

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS

DETERMINACIÓN DE LÍNEAS CLONALES ELITE DE *Agave angustifolia* Haw.

MEDIANTE MICROCALORIMETRÍA ISOTÉRMICA



TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA
CON OPCIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

GABRIELA MILLÁN SOTO

Hermosillo, Sonora

Junio 2012.

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMATO DE APROBACIÓN

Los miembros del Comité de Tesis designado para revisar la Tesis de Gabriela Millán Soto la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito para obtener el Título de Licenciado en Biología con opción en Biotecnología.

Dr. Martín Esqueda Valle
Director de Tesis

Dr. Alejandro E. Castellanos Villegas
Sinodal Secretario

M.C. Jesús Antonio Orozco Avitia
Sinodal

M.C. Aldo Hiram Gutiérrez Saldaña
Sinodal

El maguey era para los mexicanos, alimento, bebida, vestido y material para escribir. Seguramente la naturaleza jamás ha reunido en una planta tantos elementos con que satisfacer lo que exigen la necesidad, la comunidad y la civilización.

W.H. Prescott, 1843
Historia de la conquista de México
Adaptación de Piña Luján, 1982

DEDICATORIA

A ustedes, mi querida familia...

A mis padres Gabriela y José Reyes porque soy el reflejo de su esfuerzo y de sus sueños. Por enseñarme a ser la persona que hoy en día soy. Porque han sabido guiarme por el camino de la razón, la verdad y los valores. Por todo su amor, comprensión y apoyo incondicional. Por ser mi mejor ejemplo de fuerza y superación.

A mi único y adorado hermano Ernesto Alonso por estar siempre en los buenos y no tan buenos momentos de la vida. Por compartir tantas alegrías, sueños e inquietudes. Porque hemos descubierto el mundo de la mano. Por su constante apoyo y comprensión.

A mis abuelos Jesús Otilio y Elvira por ser mis segundos padres. En especial a ti mi querido Tili, que aunque te nos has adelantado en el camino de la vida, jamás te olvidaremos, porque fuiste un gran hombre, un gran padre y abuelo, porque mucho de lo que soy y seré te lo debo a ti. Por tu amor, tus enseñanzas y tu enorme corazón.

A mi futura familia...A mi novio Arturo por todo su amor, apoyo, comprensión e infinita paciencia. Por ser mi compañero de aventuras, mi complemento y mi cómplice en la construcción de sueños. A ti por ser mi inspiración, mi fuerza y mi motivación.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sonora por ser la institución responsable de mi formación académica y profesional.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD), en particular al Departamento de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal, por brindarme el apoyo y los medios para realizar este trabajo de investigación en sus instalaciones.

Al Dr. Martín Esqueda Valle por aceptarme como su alumna, darme la oportunidad de trabajar con lo que más me apasiona y enseñarme las maravillas de una especie tan noble como el agave. Gracias por su gran apoyo, paciencia y amistad a lo largo de estos años.

A los integrantes de mi comité de tesis el Dr. Alejandro E. Castellanos Villegas porque además de ser un excelente profesor-investigador siempre es un amigo para nosotros sus estudiantes; al M.C. Jesús Antonio Orozco Avitia porque sin su valiosa aportación académica y técnica no hubiera sido posible la realización de este trabajo, gracias por todo su conocimiento en el área de la calorimetría; al M.C. Aldo Hiram Gutiérrez Saldaña por su apoyo en el análisis estadístico y sus útiles correcciones. En general, gracias a todos por su amistad, paciencia y acertadas observaciones.

Al Biol. Georgina Vargas por proporcionar las muestras de agave.

Al Ing. José Luis Herrera por su apoyo en el establecimiento del experimento para determinar los parámetros morfológicos de agave y su invaluable espíritu de servicio y amistad.

Al M.C. Alfonso Sánchez por su apoyo técnico en la determinación del peso seco de las muestras de agave, así como la amistad brindada.

Al Tec. Haidée Villa por su apoyo técnico en el establecimiento del experimento de parámetros morfológicos.

A mis padres por todo su apoyo en estos años de formación profesional y en todas las etapas de mi vida.

A R2 por ser mi ejemplo de lo que significa ser un biólogo de corazón, por todas tus aportaciones y porque siempre estuviste a mi lado.

A los Chimis: Ernesto y Anita por siempre estar al pendiente de este proceso y darme porras en todo momento.

A la Fam. Ibarra Acosta por adoptarme como su hija y brindarme todo su cariño y apoyo.

A mis amigas casi hermanas Alma, Patsy, Nabile e Isabel por todos estos años de amistad y momentos vividos.

A mi grupo de biología Z11, en particular a mis amigas de aventuras y tareas Alejandra, Nohelia, Carolina y Vanne.

A mis compañeros y amigos del CIAD Haideé, Javier, Rafita, Nena y Teresita por hacer más amena mi estancia en esta institución.

A todos aquellos que no pude mencionar pero forman parte de mi vida...Gracias!!!

Y por último, pero no menos importante, a Dios, por darme vida y razón, por depositar en mí la fé, la esperanza y la confianza de superarme y ser mejor cada día.

CONTENIDO

LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
RESUMEN	xiii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1. Género <i>Agave</i>	3
II.2. Características Generales de <i>Agave angustifolia</i>	4
II.2.1. Distribución	4
II.2.2. Biología	5
II.3. Importancia de <i>Agave angustifolia</i> en Sonora	5
II.4. Micropropagación del Agave	8
II.5. Microcalorimetría Isotérmica	10
II.6. Parámetros morfológicos en plantas	11
III. JUSTIFICACIÓN	12
IV. HIPÓTESIS	13
V. OBJETIVO GENERAL	14
V.1. Objetivos Específicos	14
VI. METODOLOGÍA	15
VI.1. Microcalorimetría Isotérmica	15
VI.1.1 Material vegetal	15
VI.1.2. Condiciones de micropropagación	16
VI.1.3. Tratamiento de las muestras	16
VI.1.4. Método de medición	18
VI.2. Medición de Parámetros Morfológicos	20
VI.2.1 Altura	20
VI.2.2. Número de hojas	20
VI.2.3. Peso fresco	21
VI.2.4. Peso seco	21
VI.3. Factor de Multiplicación	22

VI.4. Análisis Estadístico	22
VII. RESULTADOS	23
VII.1. Microcalorimetría Isotérmica	23
VII.1.1. Calor metabólico (R_q) y producción de CO_2 (R_{CO_2})	23
VII.1.2. Eficiencia metabólica (R_q/R_{CO_2})	25
VII.1.3. Tasa de crecimiento específico ($R_{ce}, \Delta H_B$)	25
VII.2. Parámetros Morfológicos	27
VII.2.1. Altura	27
VII.2.2. Número de hojas	27
VII.2.3. Peso fresco y peso seco	28
VII.3. Factor de Multiplicación	29
VIII. DISCUSIÓN	38
IX. CONCLUSIÓN	47
XI. LITERATURA CITADA	48

LISTA DE TABLAS

Tabla I	Número de especies de la familia Agavaceae y de especies en México. Fuente: CONAFOR (www.conafor.com.mx).	3
Tabla II	Datos de origen, procedencia y establecimiento de las líneas clonales LC15s, LC26s, LC24b y LC23b.	16
Tabla III	Descripción de variables calorimétricas. 455 = Constante de Thornton que indica que la eficiencia mínima es 455 Kcal mol CO ₂ ⁻¹ (Hansen et al., 1998).	19
Tabla IV	Altura de las cuatro líneas clonales de agave LC15s, LC26s, LC24b y LC23b. Los valores corresponden al promedio y la desviación estándar de 15 muestras. Promedios con la misma letra no son significativamente diferentes según prueba de Tukey a una P<0.05. To= Tiempo inicial, T _F = Tiempo final, I= Incremente (T _F -To), %I= Porcentaje de incremento.	32
Tabla V	Número de hojas de las cuatro líneas clonales de agave LC15s, LC26s, LC24b y LC23b. Los valores corresponden al promedio y la desviación estándar de 15 muestras. Promedios con la misma letra no son significativamente diferentes según prueba de Tukey a una P<0.05. To= Tiempo inicial, T _F = Tiempo final, I= Incremente (T _F -To), %I= Porcentaje de incremento.	33
Tabla VI	Peso fresco de las cuatro líneas clonales de agave LC15s, LC26s, LC24b y LC23b. Los valores corresponden al promedio y la desviación estándar de 15 muestras. Promedios con la misma letra no son significativamente diferentes según prueba de Tukey a una P<0.05. To= Tiempo inicial, T _F = Tiempo final, I= Incremente (T _F -To), %I= Porcentaje de incremento.	34

Tabla VII	Peso seco de las cuatro líneas clonales de agave LC15s, LC26s, LC24b y LC23b. Los valores corresponden al promedio y la desviación estándar de 15 muestras. Promedios con la misma letra no son significativamente diferentes según prueba de Tukey a una $P < 0.05$. T _F = Tiempo final, PF=Peso fresco, PS= Peso seco, %MS= Porcentaje de materia seca.	35
Tabla VIII	Factor de multiplicación (FM) de las cuatro líneas clonales de agave LC15s, LC26s, LC24b y LC23b. Prueba de Tukey a una $P < 0.05$.	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Distribución de <i>Agave angustifolia</i> en México. Fuente: Gentry (1998).	4
Figura 2	Esquema general del agave. Fuente: CONABIO (2006).	6
Figura 3	Municipios con Denominación de Origen del Bacanora. Fuente: Salazar (2007).	8
Figura 4	Morfología de una vitroplanta de agave en fase de multiplicación.	15
Figura 5	Características de las vitroplantas de agave en fase de multiplicación. A) Fase de crecimiento C1: Brotes de aprox. 1cm de alto, sin tallo definido. Generalmente se trata de microcortes unidos que generan dos o más plantas. B) Fase de crecimiento C2: Plántulas de aprox. 2 cm de alto, con tallo definido y al menos dos hojas. C) Fase de crecimiento C3: Plántulas de 3-5 cm de alto, con tallo definido y al menos 3 hojas. D) Fase de crecimiento E1: Plantas mayores de 5 cm de altura, con tallo definido y al menos 4 hojas. Vitroplantas para inducir la formación de raíz.	17
Figura 6	Esquema del corte transversal de las vitroplantas para la obtención de la muestra (tallo aprox. 1cm).	18
Figura 7	Efecto de la temperatura en la actividad metabólica de cuatro líneas clonales de <i>Agave angustifolia</i> . Barra vertical corresponde a la desviación estándar. Prueba de Tukey a una $P < 0.05$.	24
Figura 8	Velocidad de producción de CO ₂ de cuatro líneas clonales de <i>Agave angustifolia</i> por efecto de la temperatura. Barra vertical corresponde a la desviación estándar. Prueba de Tukey a una $P < 0.05$.	24
Figura 9	Eficiencia metabólica de cuatro líneas clonales de <i>Agave angustifolia</i> por efecto de la temperatura y en base a la constante de Thorntons (455 kJmol ⁻¹). Barra vertical corresponde a la desviación estándar. Prueba de Tukey a una $P < 0.05$.	26

Figura 10	Tasa de crecimiento específico de cuatro líneas clonales de <i>Agave angustifolia</i> por efecto de la temperatura. Barra vertical corresponde a la desviación estándar. Prueba de Tukey a una $P < 0.05$.	26
Figura 11	Incremento en altura, número de hojas y peso fresco de las vitroplantas de <i>Agave angustifolia</i> en fase C3 y C2 de las líneas clonales (Tukey, $P < 0.05$).	30
Figura 12	Incremento en altura, número de hojas y peso fresco en vitroplantas de <i>Agave angustifolia</i> en fase C3 de las líneas clonales.	30
Figura 13	Incremento en altura, número de hojas y peso fresco en vitroplantas de <i>Agave angustifolia</i> en fase C2 de las líneas clonales.	31
Figura 14	Producción de materia seca (%MS) de las cuatro líneas clonales de <i>Agave angustifolia</i> .	31
Figura 15	Factor de multiplicación de vitroplantas de <i>Agave angustifolia</i> de las cuatro líneas clonales por fase de crecimiento C1, C2 y C3. (Tukey, $P < 0.05$).	36
Figura 16	Distribución de las vitroplantas de agave por fase de crecimiento y línea clonal.	36

RESUMEN

Agave angustifolia Haw. se ha utilizado tradicionalmente en Sonora para la elaboración del bacanora y la sobreexplotación ha puesto en riesgo su supervivencia y generado una disminución importante de la población nativa. La micropropagación permite el establecimiento de líneas clonales, pero es de gran importancia desarrollar un método que apoye en la selección temprana de individuos elite. La microcalorimetría isotérmica brinda la respuesta de los tejidos vegetales a la temperatura de exposición y el éxito de las clonas dependerá de la adaptación genética y las condiciones ambientales. Para esta investigación se analizaron los parámetros calorimétricos y morfológicos de cuatro líneas clonales: LC15s, LC26s, LC24b y LC23b. Se determinó la actividad metabólica, la producción de CO₂, la eficiencia metabólica y la tasa de crecimiento. Se evaluó la altura, número de hojas, peso seco, peso fresco y factor de multiplicación. El análisis estadístico indicó un incremento altamente significativo del calor metabólico y la producción de CO₂ de las diferentes líneas clonales de agave a medida que aumentó la temperatura. Las clonas de agave son más sensibles a las temperaturas extremas y su crecimiento y supervivencia está más asociado a temperaturas entre los 25 y 35 °C, a excepción de la LC24b que se extiende hasta los 45 °C. El número de hojas, el peso seco y el factor de multiplicación complementaron los datos de calorimetría. La línea clonal elite fue la LC24b con una eficiencia metabólica de 300 kJmol⁻¹ y una tasa de crecimiento de 7.4 μW mg⁻¹ PS. La técnica de microcalorimetría isotérmica es una opción viable, sensible, rápida y eficaz para determinar de forma temprana las líneas clonales elite de agave con mayor potencial de crecimiento y rendimiento.

I. INTRODUCCIÓN

Agave angustifolia Haw. se ha utilizado tradicionalmente en Sonora para la elaboración del legendario bacanora (Núñez, 2001). La materia prima proviene básicamente de poblaciones silvestres, ya que la especie aún no está domesticada. Desde un escenario ecológico, la sobreexplotación de este agave ha puesto en riesgo su supervivencia y como consecuencia se ha generado una disminución importante de la población nativa de esta planta. Esto debido a que no se respeta el estado de madurez para su aprovechamiento, aunado a que no existe una reglamentación para el uso de estos recursos (CONABIO, 2006; Eguiarte y Souza, 2007; Robert et al., 2004).

Desde un punto de vista meramente comercial, actualmente existen en el estado algunas plantaciones de agave (Eguiarte y Souza, 2007). Sin embargo, como resultado de casi 80 años de ilegalidad de la actividad, su tecnología de producción no ha sufrido cambios importantes y se caracteriza por procesos poco eficientes, carentes de control de calidad, bajos precios y mercados inestables (Núñez, 2001; Robert et al., 2004). Para que el bacanora se transforme y pase de ser un logro artesanal, a un sistema de producción industrial es necesario establecer estrategias de producción sustentable que promuevan la conservación y la recuperación de áreas naturales de distribución de *A. angustifolia*, además del desarrollo comunitario.

La técnica de cultivo de tejidos vegetales se presenta como una alternativa para la conservación de agave y otros grupos de plantas de zonas áridas (Rubluo et al., 1993; Martínez-Palacios et al., 2003). La propagación in vitro permite la rápida y eficiente multiplicación de plantas en un reducido espacio y libres de enfermedades. A pesar de sus ventajas, la micropropagación también implica un desconocimiento del comportamiento de las líneas clonales (Robert et al., 1991; Zimmerman, 1993). Por ello es de gran importancia desarrollar un método que apoye en la selección temprana de individuos elite para el establecimiento de líneas clonales de agave de alto rendimiento. De igual manera, ésto haría posiblemente más eficiente el proceso de micropropagación en cuanto a costos y tiempos de producción.

Por lo tanto, es de interés restablecer las poblaciones de agave teniendo como base que el crecimiento y supervivencia de las plantas depende de su adaptación genética a los regímenes de temperatura presentes en su medio ambiente nativo (Criddle et al., 1997), ya que la temperatura es uno de los factores más determinantes de la distribución de las plantas, estas adaptan su crecimiento a su nicho, adecuando su metabolismo respiratorio al patrón de temperatura del medio ambiente (Criddle et al., 2005).

Las mediciones de las tasas calorimétricas, O₂ y CO₂ de las plantas y tejidos, proveen un medio para relacionar su crecimiento al metabolismo fisiológico y bioquímico y por ende, proporcionan una alternativa rápida de selección de plantas para optimizar la productividad en un ambiente dado (Hansen et al., 1996). El efecto de estas condiciones puede monitorearse utilizando un método denominado calorimetría o microcalorimetría biológica (Loike et al., 1981).

La microcalorimetría permite determinar de manera rápida y precisa, variables como la actividad metabólica, la velocidad de respiración, la eficiencia metabólica y la velocidad de crecimiento de la planta. La técnica de microcalorimetría isotérmica permite conocer la respuesta de los tejidos vegetales a una temperatura dada (Hansen et al., 1998).

Con el fin de generar los conocimientos que conduzcan a la innovación tecnológica y un uso más eficiente y sostenible de los agaves, el objetivo de este estudio es determinar las líneas clonales elite de *A. angustifolia* Haw. con mayor potencial de crecimiento y rendimiento, realizando mediciones calorimétricas y de parámetros morfológicos en vitroplantas de agave.

II. ANTECEDENTES

II.1. Género *Agave*

El género *Agave* L. es el más representativo de la familia Agavaceae e incluye aproximadamente 200 especies y 247 taxa, de los cuales el 75% se distribuye en México y del cual 69% corresponde a especies endémicas (Tabla I) (García-Mendoza, 2000, 2004). Entre los usos múltiples de los agaves se encuentra la elaboración de destilados, siendo los principales tequila, mezcal y bacanora. En México se conocen 22 especies mezcaleras de este género, de las que *Agave angustifolia* Haw. es la más empleada para la elaboración de esta bebida y la más ampliamente distribuida en nuestro país (Palomino et al., 2007).

Tabla I. Número de especies de la familia Agavaceae y de especies en México. Fuente: CONAFOR (www.conafor.com.mx).

Subfamilia	Géneros	Total de Especies	Total de especies en México (%)
Yuccoideae			
	<i>Yucca</i>	46	30 (65)
	<i>Hesperaloe</i>	5	5 (100)
	<i>Hesperoyucca</i>	3	3 (100)
Agavoideae			
	<i>Agave</i>	200	150 (75%)
	<i>Bescomeri</i>	7	7 (100)
	<i>Furcraea</i>	25	13 (52)
	<i>Manfreda</i>	29	28 (96)
	<i>Polianthes</i>	15	15 (100)
	<i>Prochnyanthes</i>	2	2 (100)
Total		332	253 (76)

II.2. Características Generales de *Agave angustifolia*

II.2.1. Distribución

Agave angustifolia tiene una distribución amplia que va desde Costa Rica a lo largo del Océano Atlántico y Pacífico hasta Tamaulipas y el Desierto Sonorense (Nobel, 1998). Según Gentry (1998) su abundancia en Sonora, abarca los municipios de Arivechi, Ónavas, Sahuaripa, Soyopa y Nácori Chico, aunque también se puede encontrar en el resto del estado en menor cantidad (Figura 1). Su gran distribución se debe a su exitosa adaptación en ecosistemas muy diversos que incluyen la selva baja caducifolia, la sabana tropical y el matorral espinoso (Turner et al., 2005).

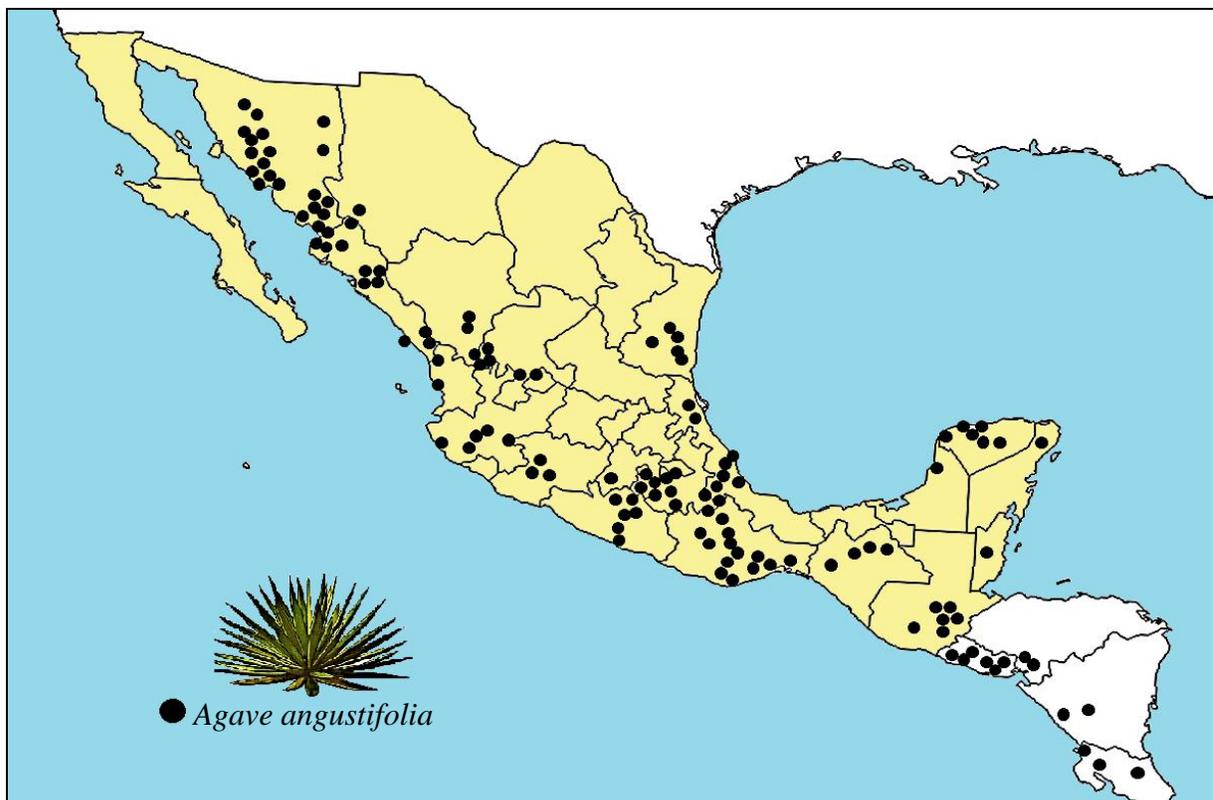


Figura 1. Distribución de *Agave angustifolia* en México. Fuente: Gentry (1998).

II.2.2. Biología

Morfológicamente *Agave angustifolia* se caracteriza por tener un tallo corto de 20 a 60 cm y hojas múltiples parecidas a una espada dispuestas en una roseta radial. En general miden de 1 a 1.5 m de alto y 1.5 a 2 m de diámetro, con hojas de 50 a 120 cm de largo y de 4 a 8 cm de ancho con formas lineales o lanceoladas y de cóncavas a planas color verde claro o grisáceo. Los dientes del margen de la hoja son regulares, generalmente de 2 a 6 mm de longitud de un color marrón oscuro o negro. Sus frutos son cápsulas ovoides de 3 a 5 cm de largo, de color marrón oscuro y leñosas. Las semillas son desde negras hasta marrón opacas con una longitud que varía de 8 a 10 mm (Figura 2) (Gentry, 1998).

Al igual que el resto de los agaves se caracteriza por un ciclo de vida largo, pues en general tarda de 6 a 8 años para que se produzcan frutos con semilla, aunque no siempre los forma (Cervantes-Mendivil et al., 2007). Al final de su ciclo vital, desarrolla un escapo floral o quiole que alcanza una altura de 3 a 5 m y a partir del cual se desarrollan inflorescencias de color amarillo-verdoso. Esta característica las clasifica como un organismo semélparo, pues la planta muere tras su única reproducción sexual (Gentry, 1998).

A. angustifolia tiene porcentajes inciertos de fertilidad, así como una tasa germinativa y de supervivencia baja, por lo que ha desarrollado de manera alternativa la reproducción asexual mediante hijuelos y bulbilos. Los primeros se desarrollan alrededor de la planta madre a partir de meristemas apicales de múltiples rizomas, mientras que los bulbilos se desprenden de meristemas axiales en las inflorescencias una vez desarrollado el escapo floral (Figura 2) (Gentry, 1998; Nobel, 1998).

II.3. Importancia de *Agave angustifolia* en Sonora

Agave angustifolia se ha utilizado durante siglos para la elaboración de bacanora, una bebida alcohólica destilada parecida al mezcal y tequila diferenciándose por el sabor, el aroma, las características de la planta utilizada, por las condiciones climáticas imperantes en la región serrana de Sonora, el tipo de levaduras silvestres utilizadas y el proceso empleado para su elaboración (Gutiérrez et al., 2007).

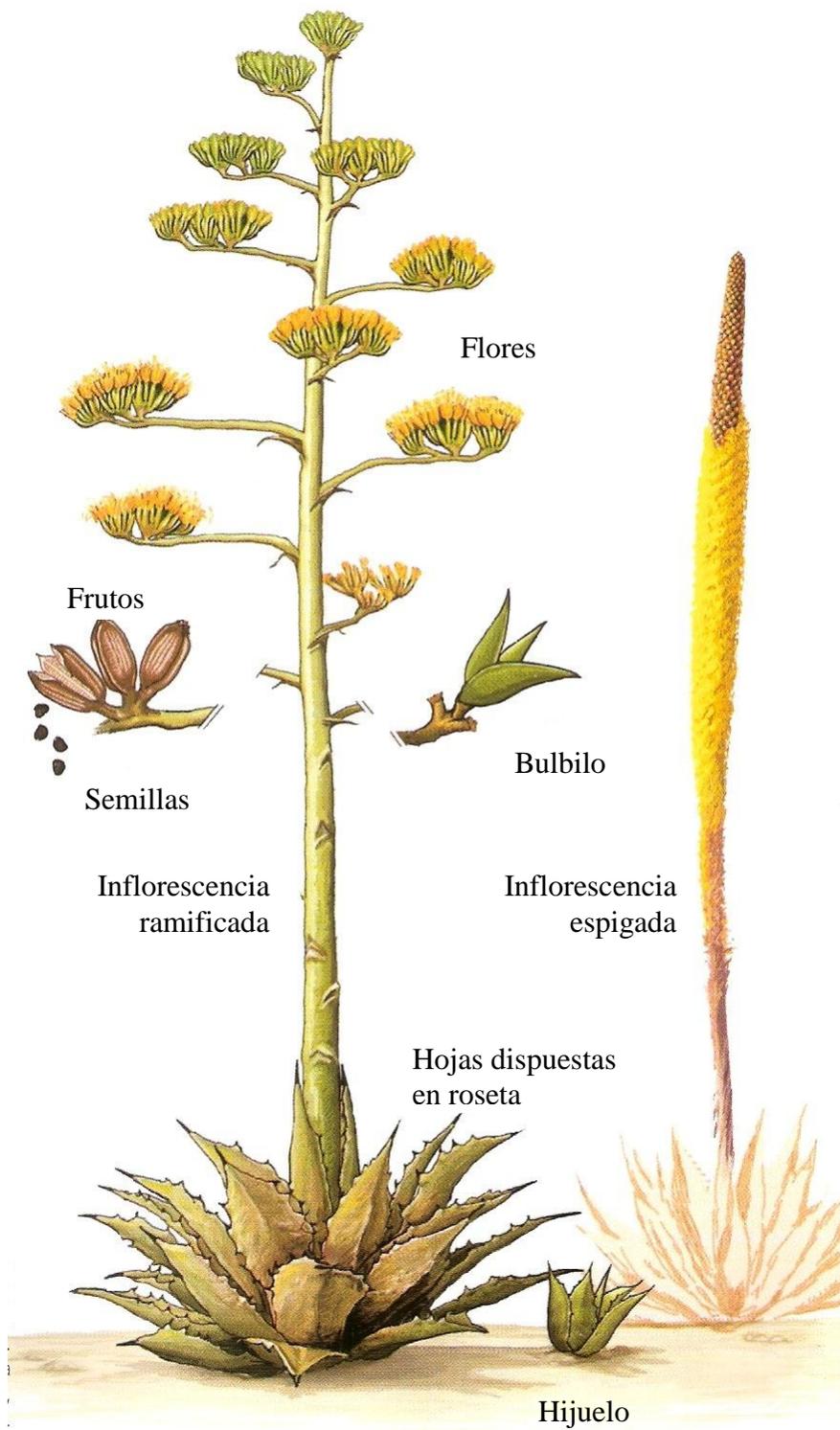


Figura 2. Esquema general del agave. Fuente: CONABIO (2006).

En 1915 se decretó la Ley Seca durante el gobierno del Gral. Plutarco Elías Calles, que penalizaba la elaboración y comercialización de bacanora, lo que contribuyó a la conservación de las poblaciones silvestres de agave hasta finales de la década de los 80's, cuando las comunidades rurales incrementaron sus actividades clandestinas por la inestabilidad económica (Gutiérrez et al., 2007). Para 1992 la Cámara de Diputados de Sonora modificó la ley de alcoholes y con ello finalizó la prohibición de la producción de esta bebida. Esto impulsó aún más la explotación masiva del agave provocando una disminución considerable de las poblaciones naturales, reduciendo así la disponibilidad de materia prima para la obtención de bacanora. No obstante, el día 6 de enero de 2000 se publicó en el Diario Oficial de la Federación la Declaratoria General de Protección al Área de Denominación de Origen "Bacanora" (ADOB), señalándose que el Estado de Sonora es la única entidad que se reconoce como productora de esta bebida.

El ADOB está integrada por 35 municipios, siendo los principales que se dedican a esta actividad Bacanora, Sahuaripa, Moctezuma y Cumpas (Figura 3) (Salazar y Mungaray, 2008). Asimismo, en el Diario Oficial de la Federación se publicó el 14 de diciembre de 2005 la Norma Oficial Mexicana del Bacanora: NOM-168-SCFI-2004 que privilegia la calidad y autenticidad de la bebida. Esta norma está en manos del Consejo Regulador del Bacanora quien es el responsable de aplicarla (Nuñez, 2004).

Actualmente, con el Decreto de Denominación de Origen, la reciente Norma Oficial Mexicana y la creación de un Consejo Sonorense Promotor de la Regulación del Bacanora se ha puesto de manifiesto la necesidad de contar con materia prima suficiente para proveer el mercado presente y futuro, y que el proyecto de bacanora en el estado se consolide como actividad potencial, eficiente y de calidad (Nuñez, 2004).

Los agaves son difíciles de multiplicar masivamente por métodos convencionales, ya que presentan lento crecimiento, así como bajas tasas de reproducción asexual y sexual limitada por problemas de polinización y viabilidad de las semillas. Una alternativa prometedora es la producción de vitroplantas.

Municipios con denominación de origen del bacanora

- | | |
|-----------------------------|---------------------------|
| 1. Arizpe | 19. Divisaderos |
| 2. Opodepe | 20. Tepache |
| 3. Banámichi | 21. Sahuaripa |
| 4. Huépac | 22. Bacanora |
| 5. San Felipe de Jesús | 23. Arivechi |
| 6. Rayón | 24. Villa Pesqueira |
| 7. Aconchi | 25. Soyopa |
| 8. Baviácora | 26. Mazatán |
| 9. San Miguel de Horcasitas | 27. La Colorada |
| 10. Ures | 28. Ónavas |
| 11. Moctezuma | 29. San Javier |
| 12. Villa Hidalgo | 30. San Pedro de la Cueva |
| 13. Huachineras | 31. Suaqui Grande |
| 14. Cumpas | 32. Yécora |
| 15. Huásabas | 33. Rosario |
| 16. Granados | 34. Quiriego |
| 17. Bacadéhuachi | 35. Álamos |
| 18. Nácori Chico | |



Figura 3. Municipios con denominación de origen del bacanora. Fuente: Salazar (2007).

II.4. Micropropagación del Agave

La micropropagación es la reproducción vegetativa empleando técnicas de cultivo in vitro, lo que permite la rápida y eficiente multiplicación de plantas silvestres y cultivares valiosos, la producción de plantas libres de enfermedades y la generación de individuos rejuvenecidos, más vigorosos y de rápido crecimiento (Ewaid y Kretschmar, 1996).

Esta técnica se utiliza actualmente en cientos de laboratorios comerciales para la producción de millones de plantas ornamentales, hortícolas, frutícolas y forestales, y ofrece ventajas particulares a especies de largo ciclo de vida y con procesos de reproducción ineficientes como es el caso de los agaves (Robert et al., 2007).

Las especies de agave que más se han estudiado en el ámbito de la propagación in vitro son aquellas que tienen valor comercial como *A. fourcroydes* Lem (Robert et al., 1987), *A. tequilana* (Robert et al., 1991), *A. sisalana* y *A. cantala* Robx (Binh et al., 1990), entre otros. Sin embargo, también se han reportado metodologías dirigidas a micropropagar especies que son ecológicamente importantes y además bajo algún régimen de protección ambiental.

En los últimos siete años se ha desarrollado investigación con la finalidad de brindar una alternativa integral para recuperar poblaciones de *A. angustifolia*, mediante la micropropagación del agave y un criterio holístico de trasplante. Se ha desarrollado un protocolo de propagación in vitro en medio sólido y líquido de *A. angustifolia*. Además está estandarizado el proceso de aclimatación y endurecimiento de las vitroplantas (Esqueda y Vargas, 2007). A pesar de lo anterior, la micropropagación también implica un desconocimiento del comportamiento de las líneas clonales (Robert et al., 1991; Zimmerman, 1993).

El objetivo principal de la micropropagación, no es solamente obtener un gran número de plantas, sino generar individuos altamente eficientes y productivos. Por eso es importante la detección temprana de individuos sobresalientes que permitan incrementar poco a poco los rendimientos a través de la introducción paulatina de clonas con más rápido desarrollo y mayor contenido o longitud de fibra. En este sentido, la microcalorimetría puede ser una opción viable para la detección y selección de líneas clonales elite.

II.5. Microcalorimetría Isotérmica

La calorimetría es la medición de la energía en forma de calor, la cual permite determinar la velocidad y la eficiencia de energía almacenada dentro de una planta, las propiedades de crecimiento y el efecto de las condiciones del medio ambiente sobre el crecimiento (Anekonda et al., 1994).

La microcalorimetría isotérmica determina la producción de calor metabólico total en muestras vegetales. Esta técnica proporciona mediciones relativamente rápidas de la dependencia de la velocidad metabólica de las plantas por la temperatura. La pérdida de actividad metabólica de las plantas a temperaturas altas puede analizarse isotérmicamente aumentando la temperatura a un valor seleccionado y observando la velocidad de decremento en actividad (Criddle et al., 1991b). En otras palabras, la velocidad de la respiración vegetal depende de la temperatura ambiental. De esta manera la sensibilidad de las plantas a las temperaturas altas o bajas es una característica importante para definir límites geográficos de crecimiento (Anekonda et al., 1994).

Los datos que se obtienen de las mediciones calorimétricas de los tejidos vegetales son la actividad o calor metabólico (R_q) y la producción de CO_2 o velocidad de respiración (R_{CO_2}); a partir de los valores anteriores se obtiene una descripción matemática de la velocidad de crecimiento del tejido y de la eficiencia en la conversión de los sustratos de carbono (Hansen et al., 1998).

La energía liberada a partir de la oxidación de 1 mol de glucosa es de 686 Kcal, de los cuales 277 Kcal se utilizan en la regeneración de compuestos como ATP, NADH y NADPH que se emplean en el crecimiento, mientras que los 409 restantes se liberan en forma de calor (Salisbury y Ross, 1994). Considerando la liberación de 6 moles de CO_2 por mol de glucosa y 409 Kcal en forma de calor es posible establecer una relación entre el calor y el CO_2 liberado por el tejido en función del tiempo bajo condiciones de temperatura constante. De esta forma el cociente del calor liberado respecto al CO_2 producido es un indicador de la eficiencia metabólica (R_q / R_{CO_2}) del tejido vegetal para la producción de los biosintatos requeridos en su mantenimiento y crecimiento (Hansen et al., 1996). A mayor calor liberado la relación R_q/R_{CO_2} es también más alta, evidenciando la menor eficiencia metabólica, ya que la energía disponible para el crecimiento del tejido es también inferior.

Estas mediciones calorimétricas de la producción de calor metabólico son también un método útil para la selección individual rápida de plantas de propagación o plantaciones comerciales a escala (Zobel y Talbert, 1984). Los experimentos por calorimetría permiten predecir el potencial de crecimiento del genotipo.

La tasa de crecimiento específico ($R_{ce, \Delta H_B}$) permite conocer la velocidad de crecimiento del tejido, considerando la Constante de Thornton que indica que la eficiencia mínima es $455 \pm 15 \text{ Kcal mol CO}_2^{-1}$. Los parámetros R_q , R_{CO_2} y R_q/R_{CO_2} , así como la mencionada constante permiten conocer la velocidad de crecimiento mediante la fórmula: $R_{ce, \Delta H_B} = (455 * R_{CO_2}) - R_q$ (Hansen et al., 1998).

II. 6. Parámetros Morfológicos en Plantas

La morfología de la planta es la manifestación de la respuesta fisiológica de la misma a las condiciones ambientales y a las prácticas culturales del vivero y generalmente es fácil de cuantificar. El número de posibles parámetros morfológicos a examinar es alto y como algunos de ellos están muy correlacionados, se deben elegir aquéllos que proporcionen una mayor información y sean de medición más sencilla. Algunos parámetros morfológicos que permiten definir una planta ideal son altura, diámetro, número de hojas, longitud del tallo, número de ramas, sistema radical, volumen de la raíz, peso fresco y peso seco, entre otros (Birchler et al, 1998).

Un método conveniente para estudiar tales aspectos es el análisis de crecimiento de plantas que puede basarse directamente en la evolución cronológica de medidas, el cual requiere primordialmente de dos tipos de mediciones: peso seco y área foliar. El análisis de crecimiento también permite evaluar la distribución de biomasa y calcular los índices de eficiencia del crecimiento, como la tasa de crecimiento relativo, tasa absoluta de crecimiento y la tasa de asimilación neta. Mientras los primeros, tienen que ver con el desarrollo absoluto de la planta, los segundos explican su eficiencia en acumular materia seca como producto de sus procesos metabólicos (Sedano et al, 2005).

III. JUSTIFICACIÓN

Debido a que el ciclo de vida de *Agave angustifolia* tiene una duración promedio de 6 a 8 años, porcentajes inciertos de fertilidad, una tasa germinativa y de supervivencia baja y las condiciones climáticas extremas en la sierra sonoreense han disminuido o retrasado su recuperación, la disponibilidad de un método eficiente de selección temprana de líneas clonales elite que aseguren un máximo prendimiento en campo, impactará de forma positiva la recuperación de áreas naturales de distribución del agave, para proteger las poblaciones nativas para su uso comercial.

IV. HIPÓTESIS

El uso de la microcalorimetría en el estudio de los tejidos vegetales del agave permite diferenciar las líneas clonales elite de mayor crecimiento y adaptación a las condiciones de temperatura ambiental, lo cual permitirá seleccionar de forma temprana los genotipos mejor adaptados a las condiciones de crecimiento y hábitat de la especie.

V. OBJETIVO GENERAL

Determinar las líneas clonales elite con mayor potencial de crecimiento de *Agave angustifolia* Haw. mediante microcalorimetría isotérmica y medición de parámetros morfológicos de plantas en fase in vitro.

V.1. Objetivos Específicos

Determinar la actividad metabólica, la velocidad de respiración, la eficiencia metabólica y la velocidad de crecimiento de tejidos de vitroplantas de agave.

Determinar la línea clonal elite con mayor velocidad de crecimiento y eficiencia metabólica.

Determinar la altura, número de hojas, factor de multiplicación, peso fresco y peso seco de vitroplantas de agave.

VI. METODOLOGÍA

VI.1 Microcalorimetría Isotérmica

VI.1.1 Material vegetal

Se utilizaron vitroplantas de agave en fase de multiplicación de 4 cm de altura, con tallo definido y al menos 3 hojas (Figura 4). Las plántulas fueron proporcionadas por el Laboratorio de Micropropagación del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se analizaron cuatro líneas clonales (LC): LC15s y LC26s procedentes de semilla y originarias de Bacanora, Sonora y LC24b y LC23b procedentes de bulbillo y originarias de Moctezuma, Sonora. Todas las líneas se establecieron en junio de 2003 a partir del meristemo (Tabla II). Se seleccionaron aleatoriamente 12 vitroplantas de cada línea y se transportaron al laboratorio de calorimetría del CIAD en cajas magentas en medio de cultivo sólido.



Figura 4. Morfología de una vitroplanta de agave en fase de multiplicación.

VI.1.2. Condiciones de micropropagación

Las plántulas se obtuvieron del establecimiento del meristemo de una planta madre sana y vigorosa en cajas magenta con 50 mL de medio de multiplicación según Robert et al. (1991). Los brotes obtenidos en la fase de inducción fueron cultivados en cajas magenta con 50 mL de medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) modificado. Las plántulas de agave fueron incubadas en un cuarto de crecimiento con fotoperíodos de 12 h de luz blanca suministrada por tubos fluorescentes a una temperatura de 27 ± 2 °C. Las vitroplantas obtenidas en la fase de multiplicación se clasificaron en tres tipos de crecimiento como se describe en la Figura 5, siendo las C3 las que se utilizaron en este estudio. Las resiembras se realizaron bajo condiciones de esterilidad en cámara de flujo laminar cada 6 semanas hasta obtener las plántulas C3.

Tabla II. Datos de origen, procedencia y establecimiento de las líneas clonales LC15s, LC26s, LC24b y LC23b.

LÍNEA CLONAL (LC)	REGIÓN DE ORIGEN	PROCEDENCIA	ESTABLECIMIENTO
15s y 26s	Bacanora, Sonora	Semilla	19 junio 2003
24b y 23b	Moctezuma, Sonora	Bulbilo	17 junio 2003

VI.1.3. Tratamiento de las muestras

Para asegurar mediciones más representativas se utilizó la parte basal de los agaves por presentar mayor actividad metabólica. Se les realizó un corte transversal a las vitroplantas y se conservaron tallos de aproximadamente 1 cm de altura y un peso fresco promedio de 290 mg (Figura 6). Las muestras se almacenaron sobre papel filtro húmedo dentro de una caja Petri para evitar problemas de deshidratación entre las mediciones.

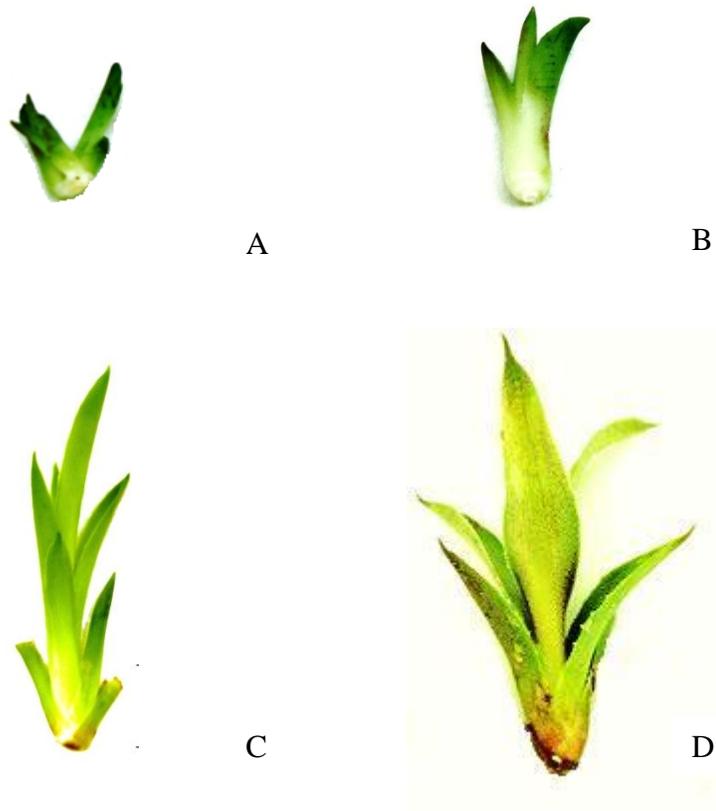


Figura 5. Características de las vitroplantas de agave en fase de multiplicación. A) Fase de crecimiento C1: Brotes de aprox. 1cm de alto, sin tallo definido. Generalmente se trata de microcortes unidos que generan dos o más plantas. B) Fase de crecimiento C2: Plántulas de aprox. 2 cm de alto, con tallo definido y al menos dos hojas. C) Fase de crecimiento C3: Plántulas de 3-5 cm de alto, con tallo definido y al menos 3 hojas. D) Fase de crecimiento E1: Plantas mayores de 5 cm de altura, con tallo definido y al menos 4 hojas. Vitroplantas para inducir la formación de raíz.

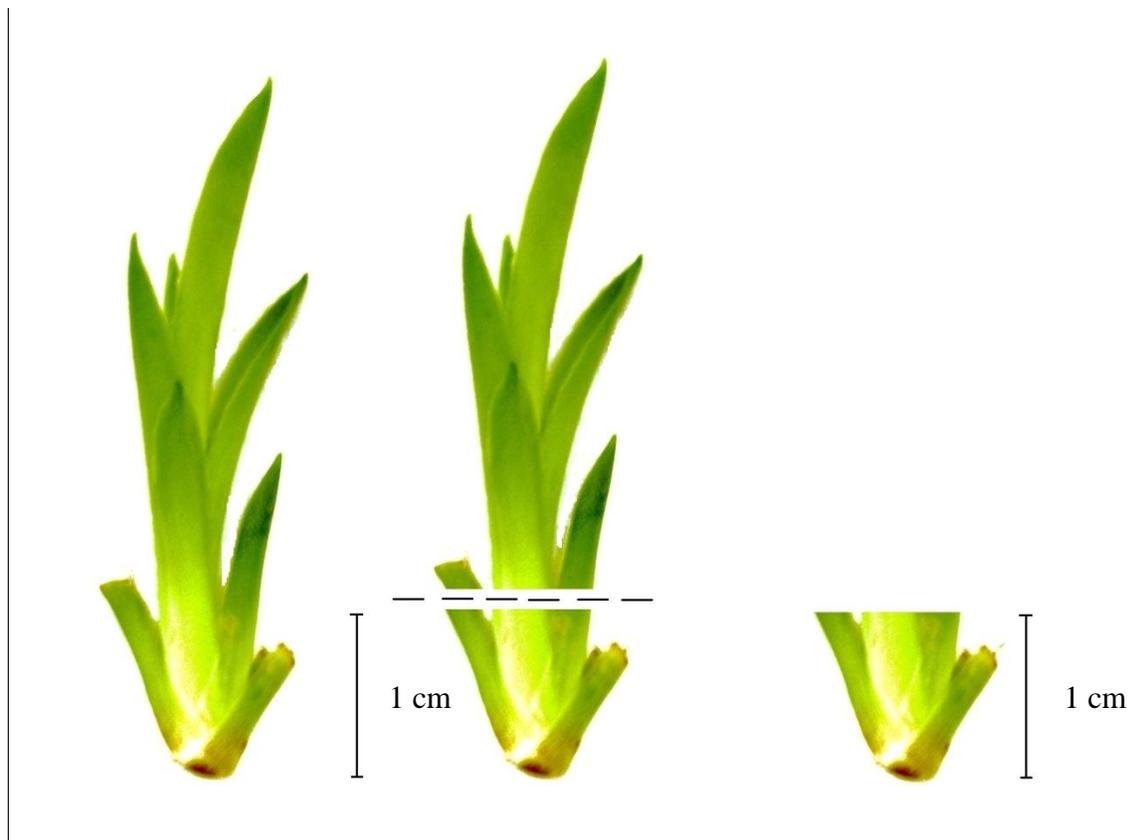


Figura 6. Esquema del corte transversal de las vitropiantas para la obtención de la muestra (tallo aprox. 1cm).

VI.1.4. Método de Medición

El instrumento utilizado fue un calorímetro diferencial de barrido CSC 4100 (Calorimetry Science Corporation, Pleasant Grove, Utah, E.U.A.) equipado con cuatro celdas metálicas herméticas de 1mL y una capacidad de barrido de temperatura de -30 a 110 °C. La cuarta celda fue utilizada como referencia y se conservó vacía durante las mediciones. Para prevenir condensación de humedad dentro del instrumento, se utilizó un flujo constante de N₂ de 1.75 Kg m⁻². La temperatura en la cámara del calorímetro se mantuvo constante a 15 °C por medio un baño circulante-refrigerante (PolyScience, Niles, Illinois, E.U.A.). Las plántulas se colocaron con la parte basal en contacto con el fondo de las celdas donde previamente se colocaron 50 µL de agua estéril para prevenir su deshidratación. Una vez colocada la muestra, se seleccionó la temperatura deseada y se dejó estabilizar el calorímetro por 2500 seg., para

obtener de esta manera una tasa de calor metabólico estable. Una vez determinado el calor metabólico de la muestra, las celdas fueron abiertas y se agregó un vial con 50 μL de NaOH 0.4M para posteriormente medir de nuevo la tasa de calor. El calor obtenido en esta segunda medición, es la suma del calor metabólico más el calor proveniente de la reacción de NaOH con CO_2 , (CO_2 (gas) + $2\text{NaOH}^-(\text{ac}) = \text{Na}_2\text{CO}_3^{2-}(\text{ac}) + \text{H}_2\text{O}(\text{ac})$ $\Delta H = -108.5 \text{ kJ mol}^{-1}$). Después de remover el vial con el NaOH, el calor metabólico fue medido de nuevo. La tasa de calor metabólico de la primera y tercera medición fueron promediadas y restada al calor producido en la segunda medición, para obtener la tasa de calor por la formación de carbonato (μW o μJsec^{-1}). Dividiendo este calor por $-108.5 \text{ kJ mol}^{-1}$ se obtuvo la tasa de producción de CO_2 (R_{CO_2}) en nmol sec^{-1} (Criddle et al., 1991a, 1991b; Hansen et al., 1994, 1995; Weili et al., 2008). Los datos se ajustaron conforme a la línea base del calorímetro y se recalcularon por unidad de peso seco (ps). Este protocolo fue repetido a 15, 25, 35 y 45 $^\circ\text{C}$ para cada una de las líneas clonales. Las variables evaluadas fueron: Actividad metabólica (R_q), producción de CO_2 o velocidad de respiración (R_{CO_2}), eficiencia metabólica (R_q/R_{CO_2}) y velocidad de crecimiento ($R_{\text{ce}}, \Delta H_B$) (Tabla III).

Tabla III. Descripción de variables calorimétricas. 455 = Constante de Thornton que indica que la eficiencia mínima es 455 Kcal mol CO_2^{-1} (Hansen et al., 1998).

Variable calorimétrica	Abreviación	Fórmula	Unidades
Actividad metabólica	R_q	$R_q/\text{peso seco}$	$\mu\text{W mg}^{-1} \text{ ps}$
Producción de CO_2 o velocidad de respiración	R_{CO_2}	$\frac{q\text{CO}_2 / 108.5}{\text{peso seco}}$	$\text{nmol mg}^{-1} \text{ s}^{-1}$
Eficiencia metabólica	R_q/R_{CO_2}	R_q/ R_{CO_2}	kJmol^{-1}
Velocidad de crecimiento	$R_{\text{ce}}, \Delta H_B$	$[455 - R_{\text{CO}_2}] - R_q$	$\mu\text{W mg}^{-1} \text{ ps}$

VI.2. Medición de parámetros morfológicos

Se seleccionaron 225 vitroplantas de agave de cada línea clonal y se dividieron en 3 grupos de 75 individuos en fase C3, C2 y C1 respectivamente, de los cuales se sembraron 25 vitroplantas por caja magenta en medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) modificado. Se seleccionaron aleatoriamente 5 vitroplantas por caja magenta, es decir, se analizaron 15 individuos por cada fase de crecimiento y se determinaron los parámetros morfológicos: altura, número de hojas, peso fresco y peso seco para las plántulas en fase C3 y C2, mientras que para las C1 solamente se determinó el factor de multiplicación. Los parámetros se midieron en tiempo inicial (T_O) y tiempo final (T_F), excepto el peso seco que sólo se estableció en T_F . Los parámetros T_F se determinaron después de 6 semanas de cultivo. Para realizar las mediciones T_O y T_F las plántulas se marcaron espacialmente en la caja magenta utilizando un marcador.

Para evaluar el crecimiento se midieron los parámetros morfológicos altura, número de hojas, peso fresco y peso seco:

VI.2.1. Altura

La vitroplanta se midió desde la parte basal del tallo hasta la parte apical de la hoja más larga. En T_O se utilizó una caja de Petri para manipular la vitroplanta y papel milimétrico para establecer el valor, ya que la medición se realizó dentro de la campana de flujo laminar para evitar cualquier tipo de contaminación durante el cultivo. En T_F se utilizó una regla graduada. El incremento de altura se obtuvo de restar la altura $T_F - T_O$ y se registró en centímetros.

VI.2.2. Número de hojas

Se contaron las hojas de forma empírica. El número de hojas emitidas o incremento de hojas se obtuvo de la diferencia de $T_F - T_O$.

VI.2.3. Peso fresco

Las plántulas se pesaron en charolas de aluminio limpias y secas utilizando una balanza analítica. Las vitroplantas se pesaron inmediatamente después de retirarlas del medio de cultivo para evitar que perdieran humedad. Se quitó el exceso de medio utilizando papel absorbente. El incremento de peso fresco se obtuvo de $T_F - T_O$ y se registró en gramos.

VI.2.3. Peso seco

Se registró el peso de la charola de aluminio limpia y seca y el peso fresco de la vitroplanta en una balanza analítica (peso de la charola más planta). Las charolas de aluminio se etiquetaron debidamente antes de iniciar el procedimiento. Se colocaron en un horno de secado a 65 °C durante 48 h hasta peso constante. Posteriormente se depositaron en un desecador durante 1 h para evitar que el tejido absorbiera humedad durante el pesaje. Para obtener el peso seco se registró el peso de la charola más el tejido seco y se le restó el peso de la charola. El peso se registró en gramos. Teniendo entonces, los datos de peso fresco T_O y peso seco T_F , se logra establecer el porcentaje de materia seca de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\%MS = \frac{PS T_F \times 100}{PF T_O}$$

donde:

$\%MS$ = Porcentaje de Materia Seca.

$PS T_F$ = Peso Seco Final (g).

$PF T_O$ = Peso Fresco Inicial (g).

VI.3. Factor de multiplicación (FM)

Se estableció el número de vitroplantas $T_0 = 225$ para cada línea clonal. Después de 6 semanas de cultivo se colectaron las vitroplantas contenidas en todos los tratamientos y se registró el número de individuos T_F en las fases C1, C2, C3 y E1. El factor de multiplicación es la relación entre el número de vitroplantas producidas al final del cultivo y el número de vitroplantas iniciales.

$$FM = \frac{\text{Número de vitroplantas } T_F}{\text{Número de vitroplantas } T_0}$$

VI.4. Análisis Estadístico

Los datos de calorimetría se analizaron estadísticamente por un análisis de varianza con un diseño completamente al azar con 4 repeticiones por temperatura, con un arreglo factorial para línea clonal y temperatura. La comparación de medias se efectuó mediante la prueba de Tukey ($P < 0.05$). Se utilizó el paquete estadístico SAS versión 6.08 (SAS Software, 2002).

Para los parámetros morfológicos se elaboró una base de datos con los valores medidos en los individuos de las líneas clonales utilizando una hoja electrónica de Microsoft Office Excel 2010. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con el programa estadístico NCSS 2007 (Hintze, 2007) para determinar la existencia de diferencias entre las clonas, bajo un diseño experimental completamente al azar. La comparación de medias se efectuó mediante la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

VII. RESULTADOS

VII.1. Microcalorimetría Isotérmica

VII.1.1. Calor metabólico (R_q) y producción de CO_2 (R_{CO_2})

El análisis estadístico mostró un incremento altamente significativo del calor metabólico y la producción de CO_2 de las diferentes líneas clonales de agave a medida que se aumentó la temperatura. Las Figuras 7 y 8 muestran el patrón de R_q y R_{CO_2} producido por cada línea clonal *versus* temperatura.

La máxima actividad metabólica de todas las líneas clonales a excepción de la LC26s se registró a los 35 °C. Sin embargo, al alcanzar una temperatura de 45 °C se presentó una disminución en R_q y R_{CO_2} en las cuatro clonas. Los valores de actividad metabólica más bajos se presentaron a los 15 °C. La velocidad de respiración mostró un comportamiento similar al de R_q , observándose un incremento gradual para las clonas a partir de los 15 °C hasta alcanzar sus valores máximos en 35 °C y su posterior disminución a los 45 °C. La máxima tasa de R_q a 35 °C para la LC15, LC24b, LC23b, LC26s fue de 20.5, 14.3, 18.3 y 14. $\mu W mg^{-1} PS$ respectivamente. Las tres primeras clonas no presentaron diferencias significativas, mientras la LC15s fue estadísticamente superior al resto de las clonas (Tukey, $P < 0.05$). En este mismo orden la producción de R_{CO_2} fue de 0.54, 0.47, 0.42, 0.42, y $nmol mg^{-1}s^{-1}$ respectivamente. Entre las dos primeras líneas clonales no existió diferencia significativa, al igual que entre las últimas tres (Tukey, $P < 0.05$).

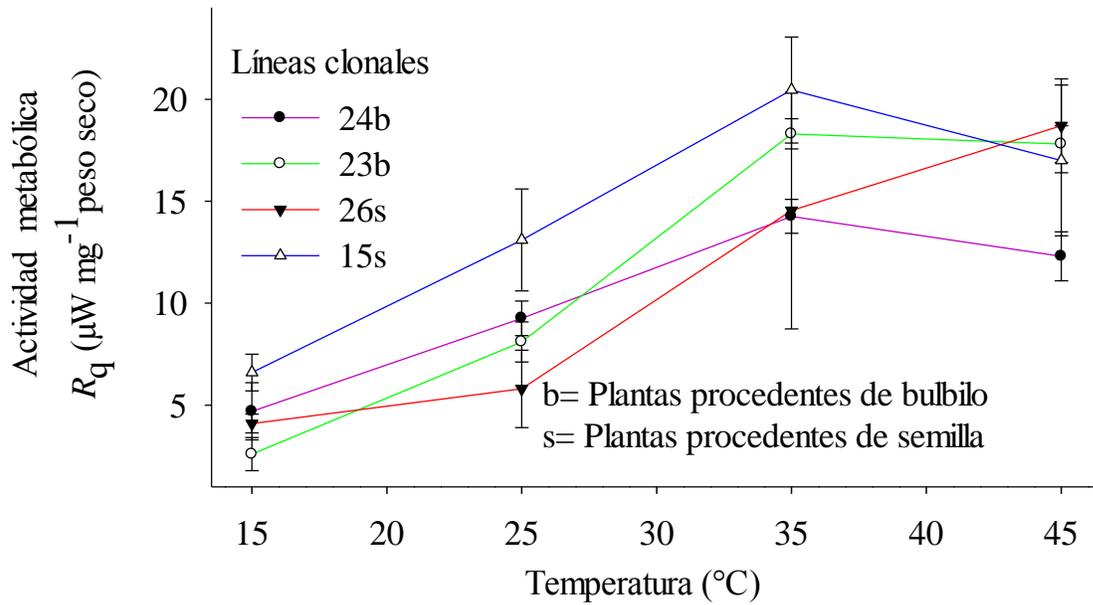


Figura 7. Efecto de la temperatura en la actividad metabólica de cuatro líneas clonales de *Agave angustifolia*. Barra vertical corresponde a la desviación estándar. Prueba de Tukey a una $P < 0.05$.

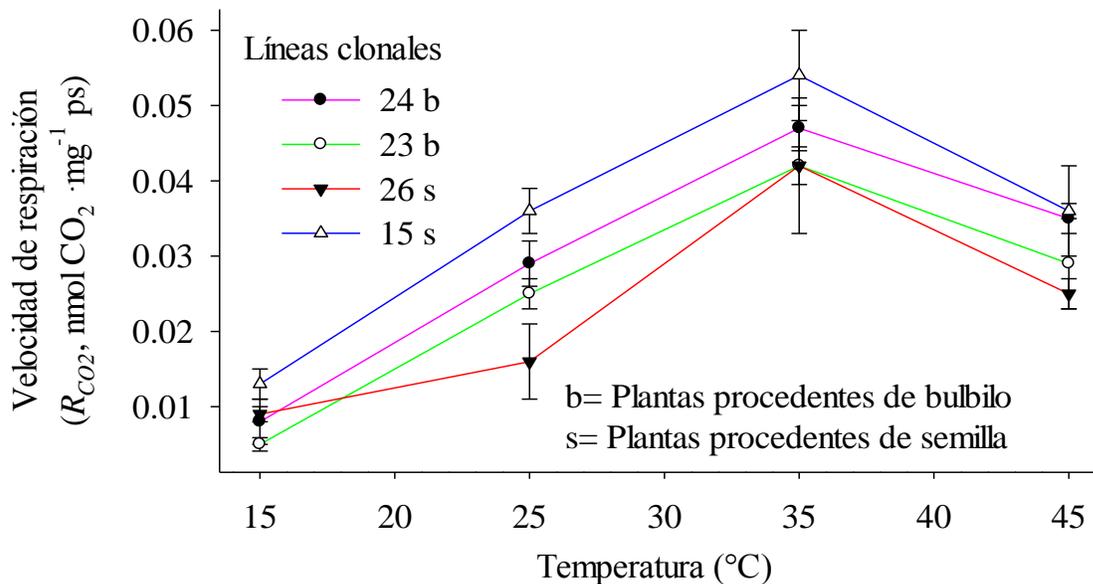


Figura 8. Velocidad de producción de CO_2 de cuatro líneas clonales de *Agave angustifolia* por efecto de la temperatura. Barra vertical corresponde a la desviación estándar. Prueba de Tukey a una $P < 0.05$.

VII.1.2. Eficiencia metabólica (R_q / R_{CO_2})

En la Figura 9 se muestran los valores de R_q / R_{CO_2} obtenidos para las cuatro líneas clonales a diferentes temperaturas, las cuales presentaron mayor eficiencia entre los 25 y 35 °C. A la temperatura de 25 °C todas las líneas clonales indicaron ser altamente eficientes con valores promedio por debajo de 400 kJmol^{-1} . Aún a la temperatura de 35 °C todas las clonas fueron eficientes sobresaliendo la LC24b con un valor de 300 kJmol^{-1} . La eficiencia mostrada por la LC23b, LC26s y LC15s a dicha temperatura fue: 446, 407 y 377 kJmol^{-1} respectivamente. Sin embargo, a 45 °C la única línea clonal que se mantuvo eficiente fue la LC24b con un valor de 347 kJmol^{-1} . En tanto que el resto de las líneas clonales LC23b, LC26s y LC15s, rebasaron el umbral de eficiencia (455 kJmol^{-1}) con valores de 620, 745 y 472 kJmol^{-1} respectivamente.

A los 15 °C todas las líneas clonales mostraron ser ineficientes en la conversión de sustratos de carbono a biomasa. En dicha temperatura los valores promedio encontrados para la LC24b, LC23b, LC26s y LC15s fueron: 554, 597, 459 y 512 kJmol^{-1} respectivamente. Estadísticamente la LC24b mostró diferencias significativas con el resto de las clonas, al presentar la mayor eficiencia metabólica (Tukey, $P < 0.05$).

VII.1.3. Tasa de crecimiento específico ($R_{ce}, \Delta H_B$)

La temperatura de máximo crecimiento para la LC24b, LC26s y LC15s se encontró a 35 °C con valores de 7.4, 4.7 y 4.3 $\mu\text{W mg}^{-1}$ PS respectivamente. En tanto que para la LC23b su máximo crecimiento fue a los 25 °C con un valor de 0.9 $\mu\text{W mg}^{-1}$ PS. Sin embargo, a 45 °C el crecimiento de los agaves de las cuatro líneas clonales disminuye significativamente (Figura 10). La estadística indica que la LC24b tiene una tasa de crecimiento altamente significativa con respecto al resto de las clonas (Tukey, $P < 0.05$).

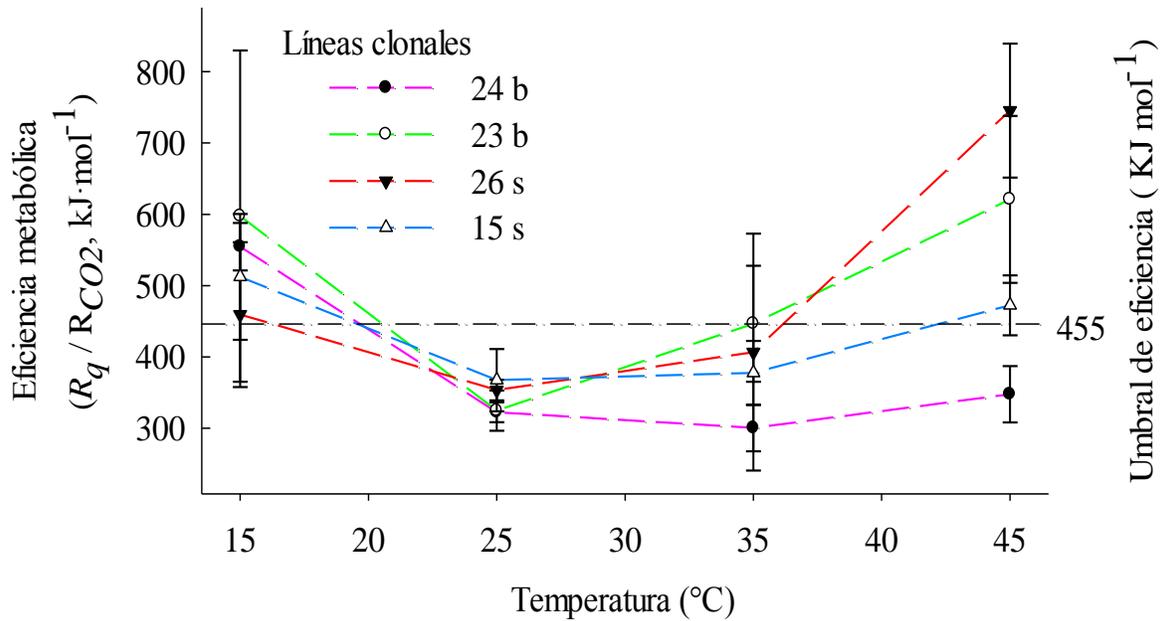


Figura 9. Eficiencia metabólica de cuatro líneas clonales de *Agave angustifolia* por efecto de la temperatura y en base constante de Thornton (455 kJmol⁻¹). Barra vertical corresponde a la desviación estándar. Prueba de Tukey a una P<0.05.

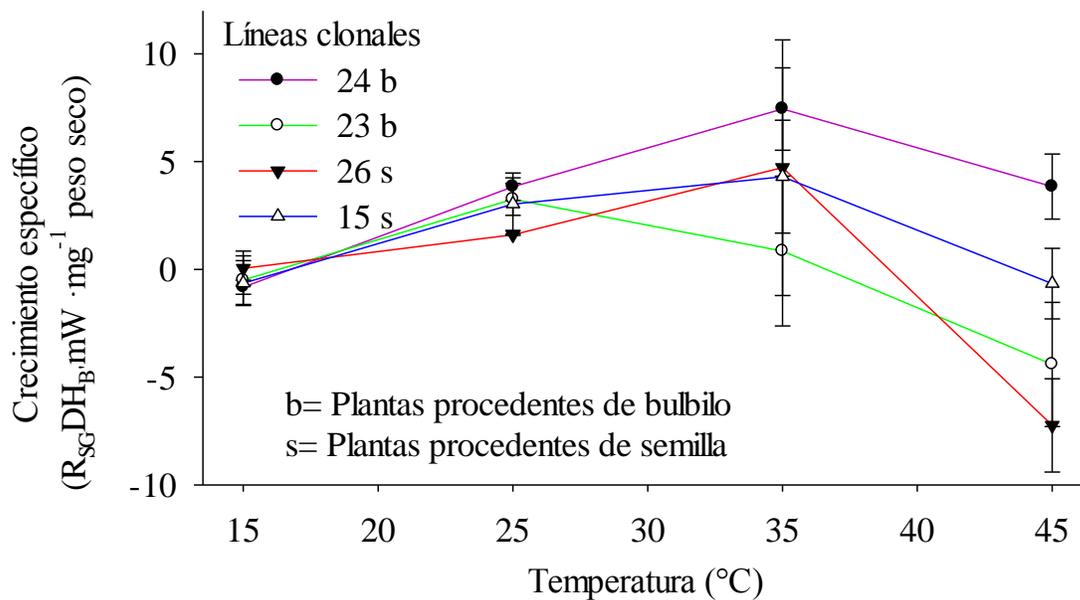


Figura 10. Tasa de crecimiento específico de cuatro líneas clonales de *Agave angustifolia* por efecto de la temperatura. Barra vertical corresponde a la desviación estándar. Prueba de Tukey a una P<0.05.

VII.2. Parámetros Morfológicos

Los resultados de los parámetros morfológicos de las líneas clonales en estudio se pueden observar en las Tablas IV a VII. Se presentaron diferencias significativas entre líneas clonales, pero no entre las fases de crecimiento C3 y C2 (Tukey, $P < 0.05$).

VII.2.1. Altura

Considerando todas las fases de crecimiento el porcentaje de incremento de altura fue de 8.2, 15.8, 18.4 y 27.9 % en la LC26s, LC15s, LC24b y LC23b, respectivamente. No existió diferencia significativa entre la LC24b y LC26s, pero sí en la LC23b que presentó el mayor incremento y la LC26S que presentó el menor (Tukey, $P < 0.05$) (Figura 11). Se observó aumento de altura en todas las líneas clonales, aunque con un comportamiento disímil entre ellas.

De forma independiente, las vitroplantas en fase C2 presentaron un porcentaje de incremento de altura superior a la fase C3 en todas las líneas clonales como se observa en la Figura 12 y 13. La LC23b fue la que presentó el mayor porcentaje de incremento de altura para ambas fases de crecimiento, $18.3 \pm 13.8\%$ y $37.4 \pm 22.0\%$ para vitroplantas C3 y C2 respectivamente. Sin embargo, la Prueba de Tukey ($P < 0.05$) indica que no existen diferencias significativas entre las fases de crecimiento.

VII.2.2. Número de hojas

El porcentaje de incremento de hojas emitidas en forma conjunta fue de 31.9, 38.4, 38.5 y 69.6% correspondiente a la LC15s, LC26s, LC23b y LC24b, respectivamente. El porcentaje de hojas emitidas fue estadísticamente mayor para la LC24b como se observa en la Figura 11. Para esta línea clonal se registró de forma general un número de hojas $T_0 = 3.5$ y un $T_F = 5.7$ con un incremento de 2.2 hojas. Entre las tres primeras clonas no hubo diferencias significativas,

por lo que la LC24b fue superior a todas las clonas en la producción de hojas por más del 40% (Tukey, $P < 0.05$).

La producción de hojas fue superior en la fase C2 en todas las líneas clonales excepto en la LC15s que presentó un porcentaje de incremento de $40.8 \pm 21.5\%$ para vitroplantas C3 y un 33.3 ± 20.4 para C2 (Figuras 12 y 13).

VII.2.3. Peso seco y peso fresco

El incremento promedio para el peso fresco (%) en todas las fases de crecimiento fue de 8.94, 17.0, 20.40 y 53.83 % para la LC26s, LC24b, LC15s y LC23b, respectivamente. Entre las tres primeras líneas clonales no existió diferencia significativa. El mayor incremento de peso fresco en forma conjunta se observó en la LC23b siendo disímil al resto de las clonas (Tukey, $P < 0.05$), con valores de 38.28 ± 53.70 % en fase C3 y 69.40 ± 37.54 % en fase C2. El menor incremento lo presentó la LC26s con un comportamiento desigual en las fases de crecimiento, ya que en las vitroplantas C2 se incrementó el peso fresco, mientras que en las C3 hubo una disminución de -1.02 ± 15.47 % (Figuras 11, 12 y 13).

Para el análisis de peso seco se consideró el T_F , ya que para determinar este parámetro se emplea un método destructivo del material vegetal que impidió tener como referencia el valor en T_0 . El mayor peso seco registrado en todas las fases de crecimiento lo presentaron la LC23b y la LC24b con valores similares de 0.0399 g y 0.0365 g, respectivamente (Tukey, $P < 0.05$). La LC24b fue superior en la fase de crecimiento C2, mientras que la LC23b fue superior en la fase C3. Los menores valores de peso seco fueron 0.0282 g para la LC15s y 0.0266 g para la LC26s.

El mayor contenido de MS general fue para la LC24b con un 14.6 %, seguido de la LC23b con 13.35%. No obstante, de forma independiente la LC24b ocupó la tercera posición de %MS en las vitroplantas fase C3, pero conservó el valor más alto para las C2 con 20.43 %MS. Todas las líneas clonales presentaron un comportamiento similar, las vitroplantas en fase C2 presentaron %MS más altos que los individuos en fase C3, excepto en la LC23b donde el %MS fue ligeramente mayor en la fase C3 con 13.58 %MS respecto a 13.11 %MS en

las vitroplantas C2. El %MS en la LC23b resultó ser más equilibrado que el resto de las clonas, incluyendo la LC24b que obtuvo el %MS más elevado (Figura 14).

VII.3. Factor de Multiplicación

La LC24b fue estadísticamente superior al resto de las clonas con respecto al factor de multiplicación (FM) con un valor de 2.6, mientras que las otras líneas clonales presentaron valores similares de 1.4 para la LC26s y LC23b y 1.3 para la LC15s (Tukey, $P < 0.05$). La LC24b también presentó el FM más alto en cada fase de crecimiento: 3.5 para C1, 2.8 para C2 y 1.6 para C3 (Figura 15). El resto de las clonas presentó valores de FM por debajo de 1.5 en todas las fases de crecimiento. La línea más productiva fue la LC24b y el porcentaje de distribución de las plantas fue 53.5 para C1, 20.1 para C2, 21.8 para C3 y 4.7 para E1 (Figura 16). La clona con mayor porcentaje de plantas para enraizamiento fue la LC23b con 39.2%, seguida de la LC26s con 34.2%. La LC24b ocupó el último sitio para vitroplantas con talla para enraizar con un 14% (Tabla VIII).

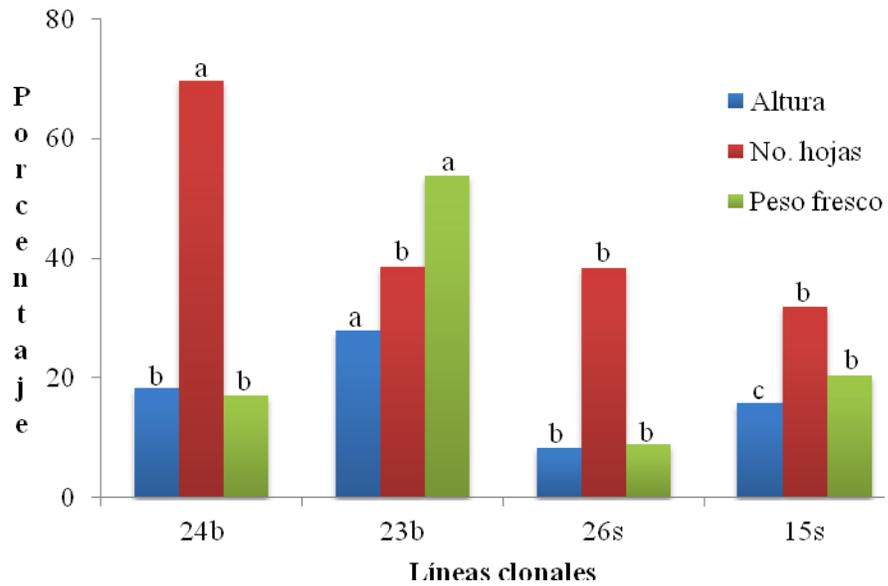


Figura 11. Incremento en altura, número de hojas y peso fresco de las vitroplantas de *Agave angustifolia* en fase C3y C2 de las líneas clonales (Tukey, P<0.05).

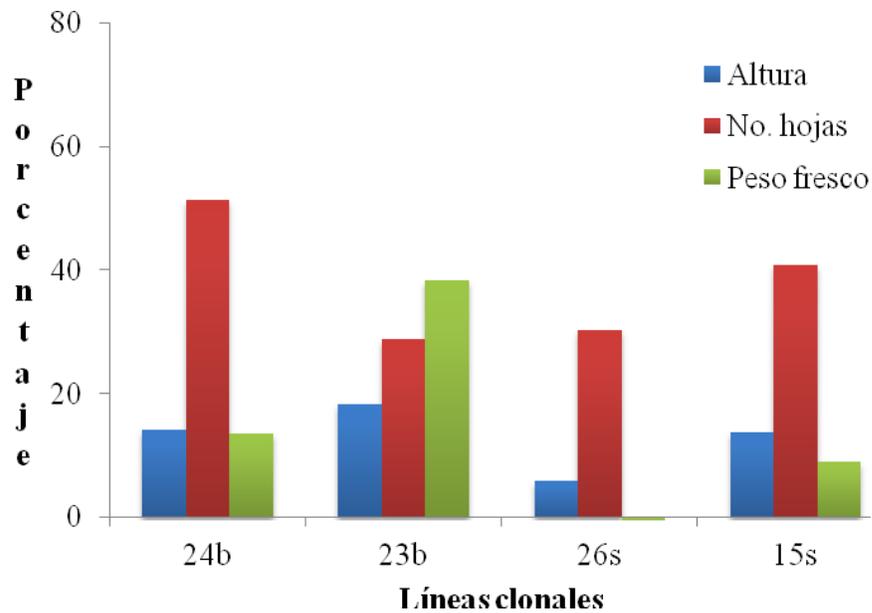


Figura 12. Incremento en altura, número de hojas y peso fresco en vitroplantas de *Agave angustifolia* en fase C3 de las líneas clonales.

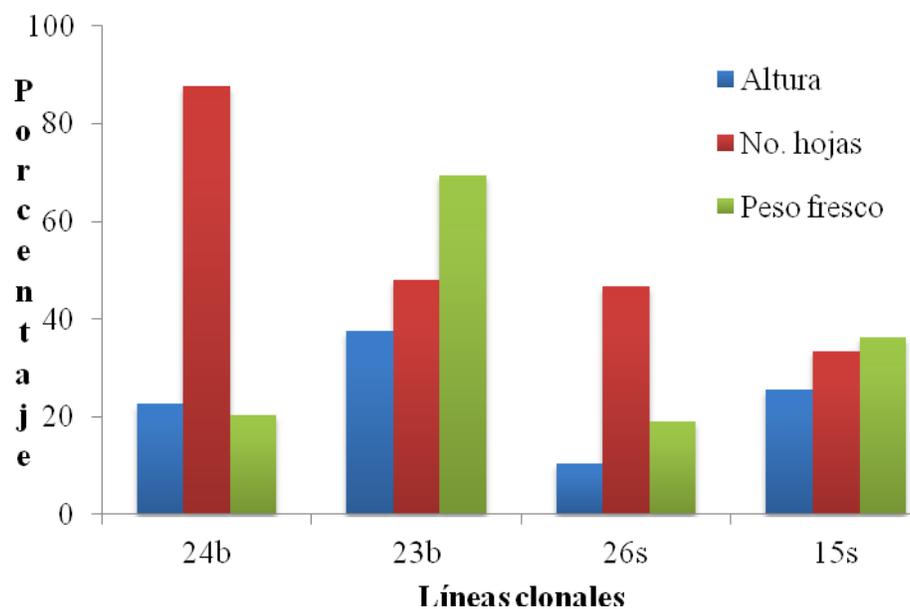


Figura 13. Incremento en altura, número de hojas y peso fresco en vitroplantas de *Agave angustifolia* en fase C2 de las líneas clonales.

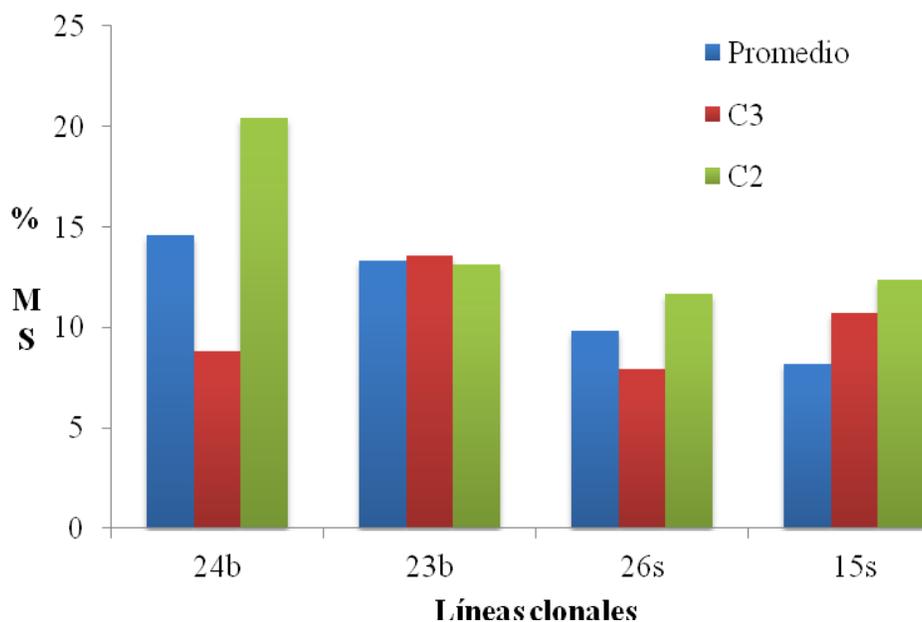


Figura 14. Producción de materia seca (%MS) de las cuatro líneas clonales de *Agave angustifolia*.

Tabla IV. Altura de las cuatro líneas clonales de agave LC15s, LC26s, LC24b y LC23b. Los valores corresponden al promedio y la desviación estándar de 15 muestras. Promedios con la misma letra no son significativamente diferentes según prueba de Tukey a una $P < 0.05$. T_o = Tiempo inicial, T_F = Tiempo final, I = Incremento ($T_F - T_o$), $\%I$ = Porcentaje de incremento.

Línea clonal	Fase	Parámetro morfológico				
		Altura				Tukey ($P < 0.05$)
		T_o (cm)	T_F (cm)	I (cm)	$\%I$	
LC15s	C3	4.0±0.3	4.5±0.5	0.5±0.3	13.7±8.3	
	C2	2.5±0.6	3.2±0.7	0.6±0.3	25.5±14.2	
	General	2.3	2.7	0.5	15.8	b
LC26s	C3	4.5±0.4	4.7±0.4	0.3±0.2	6.0±4.9	
	C2	2.8±0.4	3.1±0.5	0.3±0.3	10.5±11.6	
	General	3.7	3.9	0.3	8.2	c
LC24b	C3	4.2±0.4	4.7±0.6	0.6±0.5	14.1±10.8	
	C2	2.7±0.5	3.3±0.5	0.6±0.3	22.6±12.5	
	General	3.4	4.0	0.6	18.4	b
LC23b	C3	4.0±0.6	4.7±0.7	0.7±0.5	18.3±13.8	
	C2	2.8±0.3	3.8±0.6	1.0±0.6	37.4±22.0	
	General	3.4	4.3	0.9	27.9	a

Tabla V. Número de hojas de las cuatro líneas clonales de agave LC15s, LC26s, LC24b y LC23b. Los valores corresponden al promedio y la desviación estándar de 15 muestras. Promedios con la misma letra no son significativamente diferentes según prueba de Tukey a una $P < 0.05$. T_o = Tiempo inicial, T_F = Tiempo final, I = Incremento ($T_F - T_o$), $\%I$ = Porcentaje de incremento.

Línea clonal	Fase	Parámetro morfológico				Tukey ($P < 0.05$)
		Número de hojas				
		T_o (cm)	T_F (cm)	I (cm)	$\%I$	
LC15s	C3	3.5±0.6	4.8±0.7	1.3±0.6	40.8±21.5	
	C2	3.4±0.5	4.5±0.5	1.1±0.6	33.3±20.4	
	General	2.5	3.3	1.0	31.9	b
LC26s	C3	3.9±0.7	4.9±0.7	1.1±0.7	30.2±21.4	
	C2	2.5±0.6	3.5±0.6	1.0±0.8	46.7±35.7	
	General	3.2	4.2	1.0	38.4	b
LC24b	C3	4.1±0.6	6.1±1.2	2.1±1.0	51.3±22.3	
	C2	2.9±0.6	5.3±1.2	2.4±0.9	87.8±43.3	
	General	3.5	5.7	2.2	69.6	a
LC23b	C3	4.5±0.7	5.7±0.8	1.2±0.7	28.9±20.2	
	C2	3.7±0.7	5.5±1.1	1.7±0.9	48.1±27.0	
	General	4.1	5.6	1.5	38.5	b

Tabla VI. Peso fresco de las cuatro líneas clonales de agave LC15s, LC26s, LC24b y LC23b. Los valores corresponden al promedio y la desviación estándar de 15 muestras. Promedios con la misma letra no son significativamente diferentes según prueba de Tukey a una $P < 0.05$. T_o = Tiempo inicial, T_F = Tiempo final, I = Incremento ($T_F - T_o$), $\%I$ = Porcentaje de incremento.

Línea clonal	Fase	Parámetro morfológico				
		Peso fresco				Tukey ($P < 0.05$)
		T_o (g)	T_F (g)	I (cm)	$\%I$	
LC15s	C3	0.34±0.07	0.37±0.07	0.03±0.05	9.08±15.88	
	C2	0.16±0.07	0.23±0.10	0.06±0.07	36.23±33.68	
	General	0.19	0.22	0.05	20.40	b
LC26s	C3	0.46±0.08	0.46±0.08	-0.01±0.06	-1.02±15.47	
	C2	0.14±0.04	0.17±0.05	0.03±0.03	18.91±24.11	
	General	0.30	0.31	0.01	8.94	b
LC24b	C3	0.46±0.10	0.52±0.13	0.06±0.06	13.61±14.01	
	C2	0.21±0.08	0.24±0.08	0.03±0.06	20.43±24.05	
	General	0.3	0.4	0.0	17.0	b
LC23b	C3	0.47±0.14	0.62±0.21	0.16±0.17	38.28±53.70	
	C2	0.24±0.06	0.40±0.11	0.16±0.08	69.40±37.54	
	General	0.35	0.51	0.16	53.84	a

Tabla VII. Peso seco de las cuatro líneas clonales de agave LC15s, LC26s, LC24b y LC23b. Los valores corresponden al promedio y la desviación estándar de 15 muestras. Promedios con la misma letra no son significativamente diferentes según prueba de Tukey a una $P<0.05$. T_F =Tiempo final, PF=Peso fresco, PS= Peso seco, %MS= Porcentaje de materia seca.

Línea clonal	Fase	Parámetro morfológico			
		Peso seco			Tukey ($P<0.05$)
		T_F (g)	PF/PS	%MS	
LC15s	C3	0.0359±0.0051	10.22±1.49	10.75	
	C2	0.0205±0.0077	11.09±2.76	12.34	
	General	0.0282	10.83	8.19	b
LC26s	C3	0.0367±0.0069	12.42±1.02	7.94	
	C2	0.0165±0.0052	10.09±2.02	11.70	
	General	0.0266	11.70	9.82	b
LC24b	C3	0.0403±0.0103	12.87±1.02	8.83	
	C2	0.0327±0.0601	7.32±24.05	20.43	
	General	0.0365	10.39	14.6	a
LC23b	C3	0.0486±0.0143	12.80±2.28	13.58	
	C2	0.0311±0.0080	12.90±2.25	13.11	
	General	0.0399	12.84	13.35	a

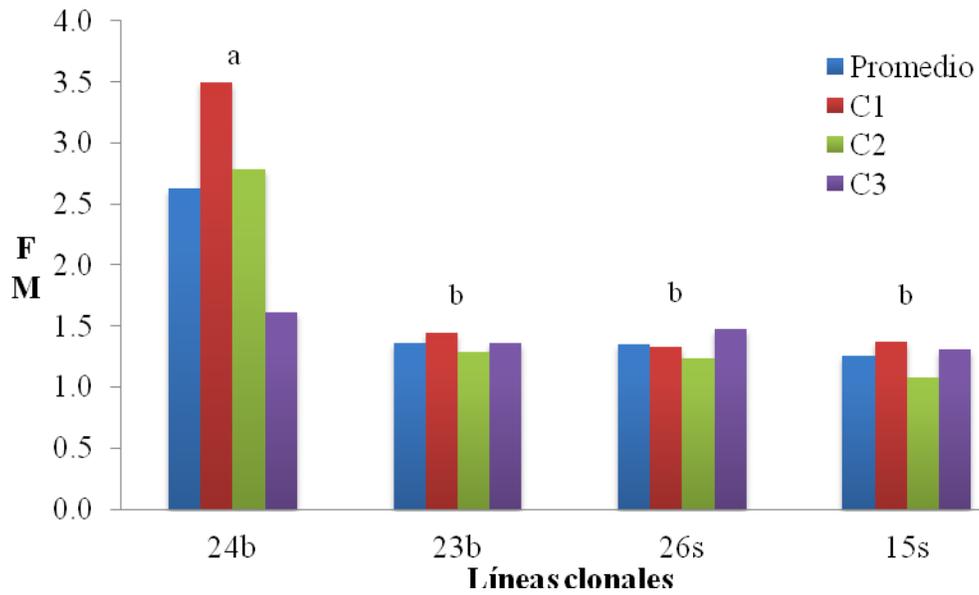


Figura 15. Factor de multiplicación de vitropplantas de *Agave angustifolia* de las cuatro líneas clonales por fase de crecimiento C1, C2 y C3. (Tukey, P<0.05).

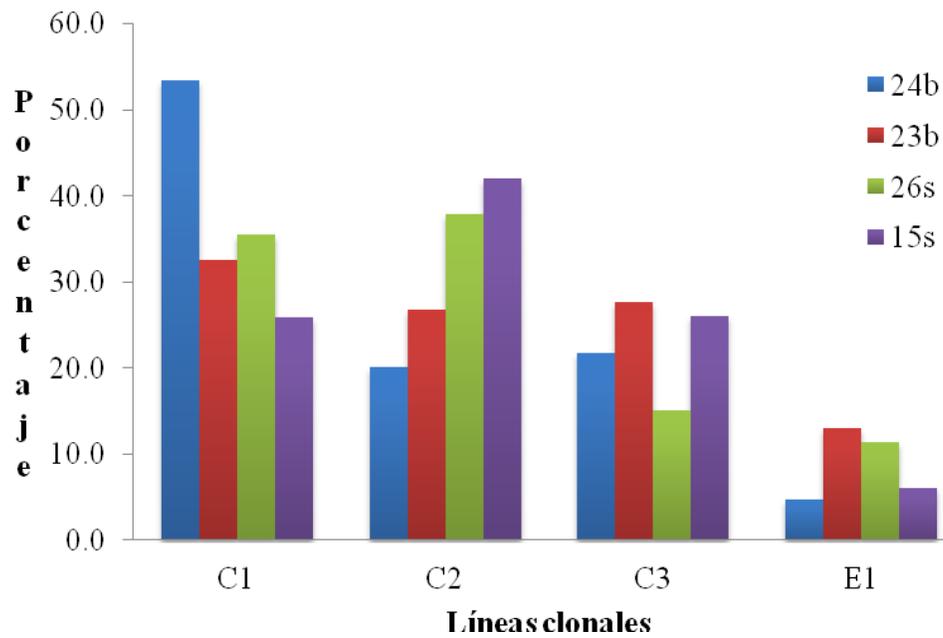


Figura 16. Distribución de las vitropplantas de agave por fase de crecimiento y línea clonal.

Tabla VIII. Factor de multiplicación (FM) de las cuatro líneas clonales de agave LC15s, LC26s, LC24b y LC23b. Prueba de Tukey a una $P < 0.05$.

Línea clonal	Fase	No. Inical plantas	Factor de multiplicación										Tukey (P<0.05)
			No. de plantas por fase					Porcentaje por fase					
			C1	C2	C3	E1	TOTAL	FM	C1	C2	C3	E1	
LC15s	C1	75	48	50	5	0	103	1.4	46.6	48.5	4.9	0.0	b
	C2	75	6	62	13	0	81	1.1	7.4	76.5	16.0	0.0	
	C3	75	23	1	56	18	98	1.3	23.5	1.0	57.1	18.4	
	TOTAL	225	77	113	74	18	282	1.3	25.8	42.0	26.0	6.1	
LC26s	C1	75	58	40	2	0	100	1.3	58.0	40.0	2.0	0.0	b
	C2	75	16	66	11	0	93	1.2	17.2	71.0	11.8	0.0	
	C3	75	35	3	35	38	111	1.5	31.5	2.7	31.5	34.2	
	TOTAL	225	109	109	48	38	304	1.4	35.6	37.9	15.1	11.4	
LC24b	C1	75	182	76	4	0	262	3.5	69.5	29.0	1.5	0.0	a
	C2	75	121	55	33	0	209	2.8	57.9	26.3	15.8	0.0	
	C3	75	40	6	58	17	121	1.6	33.1	5.0	47.9	14.0	
	TOTAL	225	343	137	95	17	592	2.6	53.5	20.1	21.8	4.7	
LC23b	C1	75	64	41	3	0	108	1.4	59.3	38.0	2.8	0.0	b
	C2	75	21	41	35	0	97	1.3	21.6	42.3	36.1	0.0	
	C3	75	17	0	45	40	102	1.4	16.7	0.0	44.1	39.2	
	TOTAL	225	102	82	83	40	307	1.4	32.5	26.7	27.7	13.1	

VIII. DISCUSIÓN

Agave angustifolia es una especie de gran importancia ecológica y económica en Sonora. Sin embargo, existen pocas investigaciones orientadas a generar conocimiento sobre su biología y ecología, por lo que es necesario incrementar los esfuerzos en investigación para esta especie. Además, es relevante señalar que hay escasos registros sobre calorimetría aplicada a los tejidos vegetales de agave.

Los parámetros calorimétricos analizados en este estudio mostraron diferencias estadísticas en las líneas clonales de agave. El calor metabólico y la producción de CO₂ de las clonas se incrementó significativamente a medida que se aumentó la temperatura. Los resultados indican que la temperatura óptima para el desarrollo de las vitroplantas de agave oscila entre los 25 y 45 °C, siendo los 35 °C la temperatura a la que presentan la mayor actividad metabólica, lo cual concuerda con las tasas de producción de calor metabólico y CO₂ reportados para otros tejidos vegetales (Carvajal-Millán et al., 2007; Gardea et al., 1994, 2000; Ochoa, 2007).

Las temperaturas extremas afectan la distribución, sobrevivencia y crecimiento de las plantas. Los datos obtenidos, indican que las bajas temperaturas disminuyen la actividad metabólica y la velocidad de respiración de las cuatro líneas clonales de agave lo que señala que temperaturas menores a 15 °C ponen en riesgo el adecuado funcionamiento y desarrollo de la especie.

Ochoa (2007) determinó mediante calorimetría isotérmica a 25 °C los valores de R_q y R_{CO₂} en vitroplantas de agave de la LC15s y LC24b de plantas aclimatadas empleando el meristemo apical como muestra. No encontró diferencias significativas en las variables de calorimetría. Los valores registrados para estos parámetros calorimétricos fueron inferiores a los obtenidos en el presente estudio, lo cual sugiere que las vitroplantas en fase de multiplicación cultivadas en laboratorio muestran metabolismos más rápidos que las vitroplantas endurecidas. Esta drástica disminución de la actividad metabólica en plantas aclimatadas, posiblemente se debe a que las vitroplantas se ven favorecidas por las condiciones controladas de luz, humedad y temperatura en el laboratorio, mientras que en aclimatación, las plántulas de agave tienen que modificar sus mecanismos para poder desarrollarse en condiciones menos favorables.

Hansen et al. (1998) reportaron que el valor que representa la mínima eficiencia del tejido vegetal es de 455 ± 15 Kcal/mol CO₂ (Constante de Thornton), es decir, valores mayores que esta constante se consideran de baja eficiencia, mientras que los valores menores o iguales a la constante se determinan como de alta eficiencia metabólica. A la temperatura de 25 °C todas las líneas clonales mostraron ser altamente eficientes, puesto que presentaron una baja pérdida de calor por mol de CO₂ lo que indica que la cantidad de energía utilizada para biomasa estructural es mayor (Hansen et al., 1996).

Con las bajas temperaturas todas las líneas clonales mostraron ser ineficientes en la conversión de sustratos de carbono a biomasa, a estas temperaturas la pérdida de calor o gasto energético fue mayor de 455 kJmol^{-1} para la formación de CO₂ en biomasa. *A. angustifolia* se ha adaptado bien a la sierra sonorensis, pero las bajas temperaturas son un aspecto limitante importante en su desarrollo y en la germinación de semillas. A 8 °C la tasa germinativa disminuye considerablemente y puede incrementarse en temperaturas en el rango de 18 a 22 °C (Nobel y Stanley, 1983).

La mayoría de los agaves pueden tolerar las temperaturas frías cuando la temperatura del aire se reduce de manera gradual entre días o semanas. Las temperaturas frías por debajo del nivel de congelamiento inducen a los agaves a liberar calor por un proceso denominado actividad exotérmica. Ésta conduce al agave a un fenómeno temporal llamado sobreenfriamiento, que consiste en mantener el agua de la planta en estado líquido por medio del incremento de la temperatura del tejido, suficiente para derretir los cristales de hielo formados en las paredes celulares. Si la temperatura continúa decreciendo puede ocurrir un daño irreversible en la planta, incluso la muerte, principalmente por la deshidratación de las células. Una adaptación importante de los agaves a las bajas temperaturas es el incremento de azúcares con la finalidad de proteger elementos constituyentes celulares durante la exposición a las temperaturas de congelamiento (Nobel, 1994).

Con las altas temperaturas (45 °C) todas las clonas dejaron de ser eficientes a excepción de la LC24b que continuó siendo altamente eficiente con un valor muy inferior a la constante de Thornton. La alta eficiencia metabólica de esta línea clonal puede atribuirse al componente genético transmitido por la planta madre que define las características de la clona. Si consideramos el fundamento de la propagación clonal, la selección de la planta madre con

las características deseables, por ejemplo una adaptación a condiciones ambientales específicas, de inicio contamos con una base sólida para un éxito en el trasplante.

Hadley (1970) argumenta que la temperatura en la superficie del suelo es alrededor de 30 °C más alta que en el aire circundante en un día de verano. En casos extremos las temperaturas del suelo alcanzan los 70 °C en el desierto sonoreño, afectando de manera crucial la sobrevivencia de las plantas recién germinadas. Aunque se ha demostrado que los agaves con la edad, llegan a ser más tolerantes con las altas temperaturas.

Los resultados indican que los rangos de temperatura ambiental donde puede sobrevivir exitosamente la LC24b son más amplios que el resto de las líneas clonales, ya que se comporta altamente eficiente desde los 25 hasta los 45 °C. Esta clona mostró la menor pérdida de calor por mol de CO₂ y esta característica le permite mayor capacidad de sobrevivencia y por lo tanto ser plantada con éxito en zonas con temperatura de hasta 45 °C que conforman el Área de Denominación de Origen. Esta tolerancia a las temperaturas altas se puede relacionar con los valores extremos de su hábitat de origen. En Sonora, *A. angustifolia* se desarrolla bien en zonas áridas con temperaturas extremas utilizando sus ventajas adaptativas (Nobel y Stanley, 1983; Cervantes-Mendivil et al., 2007; Vázquez-García et al., 2007). Mientras tanto la LC23b, LC26s y LC15s son más eficientes o su eficiencia en la conversión de sustratos de carbón en tejido estará limitada a zonas con temperaturas promedio entre 25 y 35 °C.

En estudios anteriores (Ochoa, 2007) se registraron valores de eficiencia para la LC15s y LC24b a una temperatura de 25 °C utilizando vitroplantas aclimatadas. Los resultados obtenidos se ubican dentro del umbral de eficiencia al igual que los valores registrados en este trabajo de investigación con vitroplantas en fase in vitro. Lo anterior indica un patrón de comportamiento similar entre las vitroplantas en fase de multiplicación y las que presentan un ciclo completo de aclimatación. Esto podría indicar que las condiciones de vivero aún con riego limitado, no reducen el crecimiento y desarrollo del agave y la adaptación de la especie a ambientes extremos. Esto propone que las diferencias de energía metabólica en la fase de multiplicación son detectables por microcalorimetría isotérmica, como lo han sugerido otras investigaciones para otras especies (Wang et al., 1985; Young, 1990).

En respuesta a condiciones severas de estrés ambiental, toda la energía disponible en el organismo se utiliza para responder a incremento en la demanda de los procesos de

mantenimiento y provoca como consecuencia una carencia de energía para la síntesis de biomasa (Gustafsson, 1991). De acuerdo a esta explicación, el crecimiento de las vitroplantas de agave empezó a disminuir después de alcanzar su máximo crecimiento a los 35 °C y se observó una mayor pérdida de energía en forma de calor, lo cual soporta la explicación de que poca energía se transfirió a biomasa. Esto demuestra que el crecimiento de la planta está influenciado grandemente por la temperatura. Esta variación en el crecimiento por efecto de la temperatura también fue reportada en estudios realizados en cultivos como tomate y col (Criddle et al., 1997).

El crecimiento y supervivencia de las plantas depende de su adaptación genética a los regímenes de temperatura presentes en su medio ambiente nativo (Criddle et al., 1997), ya que la temperatura es uno de los factores más determinantes de la distribución de las plantas. Estas adaptan su crecimiento a su nicho, adecuando su metabolismo respiratorio al patrón de temperatura del medio ambiente (Criddle et al., 2005). Es bien conocido que el crecimiento está influenciado por las condiciones ambientales, por ejemplo las plantas crecen más rápido cuando disponen de abundancia de agua y nutrientes, pero las tasas de crecimiento tienen también un importante componente genético.

Ochoa (2007) reportó valores de la tasa de crecimiento de vitroplantas aclimatadas de la LC15s y LC24b muy inferiores a los encontrados en este análisis. Lo cual sugiere que con el desarrollo, las vitroplantas de agave disminuyen la velocidad de crecimiento, debido a que utilizan su energía para tolerar las condiciones de vivero y, esta tolerancia implica un coste energético que supone un menor crecimiento pero a cambio tienen una mayor probabilidad de supervivencia.

Según los resultados obtenidos la línea con mayor eficiencia metabólica, mayor tasa de crecimiento y mayor rango de distribución respecto a la temperatura fue la denominada LC24b. Esto significa que dicha clona pierde pequeñas cantidades de energía durante la respiración oscura o fase oscura y esto le permite conservar mayor energía para ser usada en la formación de biomasa reflejada en mayor crecimiento (Hansen et al., 1995).

En varias especies de agave se ha observado que la acumulación de biomasa no puede ser explicada solamente por la asimilación de CO₂ o la eficiencia metabólica, sino que varía de acuerdo a la interacción del genotipo del agave con las condiciones ambientales. (Nobel, 1994). Existen algunas características morfológicas y fisiológicas que favorecen el

crecimiento más rápido, que supone una mayor capacidad competitiva y a medio plazo mayor supervivencia.

La morfología de la planta es la manifestación de la respuesta fisiológica de la misma a las condiciones ambientales y generalmente es fácil de cuantificar. La altura, número de hojas, peso fresco y peso seco presentaron diferencias estadísticas entre las líneas clonales. Se observó un aumento significativo de la altura en todas las clonas, siendo la LC23b la de mayor incremento. La LC24b fue la más productiva en cuanto al número de hojas emitidas. El mayor incremento de peso fresco lo registró la LC23b, mientras que el peso seco y el porcentaje de materia seca no mostraron diferencias entre la LC23b y LC24b.

Según lo datos obtenidos en calorimetría, se esperaba que los parámetros morfológicos ideales fueran representados por la LC24b. Sin embargo, esta clona ocupó la segunda posición en incremento de altura y la tercera posición en incremento de peso fresco. No obstante, fue la línea clonal más productiva en incremento de número de hojas, porcentaje de materia seca y la que presentó el mayor factor de multiplicación.

En la medición de los parámetros morfológicos se presentaron circunstancias contradictorias. Por ejemplo, que la LC24b tuviera una producción de hojas significativamente mayor al resto de las clonas, cuando el incremento del peso fresco no fue significativo. O bien, que la LC26s presentará disminución del peso fresco, pero tuviera un incremento de altura y número de hojas. Esto podría explicarse por el comportamiento que presentan las diferentes líneas clonales en el proceso de cultivo de tejidos. Se pueden encontrar diferentes impedimentos que permitan cumplir con todos los parámetros morfológicos, principalmente la existencia de factores microclimáticos específicos del cuarto de crecimiento o incubación.

Las diferencias de los parámetros podrían deberse a la variación de las condiciones ambientales dentro del cuarto de cultivo. A pesar de que dichas condiciones son controladas, dentro del cuarto de incubación se forman microclimas que confieren diferente respuesta de las líneas clonales por el acomodo espacial de los estantes en los que se ordenan las vitroplantas. El crecimiento y desarrollo de las diferentes líneas clonales depende de dos factores principales: 1) de la dirección y distancia de las vitroplantas al equipo de refrigeración que mantiene la temperatura constante y 2) la cercanía a las ventanas que permiten mayor exposición a la luz solar. Los anteriores puntos pueden influir en la absorción y acumulación

de agua en la planta, lo que puede provocar las diferencias de peso fresco de una resiembra a otra.

Las plantas cultivadas *in vitro* pueden presentar un aspecto robusto y vigoroso como los individuos de la LC23b y, sin embargo, no ser capaces de comportarse adecuadamente en el campo como lo sugieren Coronel (2010), Téllez (2010) y Pérez (2010) para esta clona en particular, ya que durante su cultivo en el laboratorio las condiciones de humedad, luz y nutrientes son óptimas, situación raramente encontrada en su medio natural.

Es difícil determinar qué medir y utilizar para complementar los datos calorimétricos, teniendo en cuenta los numerosos atributos morfológicos y, además, fisiológicos que afectan el comportamiento en el laboratorio y el campo, pero una vez identificados permitirán definir la línea clonal elite, que incluye todas las características morfológicas y fisiológicas que se pueden ligar cuantitativamente con el éxito de la planta, es decir, que permitan su supervivencia y crecimiento.

Pérez (2010), Coronel (2010) y Téllez (2010) evaluaron el comportamiento de 1000 individuos de las cuatro líneas clonales en estudio bajo condiciones de agostadero en los municipios de Banámichi, Ures y Suaqui Grande en el estado de Sonora. Monitorearon *in situ* las variables de talla, número de hojas y cobertura, así como los factores bióticos y abióticos que afectan su adaptación. Los resultados indicaron una adaptación positiva de todas las clonas en los tres sitios evaluados. Sin embargo, la LC24b fue la que respondió mejor a las condiciones ambientales en las áreas de estudio.

Coronel (2010) reportó el mayor crecimiento para la LC24b con 10.5 cm, mientras que la menor talla la presentó la LC23b. Con respecto al incremento del número de hojas no hubo diferencias significativas, pero la LC24b presentó el mayor incremento con 1.4 hojas y el menor se registró para la clona 23b. La cobertura promedio total incrementó significativamente entre las clonas, siendo la LC24b con una mayor cobertura final de 429.1 cm². En cuanto a la sobrevivencia el porcentaje más alto lo obtuvo también la LC24b con 98% y el más bajo la LC23b con 84%.

Por su parte, Telléz (2010) registró un comportamiento de las líneas clonales similar al de Coronel (2010). Los valores más altos se observaron para la LC24b con 8.6 cm de crecimiento, 0.9 incremento en el número de hojas y 95% de sobrevivencia. No obstante, Pérez (2010) difirió con los resultados anteriores encontrando que la LC15s fue la que mejor

respondió a las condiciones ambientales, lo que pudo deberse a los factores bióticos y abióticos prevalecientes en el área de estudio.

Las investigaciones anteriores reafirman los datos obtenidos en el análisis de microcalorimetría isotérmica aplicada a las líneas clonales de agave, debido a que el crecimiento en talla, hojas y cobertura es el resultado de una alta eficiencia metabólica.

Si se relacionan los datos calorimétricos con los parámetros morfológicos obtenidos en este trabajo, además de considerar la evaluación morfológica en campo para las cuatro líneas clonales registrada en otras investigaciones (Coronel, 2010; Téllez, 2010; Pérez, 2010), se podría establecer que las mediciones más representativas y que aportaron mayor información para apoyar la calorimetría de las plantas de agave en la fase *in vitro* son el número de hojas, el peso seco y el factor de multiplicación.

El número de hojas es un parámetro importante en la tasa de crecimiento, puesto que una planta que invierte más en tejido foliar tendrá un crecimiento más rápido. Si una planta invierte una mayor asignación de biomasa a hojas, con la consecuente mayor capacidad para captar luz y dióxido de carbono, redundará en una mayor tasa de crecimiento.

Por otra parte, la LC24b no presentó el mayor peso fresco ni la mayor altura, pero sus recursos también fueron utilizados para la formación de biomasa estructural expresada en brotes laterales. Las vitroplantas se pesaron de forma individual, es decir, sin brotes. Lo anterior compensa el menor peso y altura en comparación con otras clonas. El factor de multiplicación de esta línea clonal fue superior al resto de las clonas con más del 40% de producción de brotes. De esta manera se garantiza la producción de un gran número de individuos de agave, con una alta eficiencia metabólica y alta tasa de crecimiento.

Se esperaba encontrar un mejor comportamiento de las clonas provenientes de bulbito, puesto que éstas muestran un mejor desarrollo en las fases del proceso de micropropagación. No obstante, las líneas provenientes de bulbito presentaron comportamientos diferentes, ya que la LC24b generó la mejor respuesta en los diferentes parámetros medidos, mientras que la LC23b resultó ser más sensible a las temperaturas extremas registrando una baja eficiencia metabólica y baja tasa de crecimiento, tanto en vitroplantas en fase de multiplicación como en vitroplantas establecidas en campo.

La diferente respuesta de las líneas clonales al efecto de la temperatura se puede atribuir a sus características genotípicas, ya que se han registrado altos niveles de variabilidad

genética dentro de las poblaciones de la región serrana de Sonora de donde provienen las clonas en estudio (Barraza et al., 2006). Además, se ha demostrado que existe variabilidad genética entre las vitroplantas de *A. angustifolia* correspondiente a una misma línea clonal, parte de la cual es inducida por el sistema de cultivo in vitro (Robert et al., 2007). También se ha probado que la presencia de variabilidad genética es mayor en las clonas establecidas a partir de bulbilo que de semilla. Se encontraron valores del índice de similitud en bulbilo de 0.61 y 0.96, un rango mayor al de semilla, el cual varió 0.85 y 0.97. La proporción de fragmentos polimórficos también fue mayor en bulbilo que en semilla. Esto indica que las clonas originadas por semilla son genéticamente similares entre sí que a las derivadas de bulbilo (Verdugo, 2011).

Las diferencias detectadas en los valores de R_q y R_{CO_2} indican que la técnica de microcalorimetría isotérmica constituye una herramienta altamente sensible para medir los cambios metabólicos de este tejido vegetal y predecir su rendimiento y crecimiento en el campo.

La micropropagación, además de producir un gran número de plantas, tiene como objetivo generar plantas de mayor calidad y eficiencia. Esto implica la definición de una línea clonal elite, así como la mejor manera de evaluarla. Una opción factible es la microcalorimetría isotérmica complementada con evaluación de parámetros morfológicos y fisiológicos.

En este caso, aunque los resultados morfológicos obtenidos en el laboratorio no siempre mostraron diferencias significativas hacia una clona en particular, los resultados correspondieron con los obtenidos en campo en anteriores investigaciones. Lo antes mencionado confirma la utilidad de la técnica calorimétrica para determinar las líneas clonales elite y la selección temprana de agaves de alto rendimiento. De esta manera, se puede hacer más eficiente el proceso de micropropagación.

Los resultados de este estudio constituyen una herramienta base para evaluar el comportamiento de las líneas clonales de *A. angustifolia* que nunca antes había sido documentado. Sugieren además la necesidad de determinar relaciones morfológicas y fisiológicas en las diferentes fases del proceso de propagación in vitro: vitroplantas en multiplicación, aclimatadas y establecidas en el campo.

Este tipo de estudios constituyen una etapa fundamental y necesaria para establecer planes de manejo de este importante recurso en Sonora, que permita reforestar las áreas sobreexplotadas y producir materia prima para la elaboración del bacanora.

IX. CONCLUSIONES

La información generada en este proyecto de tesis contribuye al conocimiento de la especie *Agave angustifolia* y pone de manifiesto la utilidad de la microcalorimetría isotérmica para la selección temprana de líneas clonales elite de agave debido a que la caracterización calorimétrica permite conocer la respuesta metabólica del tejido en función de la temperatura de exposición.

Los resultados de las mediciones de los parámetros respiratorios indican que las líneas clonales son más sensibles a las temperaturas extremas y su crecimiento y supervivencia está más asociado a temperaturas entre los 25 y 35 °C.

Las mediciones de parámetros morfológicos en vitroplantas de agave en fase in vitro pueden ser de utilidad para predecir el comportamiento de las líneas clonales en el campo y complementar los datos obtenidos mediante microcalorimetría isotérmica. Los que mejor complementan los datos calorimétricos podrían ser el número de hojas, el peso seco y el factor de multiplicación.

La línea clonal elite resultó ser la denominada LC24b con una eficiencia metabólica de 300 kJmol⁻¹ y una tasa de crecimiento de 7.4 μW mg⁻¹ PS. Además, puede desarrollarse exitosamente en zonas de hasta 45 °C en comparación con el resto de las líneas clonales que reducen su eficiencia a dicha temperatura. Adicionalmente, registró los valores más altos para el número de hojas emitidas, el porcentaje de materia seca y el factor de multiplicación.

La técnica de microcalorimetría isotérmica es una opción viable, sensible, rápida y eficaz para determinar líneas clonales elite de *Agave angustifolia* con mayor potencial de crecimiento y adaptación.

X. LITERATURA CITADA

- Anekonda, T., R. S. Criddle, W. J. Libbly, R. W. Breidenbech y L. D. Hansen. 1994. Respiration rates predict differences in growth of coast reedwood. *Plant, Cell and Environment* 17:197-203.
- Barraza, A., F. Sánchez, M. Robert, M. Esqueda y A. Gardea. 2006. Variabilidad genética en *Agave angustifolia* Haw, de la Sierra Sonorense, México, determinada con marcadores AFLP. *Revista Fitotecnia Mexicana* 29:1-8.
- Binh, L. T., L. T. Muoi, H. T. K. Oanh, T. D. Thang y D. T. Phong. 1990. Rapid Propagation of Agave by in vitro Tissue Culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 23:67-70.
- Birchler, T., R. W. Rose, A. Royo y M. Pardos. 1998. La planta ideal: Revisión del concepto, parámetros definitorios e implementación práctica. *Investigación Agraria: Sistemas y Recursos Forestales* 7:1-2.
- Carvajal-Millán, E., A. Gardea, A. Rascón-Chu, J. A. Orozco, N. Ponce de León, J. A. Márquez-Escalante, A. Romo-Chacón y V. M. Guerrero. 2007. Respiratory response of Apple buds treated with budbreaking agents. *Thermochimica Acta* 457:109-112.
- Cervantes-Mendivil, T., A. D. Armenta-Calderón y J. G. Sánchez-Arellano. 2007. El cultivo del maguey bacanora (*Agave angustifolia* Haw.) en la sierra de Sonora. Publicación Técnica No. 1. Centro de Investigación Regional del Noroeste. Campo experimental Costa de Hermosillo. Instituto Nacionales de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Fundación Produce Sonora, A. C. y Unisierra. Hermosillo, Sonora, México.
- CONABIO. 2006. Mezcales y diversidad. 2da ed. Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la biodiversidad. México.
- CONAFOR. www.conafor.com.mx
- Coronel, Z. Z. 2010. Adaptación al medio biótico y abiótico de líneas clonales de *Agave angustifolia* Haw. en un módulo experimental en Ures, Sonora. Centro de Estudios Superiores del Estado de Sonora. Hermosillo, Sonora, México. Tesis de licenciatura.
- Criddle, R. S., A. J. Fontana, D. R. Rank, D. Paige, L. D. Hansen y R. W. Breidenbech. 1991a. Simultaneous measurement of metabolic heat rate, CO₂ production, and O₂ consumption by microcalorimetry. *Analytical Biochemistry* 194:413-417.

- Criddle, R. S., R. W. Breidenbach y L. D. Hansen. 1991b. Plant calorimetry: how to quantitatively compare apples and oranges. *Thermochemica Acta* 193:67-90.
- Criddle, R. S., L. D. Hansel, B. N. Smith, C. Macfarlane J. N. Church, T. Thygeson, T. Jovanic y T. Booth. 2005. Thermodynamic law for adaptation of plants to environmental temperatures. *Pure and Applied Chemistry* 77 (8):1415-1444.
- Criddle, R. S., B. N. Smith y L. D. Hansen. 1997. A respiration based description of growth rate responses to temperature. *Planta* 201: 441-445.
- Eguiarte, L. E. y V. Souza. 2007. Historia del *Agave* y sus parientes: Evolución y Ecología. En: P. Colunga-García, A. Larqué, L. E. Eguiarte y D. Zizumbo-Villarreal. En: En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. México.
- Esqueda, M. y G. Vargas. 2007. Biotecnología aplicada en el aprovechamiento sostenible de agave. *Reconversión* 9:10-13.
- Ewaid , D. y U. Kretschmar. 1996. The influence of micrografting in vitro on tissue culture behavior and vegetative propagation of old European larch trees. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 44:249-252.
- García-Mendoza, A. 2000. Distribution of *Agave* (Agavaceae) in México. *Cactus and Succulent Journal* 74:177-188.
- García-Mendoza, A. 2004. Agaváceas. En: A. J. García-Mendoza, M. J. Ordoñez y M. Briones-Salas (Ed.) Biodiversidad de Oaxaca. Instituto de Biología, UNAM-Fondo Oaxaqueño para la Conservación de la Naturaleza-World Wildlife Fund, México.
- Gardea, A., E. Carvajal-Millán, J. A. Orozco, V. M. Guerrero y J. Llamas. 2000. Effect of chilling on calorimetric responses of dormant vegetative Apple buds, *Thermochemica Acta* 349:89-94.
- Gardea, A. A., Y. M. Moreno, A. N. Azarenko, P. B. Lombard, L. S. Daley y R. S. Criddle. 1994. Changes in metabolic properties of grape buds during development. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 119:756-760.
- Gentry, H. S. 1998. *Agaves of Continental North America*. The University of Arizona Press. Second edition. Tucson, Arizona.
- Gustafsson, L. 1991. Microbiological calorimetry, *Thermochim. Acta* 193:145-171.

- Gutiérrez, M. L., E. Acedo y A. I. Valenzuela. 2007. Industria del Bacanora y su proceso de elaboración. *Ciencia y Tecnología Alimentaria* 5 (5):394-404.
- Hadley, N. 1970. Micrometeorology and energy exchange in two desert arthropods. *Ecology* 51:434-444.
- Hansen, L. D., M. S. Hopink, D. R. Rank, T. S. Anakonda, R. W. Breidenbach y R. S. Criddle. 1994. The relation between plant growth and respiration: thermodynamic model. *Planta* 194:77-85.
- Hansen, L. D., M. S. Hopink, D. K. Taylor, T. S. Anakonda, D. R. Rank, R. W. Breidenbach y R. S. Criddle. 1995. Plant calorimetry: II. Modeling the difference between apples and oranges. *Thermochemica Acta* 250:215-232.
- Hansen, L. D., B. N. Smith y R. S. Criddle. 1998. Calorimetry of plant metabolism: A means to rapidly increase agricultural biomass production. *Pure and Applied Chemistry* 70:687-694.
- Hansen, L. D., D. K. Taylor, B. N. Smith y R. S. Criddle. 1996. The Relation between Plant Growth and Respiration: Applications to Ecology and Crop Cultivar Selection. *Russian Journal of Plant Physiology* 43 (6):691-697.
- Hintze, J.. 2007. NCCS 2007. NCCS, LLC. Kaysville, Utah, USA. <http://www.nccs.com>
- Loike, J., S. C. Silverstain y J. M. Sturtevant. 1981. Application of Differential Scanning Microcalorimetry to the Study of Cellular Processes: Heat Production and Glucose Oxidation of Murine Macophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 78(10):5958-5962.
- Martínez-Palacios, A., P. Ortega-Larrocea, V. Chávez y R. Bye. 2003. Somatic embryogenesis and organogenesis of *Agave victoriae-reginae* : Considerations for its conservation *Biology* 13:143-190.
- Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol Plant* 15:473-497.
- Nobel, P. 1998. *Los incomparables Agaves y Cactus*. Ed. Trillas. México.
- Nobel, P. y D. Stanley. 1983. High and low temperature tolerance and their relationships to distribution of agaves. *Plant, Cell and Environment* 6:711-719.
- Nobel, P. 1994. *Remarkable agaves and cacti*. University of California. Oxford University Press. Los Angeles.

- Núñez, N. L. 2001. La producción de mezcal bacanora: una oportunidad económica para Sonora. Ed. Imagen Digital del Noroeste. México.
- Núñez, N. L. 2004. Estrategias para el desarrollo de la industria del bacanora en Sonora. En: P. Colunga-García, A. Larqué, L. E. Eguiarte y D. Zizumbo-Vallarreal. En: En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. México.
- Ochoa, A. 2007. Hongos micorrízico arbusculares asociados con *Agave angustifolia* Haw. silvestre y efecto de esporotipos nativos en el desarrollo de vitroplantas. Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Hermosillo, Sonora, México. Tesis de doctorado.
- Palomino, G., J. Matínez, e I. Méndez. 2007. Variación inter e intraespecífica en especies de *Agave* por citometría de flujo y análisis de sus cromosomas. En: P. Colunga-García, A. Larqué, L. E. Eguiarte y D. Zizumbo-Vallarreal. En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. México.
- Pérez, C. D. 2010. Estudio de adaptación de *Agave angustifolia* Haw. micropropagado en condiciones ambientales prevalecientes en Banámichi, Sonora. Centro de Estudios Superiores del Estado de Sonora. Hermosillo, Sonora, México. Tesis de licenciatura.
- Robert, M. L., J. L. Herrera y M. Arce-Montoya. 2007. La biotecnología aplicada al mejoramiento genético de los agaves. En: P. Colunga-García, A. Larqué, L. E. Eguiarte y D. Zizumbo-Vallarreal. En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. México.
- Robert, M. L., J. L. Herrera, F. Contreras y K. N. Scorer. 1987. In vitro Propagation of *Agave fourcroydes* Lem. (Henequen). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 8:37-48.
- Robert, M. L., J. L. Herrera, J. L. Chang y F. Contreras. 1991. Micropropagation of *Agave* spp. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 19.
- Robert, M. L., J. L. Herrera-Herrera, M. A. Herrera-Alamillo, A. Quijano-Ramayo, y E. Balám. 2004. Manual for the in vitro culture of agaves. United Nations Industrial Development Organization and Common Fund for Commodities. Technical Paper No. 38.

- Rubluo, A., V. Chávez, A. Martínez y A. Martínez-Palacios. 1993. Strategies for the recovery of endangered orchids and cacti through in vitro culture. *Biological Conservation* 63:163-169.
- Salazar, V. 2007. La industria del bacanora: Historia y tradición de resistencia en la Sierra Sonorense. *Región y Sociedad. El Colegio de Sonora* 19: 039:105-133.
- Salazar, V. y A. Mungaray. 2008. La industria informal del bacanora. *Revista Estudios Sociales* 17:33.
- Salisbury, F. B. y C. W. Ross. 1994. *Fisiología Vegetal*. 4ta. ed. Editorial Iberoamericana. México, D.F.
- SAS Software. 2002. SAS software, Versión 9 para Windows. SAS Institute Inc. SAS. Cary, NC, USA.
- Sedano, G., V. A. González, E. M. Engleman y C. Villanueva. 2005. Dinámica de crecimiento y eficiencia fisiológica de la planta de calabacita. *Revista Chapingo. Serie horticultura*. 11 (002):291-297.
- Téllez, S. N. 2010. Comportamiento de cuatro líneas clonales de *Agave angustifolia* Haw. en un módulo experimental en Suaqui Grande, Sonora. Centro de Estudios Superiores del Estado de Sonora. Hermosillo, Sonora, México. Tesis de licenciatura.
- Turner, R., J. Bowers y T Burgess. 2005. *Sonoran Desert Plants*. The University of Arizona Press. Tucson.
- Vázquez-Gacía, J. A., M. J. Cházaro-Basáñez, G. Hernández-Vera, Y. L. Vargas-Rodríguez y M.P. Zamora-Tavares. 2007. Taxonomía del género *Agave* (Agavaceae) en el occidente de México: una panorámica preliminar. En: *Agaves del Occidente de México*. Universidad de Guadalajara, México.
- Verdugo, L. 2011. Variabilidad genética en plantas micropropagadas de *Agave angustifolia* determinada por marcadores moleculares AFLP. Centro de Estudios Superiores del Estado de Sonora. Hermosillo, Sonora, México. Tesis de licenciatura.
- Wang, S. Y., M. Faust y L. G. Steffens. 1985. Metabolic changes in cherry flower buds associated with breaking of dormancy in early and late blooming cultivars. *Physiol Plant* 65:89-94.

- Weili Y. U., L. D. Hansel, F. Wenying, Z. Wenyi y E. D. McArthur. 2008. Adaptation of growth and respiration of three varieties of *Caragana* to environmental temperature. *Asian Journal of Plant Sciences* 7 (1):67-72.
- Young, E. 1990. Changes in respiration rate and energy of activation after chilling and forcing dormant apple trees. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 115(5):809-814.
- Zimmerman, J. L. 1993. Somatic Embryogenesis: A model for early development in higher plants. *Plant Cell* 5:1411-1423.
- Zobel, B. y J. Talbert. 1984. *Applied tree improvement*. John Wiley & Sons. New York, U.S.A.