corresponden al mismo grupo estadístico determinado por intervalos de mínima significancia al 95%. Los datos del análisis de varianza se encuentran en el anexo 2, Tablas 10,14 y 18.

Tabla 8. Efecto de la inoculación de *Fusarium oxysporum* en la longitud axial, apical y número de hojas de *Agave vilmoriniana* a los dos meses de su inoculación.

Parámetro	Valores promedio del crecimiento vegetativo en plantas no inoculadas	Valores promedio del crecimiento vegetativo en plantas inoculadas
número de hojas	0.88 ^a	1.26 ^a
longitud axial (cm)	4.82 ^b	5.68 ^b
longitud apical (cm)	0.29 ^c	1.40 ^d

nota: letras iguales corresponden al mismo grupo estadístico determinado por intervalos de mínima significancia al 95%. Los datos del análisis de varianza se encuentran en el anexo 2, Tablas 11,15 y 19.

Tabla 9. Efecto de la inoculación de *Fusarium oxysporum* en la longitud axial, apical y número de hojas de *Agave victoria-reginae* a los dos meses de su inoculación.

Parámetro	Valores promedio del crecimiento vegetativo en plantas no inoculadas	Valores promedio del crecimiento vegetativo en plantas inoculadas
número de hojas	0.61 ^a	0.77 ^a
longitud axial (cm)	0.83 ^b	1.88 ^c
longitud apical (cm)	0.49 ^d	0.48 ^d

nota: letras iguales corresponden al mismo grupo estadístico determinado por intervalos de mínima significancia al 95%. Los datos del análisis de varianza se encuentran en el anexo 2, Tablas 12, 16 y 20.

7.5 DENSIDAD ESTOMÁTICA

Esta variable compuesta, formada con el conteo del número de estomas de la parte axial y de la parte abaxial, tuvo una fuerte influencia con la inoculación del hongo. Respecto a la parte axial, tres especies mostraron incremento estadísticamente significativo en el número de estomas, estas fueron *A. tequilana*, *parrasana* y *victoria-reginae*. *Agave parrasana* presentó el mayor incremento al duplicar el número de estomas respecto a las plantas no inoculadas (Tabla 10). Respecto a la parte abaxial, todas las plantas inoculadas presentaron un incremento estadísticamente significativo en el número de estomas respecto a sus controles (ver Tabla 11).

7.6 INCREMENTO EN BIOMASA

Las diferencias del incremento en Biomasa en las plantas inoculadas y las no inoculadas se muestran en la Tabla 12 en donde se observa que las plantas inoculadas presentaron un mayor incremento respecto a las no inoculadas con el hongo. De las cuatro especies estudiadas *Agave parrasana* presentó el mayor incremento al duplicar su incremento en biomasa (ver Figura 6).

Tabla 10. Efecto de la inoculación de *Fusarium oxysporum* sobre el incremento del número de estomas de la parte axial a los dos meses de su inoculación.

Especie	Valores promedio del número de estomas en plantas no inoculadas	Valores promedio del número de estomas en plantas inoculadas
<i>Agave tequilana</i>	9 ^a	15 ^b
<i>Agave parrasana</i>	6 ^c	13 ^d
<i>Agave vilmoriniana</i>	8 ^e	9 ^e
<i>Agave victoria-reginae</i>	4 ^f	6 ^g

nota: letras iguales corresponden al mismo grupo estadístico determinado por intervalos de mínima significancia al 95%. Los datos del análisis de varianza se encuentran en el anexo 2, Tablas 21, 23, 25 y 27

Tabla 11. Efecto de la inoculación de *Fusarium oxysporum* sobre el incremento del número de estomas de la parte abaxial a los dos meses de su inoculación.

Especie	Valores promedio del número de estomas en plantas no inoculadas	Valores promedio del número de estomas en plantas inoculadas
<i>Agave tequilana</i>	15 ^a	19 ^b
<i>Agave parrasana</i>	10 ^c	11 ^d
<i>Agave vilmoriniana</i>	14 ^e	19 ^f
<i>Agave victoria-reginae</i>	9 ^g	11 ^h

nota: letras iguales corresponden al mismo grupo estadístico determinado por intervalos de mínima significancia al 95%. Los datos del análisis de varianza se encuentran en el anexo 2, Tablas 22, 24, 26 y 28

Tabla 12. Efecto de la inoculación de *Fusarium oxysporum* sobre el incremento de la biomasa en las cuatro especies de *Agave* estudiadas a los dos meses de su inoculación.

Especie	Valor numérico de la biomasa en plantas no inoculadas (g/m ² s)	Valor numérico de la biomasa en plantas inoculadas (g/m ² s)
<i>Agave tequilana</i>	2.7 x 10 ⁻⁶	4.2 x 10 ⁻⁶
<i>Agave parrasana</i>	1.8 x 10 ⁻⁶	3.7 x 10 ⁻⁶
<i>Agave vilmoriniana</i>	2.4 x 10 ⁻⁶	3.6 x 10 ⁻⁶
<i>Agave victoria-reginae</i>	2.2 x 10 ⁻⁶	3.4 x 10 ⁻⁶

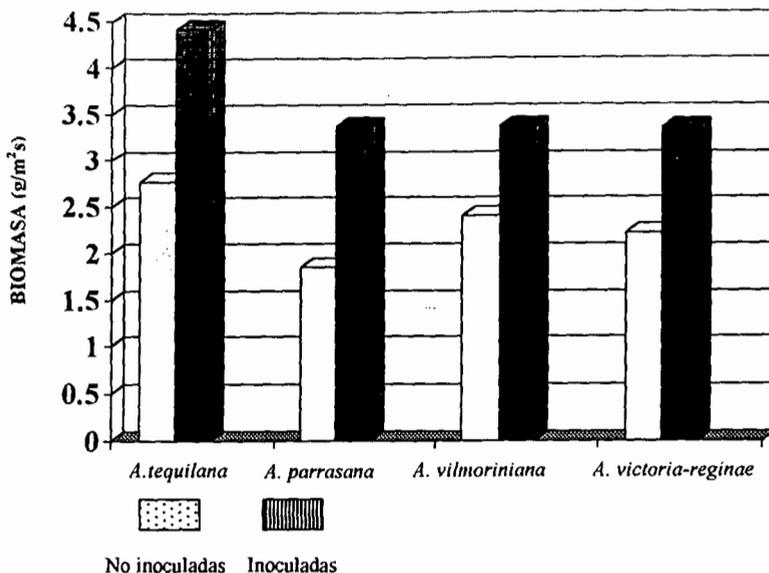


Figura 6. Relación del incremento en biomasa entre plantas inoculadas y no inoculadas en cuatro especies del género *Agave*.

7.7 DETERMINACION DEL pH, PORCENTAJE DE ACIDO MALICO Y ACIDEZ NOCTURNA

La diferencia entre el pH diurno y nocturno, ácido málico y acidificación nocturna entre las plantas inoculadas y no inoculadas, fue muy marcada. *Agave tequilana* fue la especie que presentó las diferencias más marcadas. En el pH la diferencia entre el valor diurno y nocturno fue seis veces mayor en las plantas inoculadas respecto a las no inoculadas (Tabla 13 y Figura 7). El incremento entre el valor diurno y nocturno de ácido málico fue de un orden de magnitud mayor en todas las especies evaluadas al comparar las plantas inoculadas respecto a las no inoculadas (Tabla 14). En el caso de *A. tequilana* se encontró un incremento 16 veces mayor en las plantas inoculadas al compararlas con las no inoculadas (Figura 8). Respecto al incremento en la acidez nocturna 3 de las 4 especies presentaron incrementos de un orden de magnitud en

las plantas inoculadas. Estas especies fueron *A. tequilana*, *A. parrasana* y *A. victoria-reginae* (Tabla 15). Cabe destacar que *A. tequilana* mostró un incremento de la acidez nocturna siete veces mayor en las plantas inoculadas respecto a las no inoculadas (Figura 9).

Tabla 13. Efecto de la inoculación de *Fusarium oxysporum* sobre el incremento del pH en las cuatro especies de agave estudiadas a los dos meses de su inoculación

Especie	Valor numérico del pH en plantas no inoculadas	Valor numérico del pH en plantas inoculadas
<i>Agave tequilana</i>	0.26	1.61
<i>Agave parrasana</i>	0.08	0.85
<i>Agave vilmoriniana</i>	0.51	0.79
<i>Agave victoria-reginae</i>	0.59	0.76

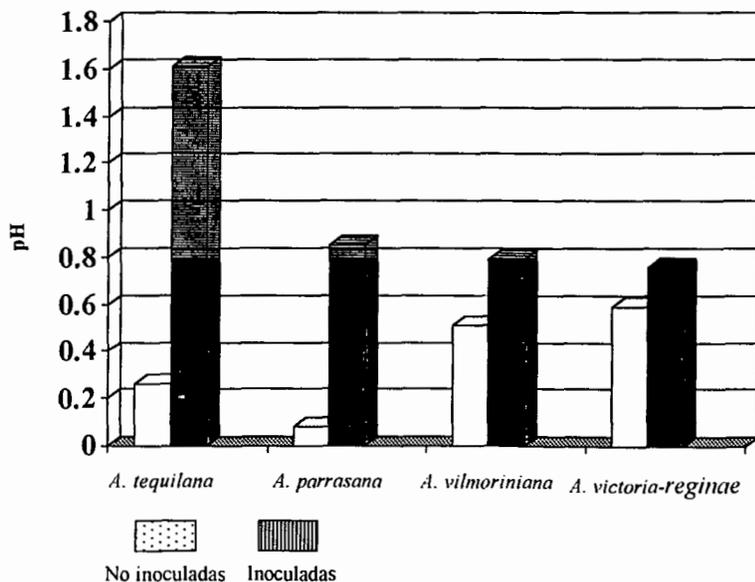


Figura 7. Relación del incremento del pH entre plantas inoculadas y no inoculadas en cuatro especies del género *Agave*.

Tabla 14. Efecto de la inoculación de *Fusarium oxysporum* sobre el incremento del ácido málico en las cuatro especies estudiadas a los dos meses de su inoculación.

Especie	Valor numérico del Acido Málico en plantas no inoculadas (%)	Valor numérico del Acido Málico en plantas inoculadas (%)
<i>Agave tequilana</i>	0.04	0.66
<i>Agave parrasana</i>	0.02	0.19
<i>Agave vilmoriniana</i>	0.04	0.14
<i>Agave victoria-reginae</i>	0.09	0.20

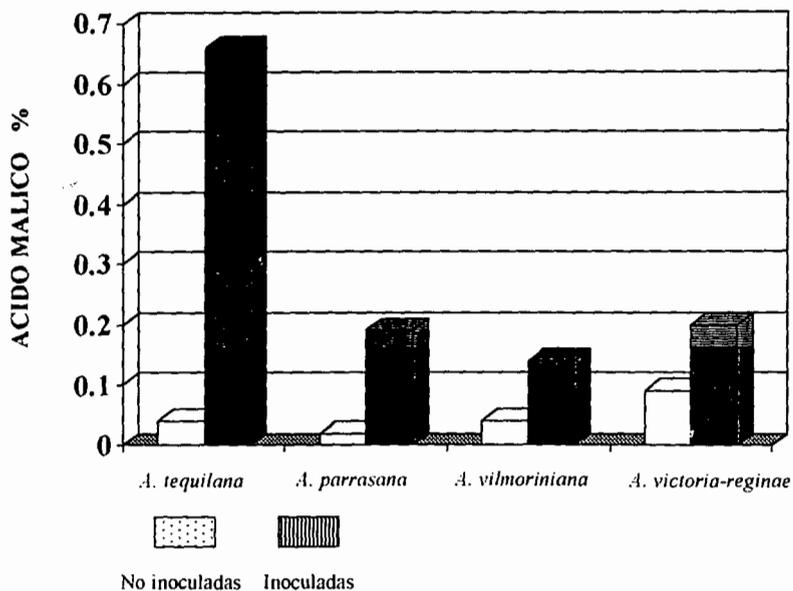


Figura 8. Relación del incremento en el porcentaje de ácido málico entre plantas inoculadas y no inoculadas en cuatro especies del género *Agave*.

Tabla 15. Efecto de la inoculación de *Fusarium oxysporum* sobre el incremento de la acidez nocturna en las cuatro especies de agave estudiadas a los dos meses de su inoculación

Especie	Valor numérico de la Acidez Nocturna en plantas no inoculadas ($\mu\text{moles/cm}^2$)	Valor numérico de la Acidez Nocturna en plantas inoculadas ($\mu\text{moles/cm}^2$)
<i>Agave tequilana</i>	2.71	20.50
<i>Agave parrasana</i>	3.02	15.11
<i>Agave vilmoriniana</i>	2.34	6.53
<i>Agave victoria-reginae</i>	5.62	15.03

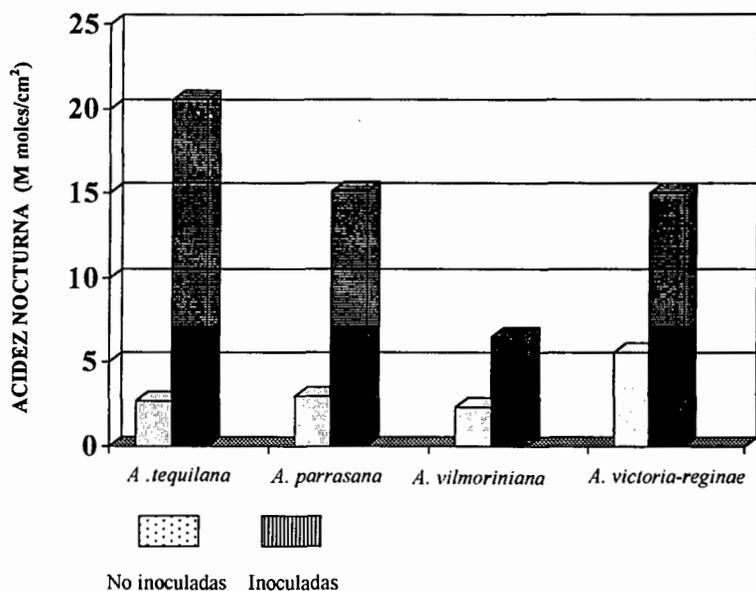


Figura 9. Relación del incremento de la acidez nocturna entre plantas inoculadas y no inoculadas en cuatro especies del género *Agave*.

7.8 DETERMINACION DE CLOROFILA

En las Tablas 16 a la 18 y las Figuras 10, 11, y 12, se muestra de forma comparativa, el contenido de clorofila total, clorofila "a" y clorofila "b" en las plantas de *Agave* inoculadas con

el hongo y las no inoculadas, los resultados muestran que, las plantas de *Agave parrasana*, *A. vilmoriniana* y *A. victoria-reginae* inoculadas presentaron un incremento en el contenido de clorofila total, clorofila "a" y clorofila "b", respecto a las no inoculadas.

Tabla 16. Efecto de la inoculación de *Fusarium oxysporum* sobre el incremento de clorofila total en las cuatro especies de *Agave* estudiadas a los dos meses de su inoculación.

Especie	Valor numérico de Clorofila total en plantas no inoculadas (µg/ml)	Valor numérico de Clorofila total en plantas inoculadas (µg/ml)
<i>Agave tequilana</i>	28.72	25.56
<i>Agave parrasana</i>	21.85	23.88
<i>Agave vilmoriniana</i>	12.61	13.54
<i>Agave victoria-reginae</i>	15.89	18.08

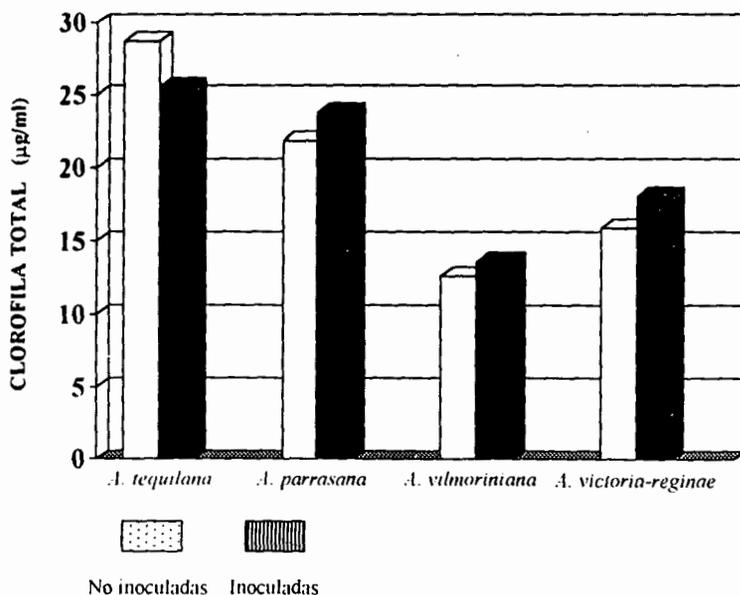


Figura 10 Relación del incremento de clorofila total entre plantas inoculadas y no inoculadas en cuatro especies del género *Agave*.

Tabla 17 Efecto de la inoculación de *Fusarium oxysporum* sobre el incremento de clorofila "a" en las cuatro especies de agave estudiadas a los dos meses de su inoculación.

Especie	Valor numérico de Clorofila "a" en plantas no inoculadas (µg/ml)	Valor numérico de Clorofila "a" en plantas inoculadas (µg/ml)
<i>Agave tequilana</i>	19.62	17.01
<i>Agave parrasana</i>	15.10	16.04
<i>Agave vilmoriniana</i>	8.80	9.20
<i>Agave victoria-reginae</i>	11.37	12.28

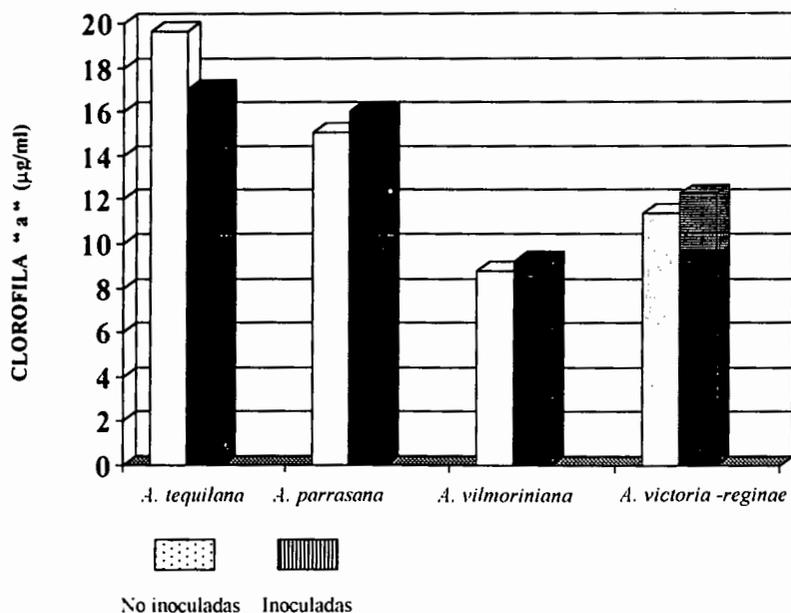


Figura 11. Relación del incremento de clorofila "a" entre plantas inoculadas y no inoculadas en cuatro especies del género *Agave*.

Tabla 18. Efecto de la inoculación de *Fusarium oxysporum* sobre el incremento de clorofila "b" en las cuatro especies de *Agave* estudiadas a los dos meses de su inoculación.

Especie	Valor numérico de Clorofila "b" en plantas no inoculadas (µg/ml)	Valor numérico de Clorofila "b" en plantas inoculadas (µg/ml)
<i>Agave tequilana</i>	9.18	8.63
<i>Agave parrasana</i>	6.81	7.91
<i>Agave vilmoriniana</i>	3.84	4.37
<i>Agave victoria-reginae</i>	4.56	5.85

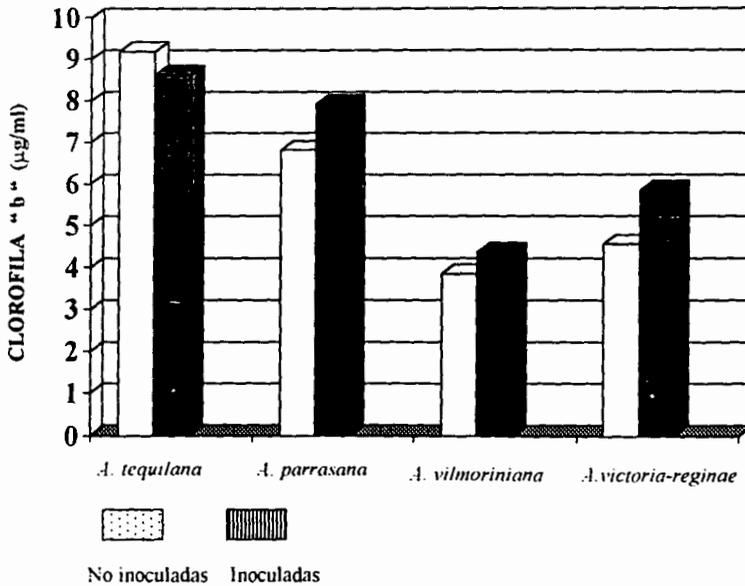


Figura 12. Relación del incremento de clorofila "b" entre plantas inoculadas y no inoculadas en cuatro especies del género *Agave*.

7.9 DETERMINACION DE AZUCARES DIRECTOS

En las cuatro especies de plantas inoculadas se incrementó la cantidad de azúcares respecto a las plantas no inoculadas, siendo los especies *parrasana* y *victoria-reginae* las que presentaron los mayores incrementos (ver Tabla 19, Figura 13).

Tabla 19. Efecto de la inoculación de *Fusarium oxysporum* sobre el incremento de azúcares directos en las cuatro especies de agave estudiadas a los dos meses de su inoculación

Especie	Valor numérico de Azúcares Directos en plantas no inoculadas (mg/gr)	Valor numérico de Azúcares Directos en plantas inoculadas (mg/gr)
<i>Agave tequilana</i>	1.79	2.78
<i>Agave parrasana</i>	2.05	5.14
<i>Agave vilmoriniana</i>	5.16	7.15
<i>Agave victoria-reginae</i>	1.80	4.91

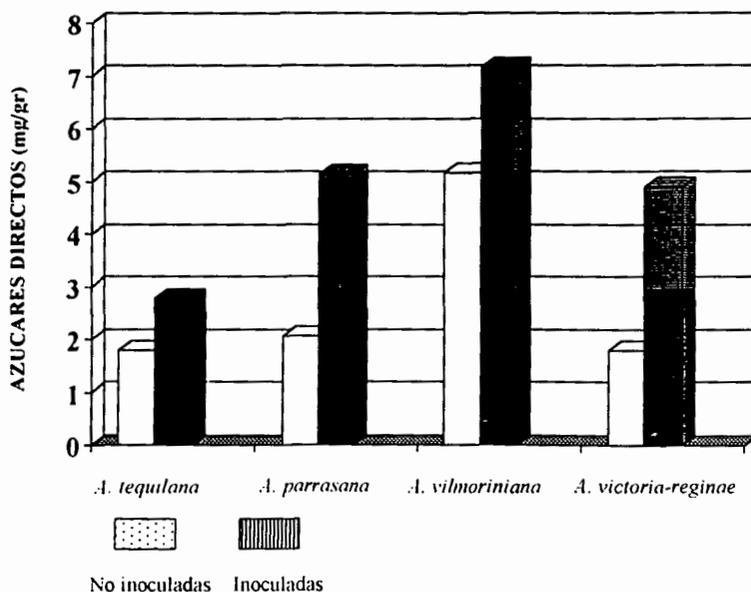


Figura 13. Relación del contenido de azúcares entre plantas inoculadas y no inoculadas en cuatro especies del género *Agave*.

En la Tabla 20 se resumen los parámetros evaluados, así como los el efecto de la inoculación del hongo *Fusarium oxysporum* en las cuatro especies de *Agave*

Tabla 20. Parámetros evaluados en las cuatro especies de *Agave*.

Parámetros evaluados	<i>A. tequilana</i>	<i>A. parrasana</i>	<i>A. vilmoriniana</i>	<i>A. victoria-reginae</i>
Crecimiento de la raíz	-	+	+	+
Ramificaciones de la raíz	+	+	+	+
Crecimiento vegetativo:				
-número de hojas	-	+	-	-
-longitud axial	-	+	-	+
-longitud apical	-	+	+	-
Densidad estomática axial	+	+	+	+
Densidad estomática abaxial	+	+	+	+
Biomasa	+	+	+	+
pH	+	+	+	+
Ácido málico	+	+	+	+
Acidez nocturna	+	+	+	+
Clorofila total	-	+	+	+
Clorofila "a"	-	+	+	+
Clorofila "b"	-	+	+	+
Azúcares directos	+	+	+	+

Nota: signo (+) indica incremento en el parámetro evaluado y el signo (-) indica que no hubo incremento en el parámetro evaluado.

Se verificó la presencia del hongo *Fusarium oxysporum* interactuando con la parte radicular de las plantas inoculadas, manifestándose por el crecimiento micelial que se presentó en las cuatro especies.

VIII. DISCUSION

Aún cuando se igualaron las condiciones de humedad, temperatura y tamaño de la raíz de las cuatro especies de agave estudiadas, se encontraron diferencias en los parámetros evaluados en plantas provenientes de cultivo *in vitro* inoculadas con la cepa de *Fusarium oxysporum*, estas diferencias favorecieron el desarrollo *ex vitro* de las plantas. Esto está en concordancia con el efecto que otros hongos, específicamente los formadores de micorrizas, han mostrado sobre la aclimatación y el establecimiento de plantas micropropagadas (Monticelli y col., 2000; Zahran, 1999). Sin embargo es un conocimiento novedoso el hecho de que este hongo, que no es considerado un hongo micorrizico (Highet y Nair., 1995), influya benéficamente sobre cuatro especies de agave. A pesar de que *Fusarium oxysporum* es principalmente conocido como un hongo fitopatógeno también existen reportes del uso benéfico de cepas no patógenas de esta especie como protectoras contra cepas patógenas (Herrera-Estrella y Carsolio, 1997) por lo tanto no es el primer reporte de los beneficios que puede obtener la agricultura por medio del empleo de *Fusarium oxysporum*.

Respuesta de las diferentes especies de agave a la inoculación del hongo

Se presentaron marcadas diferencias en la respuesta de las diferentes especies de agave a la inoculación del hongo. Esto puede deberse a características intrínsecas de las especies y también a las diferencias en el manejo genético de las mismas. Cabe destacar que de entre las cuatro especies de *Agave* estudiadas solo *Agave tequilana* Weber variedad azul proviene de una selección genética y de cultivo intensivo con empleo de pesticidas y es precisamente esta especie la que tiene menor respuesta a la inoculación del hongo. El fitomejoramiento tiene como objetivo principal aumentar el rendimiento y eventualmente la obtención de materiales resistentes a enfermedades. Poca atención se ha dado a las consecuencias que este tipo de selección ocasiona sobre los organismos simbióticos. Nutman (1984) considera que el mejoramiento como se ha llevado a cabo hasta el presente, reduce significativamente la capacidad simbiótica de las leguminosas para asociarse con *Rhizobium*. Obledo (1994) en trabajos realizados con hongos endomicorrizicos inoculados a variedades de maíz con diferentes grados de mejoramiento

genético, encontró que variedades con alto grado de manejo genético mostraron una menor capacidad de respuesta a la inoculación y variedades con menor grado de manejo genético mostraron mayor capacidad de respuesta (Obledo, 1994).

En las cuatro especies se logró recuperar el hongo a partir de tejidos vegetales. Sin embargo, la eficiencia de la inoculación, determinada por la cantidad de hongo por gramo de tejido vegetal, no se evaluó. Por lo tanto y considerando la diferencia en la respuesta entre las especies de agave cabe la posibilidad de que existan diferencias en la eficiencia de la asociación. Esta incógnita puede considerarse como un punto a investigar sobre este tipo de asociaciones planta-microorganismo

Otro aspecto que merece la pena destacar es el hecho de haber encontrado que aún cuando el hongo fue aislado de *Agave victoria-reginae*, la especie *Agave parrasana* fue la que mejor respondió a la inoculación. Esto indica que la asociación no es altamente específica y que puede inducirse de manera artificial a especies que de manera natural no la presentan.

Los resultados encontrados en esta investigación respecto al número de variables que se vieron favorecidas con la inoculación del hongo en cada una de las especies estudiadas (Tabla 20) muestran claramente que existe una interacción especie de agave-*F. oxysporum* y sobre esa base puede considerarse que la asociación *Agave parrasana-Fusarium oxysporum* es altamente eficiente, las asociaciones *Agave-victoria-reginae-F. oxysporum* y *Agave vilmoriniana-F. oxysporum* son moderadamente eficientes y la asociación *Agave tequilana* Weber Variedad Azul- *F. oxysporum* es poco eficiente.

Las diferencias encontradas como consecuencia de la inoculación del hongo no son atribuibles a las condiciones ambientales de humedad y temperatura. Esto puede aseverarse al analizar en el Anexo 1 que no se encontró correlación entre las diferencias encontradas y las condiciones de humedad y temperatura del sustrato, en ninguna de las especies de agave estudiadas. Es importante señalar esto debido a que existen reportes que atribuyen a condiciones ambientales una gran cantidad de variables en las plantas (Sinnott y Wilson, 1993).

El tamaño de la raíz fue mayor en las plantas de tres de las cuatro especies de agave estudiadas y el número de las ramificaciones fue mayor en las plantas de las cuatro especies

estudiadas (Tabla 5). Debido a que antes de la inoculación se cortó la raíz de las plantas a un tamaño uniforme, podría argumentarse que la estimulación de las raíces fue una respuesta de las plantas al corte de la raíz principal (Fuster y Galindez, 1985), sin embargo, las plantas no inoculadas no mostraron el mismo desarrollo de las ramificaciones de la raíz que las plantas inoculadas, por lo tanto las diferencias son atribuibles a la inoculación del hongo. Esto está en concordancia con lo reportado por Smith y Read en 1997 quienes mencionan que los hongos son los principales microorganismos que estimulan la producción de raíces adventicias y con lo reportado por Estrada y col. en 2000 quienes encontraron incremento en el peso seco de las raíces de plantas propagadas *in vitro* e inoculadas con hongos micorrizicos en la etapa de aclimatación.

Incremento vegetativo.

El incremento en el crecimiento vegetativo observado en *A. parrasana*, *A. vilmoriniana* y *A. victoria-reginae* es atribuible a la inoculación con el hongo. Debido a que se ha señalado que el desarrollo morfológico de una planta está determinado por el genotipo y las condiciones ecológicas en las que se desarrolla (Fuller-Harry y col., 1984) y que el crecimiento vegetativo está relacionado con la edad de la planta (Robles-Murguía, 1994), podría argumentarse que las diferencias encontradas en este trabajo son respuesta a estas variables. Sin embargo, estas variaciones se presentan en las poblaciones silvestres. En el presente trabajo se utilizaron plantas obtenidas por medio de cultivo de tejidos *in vitro* lo cual ayudó a disminuir las variaciones atribuibles a otras fuentes y a su vez permitió observar con mayor claridad el efecto del hongo.

Efectos similares respecto al incremento vegetativo han sido encontrados al inocular hongos micorrizicos durante la aclimatación de plantas micropropagadas (Estrada y col. en 2000).

Densidad estomática

La mayor densidad estomática encontrada en la parte abaxial (epidermis inferior de las hojas) de las cuatro especies de agave estudiadas concuerda con lo reportado por Wilson y Lomis en 1972. quienes mencionan que la mayoría de las especies presentan mayor número de estomas en la parte abaxial.

La frecuencia estomática puede estar determinada por la intensidad luminosa y la disponibilidad de agua (Loera-Quezada en 1990). En este experimento tanto la intensidad luminosa como la disponibilidad de agua fueron factores homogéneos en plantas inoculadas y no inoculadas. Por esta razón no se considera que las diferencias encontradas respondan a estos factores, más bien se considera una respuesta a la inoculación del hongo debido a la diferencia estadística encontrada y apoyado con el reporte de respuestas similares encontradas al inocular hongos micorrízicos a plantas provenientes de cultivo *in vitro* (Estrada y col., 2000).

Incremento en biomasa

El incremento en biomasa que mostraron las plantas inoculadas se ha reportado también con la inoculación de hongos micorrízicos (Bhatia, 1998) Esto la hacen facilitando a las plantas la obtención de nutrientes (Lüttge,1997).

Acidificación nocturna.

Los resultados encontrados respecto a la mayor acidificación nocturna, las diferencias entre el pH diurno y nocturno y el mayor porcentaje de ácido málico en las plantas de las cuatro especies inoculadas respecto a las no inoculadas, es un resultado compuesto que evidencia la mayor eficiencia fotosintética (Sutton y col., 1981).de las plantas inoculadas con *Fusarium oxysporum*.

Contenido de clorofila.

El incremento en el contenido de clorofila total y clorofila a y b de tres de las cuatro especies de agave evaluadas es otro indicio de su incremento en actividad fotosintética al ser inoculadas con el hongo *F. oxysporum*. Trabajos realizados con *Ziziphus mauritiana* Lam., (Mathur, 2000) han mostrado la influencia de la inoculación de seis especies de micorrizas en el contenido de clorofila, entre otras variables fisiológicas. Los trabajos de Gaur y Adholeya (1999) evaluaron el efecto de la inoculación de un hongo micorrízico en la aclimatación de plantas micropropagadas de *Simgonium podophyllum* y *Draecena sp.*, encontrando un efecto favorable en su adaptación con tasas de supervivencia del 100% y un incremento en la acumulación de clorofila.

Por otro lado, la disminución en el contenido de clorofila de las plantas de *Agave tequilana* Weber variedad Azul inoculadas, puede relacionarse con las restantes variables de respuesta en

las cuales no se observó el beneficio de la inoculación e inferir que esta especie no tiene la misma capacidad de asociación con el hongo que las restantes especies e incluso que el hongo induce un ligero efecto patógeno. Esta última inferencia puede hacerse debido a que la clorofila es el primer compuesto cuya cantidad disminuye, cuando la planta es atacada por patógenos (Gange and Ayres, 1999).

Contenido de azúcares.

El incremento de azúcares reductores es el reflejo de una mayor eficiencia fotosintética de la planta (Cushman y Bohner, 1997). Este incremento en la síntesis de azúcares puede ser inducida en ambientes con altas concentraciones de CO₂ y con la inoculación con hongos micorrizicos (Loewe y col. 2000) En el trabajo realizado las plantas se desarrollaron bajo condiciones de invernadero y no fueron expuestas a concentraciones de CO₂ que no fueran del ambiente del invernadero por lo que el incremento en los azúcares en las plantas se atribuye a la inoculación del hongo *Fusarium oxysporum* el cual se comporta como un hongo benéfico para la planta con resultados similares a los que se obtienen al inocular hongos micorrizicos.

IX. CONCLUSIONES

1. La asociación que se establece entre la cepa de *Fusarium oxysporum* y las cuatro especies de *Agave* evaluadas es benéfica en términos generales.
2. La asociación simbiótica que se establece de manera natural entre el *Agave victoria-reginae* y *Fusarium oxysporum*, no es altamente específica, ya que la inoculación artificial de *Fusarium oxysporum* a otras especies de *Agave* evidenciaron efectos benéficos.
3. Las especies de *Agave* estudiadas responden de manera diferente a la inoculación de la cepa de *Fusarium oxysporum*, encontrándose que la especie *Agave parrasana* fue la que manifestó mayor respuesta favorable.
4. La cepa de *Fusarium oxysporum* aislada de *Agave victoria-reginae* incrementa la eficiencia fotosintética en esta especie y en otras especies del género *Agave*, como *A. tequilana*, *A. parrasana* y *A. vilmoriniana*, reflejada en una mayor producción de biomasa y de azúcares producidos por la planta.
5. Los factores ambientales en los que se desarrollaron las plantas fueron homogéneos, por lo tanto, no tuvieron influencia en las diferencias encontradas entre las plantas inoculadas y las no inoculadas.

X. BIBLIOGRAFIA

- Agrios N G (1995) Fitopatología. Editorial Limusa. México. 838 pp.
- Bailey A M, Herrera E y Ruiz H (1997) Biología molecular de hongos de importancia agronómica. Avance y Perspectiva 16: 27-36
- Bhatia N P, Adnoleya A y Sharma A (1998) Biomass production and changes in soil productivity during longterm cultivation of *Proposis juliflora* (Swarte) DC inoculated with VA micorrhiza and Rhizobium spp in a semi-arid wasteland. Biol Fertil Soils. 26 (3) 208-214
- Bécard G y Piché Y (1988) Establishment of vesicular-arbuscular mycorrhiza in root organ culture. Review and proposed methodology. En: Norris JR., Read DJ, Varma AK (eds). Methods in Microbiology Vol. 24 Academic Press Boca Raton, Florida.
- Braun I A, Huttermann A y Majcherczyk A (1999) Screening of ectomycorrhizal fungi for degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Appl. Microbiol .Biotechnol. 53 (1): 127-132
- Bidwell R R S (1990) Fisiología vegetal. Editor ATG. México (784 p)
- Binh L T, Muoi L T, Oanh H T K y Phong T D (1990) Rapid propagation of *Agave* by *in vitro* tissue culture. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 23: 67-70
- Casas R G (1989) Micología general. Editorial Venezuela. Caracas Venezuela (486 p)
- Casells A C, Minas G y Long R (1980) Culture of *Pelargonium* hybrids from meristems and explants: chimeral and beneficially-infected varieties En Ingram D.S. y Helgeson J.P. (eds). Tissue Culture Methods for plant Pathologist (pp 125-130) Blackwell Scientific Publications
- Conzatti C A (1981) Flora Taxonómica Mexicana II. Editorial Cenet. México D.F. (377 p)
- Castillo T J (1987) Micología General. Editorial Limusa. México D. F. (518 p)

- Castro-Concha L, Loyola-Vargas V M, Chan J L y Robert M L (1990) Glutamate dehydrogenase activity in normal and vitrified plants of *Agave tequilana* Weber propagated *in vitro*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 22: 147-151
- Castro-Sotelo M X (1997) Valoración del nivel de contaminación del maíz por *Fusarium moniliforme* Sheldon en Huejotitán, Municipio de Jocotepec Jalisco, Tesis de Licenciatura. Universidad de Guadalajara
- Cedano-Maldonado M (1989) Caracterización del hongo comestible *Pleurotus ostreatoroseus* Sing. en cultivos sólidos de laboratorio y determinación del patrón de sexualidad. Tesis de Licenciatura. Universidad de Guadalajara
- Cushman J C y Bohnert H J (1997) Molecular genetics of crassulacean acid metabolism. *Plant Physiol.* 113: 667-676
- Das T (1992) Micropropagation of *Agave sisalana*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 31: 253-255
- Díaz-Barriga A (1992) Hongos comestibles y venenosos en la cuenca del Lago de Patzcuaro Michoacán Editorial Universitaria Morelia Michoacán CIDEN Centro de investigaciones para el desarrollo del Estado de Michoacán Instituto de Ecología A.C: México (148 p)
- Dood J C (2000) The role of arbuscular mycorrhizal fungi in agro-and natural ecosystems. *Agriculture* 29 (1): 55-62
- Douglas C M (1991) Diseño y Análisis de Experimentos. Editorial Iberoamericana. México (246 p)
- Epple P, Apel K y Bohlmann H (1997) Over expression of an endogenous thionin enhances resistance of *Arabidopsis* against *Fusarium oxysporum*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 9: 509-520

- Estrada-Luna A A, Davies F T y Egilla J N (2000) Mycorrhizal fungi enhancement of growth and gas exchange of micropropagated guava plantlets (*Psidium guajava* L.) during *ex vitro* acclimatization and plant establishment. MYCORRHIZA. 10 (1): 1-18
- Fuster E y Galíndez G (1985) Botánica. Editorial Kapelusz. Argentina (250 p)
- Frachia S, García R I., Godeas A y Ocampo J A (2000) Effect of the saprophytic fungus *Fusarium oxysporum* on arbuscular mycorrhizal colonization and growth of plants in green house and field trials. Plant and soil 223 (1-2): 175-184
- Gail L M (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31: 426-428
- Gange A y Ayres R (1999) On the relation between arbuscular micorrhizal colonization and plant benefit. Oikos. 87 (3): 615-621
- Garrbaye J (1991) Biológica interactions in the mycorrhizosphere. Experientia 4: 370-375
- García-Mendoza A y Galván RV (1994) Riquezas de las familias Agavaceae y Nolinaceae en México. Primer Simposio Internacional sobre Agaváceas. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F
- García-Sagún M L (1991) Evaluación del proceso de senescencia en pencas jóvenes de nopal (*Opuntia ficus Indica*, Mill.). Tesis de Licenciatura. Universidad de Guadalajara
- Gastón-Guzman (1978) Hongos. Editorial Limusa. México (194 p)
- Gaur A y Adholeya A (1999) Mycorrhizal effects on the acclimatization survival, growth and chlorophyll of micropropagated Syngonium and Draceana inoculated at weaning and hardening stages. MYCORRHIZA. 9 (4): 215-219
- Gentry H S (1982) Agaves of Continental North América. University of Arizona Press, Tucson, Arizona (670 p)

- George E F (1993) Plant Propagation by Tissue Culture. Part I. The Technology. Exegetics Limited. Inglaterra (574 p)
- Gibson C A y Nobel P S (1986) The Cactus Primer. Cambridge: Harvard University Press (286 p)
- Granados-Sánchez D (1993) Los Agaves en México. Universidad Autónoma de Chapingo, Editor Cesar Rodriguez Zárate Impresos Jer México D.F. (278 p)
- Groenewald E G, Wessels D C J y Koeleman A (1977) Callus formation and subsequent plant regeneration from seed tissue of an Agave species (Agavaceae). Z. Pflanzenphysiol 81 : 369-373
- Hagsieb-Caballero M A (1991) Mejoramiento de la digestibilidad *in situ* de bagazo de caña mediante tratamiento por fermentación semisólida con *Phaerochaete chrysosporum*. Tesis de Licenciatura. Universidad de Guadalajara
- Harry J, Zane F, Carothers B, Willard W, Payne M y Balbach K (1989) Botánica. Editorial Interamericana. México (499 p)
- Hartmann T y Kester D (1985) Propagación de plantas, Principios y Prácticas. Editorial CECSA, México
- Hernández-Orozco E (1995) Identificación y cuantificación de cepas de *Fusarium spp* productoras de zearalenona en maíz almacenado destinado para la alimentación de cerdos. Tesis de Licenciatura. Universidad de Guadalajara
- Herrera-Estrella A y Carsolio-Carolina (1997) Medio ambiente, control biológico y hongos parásitos. Avance y Perspectiva 17: 195-204
- Hight A S y Nair N G (1995) *Fusarium oryzae* associated with grapevine decline in the Hunter Valley, NSW, Australia. Australian Journals of grape and wine 1 (1): 48-53

CU



BIBLIOT

- Jordan D C (1984) Family III. Rhizobiaceae Conn 1938. En Krieg R and Holt JG (eds.) Bergey,s Mauel of Systematic Bacteriology. Vol. 1 (pp 234-254) Williams and Wilkin, U.S.A.
- Jofre G A (1987) Cultivo *in vitro* y transformación genética de amaranto *Amaranthus sp.* mediante *Agrobacterium tumefaciens*. III Reunión Nacional de Bioquímica y cultivo de tejidos vegetales (resúmenes) pp 69-72 CINVESTAV IPN, Unidad Irapuato, Gto.
- Klironomos J N y Kendrick W B (1993) Research on mycorrhizas: trends in the past 40 years as expressed in the MYCOLIT' database. *New Phytol.* 125: 595-600
- Kondorosi E y Kondorosi A (1986) Nodule induction on plant roots by Rhizobium. *Trends in Biochem. Sci.* 11: 296-298
- Loewe A, Einig W, Shi L, Dizengremel P y Hampp R (2000) Mycorrhiza formation and elevated CO₂ both increase the capacity for sucrose synthesis in source leaves of spruce and aspen. *New Phytologist.* 145 (3): 565-574
- López-Amezcu L O (1991) Estudio anatómico-fisiológico comparativo en morfoespecies de nopal (*Opuntia spp.*) tunero. Tesis de Licenciatura. Universidad de Guadalajara
- Loera-Quezada M M (1990) Estudio morfológico-anatómico de la epidermis en morfoespecies cultivadas y silvestres de nopal (*Opuntia spp.* tunero). Tesis de Licenciatura. Universidad de Guadalajara
- Luna- Hernández G (1996) Pudrición del tallo de *Agave tequilana* Weber en el Estado de Jalisco. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Chapingo
- Lüttge U (1997) *Physiological Ecology of Tropical Plants.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Germany (384 p)
- Madrigal-Lugo R, Pineda F E y Rodriguez de la O J L (1989) *Agave* En Ammirato P V, Evans DA, Sharp W R y. Bajaj Y P S (eds.) *Handbook of Plant Cell Culture*, Vol. 5. Ornamental species. Chapter 9. (pp 206-227) Mc. Graw Hill Publ. Co., New York

- Martínez-Gil F (1995) Elementos de Fisiología Vegetal, Edi. Mundi-Prensa Madrid España. (1147 p)
- Mathur N y Vyas A (2000) Influence of arbuscular mycorrhizae on biomass production, nutrient uptake and physiological changes in *Ziziphus mauritiana* Lam. under water stress. Journal of arid environments. 45 (3): 191-195
- Miller V E y De la torre F (1998) Fisiología vegetal. Editorial UTHEA. México (344p)
- Monticelli S, Puppi G y Damiano C (2000) Effects of *in vivo* mycorrhization on propagated fruit tree rootstocks. Applied soil Ecology. 15 (2): 105-111
- Montoya-Heredia A (1991) Identificación de los grupos I Y II de *Fusarium graminearum* Schweb agente causal del tizon de la espiga de trigo *Triticum aestivum*. Tesis de Licenciatura. Universidad de Guadalajara
- Murashige T y Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tabaco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-479
- Murashige T (1974) Plant Propagation Through Tissue Culture. Physiol. Plant. 25: 135-166
- Narvaez-Nieto R I (1989) Desarrollo de un medio de cultivo para la producción de la enzima glucosa oxidasa a partir de *Aspergillus niger*. Tesis de Licenciatura. Universidad de Guadalajara
- Nobel P S y Hartsock T L (1983) Relationships between photosynthetically active radiation, nocturnal acid acumulation, and CO₂ uptake for a crassulacean acid metabolism plant, *Opuntia ficus indica*. Plant Physiol. 71 : 71-75
- Novitski E (1982) Human Genetics. Editorial Macmillan Publishing. New York (487 p)
- Obledo-Vázquez N (1995) Adaptación de plantas propagadas *in vitro* a condiciones *ex vitro* en Memorias del Curso-Taller Propagación *in vitro* de especies vegetales. Técnicas modernas para una actividad tradicional México (p 123)

- Orozco-Garcia J P (1991) Manejo de hongos ectomicorrizicos a nivel de vivero en diferentes especies de pino. Tesis de Licenciatura. Universidad de Guadalajara
- Phillips G C y Collins G B (1979) *in vitro* Tissue Culture of Legumes and Plant Regeneration from Callus Cultures of Red Clover. *Crop Sci.* 19 : 59-64
- Pierik R M L (1987) *In vitro* culture of Higher Plants. Martinus Nijhoff Publ, The Netherrlands
- Pimienta-Barrios, E. 1990. El nopal tunero. Editorial de la Universidad de Guadalajara. México (237 p)
- Portillo-Martinez L (1997) Embriogenesis somática en *Agave tequilana* Weber: efecto de auxinas. Tesis de Maestría. Universidad de Guadalajara.
- Powers D E y Backhaus R A (1989) *In vitro* propagation of *Agave arizonica* Gentry et Weber. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 16 : 57-60
- Puig-Arevalo L E (1983) Estudio de la dermatomicosis humana causada por hongos *Microsporium* y *Trichophyton* y su relación zoonosis con animales domésticos. Tesis de Licenciatura. Universidad de Guadalajara
- Robles-Murguía C (1994) Estudio anatomico-fisiológico comparativo entre el nopal *Opuntia ficus indica* (L) Miller) y el pitayo *Stenocereus queretaroensis* (Webb.) Buxbaum). Tesis de Licenciatura. Universidad de Guadalajara
- Robert M L, Herrera J L, Contreras F y Scorer K N (1987) *In vitro* Propagation of *Agave fourcroydes* Lem. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 8: 37-48
- Rodriguez-Garay B, Gutierrez-Mora A y Acosta-Dueñas B (1996 a) Somatic embriogenesis of *Agave victoria-reginae* Moore. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 46: 85-87

- Rodríguez-Garay B, Gutierrez-Mora A y Santacruz-Ruvalcaba F (1996 b) Métodos de propagación biotecnológicos y convencionales en Agaváceas para zonas áridas. En Manual de Curso Taller Técnicas convencionales y biotecnológicas para la propagación de plantas de zonas áridas
- Rojas-Garcidueñas M y Rovalo M (1984) Fisiología Vegetal Aplicada. Editorial Mc GrawHill. México (pp 123-127)
- Ruiz-Oronoz M, Nieto-Roaro D y Larios-Rodríguez I (1983) Botánica. Editorial E.C.L.A.L.S.A. México (pp 87-132)
- Salisbury F y Ross B (1992) Fisiología Vegetal. Grupo Editorial Iberoamérica. México, D.F. (pp 204-214)
- Sanchez-Armenta F (1991) Comparación de metodologías de micropropagación de *Agave tequilana* Weber. Tesis de Licenciatura. Universidad de Guadalajara
- Sánchez-Sánchez O (1980) La flora del valle de México. Editorial Limusa. México (221 p)
- Santacruz-Ruvalcaba F (1997) Embriogénesis somática en *Agave tequilana* Weber: efecto de citocininas. Tesis de Maestría. Universidad de Guadalajara
- Santacruz-Ruvalcaba F, Gutierrez-Pulido H y Rodríguez-Garay B (1999) Efficient *in vitro* propagation of *Agave parrasana* Berger. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 56: 163-167
- Schimdt O y Curry J P (1999) Effects of earthworms on biomass production, nitrogen allocation and nitrogen transfer in wheat-clover intercropping model systems. Plant Soil. 214 (1-2): 187-198
- Sierra- Olguin L (1989) Efecto del Maneb 80, Tecto 60, Cuprimicin 500 y Tilt, en el control de *Fusarium moniliforme* Sheldon en *Sorghum bicolor*, L. Moench, en Acatitlan Jalisco. Tesis de Licenciatura. Universidad de Guadalajara
- Sinnott E W y Wilson K S (1993) Botánica. Editorial Continental. México (pp 82-84)
- Smith S E y Read D J (1997) Mycorrhizal symbiosis. Academic Press. San Diego, California. (589p)

- Soltero R, Nieto J F y Ramírez- Serrano C (1999) Embriogénesis somática en *Agave tequilana* Weber hacia el mejoramiento genético. VIII Congreso Nacional en biotecnología y bioingeniería (pp 548)
- Sutton B G, Ting I P y Sutton R (1981) Carbohydrate metabolism of cactus in a desert environment. *Plant physiol.* 68 : 784-787
- Tallman G (1992) The chemiosmotic model of stomatal opening revisited. *Critical Reviews in Plant Sciences* 11 (1): 35-57
- Torres R E (1988) Manual de conservación de suelos agrícolas. Editorial Diana. México.
- Valenzuela-Zapata A G (1997) El Agave tequilero, su cultivo e industria. Editorial Litteris.. México (204 p)
- Vázquez-González I (1983) Proyectos sobre la industrialización del agave. Tesis de Licenciatura. Universidad de Guadalajara
- Verastegui M A, Sánchez C A, Heredia N L y García-Alvarado J S (1996) Antimicrobial activity of extracts of three major plants from the Chihuahua desert. *Journal of ethnopharmacology* 52: Vol. (3) 175-177
- Warwick L M, Gray P P, Nippard G J y Quinlan M R (1982) Evolution of the DNS method for analysing lignocellulosic hidrolisares. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 32: 1016-1022
- Wilson C L y Loomis W E (1980) Botánica. Editorial Uthea. México (pp 91-92)
- Zahrán H H (1999) Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in arid climate. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63 (4): 960-968

ANEXO 1

Las siguientes tablas corresponden a los análisis de correlación que se establecieron entre las condiciones para el establecimiento del cultivo y el desarrollo de la planta.

Coeficiente de correlación del crecimiento axial con la temperatura en plantas de *Agave tequilana* Weber, no Inoculadas

Análisis de Regresión - Modelo Lineal: $Y = a + b \cdot X$

Variable dependiente: crecimiento axial

Variable independiente: temperatura

Estandar	T				
Parámetro	Estimación	Error	Estadístico	Nivel de significancia	
Intercepto	22.1148	34.7298	0.636767	0.5445	
Pendiente	-0.537037	1.66947	-0.321681	0.7571	

Análisis de varianza

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F calculada	Nivel de significancia
Modelo	0.311481	1	0.311481	0.10	0.7571
Residual	21.0707	7	3.01011		
Total (Corr.)	21.3822	8			

Coeficiente de correlación = -0.120695

R- cuadrada = 1.45673 percent

Error Estandar of Est. = 1.73497

Coefficiente de correlación del crecimiento axial con la temperatura en plantas de *Agave parrasana* Berger, no Inoculadas

Análisis de Regresión - Modelo Lineal: $Y = a + b \cdot X$

Variable dependiente: crecimiento axial

Variable independiente: temperatura

Estandar	T				
Parámetro	Estimación	Error	Estadístico		Nivel de significancia
Intercepto	11.049	21.9876	0.500506		0.6321
Pendiente	-0.183636	1.07329	-0.171096		0.8690

Análisis de varianza

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F calculada	Nivel de significancia
Modelo	0.10304	1	0.10304	0.03	0.8690
Residual	24.6392	7	3.51988		
Total (Corr.)	24.7422	8			

Coefficiente de correlación = -0.0645334

R- cuadrada = 0.416456 percent

Error Estandar of Est. = 1.87614

Coefficiente de correlación del crecimiento axial con la temperatura en plantas de *Agave vilmoriniana* Berger, no Inoculadas

Análisis de Regresión - Modelo Lineal: $Y = a + b \cdot X$

Variable dependiente: crecimiento axial

Variable independiente: temperatura

Estandar	T				
Parámetro	Estimación	Error	Estadístico		Nivel de significancia
Intercepto	-5.57392	7.64601	-0.728998		0.4897
Pendiente	-0.582418	0.39200	1.48573		0.1809

Análisis de varianza

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F calculada	Nivel de significancia
Modelo	1.22191	1	1.22191	2.21	0.1809
Residual	3.87489	7	0.553555		
Total (Corr.)	5.0968	8			

Coficiente de correlación = 0.489634

R- cuadrada = 23.9741 percent

Error Estandar of Est. = 0.744013

Coficiente de correlación del crecimiento axial con la temperatura en plantas de *Agave victoria-reginae* Moore, no Inoculadas

Análisis de Regresión - Modelo Lineal: $Y = a + b \cdot X$

Variable dependiente: crecimiento axial

Variable independiente: temperatura

Estandar	T				
Parámetro	Estimación	Error	Estadístico		Nivel de significancia
Intercepto	-13.4485	9.08577	-1.48017		0.1824
Pendiente	0.933116	0.47698	1.95629		0.0913

Análisis de varianza

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F calculada	Nivel de significancia
Modelo	1.18609	1	1.18609	3.83	0.0913
Residual	2.16946	7	0.309923		
Total (Corr.)	3.3555	8			

Coficiente de correlación = 0.594535

R- cuadrada = 35.3472 percent

Error Estandar of Est. = 0.556707

Coefficiente de correlación del crecimiento axial con la temperatura en plantas de *Agave tequilana* Weber.
Inoculadas

Análisis de Regresión - Modelo Lineal: $Y = a + b \cdot X$

Variable dependiente: crecimiento axial

Variable independiente: temperatura

Estandar	T				
Parámetro	Estimación	Error	Estadístico		Nivel de significancia
Intercepto	-27.1337	34.7459	-0.780919		0.4604
Pendiente	1.71272	1.57023	1.09074		0.3115

Análisis de varianza

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F calculada	Nivel de significancia
Modelo	6.55783	1	6.55783	1.19	0.3115
Residual	38.5844	7	5.51206		
Total (Corr.)	45.1422	8			

Coefficiente de correlación = 0.381144

R- cuadrada = 14.527 percent

Error Estandar of Est. = 2.34778

Coefficiente de correlación del crecimiento axial con la temperatura en plantas de *Agave parrasana* Berger.
Inoculadas

Análisis de Regresión - Modelo Lineal: $Y = a + b \cdot X$

Variable dependiente: crecimiento axial

Variable independiente: temperatura

Estandar	T				
Parámetro	Estimación	Error	Estadístico		Nivel de significancia
Intercepto	12.1729	11.7775	1.03357		0.3357
Pendiente	-0.230499	0.55942	-0.412026		0.6926

Análisis de varianza

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F calculada	Nivel de significancia
Modelo	0.168008	1	0.168008	0.17	0.6926
Residual	6.92755	7	0.98965		
Total (Corr.)	7.09556	8			

Coefficiente de correlación = -0.153876

R- cuadrada = 2.36779 percent

Error Estandar of Est. = 0.994811

Coefficiente de correlación del crecimiento axial con la temperatura en plantas de *Agave vilmoriniana* Berger, Inoculadas

Análisis de Regresión - Modelo Lineal: $Y = a + b \cdot X$

Variable dependiente: crecimiento axial

Variable independiente: temperatura

Parámetro	Estimación	Error	Estadístico	Nivel de significancia
Intercepto	0.255981	4.74253	0.0539755	0.9585
Pendiente	0.376571	0.246707	1.52639	0.1707

Análisis de varianza

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F calculada	Nivel de significancia
Modelo	2.23139	1	2.23139	2.33	0.1707
Residual	6.70416	7	0.957738		
Total (Corr.)	8.93556	8			

Coefficiente de correlación = 0.499721

R- cuadrada = 24.9721 percent

Error Estandar of Est. = 0.978641

Coefficiente de correlación del crecimiento axial con la temperatura en plantas de *Agave victoria-reginae* Moore. Inoculadas

Análisis de Regresión - Modelo Lineal: $Y = a + b \cdot X$

Variable dependiente: crecimiento axial

Variable independiente: temperatura

Estandar	T			
Parámetro	Estimación	Error	Estadístico	Nivel de significancia
Intercepto	2.48175	14.5594	0.170457	0.8695
Pendiente	0.113095	0.7135	0.1585	0.8785

Análisis de varianza

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F calculada	Nivel de significancia
Modelo	0.0214881	1	0.0214881	0.03	0.8785
Residual	5.9874	7	0.855343		
Total (Corr.)	6.00889	8			

Coefficiente de correlación = 0.0598001

R- cuadrada = 0.357605 percent

Error Estandar of Est. = 0.924848

Coefficiente de correlación del crecimiento axial con el porcentaje de humedad en plantas de *Agave tequilana* Weber, No Inoculadas

Análisis de Regresión - Modelo Lineal: $Y = a + b \cdot X$

Variable dependiente: crecimiento axial

Variable independiente: porcentaje de humedad

Estandar	T			
Parámetro	Estimación	Error	Estadístico	Nivel de significancia
Intercepto	15.8456	8.05563	1.96702	0.0899
Pendiente	-0.021132	0.034647	-0.609931	0.5612

Análisis de varianza

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F calculada	Nivel de significancia
Modelo	1.07902	1	1.07902	0.37	0.5612
Residual	20.3032	7	2.90046		
Total (Corr.)	21.3822	8			

Coefficiente de correlación = -0.22464

R- cuadrada = 5.04633 percent

Error Estandar of Est. = 1.70307

Coefficiente de correlación del crecimiento axial con el porcentaje de humedad en plantas de *Agave parrasana* Berger, No Inoculadas

Análisis de Regresión - Modelo Lineal: $Y = a + b \cdot X$

Variable dependiente: crecimiento axial

Variable independiente: porcentaje de humedad

Parámetro	Estimación	Error	Estadístico	Nivel de significancia
Intercepto	13.6579	4.62675	2.95193	0.0213*
Pendiente	-0.027097	0.019408	-1.39621	0.2053

Análisis de varianza

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F calculada	Nivel de significancia
Modelo	5.38948	1	5.38948	1.95	0.2053
Residual	19.3527	7	2.76468		
Total (Corr.)	24.7422	8			

Coefficiente de correlación = -0.466717

R- cuadrada = 21.7825 percent

Error Estandar of Est. = 1.66273

Coefficiente de correlación del crecimiento axial con el porcentaje de humedad en plantas de *Agave vilmoriniana* Berger, No Inoculadas

Análisis de Regresión - Modelo Lineal: $Y = a + b \cdot X$

Variable dependiente: crecimiento axial

Variable independiente: porcentaje de humedad

Estandar	T			
Parámetro	Estimación	Error	Estadístico	Nivel de significancia
Intercepto	9.28081	3.45226	2.68833	0.0312
Pendiente	-0.0147812	0.014480	-1.02073	0.3414

Análisis de varianza

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F calculada	Nivel de significancia
Modelo	0.614109	1	0.614109	1.04	0.3414
Residual	4.12589	7	0.589413		
Total (Corr.)	4.74	8			

Coefficiente de correlación = -0.359943

R- cuadrada = 12.9559 percent

Error Estandar of Est. = 0.767732

Coefficiente de correlación del crecimiento axial con el porcentaje de humedad en plantas de *Agave victoria-reginae* Moore, No Inoculadas

Análisis de Regresión - Modelo Lineal: $Y = a + b \cdot X$

Variable dependiente: crecimiento axial

Variable independiente: porcentaje de humedad

Estandar	T			
Parámetro	Estimación	Error	Estadístico	Nivel de significancia
Intercepto	3.93938	2.95727	1.3321	0.2246
Pendiente	0.001591	0.012253	0.129852	0.9003

Análisis de varianza

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F calculada	Nivel de significancia
Modelo	0.00806336	1	0.0080633	0.02	0.9003
Residual	3.34749	7	0.478213		
Total (Corr.)	3.35556	8			

Coficiente de correlación = 0.0490203

R- cuadrada = 0.240299 percent

Error Estandar of Est. = 0.69153

Coficiente de correlación del crecimiento axial con el porcentaje de humedad en plantas de *Agave tequilana* Weber, Inoculadas

Análisis de Regresión - Modelo Lineal: $Y = a + b \cdot X$

Variable dependiente: crecimiento axial

Variable independiente: porcentaje de humedad

Estandar	T			
Parámetro	Estimación	Error	Estadístico	Nivel de significancia
Intercepto	-2.10019	6.96271	-0.301634	0.7717
Pendiente	0.0509969	0.02748	1.85559	0.1059

Análisis de varianza

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F calculada	Nivel de significancia
Modelo	14.8837	1	14.8837	3.44	0.1059
Residual	30.2585	7	4.32264		
Total (Corr.)	45.1422	8			

Coficiente de correlación = 0.574201

R- cuadrada = 32.9707 percent

Error Estandar of Est. = 2.0791

Coefficiente de correlación del crecimiento axial con el porcentaje de humedad en plantas de *Agave parrasana* Berger, Inoculadas

Análisis de Regresión - Modelo Lineal: $Y = a + b \cdot X$

Variable dependiente: crecimiento axial

Variable independiente: porcentaje de humedad

Estandar	T			
Parámetro	Estimación	Error	Estadístico	Nivel de significancia
Intercepto	10.3597	2.85133	3.63328	0.0084
Pendiente	-0.012314	0.011491	-1.07168	0.3194

Análisis de varianza

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F calculada	Nivel de significancia
Modelo	1.00009	1	1.00009	1.15	0.3194
Residual	6.09547	7	0.870781		
Total (Corr.)	7.09556	8			

Coefficiente de correlación = -0.375427

R- cuadrada = 14.0945 percent

Error Estandar of Est. = 0.933157

Coefficiente de correlación del crecimiento axial con el porcentaje de humedad en plantas de *Agave vilmoriniana* Berger, Inoculadas

Análisis de Regresión - Modelo Lineal: $Y = a + b \cdot X$

Variable dependiente: crecimiento axial

Variable independiente: porcentaje de humedad

Estandar	T			
Parámetro	Estimación	Error	Estadístico	Nivel de significancia
Intercepto	3.61412	3.33855	1.08254	0.3149
Pendiente	0.0164465	0.01413	1.1635	0.2827

Análisis de varianza

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F calculada	Nivel de significancia
Modelo	1.44803	1	1.44803	1.35	0.2827
Residual	7.48753	7	1.06965		
Total (Corr.)	8.93556	8			

Coefficiente de correlación = 0.402557

R- cuadrada = 16.2052 percent

Error Estandar of Est. = 1.03424

Coefficiente de correlación del crecimiento axial con el porcentaje de humedad en plantas de *Agave victoria-reginae* Moore. Inoculadas

Análisis de Regresión - Modelo Lineal: $Y = a + b \cdot X$

Variable dependiente: crecimiento axial

Variable independiente: porcentaje de humedad

Parámetro	Estimación	Error	Estadístico	Nivel de significancia
Intercepto	-0.139222	3.29027	-0.0423131	0.9674
Pendiente	0.0223508	0.014872	1.50279	0.1766

Análisis de varianza

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F calculada	Nivel de significancia
Modelo	1.46574	1	1.46574	0.649021	0.1766
Residual	4.54315	7	0.649021		
Total (Corr.)	6.00889	8			

Coefficiente de correlación = 0.493892

R- cuadrada = 24.3929 percent

Error Estandar of Est. = 0.805618

ANEXO 2

Las siguientes tablas corresponden a los análisis de varianza de las variables determinadas en el experimento.

Tabla 1. Análisis de varianza en el crecimiento de la raíz en *Agave tequilana*.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Nivel de significancia
EFECTOS PRINCIPALES			
Entre grupos	0.0025	1	0.6781
Dentro de los grupos	0.485	34	
Totál	0.4875	35	

Tabla 2. Análisis de varianza en el crecimiento de la raíz en *Agave parrasana*.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Nivel de significancia
EFECTOS PRINCIPALES			
Entre grupos	0.45829	1	0.0055**
Dentro de los grupos	1.77393	34	
Totál	2.23222	35	

Prueba de rangos múltiples LSD en la variable del crecimiento de la raíz en el *Agave parrasana*.

METODO LSD (95.0)

Tipo	Cantidad	Media	Grupos homogéneos
1	18	0.152941	X
2	18	0.378947	X
Contraste	Diferencias	+/-	Limites
1-2	*-.226006	0.154973	

Tabla 3. Análisis de varianza en el crecimiento de la raíz en *Agave vilmoriniana*.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Nivel de significancia
EFECTOS PRINCIPALES			
Entre grupos	0.214998	1	0.0055**
Dentro de los grupos	0.500557	34	
Totál	0.715556	35	

Prueba de rangos múltiples LSD en la variable del crecimiento de la raíz en el *Agave vilmoriniana*.

METODO LSD (95.0)

Tipo	Cantidad	Media	Grupos homogéneos
1	18	0.0294118	X
2	18	0.184211	X
Contraste	Diferencias	+/-	Limites
1-2	*-.154799	0.0823217	

Tabla 4. Análisis de varianza en el crecimiento de la raíz en *Agave victoria-reginae*.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Nivel de significancia
EFECTOS PRINCIPALES			
Entre grupos	0.284444	1	0.0071**
Dentro de los grupos	0.17778	34	
Totál	1.46222	35	

Prueba de rangos múltiples LSD en la variable del crecimiento de la raíz en el *Agave victoria-reginae*.

METODO LSD (95.0)

Tipo	Cantidad	Media	Grupos homogéneos
1	18	0.0888889	X
2	18	0.266667	X
Contraste	Diferencias	+/-	Limites
1-2	*-.17778	0.12608	

Tabla 5. Análisis de varianza en el incremento del número de ramificaciones de la raíz del *Agave tequilana*.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Nivel de significancia
EFFECTOS PRINCIPALES			
Entre grupos	90.25	1	0.0001**
Dentro de los grupos	166.722	34	
Totál	256.972	35	

Prueba de rangos múltiples LSD en la variable del incremento del número de ramificaciones de la raíz en el *Agave tequilana*.

METODO LSD (95.0)

Tipo	Cantidad	Media	Grupos homogéneos
1	18	5.38889	X
2	18	8.555556	X
Contraste	Diferencias	+/-	Limites
1-2	*-3.16667	1.50007	

Tabla 6. Análisis de varianza en el incremento del número de ramificaciones de la raíz del *Agave parrasana*.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Nivel de significancia
EFFECTOS PRINCIPALES			
Entre grupos	71.0596	1	0.0051**
Dentro de los grupos	269.69	34	
Totál	340.75	35	

Prueba de rangos múltiples LSD en la variable del incremento del número de ramificaciones de la raíz en el *Agave parrasana*.

METODO LSD (95.0)

Tipo	Cantidad	Media	Grupos homogéneos
1	18	4.76471	X
2	18	7.57895	X
Contraste	Diferencias	+/-	Limites
1-2	*-2.81424	1.91082	

Tabla 7. Análisis de varianza en el incremento del número de ramificaciones de la raíz del *Agave vilmoriniana*.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Nivel de significancia
EFFECTOS PRINCIPALES			
Entre grupos	142.668	1	0.0000**
Dentro de los grupos	81.542	34	
Totál	224.222	35	

Prueba de rangos múltiples LSD en la variable del incremento del número de ramificaciones de la raíz en el *Agave vilmoriniana*.

METODO LSD (95.0)

Tipo	Cantidad	Media	Grupos homogéneos
1	18	4.11765	X
2	18	8.10526	X
Contraste	Diferencias	+/-	Limites
1-2	*-3.98762	1.05078	

Tabla 8. Análisis de varianza en el incremento del número de ramificaciones de la raíz del *Agave victoria-reginae*

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Nivel de significancia
EFFECTOS PRINCIPALES			
Entre grupos	34.0278	1	0.0059**
Dentro de los grupos	134.278	34	
Totál	168.306	35	

Prueba de rangos múltiples LSD en la variable del incremento del número de ramificaciones de la raíz en el *Agave victoria-reginae*.

METODO LSD (95.0)

Tipo	Cantidad	Media	Grupos homogéneos
1	18	4.16667	X
2	18	6.11111	X
Contraste	Diferencias	+/-	Limites
1-2	*-1.94444	1.34623	

Tabla 9. Análisis de varianza en el incremento de la longitud axial del *Agave tequilana*.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Nivel de significancia
EFECTOS PRINCIPALES			
Entre grupos	0.694444	1	0.6602
Dentro de los grupos	120.056	34	
Totál	120.075	35	

Tabla 10. Análisis de varianza en el incremento de la longitud axial del *Agave parrasana*.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Nivel de significancia
EFECTOS PRINCIPALES			
Entre grupos	26.2043	1	0.0012**
Dentro de los grupos	71.7957	34	
Totál	98.00	35	

Prueba de rangos múltiples LSD en la variable del incremento de la longitud axial en el *Agave parrasana*. METODO LSD (95.0)

Tipo	Cantidad	Media	Grupos homogéneos
1	18	2.76471	X
2	18	4.47368	X
Contraste	Diferencias	+/-	Limites
1-2	*-1.70898	0.985908	

Tabla 11. Análisis de varianza en el incremento de la longitud axial del *Agave vilmoriniana*.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Nivel de significancia
EFECTOS PRINCIPALES			
Entre grupos	6.64637	1	0.1800
Dentro de los grupos	120.576	34	
Totál	127.222	35	

Tabla 12. Análisis de varianza en el incremento de la longitud axial del *Agave victoria-reginae*.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Nivel de significancia
EFECTOS PRINCIPALES			
Entre grupos	10.0278	1	0.0004**
Dentro de los grupos	22.2778	34	
Totál	32.3056	35	

Prueba de rangos múltiples LSD en la variable del incremento de la longitud axial en el *Agave victoria-reginae*. METODO LSD (95.0)

Tipo	Cantidad	Media	Grupos homogéneos
1	18	0.833333	X
2	18	1.88889	X
Contraste	Diferencias	+/-	Limites
1-2	*-1.05556	0.548343	

Tabla 13. Análisis de varianza en el incremento del número de hojas del *Agave tequilana*.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Nivel de significancia
EFFECTOS PRINCIPALES			
Entre grupos	0.0277778	1	0.8016
Dentro de los grupos	14.7222	34	
Totál	14.75	35	

Tabla 14. Análisis de varianza en el incremento del número de hojas del *Agave parrasana*.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Nivel de significancia
EFFECTOS PRINCIPALES			
Entre grupos	10.4149	1	0.8016
Dentro de los grupos	27.5851	34	
Totál	38.0	35	

Prueba de rangos múltiples LSD en la variable del incremento del número de hojas en el *Agave parrasana*. METODO LSD (95.0)

Tipo	Cantidad	Media	Grupos homogéneos
1	18	0.764706	X
2	18	1.84211	X
Contraste	Diferencias	+/-	Limites
1-2	*-1.0774	0.611118	

Tabla 15. Análisis de varianza en el incremento del número de hojas del *Agave vilmoriniana*.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Nivel de significancia
EFECTOS PRINCIPALES			
Entre grupos	1.30108	1	0.1786
Dentro de los grupos	23.4489	34	
Totál	24.75	35	

Tabla 16. Análisis de varianza en el incremento del número de hojas del *Agave victoria-reginae*

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Nivel de significancia
EFECTOS PRINCIPALES			
Entre grupos	0.25	1	0.5326
Dentro de los grupos	21.3889	34	
Totál	21.6389	35	

Tabla 17. Análisis de varianza en el incremento de la longitud apical del *Agave tequilana*.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Nivel de significancia
EFECTOS PRINCIPALES			
Entre grupos	0.81	1	0.4134
Dentro de los grupos	40.16	34	
Totál	40.97	35	

Tabla 18. Análisis de varianza en el incremento de la longitud apical del *Agave parrasana*

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Nivel de significancia
EFECTOS PRINCIPALES			
Entre grupos	1.4601	1	0.0443*
Dentro de los grupos	11.3763	34	
Totál	12.8364	35	

Prueba de rangos múltiples LSD en la variable del incremento de la longitud apical en el *Agave parrasana*.

METODO LSD (95.0)

Tipo	Cantidad	Media	Grupos homogéneos
1	18	0.317647	X
2	18	0.721053	X
Contraste	Diferencias	+/-	Limites
1-2	*-.403406	0.0392453	

Tabla 19. Análisis de varianza en el incremento de la longitud apical del *Agave vilmoriniana*

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Nivel de significancia
EFECTOS PRINCIPALES			
Entre grupos	10.9728	1	0.0002**
Dentro de los grupos	21.0494	34	
Totál	32.0222	35	

Prueba de rangos múltiples LSD en la variable del incremento de la longitud apical en el *Agave vilmoriniana*.

METODO LSD (95.0)

Tipo	Cantidad	Media	Grupos homogéneos
1	18	0.294118	X
2	18	1.4	X
Contraste	Diferencias	+/-	Limites
1-2	*-1.10588	0.533835	

Tabla 20. Análisis de varianza en el incremento de la longitud apical del *Agave victoria-reginae*.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Nivel de significancia
EFECTOS PRINCIPALES			
Entre grupos	0.000277778	1	0.9742
Dentro de los grupos	8.86722	34	
Totál	8.8675	35	

Tabla 21. Análisis de varianza en el incremento del número de estomas de la parte axial del *Agave tequilana*.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Nivel de significancia
EFECTOS PRINCIPALES			
Entre grupos	162.45	1	0.0002**
Dentro de los grupos	128.5	18	
Totál	290.95	19	

Prueba de rangos múltiples LSD en la variable del incremento del número de estomas de la parte axial del *Agave tequilana*.

METODO LSD (95.0)

Tipo	Cantidad	Media	Grupos homogéneos
1	10	14.4	X
2	10	8.7	X
Contraste	Diferencias	+/-	Limites
1-2	*5.7	2.51039	

Tabla 22. Análisis de varianza en el incremento del número de estomas de la parte abaxial del *Agave tequilana*.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Nivel de significancia
EFFECTOS PRINCIPALES			
Entre grupos	110.45	1	0.0077**
Dentro de los grupos	221.3	18	
Totál	331.75	19	

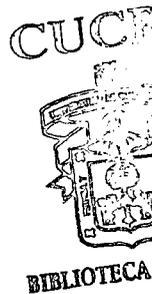
Prueba de rangos múltiples LSD en la variable del incremento del número de estomas de la parte abaxial del *Agave tequilana*.

METODO LSD (95.0)

Tipo	Cantidad	Media	Grupos homogéneos
1	10	15.4	X
2	10	20.1	X
Contraste	Diferencias	+/-	Limites
1-2	*4.7		3.29443

Tabla 23. Análisis de varianza en el incremento del número de estomas de la parte axial del *Agave parrasana*.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Nivel de significancia
EFFECTOS PRINCIPALES			
Entre grupos	120.05	1	0.0000**
Dentro de los grupos	28.09	18	
Totál	148.95	19	



Prueba de rangos múltiples LSD en la variable del incremento del número de estomas de la parte axial del *Agave parrasana*.
METODO LSD (95.0)

Tipo	Cantidad	Media	Grupos homogéneos
1	10	10.9	X
2	10	6.0	X
Contraste	Diferencias	+/-	Limites
1-2	*4.9		1.19053

Tabla 24. Análisis de varianza en el incremento del número de estomas de la parte abaxial del *Agave parrasana*.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Nivel de significancia
EFECTOS PRINCIPALES			
Entre grupos	54.45	1	0.0002**
Dentro de los grupos	44.5	18	
Totál	98.95	19	

Prueba de rangos múltiples LSD en la variable del incremento del número de estomas de la parte abaxial del *Agave parrasana*.
METODO LSD (95.0)

Tipo	Cantidad	Media	Grupos homogéneos
1	10	13.1	X
2	10	9.8	X
Contraste	Diferencias	+/-	Limites
1-2	*3.3		1.4773

Tabla 25. Análisis de varianza en el incremento del número de estomas de la parte axial del *Agave vilmoriniana*.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Nivel de significancia
EFFECTOS PRINCIPALES			
Entre grupos	6.05	1	0.2169
Dentro de los grupos	66.5	18	
Totál	72.55	19	

Tabla 26. Análisis de varianza en el incremento del número de estomas de la parte abaxial del *Agave vilmoriniana*.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Nivel de significancia
EFFECTOS PRINCIPALES			
Entre grupos	125.0	1	0.0109*
Dentro de los grupos	279.2	18	
Totál	404.2	19	

Prueba de rangos múltiples LSD en la variable del incremento del número de estomas de la parte abaxial del *Agave vilmoriniana*.

METODO LSD (95.0)

Tipo	Cantidad	Media	Grupos homogéneos
1	10	18.8	X
2	10	13.8	X
Contraste	Diferencias	+/-	Limites
1-2	*5.0		3.70039

Tabla 27. Análisis de varianza en el incremento del número de estomas de la parte axial del *Agave victoria-reginae*.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Nivel de significancia
EFECTOS PRINCIPALES			
Entre grupos	11.25	1	0.0247*
Dentro de los grupos	33.7	18	
Totál	44.95	19	

Prueba de rangos múltiples LSD en la variable del incremento del número de estomas de la parte axial del *Agave victoria-reginae*.

METODO LSD (95.0)

Tipo	Cantidad	Media	Grupos homogéneos
1	10	4.2	X
2	10	5.7	X
Contraste	Diferencias	+/-	Limites
1-2	*1.5	1.2856	

Tabla 28. Análisis de varianza en el incremento del número de estomas de la parte abaxial Del *Agave victoria-reginae*.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Nivel de significancia
EFECTOS PRINCIPALES			
Entre grupos	45.0	1	0.0002**
Dentro de los grupos	38.2	18	
Totál	83.2	19	

Prueba de rangos múltiples LSD en la variable del incremento del número de estomas de la parte abaxial del *Agave victoria-reginae*.

METODO LSD (95.0)

Tipo	Cantidad		Media	Grupos homogéneos
1	10		8.7	X
2	10		11.7	X
Contraste	Diferencias	+/-	Limites	
1-2	*3.0		1.36874	