

AHORA
en línea!

scientia

CUCBA

CONTENIDO



Universidad de
Guadalajara
Centro Universitario de
Ciencias Biológicas y
Agropecuarias

COORDINACIÓN DE
INVESTIGACIÓN

Respuesta fisiológica a factores ambientales del agave azul
(*Agave tequilana* Weber)

Eulogio Pimienta-Barrios, Julia Zañudo-Hernández, Park S. Nobel
y Javier García-Galindo **85**

Cochineal (HEMIPTERA: DACTYLOPIIDAE) production

Vigueras, A. L., C. Llanderal-Cázares and L. Portillo **99**

Latencia y escarificación química en semillas de frijol silvestre (*Phaseolus
vulgaris* L., FABACEAE)

Rogelio Lépiz Ildelfonso, José de Jesús López Alcocer, Fernando Santacruz Ruvalcaba
y Eduardo Rodríguez Guzmán **105**

Efecto competitivo de la maleza sobre el crecimiento y la respuesta fisiológica
de agave (*Agave tequilana* Weber var. azul) en la región de Tequila, Jalisco,
México

Benito Monroy Reyes, Enrique Pimienta Barrios, Salvador Antonio Hurtado de la Peña
y Javier García Galindo **113**

Relación del aparato reproductor femenino de *Dactylopius coccus* Costa
(HEMIPTERA: DACTYLOPIIDAE) en la síntesis del ácido carmínico

D. Cortés J., A. L. Vigueras y L. Portillo **131**

Macroalgae community structure in southern coast of Jalisco, México

Rosalba Mireya Hernández-Herrera, Silvia E. Ibarra-Obando
y Ma. del Refugio Mora-Navarro **139**

continúa en la contraportada

DICIEMBRE DE 2005

2

NÚMERO

7

VOLUMEN

CONTENIDO (continuación)

Servicios ambientales de un sistema silvopastoril de *Eucalyptus saligna* en *Panicum maximum*

Zoe G. Acosta Gutiérrez, José Plasencia Fraga y Alexander Espinosa Vázquez **155**

Biología celular y molecular de las poliaminas: monografía de los conocimientos básicos

Ramón Reynoso Orozco, Jorge Iván Delgado Saucedo, Ana María Puebla Pérez, Carlos Calvo Méndez, Pablo Arteaga Nieto y Anne Santerre **161**

Hábitos de estudio en alumnos con problemas de reprobación en el Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara

Ma. de Jesús Rimoldi Rentería, Ricardo Ulloa Azpeitia y Miguel Carbajal Soria **171**

Aislamiento e identificación de *Rhizobium* en *Lupinus* silvestres por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Mariana Martínez Pelayo, Hugo Castañeda Vázquez, Juan Manuel Moreno Martínez, Mario Ruiz López y Carlos Álvarez Moya **175**

Luz María Villarreal de Puga

José Luis Leal Sanabria **183**



Consulte este y otros números vía internet en
www.cucba.udg.mx/new/publicaciones

scientia-CUCBA es el órgano oficial de difusión científica del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) de la Universidad de Guadalajara. Es una publicación interdisciplinaria de ciencias biológicas, agropecuarias y ambientales que se da a la luz cada seis meses.

Editor Jefe: Servando Carvajal.

Comité Editorial

- Óscar Aguirre Calderón.** Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad Autónoma de Nuevo León, México. *oaguirre@fcf.unnl.mx*
- Esther Albarrán Rodríguez.** Departamento de Medicina Veterinaria, CUCBA. Zapopan, México. *ealbarra@cucba.udg.mx*
- Jacinto Bañuelos Pineda.** Departamento de Medicina Veterinaria. CUCBA. Zapopan, Jalisco, México. *jpineda@cucba.udg.mx*
- Anatoli Borodanienko.** Instituto de Ciencias Agrícolas (ICA), Universidad de Guanajuato, México. *anatolib@dulcinea.ugto.mx*
- Sara Caballero Chacón.** Departamento de Fisiología y Farmacología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, México. *saracachas@hotmail.com*
- Miguel Ángel Carmona Medero.** Facultad de Veterinaria. Universidad Nacional Autónoma de México. México. *medero48@hotmail.com*
- Servando Carvajal.** Departamento de Botánica y Zoología CUCBA. Zapopan, Jalisco, México. *scarvaja@cucba.udg.mx*
- Alejandro Castillo Ayala.** Universidad de Texas A & M. U.S.A. *a-castillo@tarmo.edu*
- Luis Eduardo Chalita Tovar.** Colegio de Posgraduados, Chapingo, México. *chalita@colpos.colpos.mx*
- Ir. Daniel G. Debouck.** Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. *d.debouck@ceglar.org*
- Eric Esteve.** Centro Mas Bove. Tarragona, España. *eric.esteve@irta.es*
- René Funes Rodríguez.** CICYMAR-IPN, Baja California, México. *rfunes@ipn.mx*
- Edmundo García Moya.** Colegio de Posgraduados de Chapingo, México. *edmundoc@colpos.mx*
- Steve Gliessman.** Universidad de California, Campus Santa Cruz. USA. *gliess@zxx.ucsc.edu*
- Rafael Gómez Kasky.** Universidad de Las Villas, Cuba. *suspen@ibp.edu.cu*
- Eduardo González Izquierdo.** Universidad de Pinar del Río, Cuba. *eduardo@af.upr.edu.cu*
- David Hansen.** Midamerican International Agricultural Consortium, Iowa State University. U.S.A. *miac@iastate.edu*
- Clemente Lemus Flores.** Instituto de Medicina Veterinaria de la Universidad Autónoma de Nayarit. México. *clemus@nayar.mx*
- Rogelio Lépez Idefonso.** Departamento de Producción Agrícola, CUCBA. Zapopan, Jalisco, México. *rlpez@cucba.udg.mx*
- Ángel Luque Escalona.** Universidad de Las Palmas, Gran Canaria, España. *aluque@dbio.ulpgc.es*
- Jorge Manzo.** Laboratorio de Neurociencias, Universidad Veracruzana, México. *jmanzo@altavista.net*
- Jaime Morales Hernández.** Programa Universitario de Medio Ambiente y Desarrollo. Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Occidente (ITESO), Jalisco, México. *jaimem@iteso.mx*
- Xavier Navarro Acebes.** Departament de Biología Celular, de Fisiología i d'immunologia, Bellaterra, España. *Xavier.Navarro@uab.es*
- Guillermo A. Navarro.** Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) - Turrialba, Costa Rica. *gnavarro@catie.ac.cr*
- Michael F. Notan.** Collage of Agriculture, Food & Natural Resources, University of Missouri, Columbia, U.S.A. *agmike@mucmmail.missouri.edu*
- Alejandro Ortega Corona.** Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Ciudad Obregón, Sonora, México. *aoc@cirmo.inifap.conacyt.mx*
- Daniel Ortuño Sahagún.** Departamento de Biología Celular y Molecular, CUCBA. Zapopan, Jalisco. México. *dortunos@cucba.udg.mx*
- José Manuel Palma García.** Universidad de Colima, México. *palma@cgcj.ucol.mx*
- Alfonso Peña Ramos.** Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP-Ags.), Aguascalientes, México. *apena@pabellon.inifap.gob.mx*
- Enrique Pimienta Barrios.** Departamento de Producción Agrícola, CUCBA. Zapopan, Jalisco, México. *enriquep@cucba.udg.mx*
- Oliver Pratsval Algels.** Centro de Tecnología de la Carne. Monells (Girona) España. *mariaangeles.oliver@irta.es*
- Ruperto Quesada Monge.** Instituto Tecnológico de Costa Rica. *rquesada@itcr.ac.cr*
- José Luis Quintanar Stephano.** Departamento de Fisiología y Farmacología, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, México. *jlquinta@correo.uaa.mx*
- Javier Ramírez Juárez.** Colegio de Posgraduados, Campus Tecamachalco, Puebla, México. *rjavier@colpos.colpos.mx*

continúa en la tercera de forros

Comité Editorial (continuación)

J. Antonio Rentería Flores. Centro Nacional de Investigación en Fisiología Animal. INIFAP. Ajuchitlan, Querétaro. México.

rent0021@hotmail.com

Eduardo Ríos Jara. Departamento de Ecología, CUCBA. Zapopan, Jalisco, México.

edurios@cucba.udg.mx

José de Jesús Sánchez González. Departamento de Producción Agrícola, CUCBA. Zapopan, Jalisco. México.

jjsanche@cucba.udg.mx

Juan de Jesús Taylor Preciado. Departamento de Medicina Veterinaria, CUCBA. Zapopan, Jalisco. México.

jjtaylor@cucba.udg.mx

Joan Tibau. Centro de Control Porcino. Monells (Girona) España. *joan.tibau@irta.es*

Francisco José Trigo Tavera. División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. México. *trigo@servidor.unam.mx*

Enrique Trovo Diéguez. CIBNOR, Baja California, México. *etrovo@cibnor.mx*

Raúl E. Vargas García. Departamento de Medicina Preventiva, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. México. *revg@servidor.unam.mx*

Mario Abel Vázquez García. Departamento de Producción Agrícola, CUCBA. Zapopan, Jalisco, México. *mgarcia@cucba.udg.mx*

Alejandro Velásquez Martínez. Colegio de Posgraduados de Chapingo, México. *alevela@colpos.mx*

Enrique Verdú Navarro. Departament de Biologia Cel·lular, de Fisiologia i d'immunologia, Bellaterra, España. *Enric.Verdú@uab.es*

Francisco Villalpando Ibarra. Organización Meteorológica Mundial (OMM), Ginebra, Suiza. *fvillalpando@bliuwin.ch*



DIRECTORIO DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

José Trinidad Padilla López

RECTOR GENERAL

Itzcóatl Tonatiuh Bravo Padilla

VICERRECTOR EJECUTIVO

Carlos Jorge Briseño Torres

SECRETARIO GENERAL

Juan de Jesús Taylor Preciado

RECTOR DEL CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

Enrique Pimienta Barrios

SECRETARIO ACADÉMICO DEL CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

Servando Carvajal

COORDINADOR DE INVESTIGACIÓN DEL CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

scientia-CUCBA (ISSN: 1665-8493) es una publicación semestral (junio, diciembre) y está disponible mediante suscripción que puede hacerse a la Coordinación de Investigación del CUCBA, U. de G., km 15.5 Carretera Guadalajara a Nogales, Las Agujas, Zapopan, 45110, Jalisco, México. Tel.: (0133) 3777 1155; Fax.: (0133) 3777 1150

**CERTIFICADO DE RESERVA DE DERECHOS AL USO EXCLUSIVO
NÚMERO: 04-2003-101714124100-102**

La opinión que se expresa en los artículos es responsabilidad de los autores. Se autoriza la reproducción total o parcial de los trabajos, siempre y cuando se cite la fuente y no sea con fines de lucro.

Respuesta fisiológica a factores ambientales del agave azul (*Agave tequilana* Weber)

Eulogio Pimienta-Barrios¹, Julia Zañudo-Hernández¹, Park S. Nobel² y Javier García-Galindo³

¹Departamento de Ecología, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Guadalajara.

²Department of Organismic Biology, Ecology and Evolution, University of California. ³Consejo Regulador del Tequila, A. C.

Resumen: En este trabajo se estudió en condiciones controladas la sensibilidad a bajas temperaturas y el efecto de diferentes temperaturas día/noche en la de asimilación neta de CO₂ y la respiración en plantas jóvenes de *Agave tequilana* var. azul. En condiciones de campo se evaluó la variación estacional de la temperatura del aire, contenido de agua en el suelo, e irradiación en la tasa neta de asimilación de CO₂ en un ambiente cálido y en un ambiente templado fresco en plantas adultas. Se encontró que el agave azul tiene poca tolerancia a las temperaturas bajas, en comparación con otras especies de agave. En condiciones controladas las temperaturas cálidas día/noche (35/25°C) disminuyen hasta en un 70% la asimilación neta diaria de CO₂ en comparación con las temperaturas frescas día/noche (25/15°C) y frías (15/ 5°C), y también incrementan la pérdida de CO₂ en la base de las hojas. En el campo los valores más altos de asimilación neta diaria de CO₂ fueron el resultado de periodos prolongados de ganancia de carbono que incluye asimilación de CO₂ durante el día y la noche, y esto se acompañó de altas tasas de asimilación nocturna de CO₂ que coincidieron con temperaturas frescas en la noche. El incremento en la superficie cultivada puede ayudar a reducir los efectos del cambio climático debido a su habilidad de fijar CO₂ atmosférico durante todo el año, sobre todo en periodos secos cuando pocas plantas C₃ y C₄ cultivadas y nativas pueden fijar carbono atmosférico.

Abstract: In this work we studied the effect of low temperature and different day/night temperatures on the net CO₂ uptake, and respiration in young plants of *Agave tequilana* var. azul under controlled conditions. In field conditions we evaluated the effects of seasonal variations in air temperature, soil moisture, and irradiation on the net CO₂ uptake in a warm and in a temperate environment using mature plants of *A. tequilana* var. azul. We found that the agave 'azul' was relatively intolerant to low temperatures compared with other species of *Agave*. Under controlled conditions, daily net CO₂ uptake decreased 70% in plants grown under warm day/night temperatures (35° C/25°C), compared with plants grown in conditions with cool (25/15°C) or cold (15/ 5°C) day/night temperatures. The highest values of daily net CO₂ uptake in both warm and cold regions reflected prolonged daily periods of carbon gain that included both daytime and nighttime CO₂ uptake accompanied by high rates of nocturnal CO₂ uptake due to moderate nighttime temperatures. The increase in the cultivation of *A. tequilana* might help to reduce the effects of climatic change because of the ability of this CAM plant to sequester carbon during extended dry periods when few C₃ and C₄ cultivated and native plants can fix atmospheric CO₂.

Introducción

El agave azul (*Agave tequilana* Weber) es una planta monocárpica perenne, que presenta el metabolismo ácido de las crasuláceas (planta CAM) (Nobel 1994; Valenzuela 1994). Estas plantas fijan el

CO₂ durante la noche, cuando las temperaturas son más bajas que durante el día, reduciendo la pérdida de agua por transpiración. Debido a su mayor eficiencia en el uso del agua, las plantas CAM como el

agave azul, toleran periodos prolongados de sequía (Nobel 1995). Esta característica hace posible que las plantaciones de agave azul prosperen sin la aplicación de agua de riego, en localidades donde los periodos de sequía se prolongan por más de seis meses. Recientemente se ha registrado un incremento notable de la superficie cultivada de agave en el estado de Jalisco y estados circunvecinos que se encuentran en la denominación de origen. Algunas de estas plantaciones se establecieron en nuevos ambientes, que son cálidos o fríos y difieren del medio nativo donde se originó el cultivo. Por este motivo, las nuevas plantaciones experimentan ambientes en los que se presenta una mayor variación en las temperaturas extremas (máximas y mínimas). Esta variación en los factores físicos del ambiente puede causar efectos en los procesos fisiológicos básicos de la planta, como es el caso de la fotosíntesis (mecanismo mediante el cual se fija CO_2 para producir azúcares) y respiración (proceso que libera CO_2 , por la combustión de azúcares). Trabajos realizados con otras plantas, que presentan metabolismo CAM (*Stenocereus queretaroensis* (Weber) Buxb. y *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.), en ambientes en los que se cultiva *A. tequilana* en el estado de Jalisco (Pimienta-Barrios et al. 2000), revelan que la ocurrencia de altas temperaturas reduce la producción y acumulación de azúcares en los tejidos de reserva, ya que incrementan la respiración y reducen la fotosíntesis. En el caso de las plantas CAM, se ha encontrado, que las temperaturas nocturnas cálidas incrementan la respiración y reducen la actividad de la enzima nocturna fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPcase), por lo cual se fija menos CO_2 durante la noche.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la tolerancia de *Agave tequilana* a las temperaturas extremas y el efecto de la irradiación, la temperatura, y la humedad del suelo en la asimilación neta de CO_2 y la respiración en plantas jóvenes y adultas.

Materiales y métodos

ESTUDIO ECOFISIOLÓGICO EN CONDICIONES CONTROLADAS. Este estudio inició en noviembre de 1996, con la colecta de plantas jóvenes de agave azul (*A. tequilana*) de un año de edad, que fueron plantadas en cubetas de plástico, que tenían como substrato una mezcla de suelo arenolimoso, colectado en el noroeste del Desierto de Sonora, cuarzo mediano y suelo comercial para fines hortícolas en proporción 1:1:1. Después de haberse transplantado fueron mantenidas en un invernadero por tres meses, con temperaturas promedio máximas y mínimas día/noche de 28/17°C, con humedad relativa máxima/mínima de 70/45%. La cantidad de luz que recibieron las plantas, medidas como flujo fotosintético fue de 770 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Una vez que las plantas se aclimataron, fueron divididas en tres grupos de seis plantas y cada grupo fue colocado en una cámara de ambiente controlado. De estas tres cámaras una de ellas se programó para mantener en ciclos de 24 horas temperaturas día/noche de 15/5°C, en la segunda 25/15°C y en la tercera 35/25°C, con periodos de 12 de luz y 12 de oscuridad. En cada cámara las temperaturas del día y de la noche fueron constantes durante periodos de 12 horas. Después de dos meses de estar las plantas de agave bajo los tres tratamientos de temperatura previamente mencionados, se llevaron a cabo las mediciones que se describen a continuación:

1. Sensibilidad a temperaturas bajas.

Para determinar la sensibilidad a temperaturas bajas se tomaron muestras de la mitad de la hoja (8 mm de largo por 4 mm de ancho), con la ayuda de una navaja de rasurar y se cubrieron con papel de aluminio. Estas fueron colocadas en contacto con termopares tipo T construidos con una aleación de constantano y cobre. Estas muestras fueron colocadas en un refrigerador a una temperatura de 5°C por una hora. A continuación las muestras de

hojas se expusieron por una hora a diferentes temperaturas bajas: 5°C; 0°C; -5°C; -10°C; -15°C. Después se hicieron cortes transversales, de los que se obtuvieron secciones de clorénquima con un grosor cercano a los 0.2 mm (4–5 células). A estas secciones se les agregó 1 mL de la tinción vital rojo neutro (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina [HCL], 0.1% (v/v) en un amortiguador de fosfato de potasio, pH 7.8). Las células que permanecen vivas después de los tratamientos de temperatura baja, se distinguen por que acumulan ésta tinción en sus vacuolas, y de esta manera se determina la tolerancia al frío.

Después de 10 minutos, los cortes teñidos fueron lavados en el amortiguador de fosfato y examinados a 100×, con la ayuda de un microscopio (Olympus, Lake Success) al cual se encontraba fija una cámara digital PVC 100C a color, con un software de análisis Image-Pro Plus 3.0.

2. Fotosíntesis en condiciones controladas. En las plantas que se expusieron a los tratamientos de temperaturas en las cámaras de ambiente controlado, se determinó la asimilación neta de CO₂, y la respiración en la base de hojas maduras. La asimilación neta de CO₂ se midió por lapsos de 1–2 horas durante un periodo de 24, usando un aparato portátil para medir fotosíntesis Li-Cor LI-6200 y una cámara foliar Li-Cor de 0.25 L. La parte superior de la cámara fue reemplazada por una extensión de flexiglass que tenía un ángulo de 45°, con una apertura de 1×4 cm, cuyos márgenes fueron cubiertos con una celda cerrada de espuma para sellar herméticamente el gas entre la cámara y la superficie superior de las hojas.

La respiración se determinó en muestras de hojas de 2 g de peso fresco, que fueron removidas cerca del mediodía, de la parte interna del lado blanquecino de la base de las hojas con la ayuda de una navaja de rasurar. Cada muestra se colocó en una cámara de reacción LD1, unida por un tubo

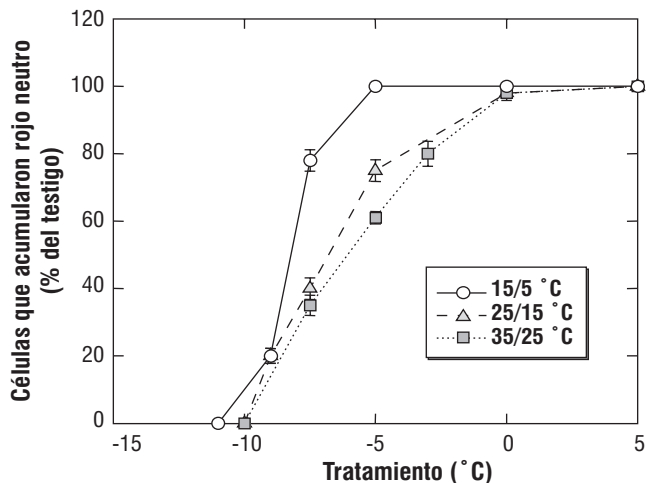
Tygon a un sistema de circulación de agua con temperatura constante; la temperatura se mantuvo estable $\pm 0.2^\circ\text{C}$, y fue monitoreada con termopares. Se midió la respiración con un analizador de gases de CO₂ LI-Cor LI-6200 con el modo diferencial y con una tasa de flujo de 12 mL min⁻¹. Cada medición duro 50 min, necesitándose 10 min para alcanzar la siguiente temperatura alta. Para determinar el peso seco (que se uso para expresar las tasas de respiración), las muestras de hojas basales fueron deshidratadas a 80°C en un horno de corriente de aire forzado, hasta que no se presentó cambio posterior en su peso.

ESTUDIO ECOFISIOLÓGICO EN CONDICIONES DE CAMPO. La segunda parte del estudio se llevó cabo de septiembre de 1998 al mes de agosto de 1999 en dos plantaciones comerciales. Una de éstas se encuentra en Amatitán, Jalisco, México (AMAJ), que para los propósitos de este trabajo se considera como la región cálida. La otra en Arandas, Jalisco, México (ARAJ), y se considera como la región fría. ARAJ se localiza en la parte central del Estado de Jalisco a una altitud de 2,000 m sobre el nivel del mar; AMAJ se encuentra en la parte central este de Jalisco a una altitud de 1,310 m sobre el nivel del mar. AMAJ presenta temperaturas promedio extremas diarias que mensualmente varían de 14 a 32°C, con una temperatura promedio anual de 24°C. El promedio de la precipitación pluvial anual es cercano a los 900 mm. ARAJ presenta temperaturas promedio extremas diarias que mensualmente varían de 9 a 24°C, con una temperatura promedio anual de 18°C, y precipitación anual de 950 mm

3. Fotosíntesis en condiciones de campo. En cada una de estas localidades se llevó a cabo la evaluación de la asimilación de CO₂ cada 2 horas por periodos de 24 horas. En AMAJ las mediciones se realizaron en las siguientes fechas: 8–9 de septiembre de 1998, 11–12

de noviembre de 1998, 14–15 de enero de 1999, 12–13 de marzo de 1999, 29–30 de junio de 1999 y agosto de 1999, y en ARAJ el 22–23 de septiembre de 1998, 19–20 de noviembre de 1998, 21–22 de enero de 1999, 26–27 de marzo de 1999, 25–26 de junio 25–26 de 1999 y 6–7 de agosto de 1999. Estas mediciones se realizaron con un aparato portátil para medir fotosíntesis (Li-Cor LI-6200), con el cual fue registrada las tasas instantáneas de asimilación de CO_2 . Además, de las mediciones de fotosíntesis, en cada una de las fechas de medición se registró: **a**) el flujo fotosintético de fotones (FFF; longitudes de onda de 400–700 nm), se registró cada hora desde la salida hasta la puesta del sol con un sensor cuántico Li-Cor 190S (Li-Cor, Lincoln); **b**) la temperatura del aire se midió cada hora durante 24 horas, usando un termómetro de bulbo; **c**) el contenido de agua en el suelo, colectando 10 muestras del suelo en el área del centro de las raíces (a una profundidad de 15 cm). Estas muestras fueron secadas en una estufa de incubación a 80°C , hasta que no hubo cambios en el peso de la masa (generalmente 72 h), los datos se expresaron como porcentaje del contenido de agua [(peso fresco de la masa - peso seco de la masa)/peso seco de la masa] (Torres 1984).

Figura 1. Viabilidad de células de clorénquima de *Agave tequilana*, medida por la acumulación de rojo neutro. Los datos son promedios \pm error estándar, al menos que los errores sean menores que los símbolos (fueron evaluadas de 45–50 células de cada planta $N=4$ plantas por tratamiento).



Resultados

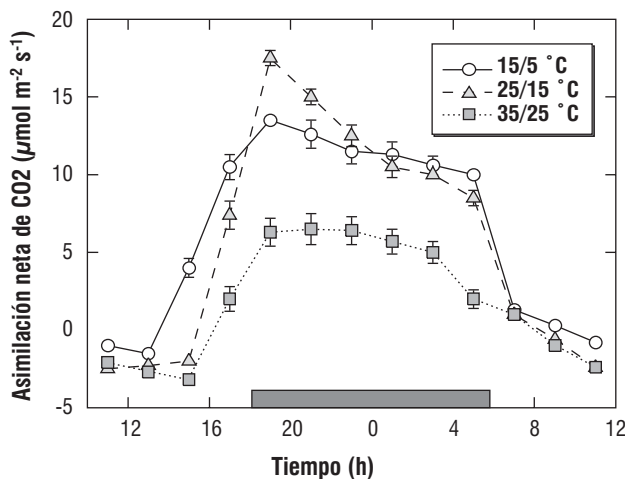
CONDICIONES CONTROLADAS

1. Sensibilidad a temperaturas bajas.

La evaluación de la sensibilidad de *Agave tequilana* a temperaturas bajas mostró que una vez que las temperaturas son inferiores a -6°C , se incrementa el porcentaje de células de clorénquima que no acumulan la tinción vital del rojo neutro, es decir aumenta el porcentaje de células dañadas por el frío. La temperatura a la cual la asimilación de la tinción vital se redujo 50% fue de -6°C para plantas que fueron aclimatadas a temperaturas día/noche de $35/25^\circ\text{C}$; -6.8°C para plantas aclimatadas día/noche a $25/15^\circ\text{C}$ y -8.2°C para las que se aclimataron a temperatura de $15/5^\circ\text{C}$ (Fig. 1).

2. Fotosíntesis. La asimilación neta de CO_2 en agave azul fue negativa durante la mayor parte de las horas del día y se vuelve positiva al final de la tarde, especialmente en las temperaturas del aire día/noche de $15/5^\circ\text{C}$ y a $25/15^\circ\text{C}$. Las tasas máximas de asimilación instantánea ocurrieron en la noche, y fue de $17 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para las plantas que se aclimataron a temperaturas de $25/15^\circ\text{C}$; $14 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para las plantas a $15/5^\circ\text{C}$, y $6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a $35/25^\circ\text{C}$. La tasa neta diaria de asimilación

Figura 2. Asimilación neta de CO₂ por periodos de 24 h en *Agave tequilana* en cámaras de ambiente controlado en diferentes temperaturas día/noche. La barra gris indica el periodo de oscuridad. Los datos son promedios ± error estándar, al menos que los errores sean menores que los símbolos (N= 4 plantas).



de CO₂ por un periodo de 24 horas, obtenida por la integración de los valores instantáneos, fue de 298 mmol m⁻² d⁻¹ a 15/5°C, 267 mmol m⁻² d⁻¹ a 25/15°C, y 84 mmol m⁻² d⁻¹ a 35/25°C (Fig. 2).

3. Respiración en hojas basales. La respiración de la parte basal de las hojas maduras se incrementa al aumentar las temperaturas, pero disminuye al incrementarse las temperaturas día/noche del aire en las que se aclimataron y crecieron las plantas (Cuadro 1). En la temperatura más baja de medición de 5°C la respiración es mayor conforme disminuye la temperatura día/noche, por lo que las plantas que crecieron a 15/5°C, la tasa de respiración fue de 0.66 µmol de CO₂ liberado s⁻¹ kg⁻¹ de su peso seco. Conforme las temperaturas de medición se incrementaron a 15°C, 25°C,

35°C, el aumento fraccional de la respiración por cada 10°C de incremento de la temperatura (Q₁₀) fue de 2.06, 2.69 y 2.56 respectivamente. Esos valores de Q₁₀ fueron 2.17, 2.48 y 2.69, para plantas que crecieron a 25/15°C, y 2.28, 2.49, 2.75, para plantas que crecieron a 35/25°C. (Cuadro 1).

CONDICIONES DE CAMPO

4. Fotosíntesis. Se registro una amplia variación en las temperaturas promedio día/noche durante las estaciones del año entre las localidades en estudio. En AMAJ los promedios más altos de temperatura día/noche se registraron en junio (30/22°C) y agosto de 1999 (29/21°C), y los promedios más bajos en enero del mismo año (26/12°C) (Cuadro 2). En ARAJ, en enero de 1999 se registró el promedio más

Cuadro 1. Tasa de respiración en secciones de hojas basales de *Agave tequilana* aclimatadas y desarrolladas en cámaras bioclimáticas a tres temperaturas del aire día/noche y varias temperaturas de medición. Los valores son medias ± error standard (N = 4 plantas).

Temperatura del aire día/noche(°C/°C)	Tasa de respiración [µmol CO ₂ s ⁻¹ (Kg peso seco ⁻¹)]			
	Temperatura de medición (°C)			
	5	15	25	35
15/5	0.66 ± 0.03	1.36 ± 0.05	3.66 ± 0.22	9.37 ± 0.43
25/15	0.47 ± 0.03	1.02 ± 0.09	2.53 ± 0.	6.80 ± 0.57
35/25	0.36 ± 0.06	0.82 ± 0.08	2.04 ± 0.21	5.60 ± 0.36

Cuadro 2. Relación entre variables ambientales, tasas instantáneas máximas de asimilación de CO₂, y de asimilación neta diaria de CO₂ en *Agave tequilana*, en Amatitán, Jalisco.

Fecha	FFF ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Temperatura día/noche(°C)	Humedad en suelo (%)	Tasa máxima asimilación CO ₂ ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Asimilación diaria neta de CO ₂ ($\text{mmol m}^{-2} \text{d}^{-1}$)
Septiembre, 1998	999	28/21	21	8	141
Noviembre, 1998	580	27/19	14	13	376
Enero, 1999	882	26/12	8	14	578
Marzo, 1999	1250	26/16	7	22	921
Junio, 1999	1343	30/22	11	12	362
Agosto, 1999	1368	29/21	20	10	438

FFF: Flujo fotosintético de fotones

bajo de temperaturas (23/7°C), y el más alto en agosto de 1999 (25/18°C) (Cuadro 3). El promedio de las temperaturas día/noche de septiembre de 1998 a la de agosto de 1999, promedió 28/19°C para la localidad de AMAJ y 23/14°C para la localidad de ARAJ (Cuadros 2 y 3).

El contenido de agua en el suelo en AMAJ alcanzó los valores más altos superiores a 20% en septiembre de 1998 y agosto de 1999, y los más bajos en enero y marzo de 1998 (8 y 7% respectivamente (Cuadro 2). La humedad en ARAJ, varió de 24% en noviembre de 1998 a 12% en marzo de 1999. El contenido de agua en suelo fue superior al 20% durante septiembre y noviembre de 1998 (Cuadro 3). En AMAJ

los valores más bajos de FFF se registraron al inicio del otoño (noviembre, 1998), los cuales fueron inferiores a los valores registrados en septiembre del mismo año. Al iniciar el invierno los valores se incrementaron de manera gradual, alcanzando sus valores máximos al final del invierno, prolongándose hasta el verano de 1999 (Cuadro 2). La cantidad de luz (FFF) en ARAJ fue baja al final del verano de 1998 (septiembre 1998), y al principio del otoño (noviembre 1998), después se incrementa gradualmente durante el invierno, alcanzando el valor máximo en marzo de 1999. Una vez más, al inicio del verano, disminuye la cantidad de luz que incide en las plantas (junio de 1999) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Relación entre variables ambientales, tasas instantáneas máximas de asimilación de CO₂, y de asimilación neta diaria de CO₂ en *Agave tequilana*, en Arandas, Jalisco.

Fecha	FFF ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Temperatura día/noche(°C)	Humedad en suelo (%)	Tasa máxima asimilación CO ₂ ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Asimilación diaria neta de CO ₂ ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
Septiembre, 1998	512	22/16	23	22	763
Noviembre, 1998	583	23/15	24	12	419
Enero, 1999	1045	23/07	14	11	416
Marzo, 1999	1337	25/14	12	23	572
Junio, 1999	555	20/16	16	11	280
Agosto, 1999	1288	25/18	18	10	188

FFF: Flujo fotosintético de fotones

Los valores de FFF registrados desde el inicio de la mañana hasta el final de la tarde de septiembre de 1998 al mes de agosto de 1999 promediaron $1,070 \pm 126 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para la localidad de AMAJ y $887 \pm 156 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para la de ARAJ (Cuadros 2 y 3).

La asimilación estacional neta diaria de CO_2 obtenida al integrar las tasas instantáneas en 24 horas, mostraron tendencias diferentes en AMAJ y ARAJ. En AMAJ Los valores de asimilación neta total diaria de CO_2 más bajo fue registrado en septiembre de 1998 ($141 \text{ mmol m}^{-2} \text{d}^{-1}$) y los valores se incrementaron en el mes de noviembre de 1998, enero de 1999, y alcanzaron sus valores más altos en marzo de 1999 ($921 \text{ mmol m}^{-2} \text{d}^{-1}$), disminuyendo en junio de 1999, y agosto de 1999 (Cuadro 4). En contraste en ARAJ los valores más altos de asimilación neta diaria de CO_2 se registraron en septiembre de 1998 ($763 \text{ mmol m}^{-2} \text{d}^{-1}$), después disminuye en noviembre de 1998 y en enero de 1999, incrementándose en marzo de 1999, disminuyendo de nuevo significativamente durante junio de 1999 y agosto de 1999. (Cuadro 4).

Las tasas instantáneas máximas de asimilación de CO_2 ocurren al final de la

tarde y al empezar la noche (Fig. 3a y 4c), al final de la noche (Fig. 4d), y alrededor de la medianoche (Fig. 4e-f). En ARAJ los valores más altos de asimilación instantánea máxima de CO_2 se registraron únicamente durante la noche (Fig. 4).

Un aspecto interesante es el hecho de que se registró asimilación diurna y nocturna de CO_2 en *Agave tequilana* en las dos localidades en estudio en la mayoría de las estaciones del año (Cuadro 4). La asimilación diurna y nocturna fue mayor en tiempo en ARAJ que en AMAJ, particularmente durante la tarde. Sin embargo, la mayor asimilación de CO_2 (arriba del 80%) ocurre en la noche. En AMAJ al final del verano de 1998 y al inicio del otoño de 1999, el tiempo de asimilación diurna fue similar (2h), después se incrementa gradualmente a 3h del inicio del invierno (enero de 1999), alcanzando sus valor más alto (6h) al final del invierno (marzo, 1999), disminuyendo estos valores durante el verano de 1999 (junio 1999 y agosto 1999). En contraste en ARAJ el periodo más largo de asimilación diurna se registró en septiembre de 1998 (7 horas), después disminuye a 3 horas en noviembre de 1998 y enero de 1999, aumentando a 4 horas en marzo de 1999, para después

Cuadro 4. Variación estacional en el tiempo de asimilación neta total de CO_2 nocturna y diurna en *A. tequilana* en las localidades de Amatitán, Jalisco México (AMAJ) y Arandas, Jalisco, México (ARAJ).

Localidad	Fecha	Periodos de asimilación positiva de CO_2 (h)			Asimilación neta diaria de CO_2 ($\text{mmol m}^{-2} \text{d}^{-1}$)
		Total	Noche	Día	
AMAJ	Septiembre 8-9 1998	11	9	2	141
	Noviembre 11-12 1998	13	11	2	376
	Enero, 14-15 1999	15	12	3	578
	Marzo 12-13, 1999	17	11	6	921
	Junio 29-30, 1999	12	10	2	362
	Agosto 3-4, 1999	12	10	2	438
ARAJ	Septiembre 22-23, 1998	18	11	7	763
	Noviembre 19-20, 1998	14	11	3	419
	Enero 21-22, 1999	15	12	3	416
	Marzo 26-27, 1999	16	12	4	572
	Junio 25-26, 1999	13	11	2	280
	Agosto 6-7, 1999	13	11	2	188

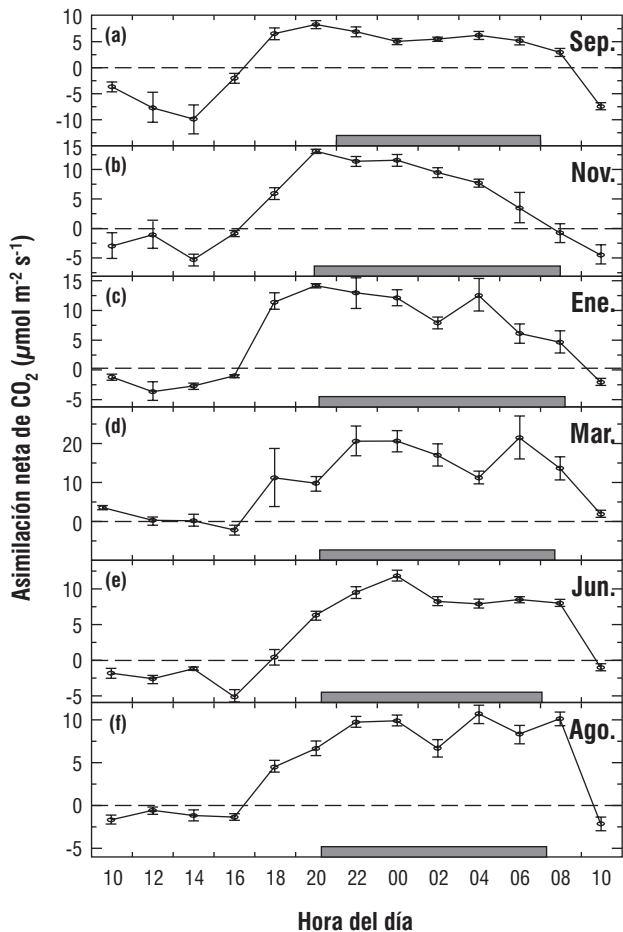
disminuir de nuevo a 2 horas durante el verano de 1999 (Cuadro 4).

La reducción en los valores totales de asimilación neta diaria de CO_2 registrada en ARAJ en noviembre de 1998 y en enero de 1999, fue debida a las bajas temperaturas nocturnas. Durante estos meses las tasas más altas de asimilación instantánea de CO_2 se registraron al empezar la noche cuando aún prevalecen temperaturas moderadas (Fig. 5), disminuyendo después de la medianoche. Lo contrario ocurrió durante el verano, cuando los valores más altos fueron registrados alrededor de la medianoche. En

adición, las temperaturas en ARAJ después de la medianoche fueron menores a 0°C en enero de 1999 (Fig. 5)

Durante estos meses se observó pérdida de turgencia en las hojas, similar a la que ocurre en periodos prolongados de sequía, lo que se debe al daño causado por las temperaturas bajas en las hojas, que dañan a las células del parénquima medular (parte clara translúcida de la hoja, que se encuentra al centro de las áreas verdes), debido a que éstas se colapsan y pierden la turgencia. Una vez que las temperaturas se incrementan de nuevo al final del invierno, las hojas empiezan a recuperarse del frío y

Figura 3. Asimilación neta de CO_2 durante periodos de 24 h en *Agave tequilana* en la localidad de Amatitán, Jalisco, durante los meses de septiembre de 1998 (a), noviembre de 1998 (b), enero de 1999 (c), marzo de 1999 (d), junio de 1999 (e) y agosto de 1999 (f). Los datos son promedios \pm error estándar, al menos que los errores sean menores que los símbolos ($N=8$ plantas). Las barras grises indican el periodo de oscuridad.



se nota una recuperación de la actividad fotosintética en ARAJ, ya que la asimilación diaria neta de CO₂ se incrementa de enero (416 mmol m⁻² d⁻¹) a marzo de 1999 (572 mmol m⁻² d⁻¹) (Cuadro 4).

Estimaciones recientes sobre la capacidad de captura de carbono en plantas jóvenes y adultas de *A. tequilana* mostraron que incorporan una cantidad substancial de CO₂ atmosférico a su biomasa en comparación con otras especies herbáceas y perennes leñosas, particularmente en plantas adultas cuyos valores de captura de carbono están cercanas a la caña que es una las plantas en que se han registrado los

valores más altos de captura de carbono (Larcher 2003). Además, llama la atención el hecho de que las plantas CAM como el agave presentan una mayor eficiencia en el uso del agua ya que la transpiración es menor en comparación con plantas C₃ y C₄ (Cuadro 5).

Discusión

Al inicio de este proyecto se esperaba que el clima cálido que prevalece en la localidad cálida de AMAJ redujera la actividad fotosintética de *Agave tequilana* más que la región fresca de ARAJ, ya que en plantas

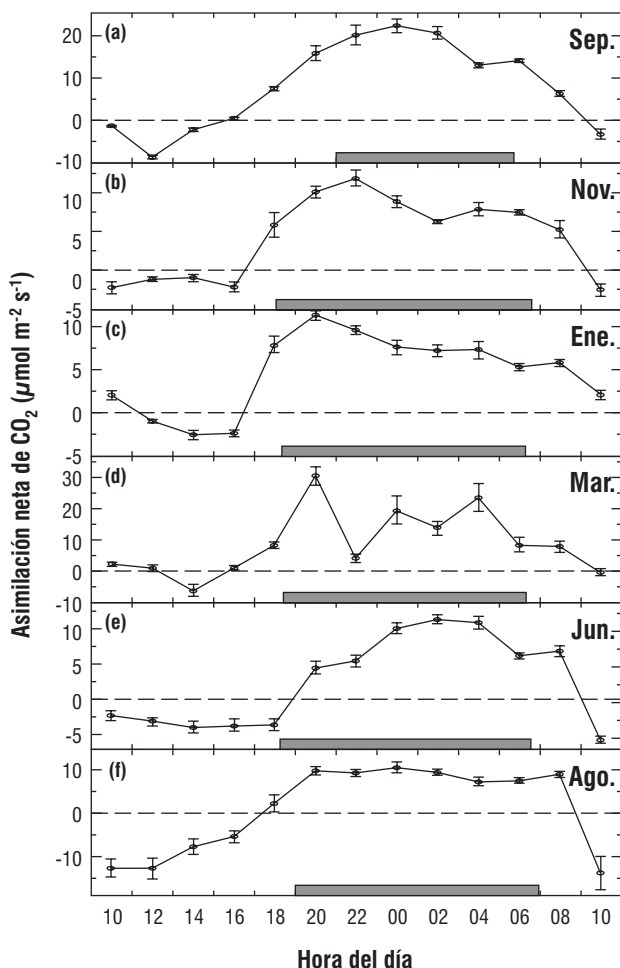
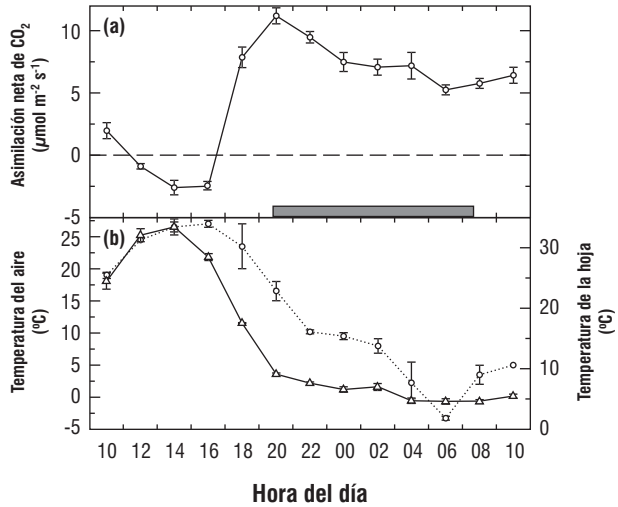


Figura 4. Asimilación neta de CO₂ durante periodos de 24 h en *Agave tequilana* en la localidad de Arandas, Jalisco, durante los meses de septiembre de 1998 (a), noviembre de 1998 (b), enero de 1999 (c), marzo de 1999 (d), junio de 1999 (e) y agosto de 1999 (f). Los datos son promedios ± error estándar, al menos que los errores sean menores que los símbolos (N=8 plantas). Las barras grises indican el periodo de oscuridad.

Figura 5. Asimilación neta de CO₂ (a) y temperatura del aire (○) y de la hoja (△) (b), en un periodo de 24 h en la localidad de Arandas, Jal., enero 21 y 22 de 1999.



Cuadro 5. Captura de carbono en especies de C₃ y C₄ y CAM de importancia económica.

Especie	Tipo de metabolismo	Asimilación de C (ton ha ⁻¹ año ⁻¹)	Transpiración (g. H ₂ O m ⁻²)
Caña (<i>Saccharum officinarum</i>)	C ₄	35	550
Agave azul (<i>Agave tequilana</i>) (6 años)	CAM	26	200
Nopal (<i>Opuntia ficus-indica</i>)	CAM	24	
Eucalipto (<i>Eucalyptus globulus</i>)	C ₃	20	950
Maíz (<i>Zea mays</i>)	C ₄	15	
Piña (<i>Ananas comosus</i>)	CAM	12	
Papa (<i>Solanum tuberosum</i>)	C ₃	10	
Agave azul (<i>A. tequilana</i>) (2 años)	CAM	9	
Soya (<i>Glycine max</i>)	C ₃	5	

CAM regularmente las temperaturas cálidas reducen la asimilación neta de CO₂, mientras que las frescas favorecen la ganancia de carbono (Hanscom y Ting 1978; Kluge y Ting 1978; Nobel 1988; Nobel et al. 1998). Las temperaturas altas durante la fase IV del metabolismo CAM favorecen la fotorespiración (Osmond 1978; Maxwell et al. 1997) lo cual se percibe al registrar valores negativos bajos como ocurrió en la tarde de septiembre de 1999 en AMAJ. Sin embargo, cuando se compara la asimilación promedio durante un año, se encontró que la ganancia de carbono fue ligeramente superior en AMAJ que en ARAJ, ya que el

promedio de las mediciones de asimilación neta diaria de CO₂ realizada durante un año fue de 469 mmol m⁻² d⁻¹ en AMAJ y 439 mmol m⁻² d⁻¹ en ARAJ. La pérdida diaria de carbono por la respiración en los días con temperaturas día/noche altas que se encuentran alrededor o arriba de 35/25°C, restringe grandemente los lugares donde *A. tequilana* puede ser cultivada exitosamente, ya que se reduce la acumulación de carbono en la piña. (Nobel et al. 1998).

Se encontró que las temperaturas frescas nocturnas desempeñan un papel más importante en la asimilación CO₂ que las diurnas, al igual que en otras plantas

CAM (Hascom y Ting op. cit.; Pimienta-Barrios et al. 2000; Nobel et al. 2002); debido a que las temperaturas frescas moderadas en la noche favorecen la actividad de la enzima PEPcase, y la asimilación de CO_2 en plantas CAM en condiciones controladas (Israel y Nobel 1995). Esto se percibe al evaluar la evolución de la asimilación de CO_2 en AMAJ de septiembre 1998 a marzo de 1999. En estas mediciones se encontró que el incremento gradual en la asimilación de CO_2 que alcanzó su máximo en el mes de marzo de 1999, se acompañó de una reducción gradual en la temperatura nocturna, ya que esta disminuyó de 21°C en septiembre de 1998 a 16°C en marzo de 1999. En contraste, las temperaturas durante el día tuvieron una reducción menor de únicamente 2°C en el mismo periodo.

En ambas localidades se obtuvieron valores más altos de asimilación neta diaria de CO_2 durante al final del invierno, cuando se reduce la humedad disponible en el suelo. El hecho de que *Agave tequilana* tenga una ganancia alta de carbono cuando se reduce la disponibilidad de agua, se atribuye a la succulencia de las hojas. La succulencia permite que el tejido fotosintético de las hojas de agave azul se mantenga hidratado, lo cual hace posible la apertura de estomas y la captura de carbono en condiciones de sequía (Nilsen et al. 1989; Nobel 1995; Pimienta-Barrios et al. 2003), y permite a esta planta poder capturar carbono hasta 4 meses después de que se ha reducido substancialmente el contenido de agua en el suelo.

Los patrones de asimilación neta diaria de CO_2 registrados en *A. tequilana* mostraron algunas similitudes con los patrones observados en otras especies cultivadas de agave (*Agave angustifolia*, *A. salmiana* y *A. mapisaga*) (Nobel 1988; Nobel et al. 1992; Jacinto y García-Moya 1995); sin embargo, la última especie mostró las tasas instantáneas más altas y los valores más altos de asimilación neta diaria de CO_2 . Por otro lado los valores

máximos de asimilación instantánea y los de asimilación diaria son superiores a los valores registrados en *A. furcroydes* (entre 8 y $11 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y *A. deserti* ($6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), dos especies de agave no domesticadas (Nobel 1988).

En AMAJ se registró asimilación diurna de CO_2 durante las mediciones realizadas en otoño e invierno, mientras que en ARAJ únicamente se presentó a finales de verano e invierno. Esta asimilación diurna se atribuye a la activación de la enzima fotosintética conocida como Rubisco, la cual en combinación con la enzima nocturna PEPcase, aumenta la fijación de CO_2 . (Nobel, 1994). Esta información es relevante, debido a que la activación de estas dos enzimas fotosintéticas incrementa la demanda de nitrógeno. La asimilación diurna de CO_2 fue más activa en AMAJ que en ARAJ, por lo cual se puede inferir que las necesidades de nitrógeno pueden ser mayores en AMAJ.

Agave tequilana tiene una tolerancia limitada a las temperaturas bajas, lo cual reflejó principalmente una restringida capacidad de aclimatación conforme las temperaturas de crecimiento fueron disminuyendo. La temperatura de aclimatación es de sólo 1.1°C por cada 10°C de disminución en la temperatura, la cual es relativamente ligera. Hasta la fecha se ha estudiado la tolerancia al frío en 19 especies de agave y de éstas, 13 presentan mayor tolerancia a temperaturas bajas que *A. tequilana*, (Nobel 1988). La limitada tolerancia a temperaturas bajas de *A. tequilana* es consistente con la ausencia del cultivo en regiones frías del estado de Jalisco. En particular, no se cultiva en localidades donde la temperatura del aire llega a ser menor a -4°C . Por tanto *A. tequilana* no puede cultivarse con éxito en localidades donde de manera ocasional puedan presentarse temperaturas inferiores a -7°C . Por otro lado, tampoco se cultiva en regiones de Jalisco donde las temperaturas del aire exceden los 36°C .

Agave tequilana tiene tasas de asimilación de CO₂ y valores de asimilación neta similares a plantas C₃ y C₄ que crecen en condiciones óptimas de humedad de suelo pero con bajas tasas de transpiración (Nobel 1991; 1994). Sin embargo *A. tequilana* tiene tasas de asimilación sustanciales a través de todo el año, y los altos valores de asimilación neta de CO₂ ocurren tanto en condiciones de humedad como sequía si las temperaturas moderadas día/noche prevalecen. El incremento en las áreas de cultivo de *A. tequilana* tiene aparentemente beneficios agronómicos y ecológicos por la facilidad de esta planta CAM de secuestrar carbono durante largos periodos de sequía cuando pocas plantas C₃ y C₄ y algunas plantas nativas pueden fijar CO₂ atmosférico (Pimienta-Barrios et al. 2001).

Conclusiones

1. *A. tequilana* tiene pobre tolerancia a las temperaturas bajas y limitada capacidad de aclimatación a estas temperaturas.
2. Los valores más altos de asimilación diaria neta de CO₂ se registraron durante los meses en que ocurren temperaturas moderadas durante el día y la noche. Por tanto, la temperatura nocturna es el factor ambiental más importante en la regulación de la ganancia de carbono en *A. tequilana*. La luz y la humedad del suelo, afectan en menor grado el proceso de fotosíntesis en condiciones de campo.
3. El agave azul es una especie idónea para climas subtropicales, con régimen térmico de templado a semicálido. Dentro de estos tipos climáticos, su cultivo debería ser promovido entre los 1600 y 2000 msnm para asegurar condiciones térmicas óptimas.
4. *Agave tequilana* presenta ganancias sustanciales de carbono durante la mayor parte del año, aún cuando el contenido de humedad del suelo sea baja, Por lo que el

incremento en la superficie cultivada puede traer beneficios agronómicos y ecológicos, debido a su habilidad de secuestrar o retirar carbono del aire.

Agradecimientos

Esta investigación fue financiada por el Programa General de Apoyo y Desarrollo Tecnológico a la Cadena Productiva Agave-Tequila, con fondos proporcionados por el Gobierno del Estado de Jalisco, CONACyT y Productores e Industriales del Agave, la Universidad de Guadalajara y la Universidad de California en los Angeles. Asimismo, a dos revisores anónimos por sus sugerencias para mejorar este documento.

Literatura citada

- CRT.** 2004. *Anuario estadístico del sistema agave-tequila*. Consejo Regulador del Tequila. Guadalajara, Jalisco, México. 50 pp.
- Hanscom, Z. y I. P. Ting.** 1978. Irrigation magnifies CAM-photosynthesis in *Opuntia basilaris* (Cactaceae). *Oecologia* **33**: 1–15.
- Israel, A. A. y P.S. Nobel.** 1995. Growth temperature versus CO₂ uptake, Rubisco and PEPCase activities, and enzyme high temperature sensitivities for a CAM plant. *Plant Physiol. Biochem.* **33**: 345–351.
- Jacinto, R.J. y E. García-Moya.** 1995. Fijación de CO₂ en *Agave angustifolia* Haw. *Bol. Soc. Bot. Méx.* **57**: 5–10.
- Kluge, M. y I. P. Ting.** 1978. *Crassulacean Acid Metabolism*. Analysis of an Ecological Adaptation. Springer-Verlag, Berlin. 209 pp.
- Larcher, W.** 2003. *Physiological Plant Ecology*. Springer. Heidelberg. 506 pp.
- Maxwell, K., S. von Caemmerer, y J. R. Evans.** 1997. Is a low internal conductance to CO₂ diffusion a consequence of succulence in plants with crassulacean acid metabolism? *Austra. J. Plant Physiol.* **24**: 777–786.
- Nilsen, E., F.C. Meinzer y P.W. Rundel.** 1989. Stem photosynthesis in *Sorothamum spinosus* (smoke tree) in the Sonoran Desert of California. *Oecologia.* **79**: 193–197.
- Nobel, P.S.** 1988. *Environmental Biology of Agave and Cacti*. Cambridge University Press, New York, 270 pp.

- Nobel, P. S.** 1991. Environmental influences on CO₂ uptake by Agaves, CAM plants with high productivities. *Econ. Bot.* **44**(4): 488–502.
- Nobel, P. S.** 1994. *Remarkable Agaves and Cacti*. Cambridge University Press. New York, USA. 166 p.
- Nobel, P. S.** 1995. *Environmental Biology*. In: Barbera, G., Inglese, P., Pimienta-Barrios, E (Eds). *Agroecology, Cultivation, and Uses of Cactus Pear*. FAO. Plant Production and Protection Paper, Roma, Italia. 216p
- Nobel, P. S., García-Moya y E. Quero.** 1992. High annual productivity of certain agaves and cacti under cultivation. *Plant Cell Env.* **15**: 329–335.
- Nobel, P. S., M. Castañeda, G. North, E. Pimienta-Barrios y J. A. Ruiz-Corral.** 1998. Temperature influences on leaf CO₂ exchange, cell viability and cultivation range for *Agave tequilana*. *J. Arid Env.* **39**:1–9.
- Nobel, P. S., E. Pimienta-Barrios, J. Zañudo-Hernández, y B. C. Ramírez-Hernández.** 2002. Historical aspects and net CO₂ uptake for cultivated crassulacean acid metabolism plants in Mexico. *Ann. Appl. Biol.* **140**: 133–142.
- Osmond, C. B.** 1978. Crassulacean acid metabolism: a curiosity in context. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **29**: 379–414.
- Pimienta-Barrios, Eu., J. Zañudo, E. Yepez, En. Pimienta-Barrios y P. S. Nobel.** 2000. Seasonal variation of net CO₂ uptake for cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) and pitayo (*Stenocereus queretaroensis*) in a semiarid environment. *J. Arid Env.* **43**: 73–83.
- Pimienta-Barrios, E., C. Robles-Murguía y P. S. Nobel.** 2001. Net CO₂ uptake for *Agave tequilana* in a warm and temperate environment. *Biotropica.* **33**(2): 312–318.
- Pimienta-Barrios, E., A. Muñoz-Urias, M. E. González del Castillo-Aranda, y P. S. Nobel.** 2003. Effects of benomyl and drought on the mycorrhizal development and daily net CO₂ uptake of a wild platyopuntia in a rocky semiarid environment. *Ann. Bot.* **92**: 1–7.
- Torres, E. R.** 1984. *Manual de Conservación de Suelos*. Editorial Diana, México, D.F. 180 pp.
- Valenzuela, A. G.** 1994. *El Agave Tequilero: Su cultivo e industrialización*. Guadalajara, México: Monsanto. 119 pp.

Recibido el 24 de mayo de 2005
Aceptado el 29 de agosto de 2005

Cochineal (HEMIPTERA: DACTYLOPIIDAE) production

Viguera¹, A. L., C. Llanderal-Cázares² and L. Portillo¹

¹Departamento de Botánica y Zoología. Universidad de Guadalajara. Apdo. Postal 1-139. 45101 Zapopan, Jalisco, México.

²Instituto de Fitosanidad, Colegio de Posgraduados, km 36.5 carr. México-Texcoco, Montecillo Edo. de México.

Correo electrónico: aviguera@cucba.udg.mx

Resumen: Se presentan cuatro métodos de infestación y dos métodos de cultivo para la producción de *Dactylopius coccus*. La infestación de cladodios con cilindros de palma y bolsa de tul fueron los más adecuados. La producción de cochinilla en cladodio cortado y plantado bajo cobertizo, produjeron un número similar de hembras por lo que no hay diferencia en el empleo de ambos sistemas de producción.

Abstract: Four inoculation and two rearing methods were evaluated relative effectiveness in the production of *Dactylopius coccus*. Inoculating prickly pear cacti cladode by placing ovipositing females in palm leaf cylinders and tulle bags which are then attached to the cladodes gave highest yields. Rearing cochineal scale insect on isolated (cut) cladodes and on planted cladodes, both of them under roof cover produced similar number of females.

Key words: *Dactylopius coccus*, propagation, production, cochineal.

Introduction

The genus *Dactylopius* is a member of the family cochineal scale insect Dactylopiidae (Homoptera) (Ferris 1955) and consists of ten species, all associated with Cactaceae (Portillo 2005). For many centuries the species *Dactylopius coccus* Costa or the fine cochineal, has been used as source of natural red dye (Baranyovits 1979).

Commercial cochineal production involves unique inoculation and rearing methods which allows for high populations numbers of the insect to be maintained. There are different methods available and the choice depends largely of the climatic conditions of the locality where the rearing takes place. From ancient times, two methods have been used for cochineal rearing in Mexico. The first was on established (growing) plants and the second on isolated (cut) cladodes kept under roof cover (Llanderal and Campos 1999). The structures for rearing cochineal under roof protection can be made of wood, agronylon material, shade cloth, palm leaves, transparent or black plastic and other materials (Rodríguez and

Portillo 1990; Santibáñez 1990). The propagation of cochineal on isolated cladodes under roof cover is recommended when conditions for rearing in the open becomes unfavorable because of adverse biotic and abiotic conditions and where the insects need special protection. The objectives of this study were to evaluate four inoculation and two rearing methods generally recommended for cochineal production in Mexico.

Materials and methods

The experiment was carried out from October 1996 through February 1997. Temperature and RH records were kept inside the shed during the course of the studies in Oaxaca, Mexico.

A total of 374 prickly pear cladodes of the cultivar «nopal de Castilla» (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.) were infested with cochineal. Two rearing methods were used, namely isolated (cut) cladodes and planted cladodes. In the first method 187 isolated cladodes were perforated at the base and

then suspended from a frame with plastic covered wire threaded through the holes. The second method consisted of planting 187 isolated cladodes in a substratum of sand (75%) and cow manure (25%). The study was carried out under semi-controlled conditions, inside a shed made of brick walls and covered by a metal roof.

Four inoculation methods were used to infest cladodes with the fine cochineal, namely: a) «Tenate», which consist in placing the ovipositing females inside

cylinders made of palm leaves and sticking these onto the cladodes (Vigueras 1998), b) tulle bag method of 6 × 6 cm (Flores 1995), c) the «Ricci» method (Portillo et al. 1992), and d) «popote» method using a laterally perforated straw (Vigueras 1998) (Figure 1). Eight females for each method was utilized. All inoculation methods were left for 21 days on the cladodes to allow optimum settlement of the crawlers.

All data were subjected to analyses of variance and means values were compared



Figure 1. Different methods of inoculation. a) Ricci, b) tenate, c) popote and d) tulle bag.

by Tukey's multiple test to detect significant differences between means of individuals variables, using the SAS procedure PROC GLM (SAS Institute 1985).

Results and discussion

The temperature during the experiment registered a maximum of 38 °C, a minimum of 2.6 °C and a mean of 21 °C. With this variation, the cochineal biological cycle was completed in 126 days in comparison with 84 days reported by Montiel (1995). During the establishment of the crawlers there was high mortality of them.

A total production of 12,622 mature females was harvested from 374 cladodes. The 106 cladodes infested by means of palm leaf cylinders method gave a total of 4,664 mature females, while tulle bags registered 4,041 females from 86 cladodes. The 92 cladodes infested with the straw bags produced 2,323 females and «Ricci» with 90 cladodes produced 1,594 cochineals. The 187 suspended cladode gave a total of 6,766 matures females while the 187 rooted cladodes produced 5,856 females (Figure 2).

No significant differences at the $\alpha = 0.05$ level were calculated between the palm leaf cylinders and tulle bags methods and between the «Ricci» and the straw methods but significant differences occurred between the former two and the latter two methods (Table 1).

Table 1. Cochineal female number per cladode in the four inoculation methods.

Inoculation method	Mean*
Tulle bag	46.98 A
Tenate	44.00 A
Popote	25.25 B
Ricci	17.71 B

*Treatments with the same letter are not significantly different (Tukey $p = 0.05$).

These results may be explained in part by the better access of the crawlers to the cladodes when emerging from first two inoculation methods. However, the results could also be explained by temperature variations in the shed during the experiment. Méndez (1992) observed that temperatures at 25 °C improved the development and growth of the insect. Other factors that could have had a significant influence on cochineal development include, photoperiod and humidity, among others. The palm leaf cylinder not only provided excellent protection to the females but also provides insulation resulting in an even temperature and so preventing excessive dehydration of the females.

The new method of using straw for inoculation gave a mean of 27 females per cladode. This method could be useful when larger numbers of ovipositing females have to be used for inoculation. However, because of the short life-span of the straws,

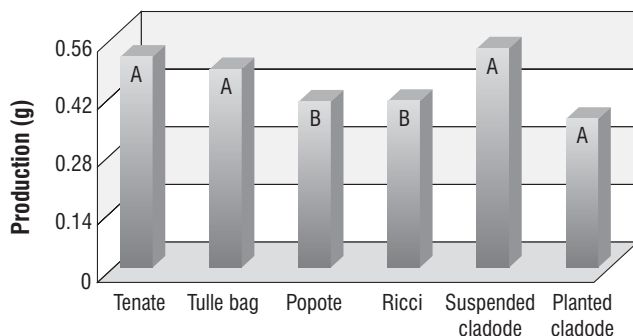


Figure 2. Production of cochineal with four inoculation and two rearing methods.

it may be necessary to replace them during inoculation which, from a productivity point of view, is uneconomical.

The «Ricci» method produced the smallest quantity (mean 17) of mature cochineal per cladode; the low temperatures during the experiment and the exposure of the females to these conditions could explain low production. This was evident from the high number of underdeveloped females at the time of harvest compared to the other methods. Carranza et al. (1996) also reported on the «Ricci» method where a similar low level of production was observed. This inoculation method may be more suitable where extreme temperatures are not important.

There was no difference between the production obtained in two rearing methods (Table 2). In isolated suspended cladodes the loss of turgidity favors settling of the crawlers as was reported by Vargas and Flores (1985) who made similar observations. In rooted cladodes, fertilization and watering were important for host plant development and subsequent cochineal production. This agrees with findings by Navarro and Palomino (1985) and Vigueras and Portillo (1995) who demonstrated reduced cochineal production where fertilizers were excluded.

A yield of 44 females per cladode as observed in this study using the tenate inoculation methods must still be considered as good in view of the adverse climatic conditions during the experiment. Also reporting on the same inoculation method Carranza et al. (1996) mentioned a mean of 58 females from isolated, suspended cladodes kept under similar temperature regimes. The smaller yields recorded from our study could therefore also be attributed to high insect mortalities and smaller individuals. Although the overall yields were unacceptable low for a viable cochineal production, the results nevertheless evaluated the different inoculation and rearing methods which can be useful when starting a production unit. In conclusion the palm leaf and the tulle

Table 2. Cochineal females per cladode in two rearing methods.

Rearing methods	Mean*
Suspended cladode	36.18 A
Planted cladode	31.31 A

*Treatments with the same letter are not significantly different (Tukey $p = 0.05$).

bag were the best means on inoculating cladodes. Rearing cochineal on isolated suspended cladodes and on rooted fertilized cladodes yielded similar production.

Acknowledgments

We thanks to the Centro para la Difusión del Conocimiento de la Grana Cochinilla (Tlapanochestli, A. C.), de Oaxaca, México, for the facilities and materials used in this investigation. We also thanks Dr. Helmuth Zimmermann (Plant Protection Research Institute, Pretoria, South Africa) for his helpful review of the manuscript.

References cited

- Baranyovits, F. L. C.** 1979. Cochineal carmine: An ancient dye with a modern role. *Endeavour* (N.S.) **2**: 85–92.
- Carranza A., G., L. Portillo M. and A. L. Vigueras G.** 1996. Factibilidad del cultivo de la cochinilla del carmín en Zapotlanejo, Jalisco, México. *Dugesiana* **3**(2): 19–31.
- Ferris, G. F.** 1955. *Atlas of the scale insects of North America*. Vol. VII. Stanford, C.A., Stanford University Press. 233 pp.
- Flores F., V. I.** 1995. Crianza de la cochinilla en Sudamérica. In: *Memorias del Conocimiento y Aprovechamiento del Nopal*. 6to. Congreso Nacional y 4to. Internacional. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jalisco, México. pp. 48–55.
- Llanderal C., C. and M. Campos F.** 1999. Sistemas de producción de la grana cochinilla. In: *Cría de la grana cochinilla del nopal para la producción de su pigmento*. Colegio de Postgraduados. México. p. 61–67.

- Méndez-Gallegos, J., J.** 1992. *Tasas de supervivencia y reproducción de la grana cochinilla Dactylopius coccus (Homoptera: Dactylopiidae) a diferentes temperaturas*. Tesis de Maestría, Colegio de Posgraduados. 70 pp.
- Montiel R., L.** 1995. *Morfología de Dactylopius coccus Costa (Homoptera: Dactylopiidae) y su biología y producción en dos fotoperiodos*. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Méx. México. 104 pp.
- Navarro A., W. and R. Palomino M.** 1985. Influencia del abonamiento en la producción de cochinilla *Dactylopius coccus Costa* en praderas naturales de tuna. In: *Resúmenes de las ponencias presentadas en el "Primer Congreso Nacional de Tuna y Cochinilla"*. Ayacucho, Perú. pp. 61–62.
- Portillo M., L., A. L. Viguera G. and A. D. Zamarripa F.** 1992. El método Ricci: Una nueva técnica de infestación para la coccidocultura. In: *Resúmenes del V congreso Nacional y III Internacional Sobre el Conocimiento y Aprovechamiento del Nopal*, Universidad Autónoma de Chapingo. Chapingo, Edo. de México. pp. 77–78.
- Portillo, L.** 2005. Origen de *Dactylopius coccus Costa* (Hemiptera: Dactylopiidae): ¿Norte o Sudamérica?. *Dugesiana* **12**(1): 1–8.
- Rodríguez, M., I. and L. Portillo M.** 1988. Algunas especies hospederas del género *Opuntia* como hospederas de *Dactylopius coccus Costa*. In: *Memorias de la 3er. Reunión Nacional y 1er. Internacional sobre el Conocimiento y Aprovechamiento del Nopal*. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila, México. pp. 92.
- Santibáñez W., L. G.** 1990. *Ciclo biológico, cultivo y aprovechamiento de la cochinilla del nopal Dactylopius coccus Costa en el municipio de Villa Díaz Ordaz, Tlacolula, adscrito al centro Coordinador Indigenista (I.N.I.) Zapoteco del Valle Oaxaca*. Reporte de Servicio Social. Universidad Autónoma Metropolitana. México. 149 pp.
- SAS Institute.** 1985. *SAS. Introductory guide for personal computers* ver 6.3. Raleigh, N. C. U.S.A. 111 pp.
- Vargas G. F. and V. I. Flores F.** 1985. Frecuencia de oviposición de la «cochinilla del carmín» *Dactylopius coccus Costa* en condiciones de laboratorio-Ayacucho. In: *Resúmenes de las ponencias presentadas al "Primer Congreso Nacional de Tuna y Cochinilla"*. Ayacucho, Perú. pp. 47–48.
- Viguera G., A. L. and L. Portillo M.** 1995. Determinación de ácido carmínico en dos generaciones de *Dactylopius coccus Costa* mediante cultivo hidropónico en nopal. *Nakari* **6**(3): 41–48.
- Viguera G., A. L.** 1998. *Producción de cochinilla Dactylopius coccus Costa y condiciones de extracción del pigmento*. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Méx. México. 86 pp.

Recibido el 10 de junio de 2005
Aceptado el 15 de noviembre de 2005

Latencia y escarificación química en semillas de frijol silvestre (*Phaseolus vulgaris* L., FABACEAE)

Rogelio Lépez Ildelfonso¹, José de Jesús López Alcocer², Fernando Santacruz Ruvalcaba¹ y Eduardo Rodríguez Guzmán¹

¹Instituto de Manejo y Aprovechamiento de los Recursos Fitogenéticos, Departamento de Producción Agrícola, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA), km 15.5 carretera Guadalajara a Nogales, C. P. 45101, Nextipac, Zapopan, Jalisco. Correo electrónico: rlepiz@cucba.udg.mx.

²Estudiante de Maestría en Ciencias Agrícolas, Departamento de Producción Agrícola, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA), km 15.5 carretera Guadalajara a Nogales, C. P. 45101, Nextipac, Zapopan, Jalisco.

Resumen: Con el objeto de conocer el efecto del ácido sulfúrico sobre el fenómeno de latencias que presentan las semillas de frijol en sus formas silvestre, intermedia y cultivada, se realizó un experimento que constó de cinco tiempos de inmersión en ácido sulfúrico concentrado (98%): 0, 15, 30, 45 y 60 minutos. Los resultados de este ensayo, mostraron lo siguiente: a) existe latencia en semillas de frijol silvestre, no así en las formas intermedia, ni cultivada; b) los tratamientos de inmersión de 0, 15, 30, 45 y 60 minutos en ácido sulfúrico concentrado, presentaron porcentajes de germinación del frijol silvestre de 0, 81, 95, 100 y 100%, respectivamente; c) las inmersiones en ácido sulfúrico por 45 y 60 minutos, mostraron daños en raíces (menor crecimiento y necrosis), en hipocotilo (menor desarrollo) y en la testa (desintegración y necrosis), principalmente en las formas intermedia y cultivada. De los ensayos de escarificación química, se puede concluir que: a) la inmersión en ácido sulfúrico concentrado, es una buena opción para romper la latencia del frijol silvestre; b) el mejor tiempo de inmersión en ácido sulfúrico concentrado, fue de 30 minutos. Adicionalmente, se encontró que cualquier grado de escarificación mecánica que no dañe al embrión, es eficiente para romper la latencia en semillas de frijol silvestre y que los frijoles conocidos como intermedios o tipos maleza, no presentan el fenómeno de dormancia en la semilla.

Palabras clave: *Phaseolus vulgaris* L., formas silvestre, intermedia y cultivada, latencia, escarificación, ácido sulfúrico.

Abstract: With the intention of knowing the effect of sulfuric acid on the phenomenon of latencies that present the seeds of beans in their wild, intermediate and cultivated forms, an experiment was made that consisted of five durations of immersion in concentrated sulfuric acid (98%): 0, 15, 30, 45 and 60 minutes. The results of this test, showed the following: a) latency exists in seeds of wild beans, not in the intermediate or cultivated forms; b) the treatments of immersion of 0, 15, 30, 45 and 60 minutes in concentrated sulfuric acid, presented 0, 81, 95, 100 and 100 percent of germination of wild beans respectively; c) the sulfuric acid immersions of 45 and 60 minutes, showed damages in the roots (smaller growth and necrosis), in hypocotyl (smaller development) and the testa (disintegration and necrosis), mainly in the intermediate and cultivated forms. From these tests of chemical scarification, it is possible to conclude that: a) the concentrated sulfuric acid immersion, seems to be a good option to interrupt the latency in wild bean germination; b) the best time of immersion in concentrated sulfuric acid, was 30 minutes. Additionally, any degree of mechanical scarification that does not damage the embryo, was efficient in interrupting the latency in seeds of wild beans, and beans known as intermediate or weedy types, do not present the phenomenon of dormancy in their seed.

Key words: *Phaseolus vulgaris* L., wild, weedy and cultivated forms, dormancy, scarification, sulfuric acid.

Introducción

1. JUSTIFICACIÓN

En la estación de crecimiento de Primavera-Verano 2004 se instaló un ensayo preliminar bajo condiciones de invernadero, para iniciar la caracterización morfológica de algunos genotipos silvestres, cultivados e intermedios entre formas silvestres y cultivadas de frijol, con el fin de conocer si los materiales genéticos identificados como intermedios o tipos maleza (en inglés *weedy types* o *weedy forms*), son realmente híbridos entre las dos formas comunes. Conociendo la existencia del fenómeno de latencia o dormancia en semillas de frijol silvestre, para asegurar la germinación y emergencia de las formas silvestres e intermedias, se procedió a la escarificación mecánica. No obstante el éxito de la escarificación practicada, se registraron algunos problemas en la emergencia de plantas en los frijoles silvestres, tal vez por la heterogeneidad en el grado de escarificación. Adicionalmente, la escarificación mecánica es tardada cuando se trata de semillas pequeñas o un alto número de las mismas. Por lo anterior, en el primer semestre de 2005 se consideró importante buscar un medio de escarificación más sencillo, seguro y donde se pudiera manejar un mayor número de semillas. La revisión de literatura mostró posibilidades mediante la inmersión en ácido sulfúrico, por lo que se tomó la decisión de evaluar tiempos de inmersión de la semilla de frijol silvestre en ácido sulfúrico concentrado, con el objetivo de encontrar un método alternativo a la escarificación mecánica.

2. LATENCIA O DORMANCIA EN SEMILLAS

Una semilla es, en esencia, una planta pequeña cuyas actividades vitales están reducidas al mínimo; es también el vehículo principal para preservar y transportar a la especie de un lugar a otro. Muchas semillas, sobre todo las de las plantas cultivadas, inician la germinación tan pronto disponen de humedad y temperatura adecuadas.

Otras semillas, entre las que se incluyen las de numerosas plantas ornamentales y la mayoría de las especies silvestres, no lo hacen, sino en condiciones especiales. Estas semillas presentan uno o varios obstáculos a los procesos de germinación y se identifican como semillas con latencia o dormancia (Toole y Toole 1986).

El fenómeno de latencia se define como el período de reposo, letargo o dormancia de algunas semillas, originado por un obstáculo físico o químico que les impide germinar inmediatamente después de la madurez (Robles 1995; Pollock y Toole 1986). La condición de latencia, es una ventaja para las semillas y la preservación de las especies. Una especie tiene mayores posibilidades de sobrevivir, si la germinación se extiende por un período de varios años. No es un fenómeno accidental, sino el resultado de mecanismos fisiológicos que conserva a la semilla en condiciones de letargo para evitar la germinación inmediata y uniforme (Pollock y Toole 1986).

Los obstáculos que impiden llevarse a cabo la germinación son variables. El físico y más común, es la existencia de semillas de envolturas impermeables, como es el caso de muchas leguminosas; estas semillas permanecen inalterables al efecto del agua después de someterlas a pruebas de germinación, no obstante haber tenido las condiciones favorables de humedad y temperatura para tal propósito (ISTA 1999). Si el agua no puede penetrar, no se cumple el primer requisito para la germinación. Las semillas de cubiertas gruesas, pueden ablandarse o romperse en el suelo mediante períodos alternos de frío y calor o de remojo y secado. De manera artificial, las semillas pueden escarificarse mecánicamente frotándolas contra superficies abrasivas; también se puede emplear la escarificación química con ácido sulfúrico o mediante la inmersión en agua caliente (Pollock y Toole 1986).

Los obstáculos químicos dentro de las semillas, son de dos tipos: sustancias químicas inhibitoras que se encuentran en

los tejidos que rodean al embrión y por la inhibición misma de compuestos existentes al interior del embrión. También puede presentarse el fenómeno de latencia, por una deficiencia en la concentración de un compuesto. Se han reportado más de 120 sustancias inhibitoras de la germinación, pero no en todos los casos ha sido posible probar su efecto (Pollock y Toole 1986).

Es un hecho conocido que la semilla de muchas plantas silvestres muestran el fenómeno de dormancia (Toole y Toole 1986). Se sabe que las formas silvestres del frijol común muestran latencia en la semilla debido a la existencia de una capa impermeable sobre la testa y una cera repelente al agua que sella el hilio y micrópilo (Smartt 1988). También se afirma que la selección durante la domesticación del frijol en contra de la dureza de la semilla ha sido efectiva y que la eliminación del fenómeno de latencia es un requerimiento básico para el cultivo comercial de una especie como el frijol que se propaga por semilla (Smartt 1988; Gepts y Debouck 1991; Gepts 1999).

3. ESCARIFICACIÓN DE LAS SEMILLAS

La escarificación mecánica tallando las semillas sobre una superficie rasposa, es una práctica conocida y muy utilizada; el propósito es desbastar la cubierta o testa de las semillas duras e impermeables al agua sin dañar el embrión, para permitir el paso del líquido a su interior y se inicie la germinación. Cuando se trata de semillas pequeñas y en cantidades grandes, la escarificación mecánica no es muy recomendable. Por esta razón, se han ensayado productos químicos corrosivos como el ácido sulfúrico o la inmersión en agua caliente, para reblandecer la testa y permitir el paso del agua al interior de la semilla.

En el caso de semillas de algunas leguminosas, la inmersión en ácido sulfúrico ha sido efectiva. Por ejemplo en sámta (*Coursetia glandulosa* A. Gray) leguminosa forrajera del desierto de Sonora, se obtuvieron porcentajes de

germinación entre 94 y 93%, mediante la inmersión en ácido sulfúrico (Miranda et al. 1996). Las semillas de cuatro leguminosas forrajeras (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit, *Centrocema pubescens* Benth., *C. macrocarpum* Benth. y *Clitoria ternatea* L.) fueron escarificadas por inmersión en ácido sulfúrico concentrado o en agua caliente a 60°C por 5 a 10 minutos. El porcentaje más alto de germinación (94.8%), se registró en *C. macrocarpum* con inmersión de 5 minutos en ácido sulfúrico concentrado (Mármol et al. 1996). En *Cassia sericea* Sw. se estudiaron tratamientos a la semilla a base de ácido sulfúrico, nitrato de potasio, bencyladenina y ethrel. Los tratamientos con nitrato de potasio, con bencyladenina y ethrel, no mejoraron la germinación, pero la inmersión en ácido sulfúrico concentrado por 12 a 21 minutos, resultó en el 100% de germinación (Jayakumar et al. 1989).

Se han hecho trabajos de escarificación química en otras semillas con problemas de latencia, como en semilla de rosas y pitaya agria (*Stenocereus gummosus* (Engelm. ex Brandege) A. Gibson & K. E. Horak) con buenos resultados. En semillas de rosa cultivar *Happiness*, la escarificación por inmersión en ácido sulfúrico a 75% por 15 minutos, produjo el más alto porcentaje de germinación (Bhanuprakash et al. 2004) y en pitaya agria el mejor tratamiento fue la escarificación con ácido sulfúrico concentrado por 30 segundos con el 45% de germinación (Avilés et al. 2001).

4. FORMAS INTERMEDIAS DE FRIJOL COMÚN O TIPOS MALEZA

Toro et al. (1990), definen a los frijoles tipo maleza (en inglés *weedy forms* o *weedy types*), a los genotipos no cultivados resultantes de cruza entre formas silvestres y formas cultivadas de *Phaseolus vulgaris* L. Mencionan que estas formas intermedias son con frecuencia genéticamente inestables, producen numerosos individuos segregantes y que son colonizadores agresivos alrededor de

vegetación secundaria, por ejemplo, en campos de agricultura primitiva o cerca de ellos. Se ven muy rara vez en vegetaciones no perturbadas.

Señalan que los frijoles híbridos entre formas silvestres y cultivadas se han visto en México, Guatemala, Costa Rica, Perú y en Bolivia, pero que falta información precisa sobre su completa distribución. Poco se han colectado y rara vez son cosechados por los agricultores, por lo que no se les encuentra en los mercados o en las reservas de semilla de los productores. El complejo que integran las tres formas silvestre-maleza-cultivada, es una unidad biológica formada por un continuo cruzamiento y flujo de genes entre formas silvestres y cultivadas en un medio ambiente particular, con óptimas condiciones para la reproducción de la especie.

Los mismos autores (Toro et al. 1990), mencionan también que las formas silvestres y los frijoles tipo maleza, son reservorios de variabilidad genética y pueden ser utilizados como fuentes de resistencia a enfermedades y plagas y de genes de tolerancia a estreses abióticos. Informan que hasta junio de 1990, en el Banco de Germoplasma del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), se tenían un total de 838 colecciones de germoplasma de *Phaseolus* no cultivado, contando entre dicho germoplasma con 245 tipos maleza, de los cuales 108 proceden de México y 119 de Perú.

Por su parte, Debouck et al. (1989), informan también haber encontrado un complejo de formas silvestres, intermedias y cultivadas que crecen en asociación con maíz en sitios de agricultura de bajos insumos en la Sierra Sur de Perú. También encontraron formas intermedias mezcladas con variedades criollas o en terrenos de cultivo abandonados. Mencionan que los productores conocen ambos tipos de frijoles (silvestres e intermedios) y que en ocasiones ellos utilizan las formas intermedias para enriquecer sus mezclas de frijoles en cultivo y que son consumidos en

la finca. Presentan una lista de 21 tipos maleza colectados en cuatro sitios; en cada sitio encontraron de cuatro hasta seis colores y tamaños diferentes. Los tamaños medidos en peso del grano, variaron entre 5.6 y 38.8 gramos en 100 semillas, siendo los más comunes los de 10 a 15 g. Hipotetizan que los tipos *weedy* son el resultado de cruas entre formas silvestres y cultivadas simpátricas.

Delgado Salinas et al. (1988), señalan que los frijoles llamados tipos *weedy*, son presumiblemente resultado de polinizaciones cruzadas entre formas silvestres y formas cultivadas, exhiben un número bajo de semillas por vaina (4.2 vs. 5.8) y tienen semillas grandes (11.9 vs. 6.3 g en 100 semillas) respectivamente, en relación a las formas silvestres. Además, las semillas pueden ser cremas, rosadas o amarillas, mismas que pueden ser más susceptibles al daño por predadores. Asientan que es posible realizar con éxito cruas entre formas cultivadas de frijol y formas silvestres, que las plantas F1 son fértiles, indicando este resultado, que no existe aislamiento reproductivo entre ellas. También señalan que varios autores han reportado porcentajes de cruzamiento natural en frijol silvestre, superiores a lo esperado (Bliss 1980: 50% y Vanderborgh 1982: 50%). Señalan que Vanderborgh (1983), informó que la existencia de formas *weedy* es el producto del flujo de genes entre las dos formas principales y que el autor encontró formas intermedias tanto en México, como en Sudamérica.

Delgado Salinas et al. (1988), señalan también que el cruzamiento natural mayor, puede deberse a que el sistema de reproducción por autofecundación en frijol, no sea tan rígido como se ha descrito, sino que en ciertas circunstancias (genotipo específico y ambiente específico), la alogamia puede llegar a ser más importante. Quizá entonces, la hibridación natural y la introgresión desde las formas silvestres hacia las poblaciones cultivadas y viceversa, sea más común y puede asumirse que tal introgresión está ayudando a la

variación ahora vista en las variedades cultivadas. Por su parte Gepts (1999) cita a Nodary et al. (1992), quienes afirman que muchos caracteres relacionados con la domesticación del frijol, como el caso de la dormancia de la semilla, están controlados en buena parte por genes de efectos mayores.

Materiales y métodos

Antes de definir e instalar un ensayo definitivo para evaluar el efecto del ácido sulfúrico como producto químico escarificador en semillas de frijol silvestre, se realizaron tres ensayos exploratorios para determinar dosis, tiempos y materiales a utilizar en el experimento final. Los ensayos exploratorios y el definitivo, se realizaron en la primavera de 2005, en el laboratorio de Cultivo de Tejidos del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA). En todos los casos se utilizaron 25 semillas por tratamiento, las semillas se lavaron con agua y detergente y enseguida se desinfectaron con una solución de cloro al 6%. Las germinaciones se efectuaron en cajas de petri en una cámara húmeda a 27°C y se registraron los datos a partir del segundo día. Se utilizaron los genotipos ROL 242 (silvestre), ROL 133 (forma intermedia) y Garbancillo zarco (cultivado).

Los tratamientos del primer ensayo exploratorio con semillas de frijol silvestre, fueron: cinco tiempos de inmersión (0, 1.5, 3, 4.5 y 6 minutos) y dos concentraciones de ácido sulfúrico (50 y 85%), con dos repeticiones. El segundo ensayo incluyó los siguientes tratamientos: cinco tiempos de inmersión (1, 5, 10, 20 y 30 minutos) en ácido sulfúrico al 85%, con dos repeticiones. En el tercer ensayo, se evaluaron ocho tiempos (1.5, 3, 4.5, 6, 10, 20, 30 y 60 minutos) y dos concentraciones de ácido sulfúrico (44 y 98%), utilizando una sola repetición. En el ensayo definitivo, se utilizó ácido sulfúrico concentrado al 98%, cinco tiempos de inmersión (0, 15, 30, 45 y 60 minutos), tres genotipos de frijol

(silvestre, intermedio y cultivado) y tres repeticiones.

Adicionalmente en dos ensayos más, se evaluaron cuatro niveles de escarificación mecánica en frijol silvestre (cero, ligera, intermedia y severa) y el porcentaje de germinación de la semilla de 10 accesiones de formas intermedias de frijol, sin someterlas a ningún tratamiento de escarificación. En el primer ensayo, el objetivo fue conocer el mejor grado de escarificación mecánica en frijol silvestre y en el segundo experimento, verificar la ausencia de dormancia en otros frijoles intermedios.

Resultados y discusión

Los tiempos de inmersión (0, 1.5, 3, 4.5 y 6 minutos) y las concentraciones de ácido sulfúrico (50 y 85%) utilizadas en el primer ensayo exploratorio, no afectaron la testa de la semilla. Los granos de frijol permanecieron duros, del mismo tamaño y sin germinar. En el segundo ensayo exploratorio, donde se aumentó el tiempo de inmersión (1, 5, 10, 20 y 30 minutos) en ácido sulfúrico al 85% de concentración, tampoco hubo respuesta a la escarificación química. Estos resultados indican que los tiempos y concentraciones utilizadas resultaron bajas y no ablandaron o rompieron la testa dura, misma que se mantuvo como obstáculo físico para la germinación (Pollock y Toole 1986). Indican también que las semillas de frijol silvestre son más resistentes a la escarificación con ácido sulfúrico que algunas leguminosas forrajeras como *Centrocema macrocarpum* (Miranda et al. 1996) y *Cassia sericea* (Jayakumar et al. 1989) o de otras semillas como *Stenocereus gummosus* (Avilés et al. 2001) o de rosas cultivar *Happiness* (Bhanuprakash et al. 2004), donde ha sido posible romper la dormancia con tiempos de inmersión en ácido sulfúrico de igual o mayor concentración, entre 1 y 15 minutos.

En el tercer ensayo, se observó respuesta progresiva en los tiempos de 20,

Cuadro 1. Porcentajes de germinación de semillas de frijol silvestre en el tercer ensayo exploratorio, tratadas con ácido sulfúrico a dos concentraciones y ocho tiempos de inmersión.

Tiempo de inmersión (minutos)	Ácido sulfúrico	
	44%	98%
1.5	0	0
3.0	0	0
4.5	0	0
6.0	0	10
10.0	0	30
20.0	10	80
30.0	20	100
60.0	30	100

* Promedio de 25 semillas y una sola repetición.

30 y 60 minutos de inmersión en ácido sulfúrico al 44%, ya que se obtuvieron porcentajes de germinación de 10, 20 y 30, respectivamente. De igual manera, se obtuvo respuesta positiva a la escarificación con ácido sulfúrico concentrado 98% a los tiempos de 6, 10, 20, 30 y 60 minutos, con 10, 30, 80, 100 y 100% de germinación, respectivamente (Cuadro 1). Los resultados de este ensayo mostraron con claridad una respuesta en la germinación de las semillas de frijol silvestre a la escarificación con ácido sulfúrico, a mayores tiempos y concentraciones. Los mejores tratamientos fueron con ácido sulfúrico concentrado (98%) en inmersión de 20, 30 y 60 minutos.

Los resultados del ensayo definitivo, se muestran en el Cuadro 2. Las semillas de frijol cultivado y frijol intermedio o tipo *weedy*, germinaron entre el 77 y 100% en todos los tratamientos, inclusive, en el tratamiento testigo sin inmersión en ácido sulfúrico. Estos resultados muestran en primer término, que la forma intermedia de frijol, no presenta latencia en la semilla. La ausencia de latencia en los frijoles tipo maleza, evidencia el intercambio genético entre las dos formas más comunes, donde el carácter no latente de la semilla en los intermedios, proviene de los frijoles cultivados. Los resultados también permiten reforzar la estimación de Nodary

et al. (1992) citados por Gepts (1999), quienes afirman que muchos caracteres relacionados con la domesticación, están controlados en buena parte por genes de efectos mayores, como es el caso de la dormancia de la semilla de frijol silvestre. Por otra parte, este carácter relativamente fácil de observar, puede utilizarse para identificar frijoles intermedios, híbridos entre las formas silvestres y las formas cultivadas.

En el ensayo definitivo, la forma silvestre tuvo 0% de germinación en el tratamiento testigo (sin inmersión en ácido sulfúrico) y 81, 95, 100 y 100%, con los tiempos de 15, 30, 45 y 60 minutos de inmersión en ácido sulfúrico concentrado, respectivamente. Este resultado corrobora lo encontrado en el tercer ensayo exploratorio, donde se apreció claramente el efecto escarificador del ácido sulfúrico concentrado en tiempos de inmersión de 20, 30 y 60 minutos. Se realizó una transformación angular de los valores en porcentaje mediante la función arcoseno para correr un análisis de varianza de los datos con distribución normal y no binomial. La prueba de Tukey sólo declaró diferencias significativas en frijol silvestre, entre el tratamiento sin ácido sulfúrico y los que llevaron este producto en cualquier tiempo de inmersión. En las formas de frijol intermedio y cultivado, todos los tratamientos mostraron valores estadísticamente iguales entre sí.

Cuadro 2. Porcentajes de germinación de semillas en el ensayo definitivo de tres formas de frijol, tratadas con ácido sulfúrico concentrado en cinco tiempos de inmersión.

Tiempo de inmersión (minutos)	Frijol		
	Silvestre	Intermedio	Cultivado
0	0	100	77
15	81	99	91
30	95	96	99
45	100	96	80
60	100	88	87

* Promedio de tres repeticiones de 25 semillas cada una.

No. de entrada	Genotipo	Color semilla	Germinación (%)
1	ROL 172-1	Café claro	100
2	ROL 172-2	Jaspeado	60
3	ROL 172-3	Pinto	70
4	ROL 133	Jaspeado	100
5	ROL 161	Pinto	70
6	ROL 168	Ojo de cabra	70
7	ROL 225	Café claro, jaspeado	80
8	ROL 227-1	Bayo	100
9	ROL 227-2	Café	100
10	ROL 227-3	Negro	90
Testigo	Garbancillo Zarco	Bayo azufrado	100
Promedio intermedios			84

* Una repetición de 20 semillas por accesión.

Es importante señalar que los tiempos de 45 y 60 minutos de inmersión de las semillas en ácido sulfúrico concentrado, mostraron daños en raíces (menor crecimiento y necrosis), en hipocotilo (menor desarrollo) y en la testa (desintegración y necrosis), sobre todo en las formas intermedia y cultivada. Los datos sugieren que la mejor escarificación para semillas de frijol silvestre, es la inmersión con ácido sulfúrico concentrado por 30 minutos.

En el ensayo de niveles de escarificación mecánica, los tres tratamientos donde se realizó escarificación (ligera, intermedia y severa), mostraron resultados positivos, de 100, 83 y 96% en el mismo orden. Es decir, cualquier grado de escarificación mecánica funciona para romper la dormancia, siempre y cuando no haya daños al embrión. El ensayo de germinación con semillas de 10 accesiones de frijoles tipo *weedy*, mostró porcentajes altos de germinación en todas las entradas, entre 60 y 100% (Cuadro 3). Este resultado concuerda con lo encontrado en el ensayo definitivo de escarificación, donde el frijol tipo maleza mostró ausencia de latencia en la semilla. En las accesiones donde no germinaron todas las semillas, éstas quedaron duras y del mismo tamaño. Se puede pensar que las semillas no germinadas, fueron mezclas de semillas de frijol silvestre, que algunas de las semillas

Cuadro 3. Resultados del ensayo de germinación de semillas de accesiones de frijol intermedio o tipo maleza.

no eran viables o que las semillas intermedias estaban segregando para el carácter latencia, posibilidad que asienta Toro et al. (1990).

Agradecimientos

Los autores agradecen a dos revisores anónimos sus comentarios críticos y aportaciones al documento y a Servando Carvajal la revisión estilística del texto.

Literatura citada

- Avilés A., H., M. A. Morales R., J. F. Treviño N., M. A. Oranday C. y M. J. Verde S.** 2001. *Datos sobre germinación de Stenocereus gummosus mediante métodos de escarificación*. XV Congreso Mexicano de Botánica.
- Bhanuprakash, K., H. S. Yogeesh and L. B. Naik.** 2004. Effect of scarification and gibberelic acid on breaking dormancy of rose seeds. *Indian Institute of Horticultural Research. Seed Research*. Vol. **32**(1): 105–107.
- Debouck, D., M. Gamarra, V. Ortiz and J. Tohme.** 1989. *Presence of a wild-weed-crop complex in Phaseolus vulgaris L. in Perú?*. Annual Report of the Bean Improvement Cooperative (BIC). Vol. 32.
- Delgado Salinas, A., A. Bonet and P. Gepts.** 1988. The wild relative of *Phaseolus vulgaris* in Middle America. In: Gepts, P. (ed.). *Genetic Resources in Phaseolus beans*. Kluwer Academic Publishers. pp. 163–184.

- Geps, P. and D. Debouck.** 1991. Origin, domestication, and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). In: van Schoonhoven, A. and O. Voysest. (eds.) *Common Beans. Research for Crop Improvement*. C.A.B International. pp. 7–53.
- Gepts, P.** 1999. Development of an integrated linkage map. In: Singh, S. P (ed.). *Common Bean Improvement in the Twenty First Century*. Kluwer Academic Publishers. pp. 53–91.
- ISTA.** 1999. *International rules for seed testing*. Seed Science and Technology. Volume 27, Supplement.
- Jayakumar, R., M. Mahadevappa, S. Joshi and T. G. Prasad.** 1989. Dormancy studies in *Casia sericea* seeds. Vol. 17(2): 118–121.
- Mármol, J. F., L. García-Aguilar y B. González.** 1996. Métodos de escarificación de semillas en cuatro leguminosas forrajeras tropicales. *Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad Zulia*. Vol. 13(5): 573–579.
- Miranda Z., H., J. Velásquez C., M. Martín R., F. Ibarra F. y M. Celaya E.** 1996. *Efecto de diferentes tratamientos de escarificación sobre la germinación de semilla de sámara*. Reunión Nacional de Investigación Pecuaría. Cuernavaca, Morelos.
- Pollock, B. M. y V. K. Toole.** 1986. Post-maduración, período de reposo y latencia. En: *Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América. Semillas*. CECSA. pp. 201–213.
- Robles Sánchez, R.** 1995. Diccionario genético y fitogenético. Trillas. 197 pp.
- Smartt, J.** 1988. Morphological, physiological and biochemical changes in *Phaseolus* beans under domestication. In: Geps, P. (ed.). *Genetic Resources in Phaseolus beans*. Kluwer Academic Publishers. pp. 143–161.
- Toole, E. H y V. K. Toole.** 1986. Hasta que el tiempo y lugar sean favorables. En: *Semillas. Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América. Semillas*. CECSA. pp. 190–201.
- Toro, O., J. Tohme and D. Debouck.** 1990. *Wild bean (Phaseolus vulgaris L.): Description and distribution*. IBPGR and CIAT. Cali, Colombia. 106 pp.

Recibido el 22 de agosto de 2005

Aceptado el 7 de noviembre de 2005

Efecto competitivo de la maleza sobre el crecimiento y la respuesta fisiológica de agave (*Agave tequilana* Weber var. azul) en la región de Tequila, Jalisco, México

Benito Monroy Reyes¹, Enrique Pimienta Barrios¹, Salvador Antonio Hurtado de la Peña¹ y Javier García Galindo²

¹Departamento de Producción Agrícola, Centro Universitario de Ciencias Biológicas Agropecuarias (CUCBA), Km 15.5 Carretera Guadalajara a Nogales, Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal. 45101, México; Apdo. Postal 39-82, CP 44171. Correo-e: bmonroy@cucba.udg.mx ²Investigación, Desarrollo Consejo Regulador del Tequila A.C.

Resumen: En el estado de Jalisco, los ecosistemas agrícolas que por tradición se dedicaron a la siembra de cultivos básicos y aquellas extensiones de tierra aprovechadas al pastoreo extensivo, han sufrido la reconversión al cultivo de agave (*Agave tequilana* Weber var. azul) y, en consecuencia, han experimentado la invasión de diferentes especies de maleza. Esto ha propiciado el uso intensivo de herbicidas preemergentes de amplio periodo residual, lo que ocasiona un impacto ambiental negativo sobre el suelo a través de la erosión. Esto es resultado de la escasa o nula presencia de una cubierta vegetal que impida ese proceso durante el periodo de lluvias. El objetivo principal de esta investigación fue generar conocimiento básico sobre los efectos de la relación maleza/agave con el fin de contribuir a establecer las bases para un manejo sustentable e integrado de la maleza en el sistema de producción de agave. El presente estudio se llevó a cabo en una plantación comercial de agave reciente (cero años) en la región de Tequila, Jalisco, durante 2003 y 2004. La competencia de la maleza afectó de manera negativa el número de hojas formadas, peso de biomasa (piña + hojas), y el peso de la piña. Sin embargo, se encontró que la presencia de maleza durante los primeros treinta días no afecta ni el crecimiento ni la fisiología de la planta de agave.

Palabras clave: *Agave tequilana* Weber var. azul, maleza, competencia, crecimiento, azúcares, clorofila.

Abstract: In the state of Jalisco, traditionally the agricultural ecosystems have been dedicated to sowing staple crops and extensive grazing. These recently have undergone a conversion to the agave (*Agave tequilana* Weber var. azul) culture and, as a consequence, have experienced the invasion of different species of weeds. This has caused the extensive use of a long soil residual preemergent herbicides, which has caused a negative environmental impact on soils through erosion due to the scarce or null presence of plant cover which normally prevents that process during the rainy season. The primary objective of this investigation was to generate basic knowledge on the effects of weeds on agave with the purpose of contributing to the establishment of a sustainable and integrated control of weeds in the areas devoted to the production of agave. The present study was carried out during 2003 and 2004, in a new commercial plantation of agave, in the region of Tequila, Jalisco. The competition from weeds affected in a negative way the number of leaves produced, weight of biomass (center stem + leaves), and the weight of the center stem. However, the presence of weeds did not affect the growth or the physiology of the agave plant during the first thirty days.

Key words: *Agave tequilana* Weber var. azul, weeds, competition, growth, sugars, chlorophyll.

Introducción

En el estado de Jalisco los ecosistemas agrícolas que tradicionalmente se dedicaron a la siembra de cultivos básicos y aquellas extensiones de tierra dedicadas al pastoreo extensivo, han sufrido la conver-

sión al cultivo de agave y en consecuencia han experimentado la invasión de especies diferentes de maleza (Pimienta 1999). Por lo anterior, y no obstante la falta de conocimiento científico sobre la biología,

distribución, grado de infestación y daño ocasionado por las que invaden al cultivo de agave, los productores han adoptado como método principal el control químico (herbicidas), para solucionar ese problema. Ello ha dado lugar al uso intensivo de herbicidas preemergentes que responde más a criterios económicos que sustentables, por lo que a través de los efectos combinados con otros tipos de agroquímicos puede alterar de manera negativa la estabilidad de los agroecosistemas de agave. El uso de herbicidas preemergentes de amplio espectro residual en el cultivo de agave esta ocasionando un impacto ambiental negativo sobre el suelo a través de la erosión por la escasa o nula presencia de una cubierta vegetal durante el periodo de lluvias, además de otros posibles efectos negativos en la composición y vitalidad de la microflora (Van et al. 2003; Moorman and Dowler 1991), así como en el desarrollo y productividad del agave.

El uso de herbicidas en el cultivo de agave carece de sustento y criterios científicos sobre el problema de la presencia de maleza que se pretende resolver. A la fecha no se han documentado los efectos directos o bien, el nivel de daño y periodo crítico de competencia en la relación maleza/agave. Esta información es relevante como base para establecer criterios y programas de manejo de la maleza que ofrezcan mayor eficacia en el control de la misma en este sistema de producción de agave. Por otro lado, la información sobre los efectos competitivos de la maleza sobre el agave es también de importancia para establecer criterios que permitan por una parte, hacer un uso más racional de herbicidas y por otra, explorar el uso de herramientas tecnológicas de menor riesgo ambiental para finalmente establecer programas de manejo integrado de la maleza con bases más ecológicas que permita la conservación de los recursos naturales, en particular de los suelos que, como ya se mencionó, se encuentran en una dinámica intensa de erosión (Berti et al. 1996; Van Acker et al. 1993). La mayoría de

los estudios de competencia conocidos se han enfocado sobre la biomasa y pocos han estudiado la relación de la ecofisiología de maleza con la competencia y otros procesos de la dinámica poblacional de las especies y, sobre todo, si se considera su relación con la conservación de los recursos naturales y de ambiente (Williams et al. 2004).

El objetivo principal de la presente investigación fue generar conocimiento básico sobre los efectos de la relación maleza/agave con el fin de contribuir a establecer las bases para un manejo sustentable e integrado de la maleza en el sistema de producción de agave. De esta manera, se describen los efectos de la competencia de la maleza sobre el crecimiento primario y sobre algunos aspectos fisiológicos en plantas de agave. Se pretende que los conocimientos generados con este trabajo contribuyan a la estabilidad del agroecosistema de agave en el estado de Jalisco.

Materiales y métodos

DESCRIPCIÓN Y CARACTERÍSTICAS AGROCLIMÁTICAS DEL SITIO DE ESTUDIO

El presente estudio se llevó a cabo en una plantación comercial de agave (*Agave tequilana* Weber var. azul), de reciente plantación (cero años), en el predio conocido como "Buenos Aires", aledaño a la población de Tequila, Jalisco, propiedad de la empresa Casa Cuervo S. A. de C. V., que se localiza en el kilómetro 40.95 de la carretera Guadalajara a Nogales (20° 50' 37" N; 103° 46' 59" W), a una altitud de 1,270 metros sobre el nivel de mar. El municipio de Tequila, Jalisco se ubica al centro-poniente del estado; desde el punto de vista climático presenta invierno y primavera seca y semicálida, sin cambio térmico invernal bien definido. La temperatura media anual es de 23.2°C, con una máxima de 31.9 °C, y mínima de 14.5 °C. El régimen de lluvias se registra entre los meses de mayo y agosto con una precipitación media de 1,073.1 milímetros.

Los suelos predominantes son del tipo luvisol crómico, ortico, regosol eútrico y feozem lúmico. (SEPRODE/INEGI 1995). En el lote experimental la textura es franco-arcillosa y el contenido de materia orgánica es de 2.8% en los primeros 30 cm del suelo, presentando una capacidad de intercambio catiónico de 31.48, un pH neutro de 7.10 y un nivel medio de nitrógeno en forma de nitrato; fósforo y potasio medios.

PREPARACIÓN DEL SUELO, PLANTACIÓN Y ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO

Antes de la plantación, el terreno se preparó mediante diversas actividades como la limpieza de residuos del cultivo de agave del ciclo anterior, subsoleo doble, un paso de arado, dos pasos de rastra cruzadas para dejar el suelo lo más mullido posible, y por último se procedió al surcado o rayado a una distancia de 2.8 metros entre hileras de plantación. La plantación se realizó en la primera semana del mes de mayo de 2003. Para ello se utilizaron hijuelos del número 2 (hijuelo conocido como «naranja»), con una separación entre hijuelos de 1.10 m. La plantación se estableció con una densidad de 3,246 plantas por hectárea. El cultivo se fertilizó el día 19 de junio de 2003 con la fórmula triple 17 a una dosis de 100 gramos por planta. En los tratamientos bajo competencia de maleza fue necesario aplicar el insecticida Carbofuran: (2,3-dihidro-2,2-dimetil-7-benzofuranil-metilcarbamato) para el control del «chapulín» a una dosis de 8 gramos por planta (20 kilogramos por hectárea).

REGISTRO DE VARIABLES FÍSICAS DEL AMBIENTE

TEMPERATURAS DEL AIRE Y PRECIPITACIÓN PLUVIAL

A diario se obtuvieron datos de temperaturas diurnas y nocturnas del aire, así como de la precipitación pluvial a través de una estación meteorológica cercana al sitio de estudio, ubicada en el «Rancho El Indio» de la empresa Sauza, en esa misma región.

FLUJO DE FOTONES FOTOSINTÉTICAMENTE ACTIVOS (FFFA)

A partir del mes de junio del 2003 y hasta noviembre de 2004, cada 15 días se registró con un Fotómetro Li-cor 250, el Flujo de Fotones Fotosintéticamente Activos (FFFA) incidentes en los tratamientos todo el tiempo que estuvo libre de invasoras y con competencia de maleza; también se obtuvieron datos de la radiación total incidente sobre el lado adaxial y abaxial de las hojas. El registro del FFFA se llevó a cabo cada hora a partir de las 08:00 y hasta las 18:00 horas en tres plantas y en cada una de ellas, sobre hojas con ángulo de exposición a los cuatro puntos cardinales.

CONTENIDO DE AGUA EN EL SUELO

A partir de mayo del 2003 hasta noviembre del 2004, cada 15 días se tomaron cuatro muestras de suelo a una profundidad de 0 a 15 y de 15 a 30 centímetros. Para el cálculo del contenido de agua en el suelo, las muestras se sometieron a un proceso de secado en una estufa marca Terlab, a una temperatura constante de 70°C hasta que no se registró variación en peso de las mismas (alrededor de 72 horas). Por último, se obtuvo el contenido de agua en el suelo de acuerdo con Torres (1984), mediante la siguiente fórmula:

$$\%H = \frac{PSH - PSS}{PSS} \times 100$$

donde:

$\%H$ = porcentaje de humedad

PSH = peso del suelo húmedo

PSS = peso del suelo seco

ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO DE SUELOS

Para determinar las características y propiedades físico-químicas del suelo del sitio experimental, se extrajo una muestra por cada unidad experimental de un corte de suelo de 30 × 30 centímetros de un peso aproximado a un kilogramo. Ellas se analizaron en el Laboratorio de Suelos del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias.

DISEÑO EXPERIMENTAL Y TRATAMIENTOS EVALUADOS

Se evaluaron 10 tratamientos bajo diferentes niveles de competencia de maleza:

1. Agave libre de maleza todo el ciclo (seis meses) **(TL)**
2. Agave libre de maleza los primeros 30 días, después enhierbado **(30 DL)**
3. Agave libre de maleza los primeros 60 días, después enhierbado **(60 DL)**
4. Agave libre de maleza los primeros 90 días, después enhierbado **(90 DL)**
5. Agave libre de maleza los primeros 120 días, después enhierbado **(120 DL)**
6. Agave con competencia todo el ciclo (seis meses) **(TE)**
7. Agave con competencia los primeros 30 días, después libre de maleza **(30 DE)**
8. Agave con competencia los primeros 60 días, después libre de maleza **(60 DE)**
9. Agave con competencia los primeros 90 días, después libre de maleza **(90 DE)**
10. Agave con competencia los primeros 120 días, después libre de maleza **(120 DE)**

Los tratamientos se evaluaron bajo un diseño completamente aleatorio generalizado con 5 repeticiones (1 plantas por repetición) y se utilizó la prueba de DMS (Rodríguez 1991). La unidad experimental consistió de 3 líneas de plantas de agave a una distancia de 3 metros de ancho cada una de ellas (igual a 6 metros) y 15 de largo lo que da 90 m²; el tamaño de la parcela útil consistió de 1 línea de plantas con 3 metros de distancia hacia líneas adyacentes de plantas (6 metros) por 13 metros de largo (78 m²), eliminando 1 metro de las orillas.

DINÁMICA POBLACIONAL E IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES DE MALEZA

Cada 15 días, mediante conteos en cuadrantes de 1 m², se registro la presencia de especies de maleza en cada tratamiento con la finalidad obtener la dinámica poblacional de ellas. Durante los dos ciclos del experimento (2003 y 2004) se

realizaron colectas de especímenes los cuales fueron identificados por personal del Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara, en el CUCBA.

REGISTRO DE HOJAS FORMADAS

Cada mes a partir de agosto de 2003 hasta noviembre de 2004, se realizó el registro de hojas formadas por planta. Se seleccionaron al azar cinco plantas de agave en cada parcela útil de cada tratamiento. Como hojas nuevas se consideraron aquellas separadas completamente del cogollo de la planta de agave y que presentaban un ángulo aproximado de 20° con respecto a él.

CONTROL DE MALEZA EN LAS DIFERENTES UNIDADES EXPERIMENTALES

La presencia de maleza en cada tratamiento se controló en forma manual, con el uso de azadón y cazanga y después, se retiró la maleza de la unidad experimental.

VARIACIÓN ESTACIONAL EN LA ACUMULACIÓN DE AZÚCARES SOLUBLES Y FORMACIÓN DE CLOROFILA

COLECTA DE TEJIDO FRESCO PARA LA DETERMINACIÓN DE AZÚCARES SOLUBLES Y DE CLOROFILA

Con la finalidad de analizar el efecto de la competencia de maleza sobre la concentración de azúcares solubles y sobre la formación de clorofila, cada mes, a partir de agosto de 2003 hasta noviembre de 2004, se tomaron muestras de tejido de hojas de agave en dos plantas seleccionadas al azar. El tamaño de la muestra de tejido se obtuvo de la parte central de la hoja de un tamaño aproximado de 15 cm², esto es, de cinco centímetro de largo por tres de ancho.

EXTRACCIÓN DE AZÚCARES SOLUBLES

Se realizó en el Laboratorio de Maleza del Departamento de Producción Agrícola del CUCBA, según el método descrito por Carnal y Black (1989). El contenido de

azúcares totales se determinó mediante el método de Dubois et al. (1956) y los reductores por el método de Somogyi (1952).

AZÚCARES TOTALES

A un gramo de tejido fresco de hoja de agave se le removió la cutícula. Enseguida se cortó en trozos pequeños y se colocó en un tubo de maceración. Después se agregaron 5 mL de alcohol al 80% y se trituró con una varilla de vidrio hasta obtener un macerado homogéneo. La muestra macerada se colocó a baño de María a 75 °C durante 5 minutos procurando agitar el extracto contra las paredes del tubo. Luego se centrifugó a 10,500 revoluciones por minuto (rpm), durante 5 minutos a 4 grados centígrados y el sobrenadante se colocó en una probeta de 25 mL. Al precipitado se le agregaron de nuevo 5 mL de alcohol al 80%, se trituró con una varilla de cristal y se calentó en baño de María a 75 °C por 5 minutos y se centrifugó a 10,500 rpm, por 5 minutos. Los dos sobrenatantes se combinaron y se centrifugaron a 13,100 rpm, por 20 minutos a 4 °C. El sobrenatante obtenido se colocó en una probeta de 25 mL y se aforó a un volumen de 25 mL con alcohol al 80%. Se tomó una muestra de 0.1 mL y se colocaron en tubos de ensaye, se le agregaron 2 mL de antrona preparada y se agitaron en Vortex por 10 segundos. Los tubos se colocaron en baño de María a 80 °C por 10 minutos. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente. La lectura de azúcares totales se realizó con un espectrofotómetro marca Spectronic modelo 4001/4 a 620 nm. Los azúcares totales se calcularon con la fórmula:

$$\left[\left(\frac{(Abs. A 620 \text{ nm}) (25 \text{ mL})}{(Alícuota 0.100 \text{ mL})} \right) + 0.00547 \right] / 107.628$$

Peso muestra mg / g de peso fresco

AZÚCARES REDUCTORES

Para determinar su concentración en tejido foliar se tomó una muestra de 0.1 mL y se colocó en un tubo de ensaye, se le agregó 1 mL de reactivo de cobre previamente preparado (cobre I y cobre II), y se agitó en Vortex por 10 segundos. Los tubos se colocaron en baño de María a 80 °C por 10 minutos. Después se dejaron enfriar. Se les agregó 1 mL de reactivo de Nelson y se agitó en Vortex por 10 segundos y se dejó reposar 30 minutos en la oscuridad, cubiertos con papel de aluminio. Por último se realizaron las lecturas en un espectrofotómetro marca Spectronic modelo 4001/4 a 565 nm. Los azúcares reductores se calcularon con la fórmula:

$$\left[\left(\frac{(Abs. A 565 \text{ nm}) (25 \text{ mL})}{(Alícuota 0.100 \text{ mL})} \right) + 0.01914 \right] / 259.987$$

Peso muestra mg / g de peso fresco

EXTRACCIÓN DE CLOROFILA

La extracción de clorofila en tejido de hojas de agave se realizó en el Laboratorio de Maleza del Departamento de Producción Agrícola del CUCBA mediante el método descrito por Castelfranco (1977). Con las lecturas obtenidas se estimó el contenido de clorofila con la fórmula de Bruinsma (1961).

CLOROFILA

Dos gramos de tejido fresco de hojas fotosintéticamente activas se cortaron en trozos pequeños y se maceraron en mortero. Se adicionaron 8 mL de acetona fría al 80% y la mezcla se centrifugó a 10,000 rpm, por 10 minutos a 4 °C. Se colectó el sobrenadante en una probeta fría protegida con papel de aluminio y al precipitado se le agregaron 8 mL de acetona al 80% y se agitó para homogeneizarlo. De nuevo se centrifugó a 10,000 rpm, por 10 minutos a 4 °C, se obtuvo un segundo sobrenadante, el cual se mezcló con el primero. Se registró el volumen final y se procedió a realizar las lecturas en un

espectrofotómetro marca Spectronic modelo 4001/4 con longitudes de onda 645 y 663 nm. La concentración de clorofila obtuvo con las fórmulas siguientes:

$$\text{Clorofila "Total"} = 8.02 (\text{A } 663 \text{ nm}) + 20.2 (\text{A } 645 \text{ nm}) = \mu\text{g/mL}$$

$$\text{Clorofila "a"} = 12.7 (\text{A } 663 \text{ nm}) - 2.59 (\text{A } 645 \text{ nm}) = \mu\text{g/mL}$$

$$\text{Clorofila "b"} = 22.9 (\text{A } 645 \text{ nm}) - 4.68 (\text{A } 663 \text{ nm}) = \mu\text{g/mL}$$

Resultados

Durante el desarrollo del presente trabajo en el área de la región de Tequila, Jalisco se registraron variables físicas del ambiente que permitieron caracterizarla como una región con la presencia de una estación húmeda definida de mayo a septiembre, ya que aproximadamente el 90%, (856 mm en el 2003 y 1037 mm en el 2004), de la precipitación pluvial registrada se presentó de junio a septiembre, con la mayor cantidad en los meses de junio y julio (Figura 1). La estación seca se presentó a partir de noviembre hasta mayo cuando el contenido de agua en el suelo se redujo hasta un 15%, (Figura 2). El mes más calido

fue mayo con una temperatura máxima promedio del aire de entre 36 °C y 37 °C y los meses más fríos fueron diciembre y enero con una temperatura mínima del aire promedio que osciló entre los 7 y 10 °C (Figura 1).

El contenido de agua en el suelo se mantuvo por arriba del 20%, en los meses de mayo a septiembre de 2003, con la mayor acumulación de los meses de julio y agosto con 30 y 31%, respectivamente. A partir de enero de 2004 se presentó la época seca reduciéndose la cantidad de agua en el suelo hasta 8.7%, en el mes de abril. Posteriormente a partir de mayo nuevamente se incrementó hasta alcanzar un valor máximo de 27%, en el mes de septiembre (Figura 2). La mayor humedad relativa se presentó de junio a septiembre en ambos años (Figura 2).

La mayor cantidad en el flujo de fotones fotosintético se registró durante la época seca a partir de noviembre de 2003 a abril de 2004 con un máximo en el mes de abril ($1041.39 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$) y un mínimo de ($473.12 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$), durante el periodo de lluvias que es de junio a octubre de ambos años (Figura 3).

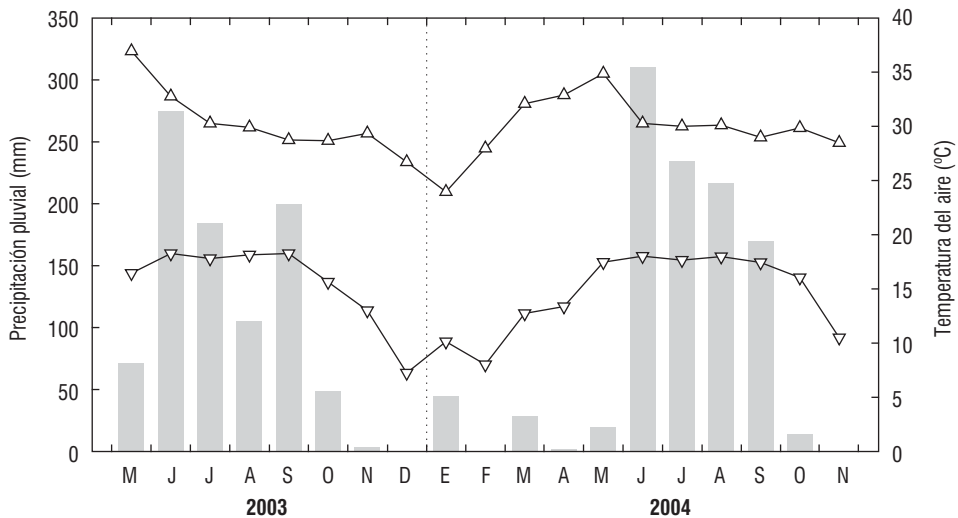


Figura 1. Distribución de la precipitación pluvial (barras) y temperaturas promedio mensuales máximas (\triangle) y mínimas (∇), para el sitio de estudio en la región de Tequila, Jalisco.

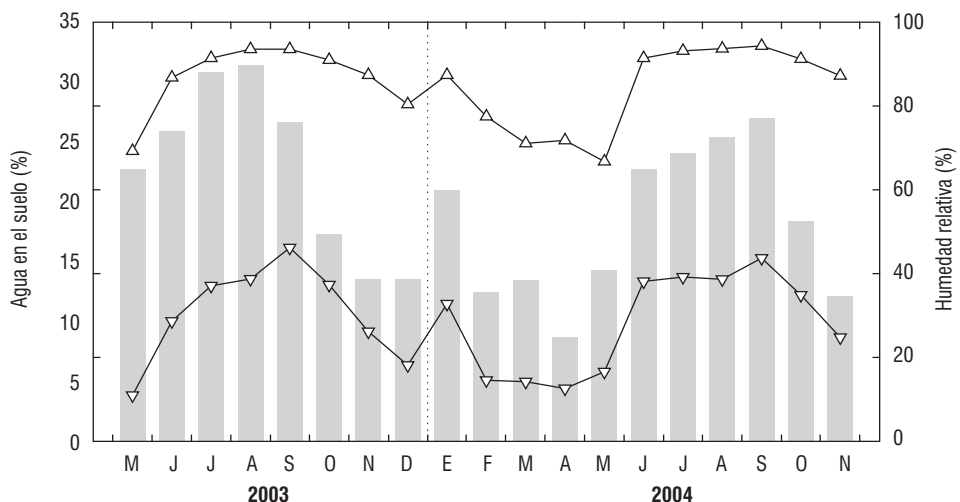


Figura 2. Contenido de agua en el suelo (barras) y humedad relativa máxima (Δ), y mínima (∇), para el sitio de estudio en la región de Tequila, Jalisco.

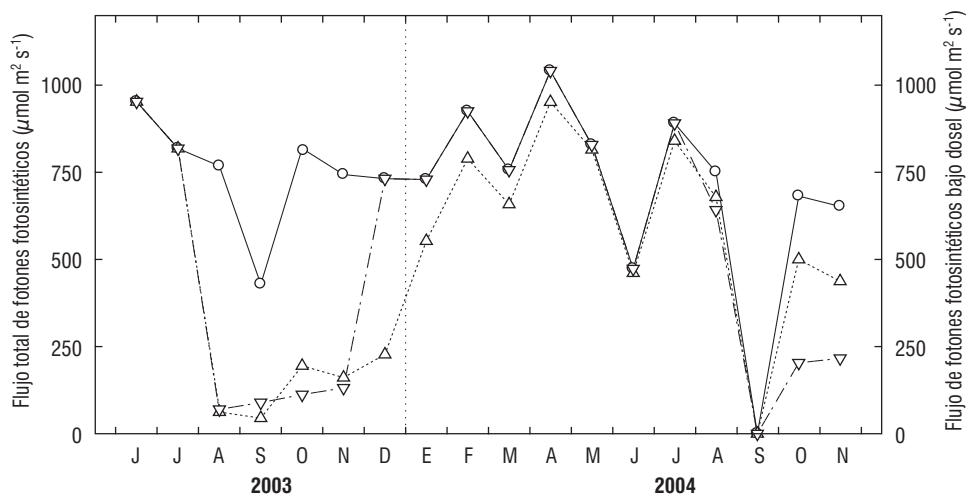


Figura 3. Radiación total incidente (\circ), sobre plantas de agave (*Agave tequilana* Weber var. azul), radiación incidente bajo dosel en plantas de agave sin competencia de maleza todo el ciclo (Δ), y radiación incidente bajo dosel de plantas de agave con competencia de maleza todo el ciclo (∇), en 2003 y 2004 en la región de Tequila, Jalisco.

DINÁMICA POBLACIONAL DE ESPECIES DE MALEZA

En la población de maleza predominaron las monocotiledóneas (gramíneas y afines de hoja angosta). En 2003, de las especies

de hoja angosta, predominó el 'coquillo' (*Cyperus esculentus* L.), con casi el 65% del total, seguida por las gramíneas *Eleusine indica* (L.) Gaertn. (15%), *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop. (7%), *Brachiaria plantaginea* (Link) Hitchc. (2%). También

se registraron otras especies de pastos que se presentaron en época posterior a la germinación de las especies anteriores o en poblaciones bajas. Entre ellas cabe citar a *Cenchrus echinatus* L., *C. pilosum* Kunth, *Chloris submutica* Kunth, *C. virgata* Sw., *Echinochloa colonum* L., *Cynodon dactylon* (L.) Pers., *Rynchelythrum repens* (Willd.) C. H. Hubb., las cuales en conjunto representaron sólo un 8%, (Figura 4). En 2004 hubo un ligero decremento en la población de *Cyperus esculentus*, (63%), pero se incrementó la población de *Rynchelithrum repens* a un 24%, seguida de *Cynodon dactylon* (4%) y *Eleusine indica* (3%). Es de resaltar que en este segundo año se presentó un cambio en la composición de la comunidad ya que las especies de los géneros *Cenchrus* spp., *Chloris* spp., y *Digitaria sanguinalis* Scop., disminuyó su presencia en forma drástica, representando únicamente tan solo un 2%, (Figura 4).

En ambos años las especies de dicotiledóneas se presentaron en poblaciones de muy baja densidad pues sólo representaron un 5% de la

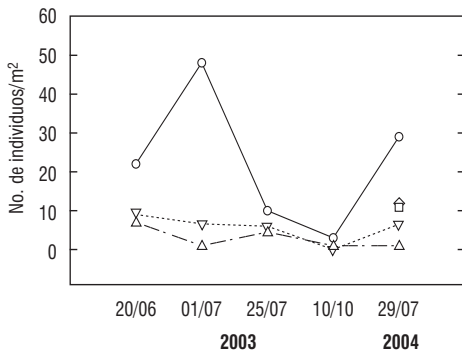


Figura 4. Dinámica poblacional de las principales especies de maleza gramíneas presentes durante el desarrollo del agave (*Agave tequilana* Weber var. azul) en la región de Tequila, Jalisco. *Cyperus esculentus* (O), *Eleusine indica* (∇), *Digitaria sanguinalis* (△), *Rynchelithrum repens* (◇) y *Brachiaria plantaginea* (□).

composición total de la flora arvense presente. Entre las especies dicotiledóneas más conspicuas se tienen a *Ipomoea purpurea* (L.) Roth e *I. pedatisecta* M. Martens & Galeotti, *Amaranthus hybridus* L., y *A. palmeri* S. Watson, *Portulaca oleracea* L. y *Euphorbia* sp.

EFFECTO DE LA COMPETENCIA DE MALEZA SOBRE EL NÚMERO DE HOJAS FORMADAS

Fue notorio el efecto de la competencia de maleza sobre el crecimiento de plantas de agave ya que el número promedio de hojas formadas se redujo significativamente ($P=0.05$) en el tratamiento de plantas de agave con competencia de maleza todo el ciclo (TE), en un 62 y 49%, para 2003 y 2004 respectivamente, en comparación al tratamiento testigo que se mantuvo sin competencia de maleza todo el ciclo (TL), (Cuadro 1). Al final del segundo año (2004), el número acumulado de hojas formadas se redujo significativa ($P=0.05$) en un 52%, para las plantas de agave en el (TE), en comparación al (TL). (Cuadro 1 y Figura 5).

Cuadro 1. Efecto de la competencia de maleza sobre el número de hojas formadas en plantas de agave (*Agave tequilana* Weber var. azul).

Tratamientos	2003	2004	Acumulado 2003 - 2004
	No. de hojas promedio/planta ⁻¹		
TL	18.40 a	43.4 a	61.8 a
30 DL	8.40 fg	25.4 e	33.8 c
60 DL	11.80 de	31.8 d	43.6 b
90 DL	19.40 a	37.8 bc	57.2 a
120 DL	17.40 ab	40.8 ab	58.2 a
TE	7.00 g	22.4 e	29.4 c
30 DE	16.00 bc	40.4 ab	56.4 a
60 DE	14.00 cd	33.6 cd	47.6 b
90 DE	12.00 de	33.8 cd	46.2 b
120 DE	10.60 ef	31.8 d	47.8 b
C.V. (%)	13	12	10
DMS_{0.05}	2.27	5.21	6.29

Medias dentro de cada columna con diferente letra difieren estadísticamente según $DMS_{0.05}$

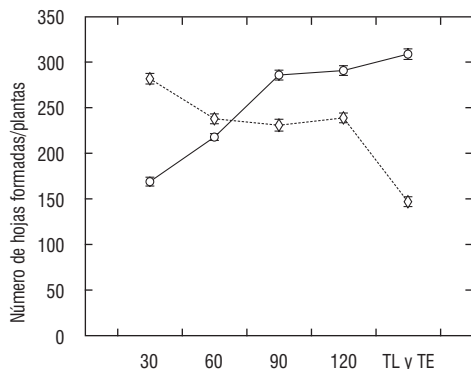


Figura 5. Número acumulado de hojas formadas por planta en agave (*Agave tequilana* Weber var. azul), bajo los tratamientos días sin competencia de maleza y después con competencia de maleza (O) y los tratamientos días con competencia de maleza y después sin competencia de maleza (◇).

La diferencia entre el tratamiento sin competencia de maleza todo el ciclo (TL), y el resto de los tratamientos también arrojó diferencias significativas ya que al analizar los tratamientos de plantas de agave sin competencia de maleza los primeros 30 días (DL), y con competencia de maleza los primeros 30 días (30 DE), contra el tratamiento (TL), el tratamiento 30 DL presentó una reducción significativa ($P=0.05$) en el número de hojas formadas del 55 y 42%, en el 2003 y 2004, respectivamente. Por el contrario, el número de hojas formadas en el tratamiento (30 DE), presentó una reducción significativa ($P=0.05$) en el número de hojas formadas de sólo 13 y 9%, para el 2003 y 2004, respectivamente. Estos resultados indican que el efecto de la competencia de la maleza sobre la planta de agave no es significativo en el número de hojas formadas durante los primeros 30 días después de la emergencia de la misma (Cuadro 1). Sin embargo, es notorio que conforme se amplía el periodo durante el cual se mantiene a las plantas de agave libre de competencia de maleza, el número de hojas formadas se incrementa paralelamente en particular, cuando el periodo

libre de maleza se alarga hasta los 90 días, ya que entre 90 y 120 días la diferencia en la formación de hojas ya no es significativa (Cuadro 1 y Figura 5).

EFFECTO DE LA COMPETENCIA DE MALEZA SOBRE LA ACUMULACIÓN DE BIOMASA Y PESO DE LA PIÑA

El efecto de la competencia sobre el peso fresco de biomasa (piña + hojas), también fue notorio ya que las plantas de agave en el testigo bajo competencia continua de maleza (TE), presentó una reducción significativa en peso ($P > 0.05$) del 70% (Cuadro 2), en comparación al testigo sin competencia de maleza (TL). Por otra parte, al analizar los tratamientos de 30 días bajo competencia y (30 DE), y el de 30 días limpio (30 DL), en comparación al testigo sin competencia de maleza (TL), los resultados demuestran que el efecto de la maleza en los primeros 30 días no fue significativo en el peso de biomasa fresca de plantas de agave ya que no presentó una diferencia significativa con relación al (TL), incluso resultó mayor a este último. Por el contrario el tratamiento (30 DL), resultó en una reducción significativa ($P > 0.05$) en el peso de biomasa fresca de alrededor del 65% (Cuadro 2). De los resultados del resto de los tratamientos se desprende que conforme se alarga el periodo de competencia, disminuye el peso de la biomasa fresca (Cuadro 2).

Los mismos resultados se reflejaron al analizar el efecto de la maleza sobre el peso de la piña. El tratamiento (TL), presentó un peso de la piña superior ($P=0.05$) en un 53%, (3.2 kilogramos) en comparación al (TE) (1.49 kilogramos) (Cuadro 2). Por otra parte, al analizar los tratamientos de 30 días bajo competencia (30 DE), y el de 30 días limpio (30 DL), en comparación al testigo siempre limpio (TL), se muestra que el efecto de la maleza en los primeros 30 días no fue significativo en peso de la piña ya que no presentó una diferencia significativa con relación al (TL), incluso resultó mayor a este último. Por el

Cuadro 2. Efecto de la competencia de maleza sobre la acumulación de biomasa fresca (piña+hojas) y sobre el peso de la piña de plantas de agave (*Agave tequilana* Weber var. azul).

Tratamientos	Peso fresco de biomasa (piña+hojas) (Kg)	Peso fresco de la piña (Kg)
TL	14.0 a	3.2 abc
30 DL	4.9 d	1.7 ef
60 DL	8.6 bc	2.3 cdef
90 DL	10.3 b	2.7 bcd
120 DL	13.8 a	3.5 ab
TE	4.3 d	1.4 f
30 DE	16.0 a	3.9 a
60 DE	8.9 bc	2.4 cde
90 DE	6.7 cd	1.9 def
120 DE	10.4 b	2.6 bcde
C.V. (%)	19.8	22.6
DMS_{0.05}	3.31	0.98

Medias dentro de cada columna con diferente letra difieren estadísticamente según DMS_{0.05}

contrario el tratamiento (30 DL), resultó con una reducción significativa ($P > 0.05$) en el peso de la piña de casi el 57% (Cuadro 2). El resto de los tratamientos refleja que el peso de la piña se redujo conforme se amplió el periodo de la presencia o competencia por la maleza.

EFFECTO DE LA COMPETENCIA DE MALEZA SOBRE LA VARIACIÓN ESTACIONAL DE AZÚCARES SOLUBLES EN HOJAS DE AGAVE

No se detectó diferencia significativa ($P=0.05$) en la concentración de azúcares totales en hojas de agave entre tratamientos, excepto en los meses de diciembre de 2003 y enero de 2004 (Cuadros 3 y 4). Conviene hacer notar que durante el periodo de junio a agosto, cuando se presentó la mayor presión competitiva de la maleza, esta no afectó de manera negativa la concentración de azúcares totales en hojas de plantas de

agave de ningún tratamiento. En diciembre de 2003 y enero de 2004 las diferencias significativas entre tratamientos en la concentración de azúcares totales no mostró un patrón definido ya que el tratamiento de 120 días bajo competencia de maleza (120 DE), resultó superior al resto. Esta diferencia observada en la concentración de azúcares totales entre los tratamientos de enero y diciembre se pudo haber debido a otro efecto diferente a la competencia de la maleza ya que ésta, a partir de octubre prácticamente se encontraba en etapa de senescencia.

El efecto de la maleza a través de la competencia también presentó diferencias significativas entre tratamientos en la concentración de azúcares reductores en hojas de agave en los meses de octubre y diciembre de 2003, así como en abril y septiembre de 2004 (Cuadros 5 y 6). En octubre de 2003, los tratamientos sin competencia de maleza por lo general presentaron mayor contenido de azúcares reductores (Cuadro 5). En los meses de diciembre y abril los resultados de los diferentes tratamientos no reflejaron una respuesta definida al efecto por la competencia de maleza. Sin embargo, en septiembre de 2004 los tratamientos en los que las plantas de agave se mantuvieron sin competencia de maleza superaron significativamente ($P=0.05$) en la concentración de azúcares reductores a aquellos con competencia de maleza (Cuadro 6). Esta respuesta fue a causa de que en este mes aún existe presión y competencia de la maleza, por lo que se asume que su efecto se reflejó de forma acumulativa y tardía.

EFFECTO DE LA COMPETENCIA DE MALEZA SOBRE LA VARIACIÓN ESTACIONAL EN LA CONCENTRACIÓN DE CLOROFILA EN HOJAS DE AGAVE

La formación y concentración de clorofila "total" en hojas fotosintéticas de agave fue superior ($P=0.05$) en el tratamiento sin competencia de maleza todo el ciclo (TL), sobre el tratamiento bajo competencia de

Cuadro 3. Efecto de la competencia de maleza sobre la concentración de azúcares totales en tejido de hojas de plantas de agave (*Agave tequilana* Weber var. azul).

Tratamientos	Azúcares totales ($\mu\text{g}/\text{gr}$ de tejido fresco)							
	2003					2004		
	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre	Enero	Febrero	Marzo
TL	1.29 a	0.79 a	0.36 a	0.54 a	0.59 bc	0.58 bc	0.50 a	0.58 a
30 DL	0.94 a	0.43 a	0.28 a	0.49 a	0.40 c	0.31 c	0.43 a	0.41 a
60 DL	0.89 a	0.31 a	0.37 a	0.45 a	0.43 c	0.43 bc	0.37 a	0.60 a
90 DL	0.56 a	0.51 a	0.42 a	0.49 a	0.77 b	0.64 bc	0.47 a	0.57 a
120 DL	0.71 a	0.31 a	0.62 a	0.99 a	0.56 bc	0.97 bc	0.56 a	0.60 a
TE	0.90 a	0.24 a	0.23 a	0.42 a	0.49 bc	0.55 bc	0.39 a	0.41 a
30 DE	1.28 a	0.70 a	0.46 a	0.53 a	0.58 bc	1.21 ab	0.48 a	0.97 a
60 DE	1.02 a	0.86 a	0.52 a	0.50 a	0.44 c	0.79 bc	0.59 a	0.66 a
90 DE	0.74 a	0.72 a	0.45 a	0.67 a	0.50 bc	1.03 bc	0.63 a	0.88 a
120 DE	0.54 a	0.71 a	0.57 a	0.90 a	1.28 a	1.88 a	0.46 a	0.86 a
C.V. %	33.14	39.88	38.75	25.20	22.57	41.61	18.84	34.02
DMS_{0.05}	NS	NS	NS	NS	0.30	0.78	NS	NS

Medias dentro de cada columna con diferente letra difieren estadísticamente según DMS_{0.05}

Cuadro 4. Efecto de la competencia de maleza sobre la concentración de azúcares totales en tejido de hojas de plantas de agave (*Agave tequilana* Weber var. azul).

Tratamientos	Azúcares totales ($\mu\text{g}/\text{gr}$ de tejido fresco)							
	2004							
	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre
TL	0.90 a	1.41 a	1.01 a	1.00 a	0.47 a	0.54 bc	0.70 a	0.76 a
30 DL	1.16 a	2.54 a	0.87 a	1.21 a	0.49 a	0.70 ab	0.87 a	0.81 a
60 DL	1.28 a	2.04 a	1.12 a	1.11 a	0.61 a	0.54 bc	0.85 a	0.74 a
90 DL	0.77 a	2.51 a	1.11 a	0.94 a	0.39 a	0.82 a	0.78 a	1.02 a
120 DL	0.86 a	0.98 a	0.83 a	1.25 a	0.43 a	0.66 ab	0.71 a	0.53 a
TE	0.48 a	1.63 a	1.43 a	0.82 a	0.43 a	0.28 d	0.55 a	0.55 a
30 DE	0.86 a	1.28 a	0.77 a	1.05 a	0.67 a	0.40 cd	0.67 a	1.00 a
60 DE	0.99 a	1.23 a	0.72 a	1.06 a	0.69 a	0.32 d	0.55 a	0.84 a
90 DE	0.96 a	0.99 a	0.79 a	1.13 a	0.47 a	0.37 cd	0.71 a	0.95 a
120 DE	0.51 a	1.30 a	0.80 a	1.22 a	0.55 a	0.31 d	0.56 a	0.94 a
C.V. %	39.65	67.54	25.05	14.10	51.08	18.03	20.43	24.10
DMS_{0.05}	NS	NS	NS	NS	NS	0.20	NS	NS

Medias dentro de cada columna con diferente letra difieren estadísticamente según DMS_{0.05}

Cuadro 5. Efecto de la competencia de maleza sobre la concentración de azúcares reductores en tejido de hojas de plantas de agave (*Agave tequilana* Weber var. azul).

Tratamientos	Azúcares reductores ($\mu\text{g}/\text{gr}$ de tejido fresco)							
	2003					2004		
	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre	Enero	Febrero	Marzo
TL	0.09 a	0.16 a	0.16 bc	0.26 a	0.18 a	0.11 a	0.09 a	0.11 a
30 DL	0.11 a	0.15 a	0.10 c	0.14 a	0.10 bc	0.07 a	0.07 a	0.07 a
60 DL	0.28 a	0.12 a	0.18 ab	0.14 a	0.10 bc	0.11 a	0.05 a	0.11 a
90 DL	0.15 a	0.11 a	0.14 bc	0.23 a	0.12 abc	0.05 a	0.07 a	0.05 a
120 DL	0.35 a	0.15 a	0.25 a	0.25 a	0.17 a	0.13 a	0.09 a	0.13 a
TE	0.10 a	0.19 a	0.09 c	0.16 a	0.14 ab	0.10 a	0.10 a	0.10 a
30 DE	0.12 a	0.15 a	0.16 bc	0.17 a	0.10 bc	0.14 a	0.09 a	0.14 a
60 DE	0.14 a	0.15 a	0.08 c	0.14 a	0.06 c	0.17 a	0.07 a	0.17 a
90 DE	0.11 a	0.14 a	0.08 c	0.16 a	0.15 ab	0.12 a	0.15 a	0.12 a
120 DE	0.25 a	0.24 a	0.19 ab	0.20 a	0.14 ab	0.27 a	0.09 a	0.27 a
C.V. %	53.69	35.49	25.25	32.21	23.36	50.96	58.52	51.19
DMS_{0.05}	NS	NS	0.08	NS	0.06	NS	NS	NS

Medias dentro de cada columna con diferente letra difieren estadísticamente según DMS_{0.05}

Cuadro 6. Efecto de la competencia de maleza sobre la concentración de azúcares reductores en tejido de hojas de plantas de agave (*Agave tequilana* Weber var. azul).

Tratamientos	Azúcares reductores ($\mu\text{g}/\text{gr}$ de tejido fresco)							
	2004							
	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre
TL	0.11 ab	0.11 a	0.14 a	0.17 a	0.16 a	0.18 ab	0.22 a	0.20 a
30 DL	0.04 c	0.08 a	0.11 a	0.14 a	0.07 a	0.17 abc	0.13 a	0.25 a
60 DL	0.06 bc	0.07 a	0.17 a	0.14 a	0.18 a	0.16 abc	0.20 a	0.22 a
90 DL	0.09 abc	0.29 a	0.14 a	0.21 a	0.10 a	0.21 a	0.15	0.36 a
120 DL	0.13 a	0.20 a	0.11 a	0.18 a	0.09 a	0.17 ab	0.15 a	0.17 a
TE	0.12 ab	0.09 a	0.16 a	0.13 a	0.07 a	0.07 d	0.09 a	0.17 a
30 DE	0.14 a	0.09 a	0.09 a	0.18 a	0.17 a	0.13 bcd	0.15 a	0.18 a
60 DE	0.12 ab	0.11 a	0.12 a	0.17 a	0.15 a	0.07 d	0.12 a	0.26 a
90 DE	0.06 bc	0.13 a	0.09 a	0.14 a	0.09 a	0.09 d	0.16 a	0.21 a
120 DE	0.07 bc	0.15 a	0.19 a	0.16 a	0.11 a	0.11 cd	0.13 a	0.27 a
C.V. %	29.35	88.90	73.38	27.22	62.91	20.81	35.00	33.10
DMS_{0.05}	0.06	NS	NS	NS	NS	0.06	NS	NS

Medias dentro de cada columna con diferente letra difieren estadísticamente según DMS_{0.05}

maleza todo el ciclo (TE), en los meses de noviembre y diciembre de 2003 (57 y 30%, respectivamente) (Cuadro 7). En el 2004, el (TL,) fue superior ($P=0.05$) al (TE), en los meses de enero, febrero, marzo y mayo con 52, 51, 35 y 51%, respectivamente (Cuadro 8). Durante el periodo de mayor presencia y competencia de maleza de junio a septiembre del 2004, no se registró un efecto de los tratamientos con competencia de maleza sobre la formación y concentración de clorofila total (Cuadro 8). Por otra parte, el resto de los tratamientos bajo diferente periodo libre de maleza (DL) y aquellos bajo competencia de maleza (DE), no reflejaron una respuesta consistente a los efectos de la competencia por maleza en la concentración de clorofila "total" en hojas de agave.

El efecto de la competencia de maleza en la concentración de clorofila "a" y "b" en hojas de agave únicamente se reflejó con mayor claridad en el tratamiento bajo competencia de maleza todo el ciclo (TE),

(Cuadros 9, 10, 11 y 12). La clorofila "a" se redujo durante la época seca de invierno de 2003 y primavera de 2004 (noviembre a mayo), ya que el tratamiento sin competencia de maleza todo el ciclo (TL), fue superior ($P=0.05$) al tratamiento bajo competencia de maleza todo el ciclo (TE), con valores superiores al 40%, en la concentración de este pigmento (Cuadros 9 y 10). La concentración de clorofila "b" en tejido fotosintético de agave solamente se redujo en los meses de febrero, marzo y mayo de 2004 ya que el tratamiento sin competencia de maleza todo el ciclo (TL), fue superior ($P=0.05$) al tratamiento bajo competencia de maleza todo el ciclo (TE) con valores superiores al 45%, en la concentración de este pigmento (Cuadros 11 y 12). Al igual que para los azúcares, el efecto competitivo de la maleza durante la época de mayor presencia y presión de la maleza no afectó la concentración de clorofila "a" y "b".

Cuadro 7. Efecto de la competencia de maleza sobre la formación de clorofila "total" en hojas fotosintéticas de agave (*Agave tequilana* Weber var. azul).

Tratamientos	Clorofila "total" ($\mu\text{g/g}$ tejido fresco)					
	2003		2004			
	Noviembre	Diciembre	Enero	Febrero	Marzo	Abril
TL	17.85 a	18.57 a	18.28 a	13.91 a	11.95 abc	10.73 a
30 DL	8.16 b	11.47 bc	9.42 bcd	6.59 d	6.46 e	5.51 d
60 DL	11.23 b	12.38 bc	7.48 d	8.35 cd	6.06 e	5.78 d
90 DL	11.57 b	10.85 bc	9.46 bcd	9.63 cd	7.26 de	6.20 cd
120 DL	9.51 b	12.52 bc	13.27 b	13.29 ab	12.11 ab	8.04 bc
TE	7.72 b	12.81 bc	8.70 cd	6.83 d	7.76 cde	9.92 ab
30 DE	11.48 b	13.79 bc	13.46 b	13.17 ab	8.08 bcde	11.57 a
60 DE	8.67 b	10.28 c	18.12 a	14.27 a	13.22 a	10.67 a
90 DE	8.89 b	10.56 c	10.42 bcd	10.86 bc	11.15 abcd	7.85 c
120 DE	8.90 b	14.68 b	11.96 bc	13.78 ab	9.59 abcde	10.32 a
C.V. %	18.85	13.61	16.54	13.04	20.35	9.80
DMS_{0.05}	4.37	3.88	4.44	3.22	4.25	1.89

Medias dentro de cada columna con diferente letra difieren estadísticamente según DMS_{0.05}

Cuadro 8. Efecto de la competencia de maleza sobre la formación de clorofila "total" en hojas fotosintéticas de agave (*Agave tequilana* Weber var. azul).

Tratamientos	Clorofila "total" ($\mu\text{g/g}$ tejido fresco)						
	2004						
	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre
TL	12.62 a	11.68 a	14.45 a	13.59 a	12.78 a	12.23 a	12.99 a
30 DL	4.79 de	12.90 a	12.39 a	15.22 a	14.93 a	12.46 a	12.17 a
60 DL	4.39 e	14.36 a	16.85 a	14.32 a	13.62 a	14.02 a	11.20 a
90 DL	6.18 cde	12.43 a	11.31 a	12.24 a	15.48 a	14.32 a	13.70 a
120 DL	8.15 bcd	12.41 a	13.95 a	13.22 a	16.05 a	14.04 a	13.78 a
TE	6.20 cde	12.81 a	11.55 a	12.09 a	13.15 a	11.88 a	13.11 a
30 DE	9.74 ab	12.42 a	12.66 a	13.60 a	11.21 a	12.17 a	10.45 a
60 DE	10.38 ab	13.67 a	14.30 a	16.37 a	13.11 a	13.69 a	12.96 a
90 DE	8.54 bc	12.17 a	11.53 a	12.63 a	14.30 a	15.58 a	10.97 a
120 DE	10.37 ab	14.59 a	12.59 a	15.08 a	13.69 a	12.44 a	14.70 a
C.V. %	19.11	17.34	11.33	16.24	13.95	11.09	21.49
DMS_{0,05}	3.46	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Medias dentro de cada columna con diferente letra difieren estadísticamente según DMS_{0,05}

Cuadro 9. Efecto de la competencia de maleza sobre la formación de clorofila "a" en hojas fotosintéticas de agave (*Agave tequilana* Weber var. azul).

Tratamientos	Clorofila "a" ($\mu\text{g/g}$ tejido fresco)					
	2003		2004			
	Noviembre	Diciembre	Enero	Febrero	Marzo	Abril
TL	12.53 a	13.41 a	13.79 a	9.04 a	7.93 ab	7.40 ab
30 DL	3.81 a	7.37 b	4.88 d	4.49 d	4.23 c	3.72 e
60 DL	5.02 a	8.20 b	6.39 bcd	5.34 cd	3.95 c	3.79 e
90 DL	7.61 a	7.41 b	6.38 bcd	6.37 bc	4.76 c	4.15 de
120 DL	1.80 b	8.25 b	8.68 b	8.82 a	6.74 b	5.47 cd
TE	1.34 b	8.35 b	5.58 cd	4.48 d	4.23 c	6.13 bc
30 DE	5.37 a	8.90 b	8.70 b	8.49 a	7.61 ab	7.59 a
60 DE	4.46 a	6.95 b	14.08 a	9.11 a	8.85 a	7.08 ab
90 DE	4.25 a	7.12 b	7.22 bcd	7.53 ab	6.45 b	5.42 cd
120 DE	3.57 a	9.02 b	7.93 bc	8.60 a	7.04 b	6.73 abc
C.V. %	64.20	11.46	13.51	11.39	12.03	10.73
DMS_{0,05}	NS	2.17	2.52	1.83	1.66	1.37

Medias dentro de cada columna con diferente letra difieren estadísticamente según DMS_{0,05}

Cuadro 10. Efecto de la competencia de maleza sobre la formación de clorofila "a" en hojas fotosintéticas de agave (*Agave tequilana* Weber var. azul).

Tratamientos	Clorofila "a" ($\mu\text{g/g}$ tejido fresco)						
	2004						
	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre
TL	8.30 a	8.00 a	9.28 ab	8.82 a	8.28 a	8.17 a	8.40 a
30 DL	3.12 d	8.92 a	8.21 b	9.00 a	9.20 a	8.35 a	8.19 a
60 DL	2.90 d	9.35 a	10.10 a	8.90 a	8.76 a	9.05 a	7.57 a
90 DL	4.18 cd	8.47 a	7.66 b	8.04 a	9.42 a	9.44 a	8.93 a
120 DL	5.53 bc	8.21 a	8.95 b	8.52 a	9.59 a	9.24 a	9.08 a
TE	3.98 cd	8.33 a	7.67 b	8.08 a	8.72 a	7.91 a	8.45 a
30 DE	6.66 ab	7.92 a	8.29 b	8.10 a	7.58 a	8.33 a	7.07 a
60 DE	6.99 ab	9.04 a	9.08 b	9.97 a	8.55 a	8.85 a	8.54 a
90 DE	5.65 bc	7.88 a	7.54 b	8.27 a	9.23 a	10.14 a	7.25 a
120 DE	6.97 ab	9.58 a	8.31 b	9.34 a	8.84 a	8.30 a	8.90 a
C.V. %	19.64	14.02	9.85	11.21	8.75	9.17	15.84
DMS_{0.05}	2.38	NS	1.89	NS	NS	NS	NS

Medias dentro de cada columna con diferente letra difieren estadísticamente según DMS_{0.05}

Cuadro 11. Efecto de la competencia de maleza sobre la formación de clorofila "b" en hojas fotosintéticas de agave (*Agave tequilana* Weber var. azul).

Tratamientos	Clorofila "b" ($\mu\text{g/g}$ tejido fresco)						
	2003			2004			
	Noviembre	Diciembre	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo
TL	5.37 a	5.20 a	4.54 a	4.91 a	4.05 ab	3.35 ab	4.36 a
30 DL	4.38 a	4.13 a	2.63 a	2.11 d	2.25 c	1.81 c	1.22 e
60 DL	6.26 a	4.22 a	3.05 a	3.04 cd	2.13 c	2.01 c	1.50 de
90 DL	4.00 a	3.47 a	3.11 a	3.29 bcd	2.52 c	2.07 c	2.02 cde
120 DL	7.75 a	4.30 a	4.63 a	4.50 abc	3.37 bc	2.59 bc	2.65 bcd
TE	6.41 a	4.49 a	3.15 a	2.36 d	2.08 c	3.83 a	2.24 cde
30 DE	6.15 a	4.59 a	4.79 a	4.72 ab	3.54 bc	4.02 a	3.11 bc
60 DE	4.24 a	3.35 a	4.09 a	5.20 a	5.39 a	3.62 a	3.42 ab
90 DE	4.67 a	3.47 a	3.23 a	3.35 bcd	3.12 bc	2.44 c	2.91 bc
120 DE	5.36 a	5.70 a	4.07 a	5.22 a	3.32 bc	3.61 a	3.43 ab
C.V. %	35.14	19.89	25.15	17.01	20.90	13.72	19.31
DMS_{0.05}	NS	NS	NS	1.47	1.48	0.90	1.15

Medias dentro de cada columna con diferente letra difieren estadísticamente según DMS_{0.05}

Cuadro 12 Efecto de la competencia de maleza sobre la formación de clorofila "b" en hojas fotosintéticas de agave (*Agave tequilana* Weber var. azul).

Tratamientos	Clorofila "b" ($\mu\text{g/g}$ tejido fresco)					
	2004					
	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre
TL	3.71 a	5.20 a	4.81 a	4.55 a	4.10 a	4.62 a
30 DL	4.02 a	4.21 a	6.26 a	5.78 a	4.15 a	4.02 a
60 DL	5.05 a	5.90 a	5.46 a	4.90 a	5.02 a	3.66 a
90 DL	3.10 a	3.69 a	4.23 a	6.10 a	4.92 a	4.81 a
120 DL	4.23 a	5.04 a	4.75 a	6.51 a	4.84 a	4.74 a
TE	4.52 a	3.92 a	4.05 a	4.46 a	4.00 a	4.70 a
30 DE	4.54 a	4.41 a	4.64 a	3.66 a	3.88 a	3.41 a
60 DE	4.67 a	5.26 a	6.45 a	4.59 a	4.87 a	4.46 a
90 DE	4.33 a	4.02 a	4.40 a	5.11 a	5.48 a	3.75 a
120 DE	5.05 a	4.31 a	5.79 a	4.88 a	4.18 a	5.84 a
C.V. %	24.23	14.54	26.46	23.86	16.82	32.73
DMS_{0,05}	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Medias dentro de cada columna con diferente letra difieren estadísticamente según DMS_{0,05}

Discusión

Los resultados obtenidos demostraron que la presencia de maleza afecta de forma negativa el crecimiento y respuesta fisiológica del agave. La capacidad competitiva de la maleza sobre las plantas de agave afectó de esa manera el número de hojas formadas y el peso fresco de biomasa acumulada. El efecto sobre el número de hojas formadas, biomasa fresca acumulada y de la piña, fue notorio hasta después de los primeros 30 días posteriores a la emergencia de la maleza y se alargó hasta los aproximadamente 70 días. Esto fue debido a que después de los primeros 30 días posteriores a la emergencia de la maleza, la altura de la misma superó a las plantas de agave y de esta forma limitó la captura de luz de parte de las plantas de agave lo que pudo haber causado una reducción en la tasa fotosintética ya que en este tipo de especies y al igual que otras similares que poseen el metabolismo MAC, la luz es un factor ambiental limitante para

la fotosíntesis (Gibson y Nobel 1986; Nobel y Pimienta 1995). Además, está ampliamente documentado que la falta de luz afecta muchas facetas del crecimiento como la distribución del peso seco, biomasa, altura, y las adaptaciones fisiológicas y morfológicas de las plantas (Massinga et al. 2003; Holt 1995).

En la época de mayor presencia y presión de la maleza (junio a octubre) no se afectó la concentración de azúcares solubles y de clorofila. Sin embargo, no obstante que en algunos meses posteriores a la presencia de maleza el tratamiento sin competencia de maleza (TL), superó al tratamiento bajo competencia de maleza (TE), en la concentración de azúcares y clorofila, la diferencia en la concentración pudo haber sido el resultado de la respuesta de las plantas de agave a otros estreses causados por los cambios ambientales, como la temperatura y el contenido de agua en el suelo como se ha reportado para otras

especies bajo competencia de maleza (Tworokoski 1992; Wilson et al. 2001).

Los resultados obtenidos en este trabajo si bien demuestran el efecto de la maleza sobre el cultivo de agave, también ponen de manifiesto que el control estricto de la maleza a través de herbicidas preemergentes es una práctica que deberá ser reconsiderada como una herramienta ya que la presencia de ésta durante los primeros 30 días no afecta negativamente el crecimiento y fisiología de la planta de agave. El uso de herbicidas preemergentes para el control de la maleza predispone un riesgo ambiental innecesario en particular: la erosión de suelo, al quedar este completamente desnudo. Debido a que en el mes de junio se presentan altas cantidades de lluvia, se induce un alto riesgo de pérdida del mismo.

Por lo anterior, es necesario en un futuro inmediato explorar nuevas alternativas para el manejo de la maleza en el cultivo de agave que garanticen la protección del suelo, su composición y actividad biológica.

Conclusiones

De acuerdo a las condiciones ambientales que prevalecieron y del manejo del presente estudio se concluye:

- La competencia por maleza no afecta el crecimiento y respuesta fisiológica de plantas de agave durante los primeros 30 días posteriores a la emergencia de la maleza.
- El periodo crítico de competencia en la relación maleza-agave se identificó entre los primeros 30 a 70 días posteriores a la emergencia de la maleza.
- Durante el periodo crítico de competencia la maleza puede causar daños al agave superiores al 40% en la formación de hojas, acumulación de biomasa y peso de la piña.
- Se recomienda buscar alternativas de manejo y control de la maleza diferentes al control con herbicidas preemergentes como una opción para el manejo sustentable del agroecosistema de agave.

Agradecimientos

Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Maleza del Cuerpo Académico en Parasitología Vegetal y con apoyo económico del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara, el Consejo Regulador del Tequila A. C., y de la Empresa Cuervo S. A. de C. V., a Servando Carvajal se le agradece la corrección de estilo del mecanoscrito.

Literatura citada

- Berti, A., C. Duran., M. Sattin, G. Zanin, and P. Westra.** 1996. A new approach to determine when to control. *Weed Science* **44**:496–503.
- Bruinsma, J.** 1961. A comment on the spectrophotometric determination of chlorophyll. *Biochem. Biophys. Acta* **52**: 579–582.
- Carnal, W.C. & C. Black.** 1989. Soluble sugars as the carbohydrates reserve for CAM in pineapple leaves. *Plant physiology* **90**: 91–100.
- Castelfranco, P.** 1977. *Laboratory Notes Advanced Course of plant physiology.* Botany Department. University of California, Davis.
- Dubois, M., K. A. Guillies, J. K. Hamilton, P. A. Rebers. & F. Smith.** 1956. Colorimetric Method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* **28**:350–356.
- Gibson, A. C. & P. S. Nobel.** 1986. *The cactus primer.* Harvard University Press. Cambridge.
- Holt, J. S.** 1995. Plant responses to light: a potential tool for weed management. *Weed Science* **43**: 474–482.
- Massinga, R. A., R. S. Currie & T. P. Trooien.** 2003. Water use and light interception under Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) and corn competition. *Weed Science* **51**: 523–531.

- Moorman, T. B. & C. C. Dowler.** 1991. Herbicide and rotation effects on soil and rhizosphere microorganisms and crop yield. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **35**: 311–325.
- Nobel, P. S. & E. Pimienta-Barrios.** 1995. Monthly stem elongation for *Stenocereus queretaroensis*: Relationships to environmental conditions, net CO₂ uptake, and seasonal variations in sugar content. *Environmental Experimental Botany* **35**: 17–42.
- Pimienta B., Enrique.** 1999. *Distribución y taxonomía de maleza en agave (Agave tequilana Weber var. azul) en Jalisco*. Informe anual de investigación. Centro de Investigaciones en Parasitología Vegetal. Departamento de Producción Agrícola. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. U. de G.
- Rodríguez del Á., J. M.** 1991. *Métodos de Investigación Pecuaria*. Editorial Trillas, México. Pp. 38–40.
- Seprode/Inegi.** 1995. *Memorias del Municipio en Jalisco*. Unidad Editorial. Gobierno de Jalisco.
- Somogyi, M.** 1952. Notes of sugar determination. *Journ. Biol. Chem.* **195**: 19–23.
- Torres, E. R.** 1984. *Manual de conservación de suelos agrícolas*. Editorial Diana, México, D.F., 180 pp.
- Twoykoski, T.** 1992. Developmental and environmental effects on assimilate partitioning in Canada thistle (*Cirsium arvense*). *Weed Science* **40**: 79–85.
- Van Acker, R. C., S. F. Weise & C. J. Swanton.** 1993. The critical period of weed control y soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Weed Science* **41**: 194–200.
- Van, E. L. L., R. E. Hoagland, R. E. Zablutowicz & H. J. Christopher.** 2003. Pesticide Metabolism in plants and microorganisms. *Weed Science* **51**: 472–495.
- Williams, M. M. II., Walsh, D. B. & R. A. Boydston.** 2004. Integrating arthropod herbivory and reduced herbicide use for weed management. *Weed Science* **52**: 1018–1025.
- Wilson, R. G., S. D. Kachman, and A. R. Martin.** 2001. Seasonal changes in glucose, fructose, and fructans in the roots of dandelion. *Weed Science* **49**: 150–155.

Recibido el 13 de mayo de 2005

Aceptado el 8 de noviembre de 2005

Relación del aparato reproductor femenino de *Dactylopius coccus* Costa (HEMIPTERA: DACTYLOPIIDAE) en la síntesis del ácido carmínico

D. Cortés J., A. L. Vigeras y L. Portillo

Laboratorio de Biotecnología. Departamento de Botánica y Zoología. Universidad de Guadalajara. Apartado Postal 1-139. Zapopan, Jalisco. México. C.P. 45101. Correo electrónico: dancj_bio@yahoo.com

Resumen: Se estudió el aparato reproductor de hembras de la grana cochinilla (en dos estadios: ninfa II y adulta oviplena) como posible lugar de síntesis del ácido carmínico en condiciones in vitro. Los medios utilizados en el establecimiento de los tejidos fueron RPMI-1640, Dulbecco's y Grace's Insect Medium®, cada uno fue modificado con base en varias técnicas empleadas para el cultivo de células de insectos, con el fin de prolongar el periodo de vida del tejido establecido. Los resultados obtenidos en los medios Dulbecco's y Grace muestran que no fueron viables para el mantenimiento del cultivo en ninguno de los dos estadios, puesto que en ambos casos se perdió el pigmento con rapidez, y la contaminación se presentó en un alto índice de los cultivos establecidos. Asimismo la degradación del tejido se presentó eventualmente. El medio RPMI-1640 arrojó mejores resultados en el mantenimiento del cultivo, es decir, mayor en tiempo (60 días) y menor en contaminación, además de que se conservó el pigmento en la mayoría de las células. Se determinó que este medio es óptimo para el establecimiento del tejido de cochinilla adulta oviplena, ya que fueron estos cultivos los que mostraron mejor respuesta. El fenómeno de resurgimiento de coloración presentado en algunas regiones del tejido establecido (adulta oviplena), después de tres meses de observación, muestra que en realidad hay una relación estrecha entre el aparato reproductor interno de la grana cochinilla y la producción del ácido carmínico, al menos en las condiciones del presente trabajo.

Palabras Clave: *Dactylopius coccus*, ácido carmínico, aparato reproductor, medio de cultivo.

Abstract: The female reproductive organ of cochineal (in two stages: nymph II and adult) was studied as a possible site of carminic acid synthesis under in vitro conditions. The media used in the tissue establishment were RPMI-1640, Dulbecco's and Grace Insect Medium®. Each one was modified by several techniques used for insect cell culture's with the purpose of extending the life span of the established tissue. The results obtained in Dulbecco's and Grace's media showed that they were unsatisfactory in all of the culture stages. This seems to be due to the fact that pigment was quickly lost, and then presented a high rate of contamination in both cases. This was followed by eventual tissue degradation. The RPMI-1640 medium exhibited better results in the culture maintenance, that is, a longer period of time (more than 60 days) and less contamination, and also the pigment was retained in most cells. Our results show that this medium is optimal for the establishment of adult cochineal tissues, since this culture showed the best response. The resurgence coloration in some regions of the developed tissue (adult stage), after three months of observation, showed that in fact there is a close relationship between the cochineal's internal reproductive organ, and the production of carminic acid, at least under the conditions used in this experiment.

Key words: *Dactylopius coccus*, carminic acid, reproductive organ, culture medium.

Introducción

La familia Dactylopiidae consta de nueve especies agrupadas en un solo género, *Dactylopius*, cuyos hospederos se restringen a la familia Cactaceae (principalmente a los géneros *Opuntia* y *Nopalea*). Todas las especies contienen ácido carmínico en sus fluidos corporales, lo cual, presumiblemente les sirve como defensa ante el ataque de depredadores (Mann 1969; Zimmerman 1989; De Haro y Claps 1998); sin embargo, *Dactylopius coccus* Costa ha sido la especie más estudiada desde el siglo XIX (Aquino y col. 2002), ya que presenta mayor contenido de ácido carmínico (principio colorante) por peso y es, por lo tanto, la única especie cultivada con fines comerciales.

Al hablar del pigmento de la grana cochinilla, se hace énfasis en la importancia de la hembra puesto que ésta es quien cuenta con un mayor contenido del pigmento. Los órganos genitales femeninos internos de este insecto constan de ovarios, oviductos laterales, oviducto común o medio, cámara genital y sus derivados, así como espermateca y glándulas accesorias (Prado y Valdéz 1990) (Figura 1).

Existen muchas suposiciones con respecto al lugar de producción de ácido carmínico en la grana cochinilla. Varias observaciones indican su posible producción en la región del aparato reproductor; algunas de estas son las hechas por Aquino y col (2002), que menciona la presencia de cromatocitos unidos al ovario (región entre el germinario y el ovocito), en donde se han detectado pequeños canales; lugar donde Tremblay (1989) ha ubicado como posible sitio de transferencia de los microorganismos simbiotes a la siguiente generación en algunos insectos, y los cuales se especula tienen relación con la producción del pigmento en la grana cochinilla. Por ende, es necesario determinar la veracidad de estos argumentos

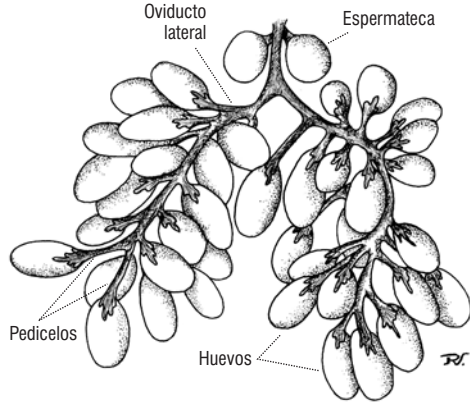


Figura 1. Órgano reproductor interno de *Dactylopius coccus* Costa (Dibujo: M. del R. Vázquez).

mediante el desarrollo de trabajos enfocados específicamente a ubicar el lugar de síntesis del metabolito y los procesos que en él ocurren.

El hecho de que la producción de carmín alcance hasta 20% del peso seco de la grana cochinilla y tomando en cuenta que el precio actual del carmín de 52% en laca (polvo) es de aproximadamente \$ 65/kg dólares (Bustamante in litt.)¹, permite formular hipótesis acerca de que el cultivo in vitro de células o tejidos especializados en medios de cultivo apropiados y en condiciones óptimas de temperatura, presión osmótica, pH, etcétera, podría aumentar la producción del metabolito considerablemente. Por otro lado, la extracción y purificación del carmín con cultivos homogéneos y estériles resultarían más sencillas que utilizar el cuerpo desecado de insectos (Bárceñas y Aquino 1997). Por medio de la biotecnología y la bioingeniería se han generado numerosos metabolitos a costos significativamente reducidos, como resultado de su alta pureza

¹ José Antonio Bustamante. Safefood, S.A. Casilla (PO Box) 578, La Serena, Chile. jab@foodsafec.cl.

y eficacia en la producción (Bárceñas y Aquino 1997), por lo que representa una opción viable para el aumento en la producción del ácido carmínico mediante técnicas más especializadas.

Uno de los medios utilizados para el cultivo de células de insectos es el establecido por Grace, el cual llevó al establecimiento de la primera línea celular de mosquito, logrando una adaptación y una continuidad de las mismas y de las obtenidas a partir de ésta primera línea (Varma y col. 1979). Existen otros medios de tipo general, como el Medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM, por sus siglas en inglés), el cual contiene un alto índice de vitaminas y aminoácidos y que en la actualidad se utiliza para una amplia gama de líneas celulares. De igual forma, existen otros medios, como el RPMI-1640 (Medio 1640 de Roswell Park Memorial Institute), el cual es utilizado para el cultivo de células en suspensión que necesitan poco calcio (Morgan y Darling 1995).

Freshey (2000) mencionó que cada cultivo requiere de un conjunto de condiciones diferentes, que se deben tomar en cuenta durante el aislamiento del cultivo para formar las líneas celulares; algunas de ellas son el removimiento de los tejidos grasos y necrosados durante la disección y el manejo adecuado de los tejidos con el instrumental especializado para causar el menor daño al tejido.

El propósito de este trabajo fue observar el órgano reproductor de las hembras de *Dactylopius coccus* Costa, inmerso en tres medios de cultivo de tejidos animales y determinar la viabilidad y permanencia del ácido carmínico, así como su posible producción.

Materiales y métodos

Para la realización del experimento fueron seleccionados tres medios (Dulbecco's, Grace y RPMI-1640®) con base en los trabajos anteriores relacionados con el cultivo de tejidos animales, en los cuales se utilizaron dichos medios, esto con el fin de

determinar la relación del aparato reproductor de *Dactylopius coccus* Costa en sus dos estadios, ninfa II y adulta oviplena, con respecto a la producción del ácido carmínico.

La fase experimental consistió en tomar los ejemplares vivos de hembras de grana cochinilla en estadios de ninfa II y adultas, los cuales fueron limpiados perfectamente de coccerina con baños de alcohol etílico al 95° y un pincel. Posteriormente se colocaron en una caja de petri sobre un trozo de papel filtro esterilizado.

La disección del insecto fue realizada en la parte dorsal y longitudinal, con una hoja de bisturí no. 10, se sujetó al insecto con pinzas para evitar el movimiento y se realizó el corte. Se lavó constantemente con agua desionizada para quitar el exceso de pigmento y tejido graso. Con alfileres se fijó al insecto en el papel filtro, para que de esta manera quedara expuesto el germinario. Todo esto se realizó bajo el microscopio estereoscópico dentro de la campana de flujo laminar tipo II.

El aparato reproductor fue extraído completo, tratando de quitar la mayor cantidad de huevos; después se estableció en diferentes medios de cultivo en agitación constante. Se mantuvieron en observación y se hicieron anotaciones con respecto a los cambios que se produjeron en el tejido, al igual que estos fueron observados en el microscopio. Dichas observaciones fueron referentes a contaminación, conservación del tejido y conservación del pigmento e incluso una posible producción del mismo (Figura 2).

Los medios utilizados en el establecimiento de los tejidos fueron RPMI-1640, Dulbecco's y Grace's Insect Medium®. Los medios fueron modificados de acuerdo a varias técnicas empleadas para el cultivo de células de insectos, con el fin de prolongar el periodo de vida de las células establecidas. De acuerdo a García y col. (2002) se empleó 30 mg de ácido acetil-salicílico (AAS) por 250 ml de medio con la finalidad de conservar el pigmento en las

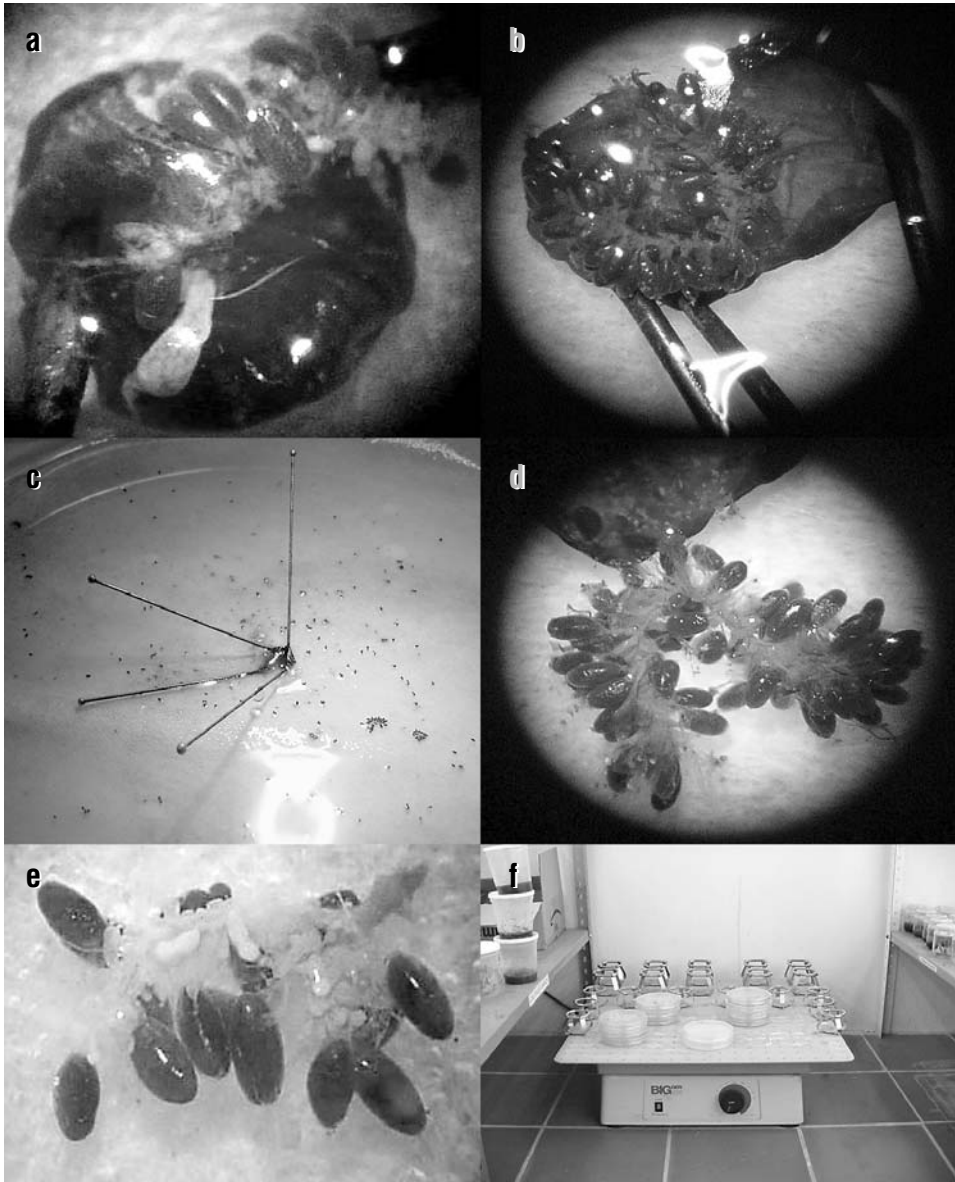


Figura 2. Proceso de disección de la grana cochinilla: a) corte dorso longitudinal; b) lavado del germinario; c) fijación del insecto con alfileres de disección; d) germinario expuesto; e) vista del germinario completo; f) tejido en agitación.

células por un lapso mayor de tiempo. De igual manera se agregó 10 ml por caja de petri de penicilina para evitar su contaminación.

El diseño experimental empleado (no paramétrico) fue un factorial de 3 x 2, cada medio constituyó una variable, con dos estadios (ninfa II y adulta oviplena) con cuatro repeticiones cada una. El análisis se desarrolló en el programa SAS® ver 6.3 (1988) y estuvo conformado por un ANOVA para las interacciones entre las variables, y una prueba de Tukey para determinar tanto los días como los medios más viables para el experimento.

Resultados y discusión

Los modelos estadísticos para las variables independientes medios y días resultaron, en general, altamente significativos en el análisis de varianza, así como las interacciones en las variables de estudio, las cuales en este caso fueron contaminación, pérdida del pigmento y conservación del tejido.

Al realizar las interacciones entre las variables, en el análisis estadístico con $p=0.01$, se observó que son altamente significativas, ya que fue evidente que la contaminación va estrechamente ligada a la pérdida de pigmento y consecuentemente a la desintegración del tejido. Asimismo los resultados arrojaron que entre los 15 y 30 días la presencia de contaminación al igual que la pérdida del pigmento es mínima y pasado este periodo hay un aumento exponencial de dichas variables. Por otro lado la conservación de tejido fue óptima durante los primeros 15 días y decreció pasado este periodo.

NINFA II: Con la prueba de Tukey (diferencia mínima significativa) con $p=0.01$ se observó que el medio RPMI-1640 mostró menor cantidad de contaminación, seguido de Dulbecco's; a diferencia del medio Grace's, que presentó un mayor grado de agentes contaminantes. La contaminación observada en la grana cochinilla en estadio de ninfa II, pudo estar

relacionada con los efectos tóxicos provocados por la alta actividad de la Feniloxidasasa (PO) (Surumaran y col. 2000) y la aglicona del ácido carmínico, la antraquinona. Este último compuesto es extensivamente usado por los insectos como disuasivo contra sus depredadores y como antibiótico contra microorganismos patógenos (Kunze y col. 1996). La contaminación por hongos fue la más recurrente (aún al agregar 10 ml de penicilina por caja de petri), estos fueron particularmente reconocibles por presentar largas hifas que confieren a nivel macroscópico, un aspecto algodonoso (Morgan y Darling 1995). El medio RPMI-1640 mostró una mayor conservación de la pigmentación en el tejido establecido (con 30 mg de AAS/250 ml). Aparentemente desde el periodo de hembra inmadura, la frecuencia de cromatocitos en las muestras de hemolinfa se incrementa considerablemente hasta su máxima frecuencia en el periodo de inicio de la embriogénesis (Aquino y col. 2002); al considerar que los cromatocitos cumplen una función de transporte, se intuye que el nivel de producción del pigmento va en aumento proporcional a la madurez de las células que componen la estructura encargada de la síntesis del metabolito (tomando el aparato reproductor como posible lugar de producción) lo que podría explicar la duración del pigmento de la cochinilla ninfa II, en comparación con la adulta oviplena. Por otra parte, también se observó que algunas células son altamente reactivas a soluciones que contienen calcio, por lo que se especula que la pérdida de pigmento es por esta causa. El tejido se conservó en mayor cantidad en el medio RPMI-1640, seguido de Dulbecco's. En el medio Grace's, la conservación del cultivo fue mínima y por lo tanto no efectiva para el experimento. Es probable que algunos de los componentes del medio, o la alta acidez debido a la adición del ácido acetil-salicílico en interacción con los ácidos orgánicos normalmente encontrados, como lo son los asociados con el ciclo de los ácidos tricarbóxicos provocaron la desintegración del

tejido (Llenderal y Nieto 1996.). Otro de los factores que afectaron a los tejidos es la agitación constante en que se encontraban, pues aunada a la presencia de agentes contaminantes, se provocó una disgregación del germinario, puesto que estos se encuentran relacionados estrechamente con la conservación del cultivo.

ADULTAS OVIPLINAS: Mediante la prueba de Tukey (comparación múltiple de medias) con $p=0.01$ se determinó que el medio que mejores resultados arrojó con respecto al menor promedio de contaminación presente fue el medio RPMI-1640, aun sin agregar la cantidad de penicilina requerida (10 ml). Uno de los factores involucrados en la contaminación de los germinarios establecidos tal vez se debieron a un mal corte en la grana cochinilla o cochinilla sucia, además de la viabilidad del medio a nutrir estas células ajenas al tejido cultivado. El medio RPMI-1640 presentó la media más baja (en comparación con Dulbecco's y Grace's, que demostraron por mucho ser los menos efectivos para preservar el pigmento) al agregarle 30 mg de ácido acetil-salicílico se logró un mantenimiento del pigmento en el tejido establecido en este medio por un periodo de tiempo mayor, además de que se conservó el mismo en la mayoría de las células por el tiempo de vida que el tejido tuvo. Se menciona que el desarrollo de los ovocitos y huevos se acelera desde la fase de hembra sexualmente inmadura a la hembra sexualmente madura (lo que podría explicar la conservación del pigmento). De esta fase a la de la hembra oviplena se observó una fuerte reducción de cromatocitos, lo que podría interpretarse como una evidencia de la transferencia del colorante a los huevos. Además específicamente durante el desarrollo del huevo se pudo observar que de la etapa de máximo tamaño del germinario hasta su desaparición, el colorante en los huevos está también confinado dependiendo del estado de desarrollo del huevo, el confinamiento puede ser en vesículas libres o en vesículas agrupadas en bolsas grandes (Aquino y col. 2002). Se

observo que el medio RPMI-1640 fue el más factible para preservar el tejido en éste estadio. La conservación del tejido está relacionada con la presencia-ausencia de agentes contaminantes, pues son estos los que ocasionan los cambios en el medio (tanto de pH como de los nutrientes contenidos en el mismo y esenciales para las células establecidas) que con el tiempo ocasionaran la disgregación del tejido por muerte celular (Morgan y Darling 1995).

Además de lo mencionado anteriormente, en algunos germinarios de cochinilla adulta cultivados en el medio RPMI-1640 (con pérdida de pigmentación juego de 3 meses) se observaron pequeñas zonas donde el pigmento volvía a aparecer.

Conclusiones

No se presentan diferencias relevantes en cuanto al estadio de la grana cochinilla utilizada (a excepción del oscurecimiento observado en el medio Grace's con el tejido obtenido de adulta oviplena). En general se concluye que el medio Grace's no es viable de utilizar para los fines buscados, ya que presentó un mayor índice de contaminación, una conservación del pigmento poco aceptable y nula conservación del tejido (aun agregando la cantidad de penicilina y ácido acetil-salicílico requeridas). El medio Dulbecco's es susceptible a la presencia de agentes contaminantes, con baja conservación del tejido y de pigmento (aun con los aditamentos de penicilina y ácido acetil-salicílico necesarios). El medio RPMI-1640, aunque es un medio diseñado originalmente para el cultivo de células de invertebrados, al realizar las modificaciones como el agregar ácido acetil-salicílico y penicilina, se obtiene una respuesta favorable con respecto a la ausencia de agentes contaminantes, así como en la conservación tanto del tejido como del pigmento, fines buscados en el experimento. Los resultados indican que el medio RPMI-1640 (el cual cumplió mejor con los objetivos del experimento) funciona de una manera óptima con el tejido de la

grana cochinilla oviplena. El estadio de ninfa II se mantuvo en el medio RPMI-1640, más no arroja resultados relevantes.

El fenómeno de resurgimiento de coloración presentado en algunas regiones del tejido establecido, después de 3 meses de observación, muestra que en realidad hay una relación estrecha entre el aparato reproductor interno de la grana cochinilla y la producción del ácido carmínico, al menos en las condiciones manejadas en el presente trabajo.

Aunque los resultados ya han mostrado las variaciones de los medios, se considera que es necesario continuar con la experimentación para determinar las causas de estas diferencias y el tipo de función que podría tener cada uno de los medios. Cabe recalcar que es muy importante ahondar en las razones por las que en el medio RPMI-1640 se presenta el fenómeno de resurgimiento de la pigmentación, por medio de técnicas más específicas como lo son celulares y moleculares, lo anterior con el fin de determinar si es ocasionado por una producción autónoma en el tejido y, por ende, los procesos que se ven implicados en el mismo.

Bibliografía

- Aquino P., G., N. M. Barcenás C. y J. Valdez C.** 2002. Avances en la citología de la cochinilla del nopal en condiciones in vivo e in vitro y su biología reproductiva. En: Portillo, L. y A. L. Viguera (editores). *Memoria del II Congreso Internacional de Grana Cochinilla y Colorantes Naturales y II Reunión Internacional del Grupo de Trabajo en Cochinilla, Castusnet - FAO*. Universidad de Guadalajara, México. pp. 275-307.
- Bárceñas N. M. y G. Aquino.** 1997. In Vitro Culture of *Dactylopius Coccus* Costa (Homoptera: Dactylopiidae): Potential Production of the Natural Dye Carminic Acid. In Vitro Cell. *Developmental Biology* **33**: 21.
- De Haro, M. E. y L. E. Claps.** 1998. Contribución para el aprovechamiento de la familia Dactylopiidae de la Republica Argentina. En: *Memorias del Primer Congreso Internacional de Grana Cochinilla y Colorantes Naturales*. Oaxaca, México. pp. 47-48.
- Freshney, R. I.** 2000. *Cultura of animal cells. A manual of basic technique*. 4th edition. CRC Department of medical oncology. University of Glasgow. Ed. Wiley-Liss. Canada. pp. 10-12.
- García, F., H. Lanz., A. Rojas y F. Hernández.** 2002. Efecto de inhibidores de la síntesis de prostaglandinas en la coagulación del homóptero *Dactylopius coccus* (cochinilla del nopal). Investigación Universitaria Multidisciplinaria (Universidad Simón Bolívar) **1**(1): 15-19.
- Kunze, A., L. Witte, M. Aregullin, E. Rodríguez y P. Proksch.** 1996. Anthraquinones in the leaf beetle *Trirhabda geminata* (Crysomelidae) Z. *Naturforsch.* **51**: 249-252.
- Llandural C. y R. Nieto H.** 1996. *Programa analítico del curso de fisiología de insectos*. Colegio de Posgraduados. Montecillo, Texcoco. México. Cap. 9. 324 pp.
- Mann, J.** 1969. Cactus-feeding insects and mites. En: *U. S. National Museum Bulletin* **256**: 137-150.
- Morgan, S. J., D. C. Darling.** 1995. *Cultivo de células animales*. Editorial Acribia, S. A. España. 155 pp.
- Padro B., E. y Valdéz C., J.** 1990. *Morfología de insectos*. Colegio de Posgraduados. Montecillo, Texcoco. México. 393 pp.
- SAS Institute.** 1988. *SAS/STAT*, versión 6.03 ed. SAS Institute, Cary, NC.
- Sugumaran M., K. Nellaippan y K. Valivittan.** 2000. A new mechanism for the control of phenoloxidase activity: Inhibition and complex formation with quinine isomerase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **379**: 252-260.
- Tremblay, E.** 1989. Coccoidea endocytobiosis. En: W: Schwemmler, G. Gassener (eds) *Insect endocytobiosis: Morphology, Physiology, Genetics and Evolution*. Boca Raton, Fla. pp. 145-173.

- Varma, R., M. G.; Pudney, M.; y Leake, C. J.** 1979. Methods in mosquito cell culture. En: *Practical Tissue Applications*. Maramorosc. Estados Unidos de Norte America. Pp. 331-349.
- Zimmermann, H. G.** 1989. The utilization of an invader cactus weed as part of an integrated control approach. En: *Proceedings of the VII Symposium on Biological Control of Weeds*. Roma, Italia. Pp. 429-432.

Recibido el 8 de julio de 2005
Aceptado el 26 de octubre de 2005

Macroalgae community structure in southern coast of Jalisco, México

Rosalba Mireya Hernández-Herrera¹, Silvia E. Ibarra-Obando² y Ma. del Refugio Mora-Navarro^{*}

¹Laboratorio de Ficología, Departamento de Botánica, Universidad de Guadalajara. Apdo. postal 139, Zapopan, Jalisco, 45110, México.

²Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada (CICESE). Km 107 carretera Tijuana-Ensenada, Ensenada, Baja California, 22860, México.

*Corresponding author. Fax: 011-52-61-45-05-45. e-mail: rosalmir@yahoo.com

Resumen: La estructura de la comunidad macroalgal y su relación con factores ambientales (estación, localidad y ambientes) fueron analizadas para la costa sur de Jalisco, México. El estudio se realizó en 1997, durante las estaciones de lluvias y secas, en 5 localidades y 4 ambientes particulares descritos para el Pacífico Tropical Mexicano (PTM): riscos, canales de corriente, pozas de marea y plataformas mixtas. Las macroalgas fueron colectadas manualmente usando cuadrantes de 0.25 m². Se utilizó estadística multivariada para explorar la contribución de las variables ambientales antes mencionadas. Los resultados fueron comprobados estadísticamente usando la prueba de ANOSIM (Análisis de Similitud). La composición y cobertura se incluyeron al análisis de la estructura de la comunidad. Se realizó un análisis biogeográfico para el PTM usando el coeficiente de Cheney (1977) y el índice de similitud de Jaccard. Los resultados indicaron que los 3 factores ambientales ejercen una influencia en la estructura observada, la estación en el primer nivel jerárquico, formaron dos grupos (lluvias y secas). Para el grupo de lluvias, los ambientes estuvieron en segundo nivel jerárquico y la localidad en tercero. Éste no fue el caso para el grupo de secas, en el cual no se separó el efecto de los dos factores. Un total de 95 especies fueron identificadas, con 40 nuevos registros. Las algas rojas fueron dominantes. Los riscos fueron el ambiente mejor representado, con el número más alto de especies. Jalisco, así como el PTM, fue caracterizado por una flora de amplia distribución. La similitud entre estados del PTM no estuvo relacionada con la distancia geográfica entre estados vecinos.

Abstract: Macroalgae community structure and its relationship to environmental factors was analyzed on the southern portion of the coast of Jalisco, Mexico. Season, location and particular environments were the considered environmental factors. The study was conducted in 1997, during dry and rainy seasons, in 5 locations and 4 particular environments described for the Mexican Tropical Pacific (MTP): cliffs, tidal channels, tidal pools, and mixed platforms. Macroalgae were collected by hand, using 0.25 m² quadrats. Multivariate statistics were used to explore the contribution of the above mentioned environmental variables. Results were statistically tested using the ANOSIM (Analysis of Similarity) test. Community structure analysis included composition and cover. A biogeographical analysis for the MTP was performed using Cheney's (1977) coefficient, Jaccard's Similarity Index, and the Beta Richness test. Results indicated the 3 environmental factors exert an influence on the observed structure, with season at the first hierarchical level, as two groups were formed: rainy and dry season samples. For the rainy season group, environments were at the second hierarchical level, and location at the third one. This was not the case for the dry season group, for which we were unable to separate the effect of these two factors. A total of 95 species was identified, with 40 new records. Red algae were dominant. Cliffs were the better represented environment, with the highest number of species. Jalisco, as well as the MTP, is characterized by species with wide distribution. A similarity value among MTP states was not always related to distance (e.g. higher values were not always found between neighboring states). We consider that the reduced number of studies in the region unable further analysis.

Key words: Intertidal zone, Mexican Tropical Pacific, Particular environments.

Introduction

Since the early 1970's, Mexican researchers have become increasingly interested in phycological research along the country's extensive littoral. In some cases, a regional approach has been used, searching for general trends in the species distribution, as well as the characterization of algal communities. This is the case of the Mexican Tropical Pacific (MTP), for which an intensive sampling between the southern coast of Nayarit (20°N), and Chiapas (15°N) (Fig. 1), permitted the identification of 10 general environments, whose differences in substrate, slope, elevation, tidal regime, and currents, determine the existence of the so called particular environments (González-González 1992). The general environments include: cliff; rocky points; rocky outcrops;

rocky headlands; submerged shallow rocky platforms; shores and beach with sand, rocky or mixed substrate; extensive shores with beaches and dunes; areas with artificial substrates forming breakwaters, jetties, or piers; coastal lagoons, estuaries and mangroves; and river mouths or deltas. Particular environments include cliffs; rocky platform; tidal pools, and tidal channels (González-González 1992).

From a floristic viewpoint, the MPT appears to be a relatively poor region when compared with the Pacific coast of Baja California, and the Gulf of California (González-González 1993). The major currents that influence the zone are the equatorial system from the south, and the California Current from the north (Badan-Dangon 1988).

The state of Jalisco is part of the MTP. Its climate is warm sub-humid with two



Figure 1. Location of the Mexican Tropical Pacific: Nayarit (N), Jalisco (J), Colima (C) Michoacán (M), Guerrero (G), Oaxaca (O) and Chiapas (Ch). Geographical location of the selected sampling sites along the southern coast of Jalisco.

Table 1. Identification of the particular environments for the selected locations, according to González-González (1992).

Environment	Locations				
	Careyitos	La Mora	El Tamarindo	Majaguas	El Palmito
Cliffs		■	■	■	■
Rocky platforms		■	■		
Tidal pools		■	■		
Tidal channels	■	■	■		■

well defined seasons: rainy (June-October), and dry (November-May); The mean annual temperature and precipitation ranges are 22-29°C, and 800-1600 mm yr⁻¹ respectively.

The continental shelf is very narrow or non-existent. Beaches are characterized by their high energy. Tidal range is reduced (0.5 - 1.5 m) and tides are mixed with a diurnal difference in the low tides amplitude. Rocky shores consist of metamorphic rocks, while sand and gravel are present on the beaches (González-González 1993; Serviére-Zaragoza 1993).

In Jalisco, the macroalgae have been studied mainly in its southern portion, where rocky shores are well developed. Most studies have emphasized floristic and taxonomic aspects, with only a few having a more ecological orientation (González-González 1992, 1993; Serviére-Zaragoza 1993; León-Alvarez & González-González 1993; León-Tejera et al. 1993). As part of a project designed to establish the basis for land use in Jalisco, we had the opportunity to study the macroalgae community structure on 5 locations of the southern portion of the state, representing different environmental conditions.

Three environmental factors were considered, probably exerting influence on the community structure: season (rainy or dry), location, and particular environments as defined by González-González (1992). Our hypothesis was that these particular environments were the most important factors.

Materials and methods

The selected study area is located between 19° 14' N - 104° 46' W and 19° 26' N - 105° 01' W, and includes the location of Careyitos (C), Mora (MO), Tamarindo (T), Majaguas (MA) and Palmito (P) (Fig. 1). We characterized these locations following the particular environments criteria of González-González (1992) (Table 1).

During 1997, macroalgae of the rocky intertidal zones or environments were collected during two field trips in the dry season (May and November), and one in the rainy season (August). Vertical transects were established on the cliffs, while they were perpendicular and parallel to the shores on the rocky platforms. Transects varied between 5 and 7 on the first case, and between 1 and 2 in the second. No transects were used for tidal channels and tidal pools. In all cases, the sampling units were 0.25m² quadrats, their number varying between 1 and 3 as a function of the particular environment (Table 2).

En every visit to the field, readings of superficial water temperature were taken at significant differences through time. A one-way non-parametric analysis (Kruskal-Wallis) was performed, setting the significance level at 0.05.

Species identification followed Abbott & Hollenberg (1976); Dawson (1953, 1954, 1958, 1960, 1961); Taylor (1945) and Norris & Johansen (1981).

Table 2. Number of transects and quadrats established per location for each environment.

Environments	LOCATIONS									
	C		MO		T		MA		P	
	t	q	t	q	t	q	t	q	t	q
Cliffs	0	0	4	11	6	22	7	30	5	15
Rocky platforms	0	0	2	2	2	8	0	0	0	0
Tidal pools	-	1	-	11	-	3	-	0	-	0
Tidal channels	-	19	-	6	-	10	-	0	-	2
Total	0	20	6	30	8	43	7	30	5	17

t= transects; q= Quadrats; (-) = No transects were established. Careyitos (C); Mora (MO); Tamarindo (T); Majaguas (MA); Palmito (P).

In order to identify differences and similarities in algal communities as a function of season, location, and particular environments, multivariate techniques were used. We first applied a hierarchical classification technique (Cluster) that used the Unweighted Pair Group Average (UPGMA) algorithm on the Bray-Curtis similarity matrix. Results of the groups formation were evaluated by a sample ordination plot, using Non-Metric Multi-dimensional Scaling (MSD) (Clarke & Green 1988; Clarke 1993). A stress value of < 0.2 is considered a useful representation (Clarke 1993). Percent similarity (SIMPER) (Clarke & Warwick 1994) within groups, percent dissimilarity among groups, and species responsible for any differences were also determined. As multivariate techniques are exploratory, we statistically tested the previously identified groups with an analysis of similarity (ANOSIM) on the Bray-Curtis similarity matrix, using a 5% significance level. Also MDS, SIMPER, and ANOSIM analyses were made using the software PRIMER 4.0 (Clarke & Warwick 1994). Community structure analysis was based on particular environments. It included: composition, and abundance (cover), expressed as percent total cover, and percent relative cover.

The flora described in this study was compared with the reported for the other states of the MTP. In order to do so, we

identified species geographic affinity following two criteria: 1) Luning (1990), who refers to temperate, tropical, or wide distribution species, and 2) Cheney (1977), who based on the (R+C)/P ratio, where R=Rhodophyta, C=Chlorophyta, and P=Phaeophyta classifies the flora as temperate, tropical or mixed, with values greater than 6 corresponding to tropical regions, values lower than 3 to temperate regions, and all intermediate values representing a mixed flora.

Jaccard's Similarity Index (Ludwing & Reynolds 1988) was used to assess the species richness of the MTP with respect to other regions of the Mexican coast. This test provides information on the species addition rate as new are added.

Results

The annual cycle cluster (figure not shown) indicated the presence of two groups at a 10% similarity level: rainy and dry season samples. These groups were also evident in the MDS plot, to which a stress value of 0.26 was associated (Fig. 2). Percent dissimilarity among both groups was 92% with *Chaetomorpha antennina* (Bory) Kützing (1849) and *Chnoospora minima* (Hering) Papenfuss (1817), having the greatest contribution to both groups differentiation during the rainy season, and *Sargassum liebmanii* J. Agardh (1849),

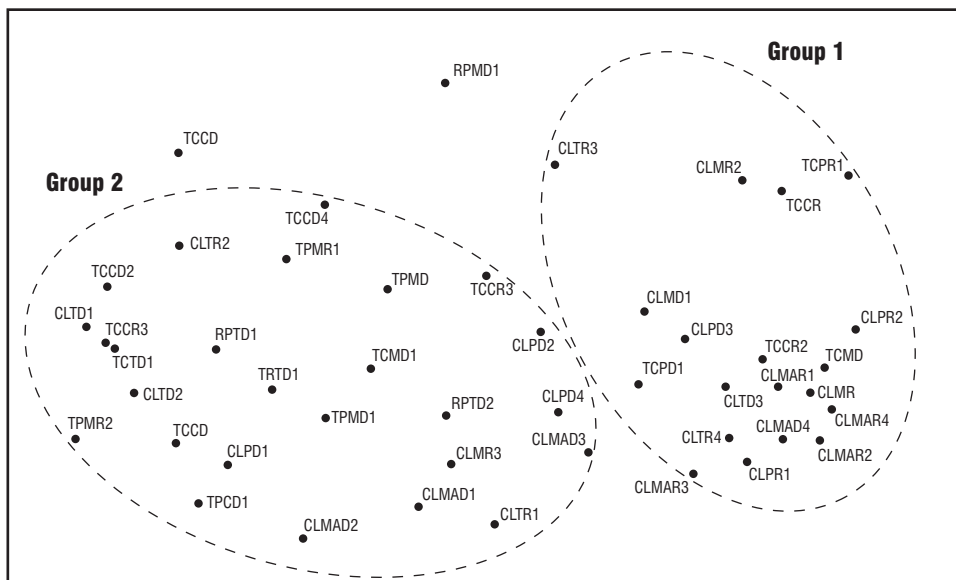


Figure 2. MDS plot for the annual cycle samples. Two groups were identified: rainy (right), and dry (left) season. Dotted lines indicate the groups identified with the cluster analysis. The first and second letter corresponds to environments: CL=cliffs; TP=tidal pools; TC=channels, and R=rocky platforms; tree letter correspond to locations: C=Careyitos, MO=Mora, T=Tamarindo, MA=Majaguas, and P=Palmito; Third letter corresponds to season: R=rainy, D=dry.

during the dry season. A one-way (season) ANOSIM test confirmed that these groups were indeed significantly different, with $R=0.0117$ ($p=0.5\%$). Significant differences in water temperature were associated with these seasons ($p=0.0035$), with a mean value of $23\text{ }^{\circ}\text{C}$ for the dry season, and $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ for the rainy season.

When the rainy season group was analyzed in detail, 4 subgroups were formed at a 10% similarity level (figure not shown): 1) tidal pools; 2) and 3) cliffs from different locations, and 4) tidal channels. These subgroups were confirmed with the MDS plot, to which a stress factor of 0.16 was associated (Fig. 3). Percent dissimilarity between the groups varied from 96.5 to 99.7%. The two species playing a major role in subgroups differentiation were: *Padina gymnospora* (Kützting) Sonder (1871), and *Ulva lactuca* Linnaeus (1753) (subgroups 1 and 2); *P. gymnospora* and *Ch. antennina* (subgroups 1 and 3); *Ch. antennina* and *U. lactuca* (subgroups 2 and

3); *C. minima* and *P. gymnospora* (subgroups 1 and 4); *C. minima* and *U. lactuca* (subgroups 2 and 4), and *C. minima* and *Ch. antennina* (subgroups 3 and 4). The one-way ANOSIM test confirmed the difference between particular environments, with $R=0.42$ ($p=0.1\%$). The aposteriori tests indicated that environments that differed were cliffs from tidal channels ($p=1.4\%$); cliffs from tidal pools ($p=1.9\%$), and tidal channels from tidal pools ($p=4.8\%$).

The cluster for the dry season group also showed 4 subgroups at the 10% similarity level (figure not shown): subgroups 1) and 2) contained most of the cliff samples from Tamarindo and Majaguas; 3) samples from Mora and Tamarindo, and 4) cliffs. The MDS plot also showed these 4 subgroups for which the effect of particular environments could not be separated from that of locations. The stress factor associated with this plot was 0.23 (figure not shown). Although the

SIMPER routine showed a high dissimilarity percentage among groups, 89.5 - 97%, the ANOSIM test could not confirm that these subgroups were significantly different, $R=0.14$ ($p=5.37\%$).

From the multivariate analysis it was evident that season was the first determinant variable on macroalgae community structure, followed by particular environments. Community structure analysis was based on particular environments.

A total of 95 species were found, belonging to 3 divisions, 14 orders, 22 families and 37 genera. Their systematic arrangement followed Wynne (1986). Red algae were dominant, with 59 species, followed by green algae with 20, and brown algae with 16. Of this total, 40 species represented new records for Jalisco, whit 26 red algae (Hernández-Herrera 2000). Community structure analysis was performed with the 80 species whose cover was $> 1\%$ of total cover.

In general terms, cliffs had the highest number of species, with red algae being dominant in the 4 environments (Table 3). Exclusive species, most of which

were red, were also more abundant on the cliffs (Fig. 4). A total of 30 red algae species were exclusive to only one particular environment, while green algae had 8 such species, and brown algae had only 5.

Rhodophyta represented 43%, Chlorophyta 31% and Phaeophyta 26% of the total cover. Ten species were found to be the most constant and abundant during the year, thus determining the general community structure. Of these, *Ch. antennina* and *C. minima* were dominant (Fig. 5).

Cover was higher in the tidal pools, 28% of the total cover, followed by tidal channels, with 25%, rocky platforms, with 24%, and cliff, with 22%. Red algae presented the higher cover in tidal pools and tidal channels. Green algae had higher cover on the rocky platforms, and green and red algae had similar cover on cliffs. The 5 species with higher percent cover per particular environment are presented in Table 4.

A total of 52 species could be identified as presenting wide distribution, while there were 30 tropical, and 13 temperate species. The analysis per

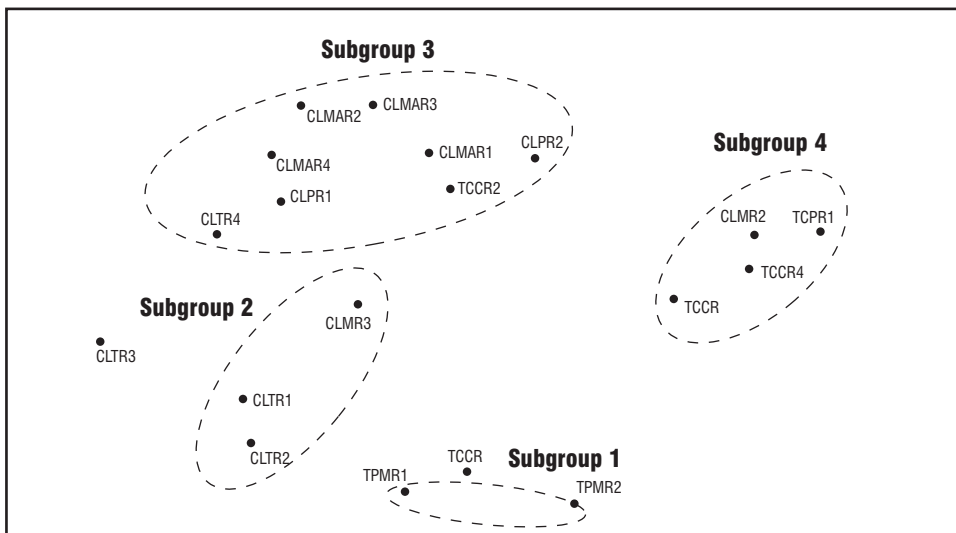


Figure 3. MDS plot for the rainy season group. Dotted lines correspond to the 4 subgroups identified with the cluster analysis. Letter as in figure 2.

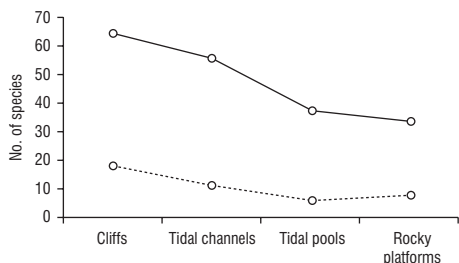


Figure 4. Number of species per particular environment. Solid line corresponds to the total number of species; dotted line to the number of exclusive species.

particular environment yielded a similar result, with the broadest distribution of species being present in only one particular environment (Table 5).

We compared the number of reported species for the Mexican Tropical Pacific, showing that Jalisco and Oaxaca are the richest states. Using Cheney's (1977) ratio, we confirmed that the MTP is constituted mainly by a mixed flora, with only Guerrero having values below 3, characteristic of temperate regions (Table 6).

Floristic affinity among the MTP states was highest between Jalisco and Oaxaca, and lowest between Jalisco and Chiapas. The highest affinities not necessarily are found between neighboring

states, as is the case of Michoacán and Colima, besides the already mentioned states of Jalisco and Oaxaca. In general, Chiapas has the lowest affinity values (Table 7).

We built a clustering dendrogram using this matrix that shows a similarity percentage of 76% 3 groups: 1) Chiapas, as an isolated group; 2) Guerrero and Michoacán; and 3) Oaxaca - Jalisco, and Colima - Nayarit (Fig. 6).

When the 40 new species found in our study were used to recalculate the Beta Richness test for the MTP, a value of 3.33 was obtained, higher than the 3.16 from previous studies. The steep slope of both curves indicates that each state has species not previously reported (Fig. 7). The number of reported species for Jalisco increased from 80 a 120.

Discussion

Multivariate statistics helped us understand the role played by the three considered environmental factors. At a first hierarchical level, we identified season, clearly separating rainy from dry season samples. Within these two groups we faced some difficulty elucidating the role played by particular environments and localities. For the rainy season samples, we were able

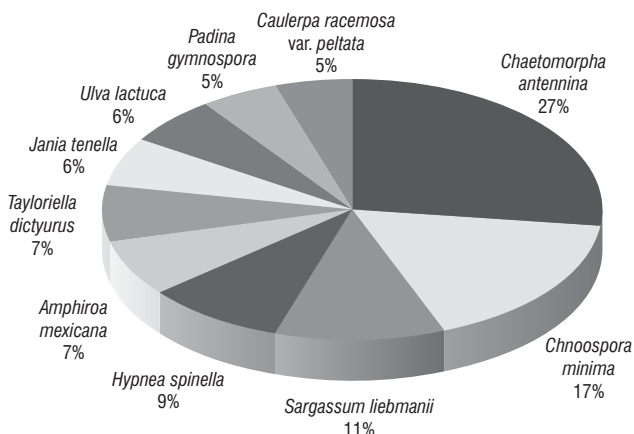


Figure 5. Percentages cover of the ten more conspicuous species of macroalgae.

Table 3. Macroalgae species composition in the four particular environments.

SPECIES	Cliffs	Tidal channels	Tidal pools	Rocky platforms
DIVISION CHLOROPHYTA				
<i>Bryopsis galapagensis</i> Taylor (1945)				■
<i>Bryopsis pennatula</i> J. Agardh (1847)	■			
<i>Caulerpa racemosa</i> var. <i>Peltata</i> (Lamoroux) Eubank (1946)	■	■	■	■
<i>Chaetomorpha antennina</i> (Bory) Kützing (1849)	■	■	■	■
<i>Chaetomorpha linum</i> (O. F. Muller) Kützing (1845)	■			■
<i>Cladophora laetiverens</i> (Dillwin) Kützing ver Van den Hoek (1982)	■			■
<i>Cladophora microcladioides</i> Collins (1909)				■
<i>Cladophora vagabunda</i> (Linneaus) Van den Hoek (1982)			■	■
<i>Codium dichotomun</i> (Hudson) S.F. Gray	■	■		
<i>Codium santamariae</i> Taylor (1945)	■			
<i>Codium simulan</i> Setchell & Gardner (1924)	■			
<i>Enteromorpha crinita</i> Nees (1920)	■			
<i>Enteromorpha flexuosa</i> (Wulfen ex Roth) J. Agardh (1883)				■
<i>Enteromorpha intestinalis</i> (Linneaus) Nees (1920)				
= [<i>E. compressa</i>] (Linneaus) Greville (1980)	■	■		
<i>Enteromorpha prolifera</i> (O. F. Muller) J. Agardh (1883)				
= [<i>E. salina</i>] Kützing (1849); [<i>E. torta</i>] (Mertens) Reinhold (1893)	■	■		
<i>Halimeda discoidea</i> Decasine (1842)		■		
<i>Rhizoclonium riparium</i> (Roth) Harvey (1849)				
= [<i>R. implexum</i>] (Dillwyn) Kützing (1845);				
[<i>R. kernerii</i>] Stockmayer (1890)	■	■		
<i>Ulva dactylifera</i> Setchell & Gardner (1920)	■	■		
<i>Ulva expansa</i> (Setchell) Setchell & Gardner (1920)	■	■		
<i>Ulva lactuca</i> Linneaus (1753)	■	■	■	■
DIVISION PHAEOPHYTA				
<i>Chnoospora minima</i> (Hering) Papenfuss (1817)				
= [<i>Chnoospora pacifica</i>] J. Agardh (1847)	■	■	■	■
<i>Colpomenia sinuosa</i> (Roth) Derbes & Soiler (1856)		■	■	
<i>Colpomenia</i> (Roth) sp.			■	■
<i>Dictyopteris deliculata</i> (Lamoroux) Schneider (1975)			■	
<i>Dictyota dichotoma</i> (Hudson) Lamoroux (1809)	■		■	
<i>Dictyota divaricata</i> Lamoroux (1809)			■	
<i>Giffordia saundersii</i> (Setchell & Gardner) Hollenberg & Abbott (1966)	■			
<i>Giffordia</i> (Batters) sp.		■		
<i>Padina</i> aff. <i>caulescens</i> Thivy in W. Taylor (1939)	■	■	■	
<i>Padina caulescens</i> Thivy in W. Taylor (1945)		■		
<i>Padina durvillaei</i> Bory (1827)	■	■	■	
<i>Padina gymnospora</i> (Kützing) Sonder (1871)				
= [<i>P. vickersiae</i>] Hoyt (1920)	■	■	■	■
<i>Padina</i> (Lamoroux) sp.	■	■		
<i>Sargassum liebmanii</i> J. Agardh (1847)	■	■	■	■
<i>Sargassum howellii</i> Setchell (1937)	■	■		
<i>Sphacelaria mexicana</i> Taylor			■	

Table 3. Continuation.

SPECIES	Cliffs	Tidal channels	Tidal pools	Rocky platforms
DIVISION RHODOPHYTA				
<i>Anhelftiopsis concinna</i> (J. Agardh) Silva & De Cew = [<i>Anhelftia concinna</i>] J. Agardh (1847)	■	■		
<i>Amphiroa dimorpha</i> Lemoine (1929)	■	■	■	■
<i>Amphiroa franciscana</i> Taylor (1934)		■		
<i>Amphiroa hancockii</i> W. Taylor		■		
<i>Amphiroa mexicana</i> Taylor (1945)	■	■	■	■
<i>Amphiroa misakiensis</i> Yendo (1902)		■		
<i>Amphiroa rigida</i> Lamoroux (1916) = [<i>A. taylorii</i>] Dawson (1934)	■	■		■
<i>Amphiroa</i> Lamoroux sp. 1	■	■		■
<i>Amphiroa</i> Lamoroux sp. 2				■
<i>Centroceras clavulatum</i> (C. Agardh in Kunth) Montagne (1822)	■	■	■	■
<i>Ceramium caudatum</i> Setchell & Gardner (1924)				■
<i>Ceramium flaccidum</i> (Kützinger) Ardissonne = [<i>C. fimbriatum</i>] Setchell & Gardner (1924); [<i>C. gracillimum</i> var. <i>byssoideum</i>] (Kützinger) Zanardini (1938); [<i>C. taylorii</i>] Dawson (1950)	■	■	■	■
<i>Ceramium ovalonae</i> Dawson (1950)	■			
<i>Ceramium zacaе</i> Setchell & Gardner (1937)			■	
<i>Gelidiella ligulata</i> Dawson (1949)		■		
<i>Gelidium arborescens</i> Gardner (1927)	■	■		
<i>Gelidium filicinum</i> Bory (1828)		■		
<i>Gelidium flacinum</i> Lamoroux			■	
<i>Gelidium lingulatum</i> Kützinger (1868)		■		
<i>Gelidium</i> (Lamoroux) sp. 1	■	■		
<i>Gelidium</i> (Lamoroux) sp. 2	■	■		
<i>Chondria arcuata</i> Hollenberg (1945)		■		
<i>Gracilaria foliifera</i> (Forsskal) Borgesen	■	■	■	
<i>Gracilaria cylindrical</i> (Borgesen) Schneider (1975)	■	■		
<i>Gracilaria spinigera</i> Dawson (1949)		■		
<i>Gracilaria textorii</i> (Suringard) J. Agardh (1876)	■			
<i>Grateloupia doryphora</i> (Montagne) Hoew (1914) = [<i>G. maxima</i>] (Gardner) Kylin (1941)	■	■	■	■
<i>Grateloupia filicina</i> (Lamoroux) C. Agardh (1822)	■			
<i>Grateloupia prolongata</i> J. Agardh (1847)	■	■		■
<i>Grateloupia</i> (C. Agardh) sp.				■
<i>Gymnogongrus crustiforme</i> Dawson (1961)	■			
<i>Gymnogongrus leptophyllus</i> J. Agardh (1876)	■			
<i>Gymnogongrus linearis</i> (C. Agardh) J. Agardh (1851)	■			
<i>Gymnogongrus platyphyllus</i> (C. Agardh)	■			
<i>Gymnogongrus</i> (Martius) sp.	■			■
<i>Herposiphonia littoralis</i> Hollenberg (1970)	■		■	
<i>Herposiphonia secundata</i> af. <i>tenella</i> (C. Agardh) Hollenberg (1980)		■		

Table 3. Continuation.

SPECIES	Cliffs	Tidal channels	Tidal pools	Rocky platforms
<i>Herposiphonia secundata</i> (C. Agardh) Falkenberg				
= [<i>H. tenella</i>] (C. Agardh) Hollenberg (1980)	■		■	■
<i>Hypnea pannosa</i> J. Agardh (1847)	■			■
<i>Hypnea spinella</i> (C. Agardh) Kützinger (1849)	■	■	■	■
<i>Jania adhaeresn</i> Lamouroux (1816)	■	■	■	■
<i>Jania crassa</i> Lamouroux (1821)		■	■	
<i>Jania tenella</i> Lamouroux	■	■	■	■
<i>Jania tenella</i> var. <i>tenella</i> Lamouroux			■	
<i>Jania longiarthra</i> Dawson (1953)	■	■	■	
<i>Jania unguulate</i> Yendo (1920)	■	■	■	
<i>Jania</i> (Lamouroux) sp.	■			■
<i>Laurencia hanconckii</i> Dawson (1944)	■		■	
<i>Litophyllum</i> (Philippi) sp.	■	■		
<i>Murrayellopsis dawsonii</i> Post (1962)				■
<i>Polysiphonia bajacali</i> Hollenberg (1961)	■			
<i>Polysiphonia confusa</i> Hollenberg (1961)	■	■		
<i>Polysiphonia hendryi</i> Gardner (1927)	■			
<i>Polysiphonia johnstonii</i> Setchell & Gardner (1924)	■			
<i>Polysiphonia johnstonii</i> var. <i>concinna</i> (Hollenberg)				
Hollenberg (1944)	■	■	■	
<i>Polysiphonia pacifica</i> Hollenberg (1942)				■
<i>Pterosiphonia dendroidea</i> (Montagne) Falkenberg (1901)	■			
<i>Rhodymenia californica</i> Kylin & Link (1931)	■			
<i>Tayloriella dictyurus</i> (J. Agardh) Kylin (1941)				
= <i>Bryocladia dictyurus</i> (J. Agardh) Taylor	■			

Table 4. Percent cover of the 5 most important species per particular environment.

Species	Cliffs	Tidal pools	Tidal channels	Rocky platforms
<i>Amphiroa mexicana</i>		8.00		9.06
<i>Caulerpa racemosa</i> var. <i>peltata</i>				18.13
<i>Chaetomorpha antennina</i>	15.56		6.61	
<i>Chnoosphora minima</i>	7.97		7.77	
<i>Dictyopteris deliculata</i>			4.84	
<i>Enteromorpha intestinalis</i>				6.25
<i>Gracilaria cylindrica</i>		7.14		
<i>Halimeda discoidea</i>			4.25	
<i>Hypnea pannosa</i>				7.50
<i>Hypnea spinella</i>	4.76			
<i>Jania longiarthra</i>		8.23		
<i>Jania tenella</i>		13.65		
<i>Padina gymnospora</i>		15.14		
<i>Sargassum liebmanii</i>	3.24		9.10	
<i>Tayloriella dictyurus</i>	5.10			
<i>Ulva lactuca</i>				7.19

Affinity	Number of particular environments				
	1	2	3	4	Total
Temperate	10	2	1	0	13
Tropical	13	10	4	3	30
Wide distribution	22	14		11	52
Total	45	26	10	14	95

Table 5. Species affinity per particular environment.

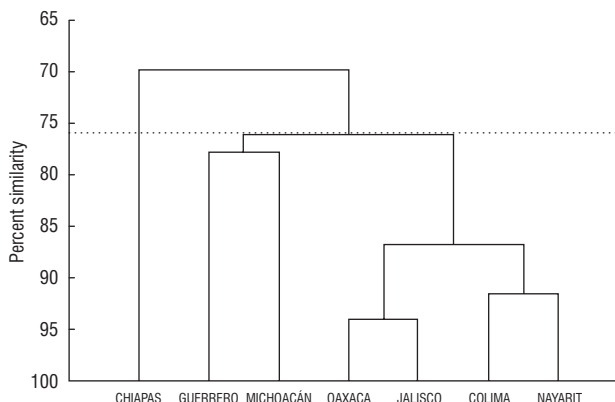
Table 6. Species richness and Cheney's (1994) ratio for the states that form the Mexican Tropical Pacific.

States	Chlorophyta	Phaeophyta	Rhodophyta	Total	(R+ C)/P
Nayarit	31	24	69	124	4.1
Jalisco	36	29	112	177	5.1
Colima	27	23	77	127	4.5
Michoacán	13	12	46	71	4.9
Guerrero	6	15	29	50	2.3
Oaxaca	41	26	99	166	5.3
Chiapas	12	7	17	36	4.1

Table 7. Jaccard's similarity matrix for the MTP states.

	Nayarit	Jalisco	Colima	Michoacán	Guerrero	Oaxaca	Chiapas
Nayarit	100.00	79.18	91.36	75.94	60.24	82.27	47.37
Jalisco		100.00	83.55	57.26	44.05	93.88	33.80
Colima			100.00	71.72	56.50	86.69	44.17
Michoacán				100.00	77.69	59.92	67.29
Guerrero					100.00	46.30	69.77
Oaxaca						100.00	35.64
Chiapas							100.00

Figure 6. Dendrogram representing analysis for the Mexican Tropical Pacific states. At a 76% similarity level, 3 groups could be identified: 1)Chiapas; 2)Guerrero-Michoacán, and 3)Oaxaca-Jalisco, and Colima-Nayarit.



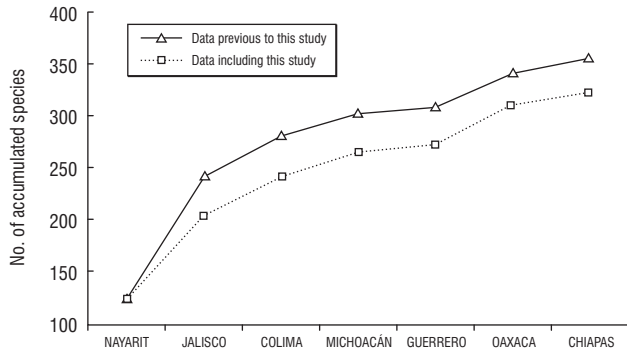


Figure 7. Beta Richness test for the Mexican Tropical Pacific.

to demonstrate that particular environments represented the second hierarchical level, while for the dry season samples; we couldn't separate one factor from the other. This seems to be a consequence of the low number of samples collected in some of the particular environments. When the number of quadrants sampled in tidal pools was compared with those for cliffs, a subsampling problem became evident (Table 2). To test possibility, we performed a crossed two-way (locations and season) ANOSIM test using only the cliffs samples, as this was the better sampled environment. With an $R=0.38$ ($p=0.1\%$) this test indicated that macroalgae community structure was determined by locations, with MO being similar to MA, and MAS also similar to T. Because in this case it was possible to separate the effect of both factors, we concluded that a more intensive sampling would have been required in some of the particular environments, specifically tidal pools. All this information, leads us to discard our working hypothesis, as it became evident that the three environmental factors play a role in determining the macroalgae community structure in the southern portion of the coast of Jalisco.

Despite the fact that during the present study only 5 locations of the extensive coast of Jalisco were sampled, a total of 40 new species were recorded, emphasizing the need for continuous monitoring to achieve a complete

description of the marine macroalgae species. This increase in the number of reported species had an effect on the Beta Richness value, which raised from 3.16 (Serviére-Zaragoza 1993; Enciso-Padilla et al. 1995) to 3.33, as already mentioned. González-González (1992), considered the MTP as a low biodiversity region when compared with the Pacific coast of Baja California and the Gulf of California, and interpret this as the result of higher water temperatures (above 28°C). We are inclined to consider that the reported low macroalgae diversity of the MTP results from few existing studies, and that this statement should be revised in the future, when a larger number of sites have been included.

Macroalgae diversity and seasonal cover are related to other environmental factors, such as light, water temperature, and substrate (Waaland 1977; Wolfe & Harlin 1988b), and seasonality as well (Sears & Wilce 1975; Tittley 1985). In this way, each species will exhibit a seasonal pattern in agreement with its phenological characteristics and environmental requirements for growth. Macroalgae abundance changed seasonally in response to environmental conditions. This was the case of *Ch. antennina* and *C. minima*, which were more abundant during the rainy season, although we ignore if other variables played contributed to the observed seasonality.

As already mentioned, biological cycles regulate changes experienced by the community in response to changes in environmental condition (Wolfe & Harlin 1988b; Mathieson 1989; Lüning 1993). In the course of this study, the number of species was greatest during the dry season, when water temperature was lowest (mean of 23°C), results in agreement with Huerta-Muzquiz & Mendoza-González (1985); Sánchez-Rodríguez et al. (1989); Mateo-Cid et al. (1993), and Núñez-López (1996), for Bahía Magdalena, Bahía de La Paz, and Bahía Concepción, location all in the southern portion of the Baja Peninsula (Baja California Sur): 51 species were present during the dry season, 10 during the rainy season, and 34 year round. For Sinaloa, Nayarit and Colima, the opposite season pattern has been described by Mateo-Cid & Mendoza-González (1991, 1992), and Mendoza-González et al. (1994). These authors explain that during the dry season (November to May) spring tides are present from noon to sunset, submitting macroalgae to high air temperatures, and desiccation, all factors resulting in a reduction of richness species.

Changes in species composition and distribution in the different particular environments reflect the unique combination of environmental variables, or microenvironments, present in each case (González-González 1992, 1993; Serviére-Zaragoza 1993; León Tejera et al. 1993; Serna 1996). Cliffs were the environment with the highest number of species, as reported by Serviére-Zaragoza (1993), and Mendoza-González et al (1994) for Nayarit and Jalisco. Cover was however low, as species were small, and their morphology and growth form did not allowed them to occupy larger areas; some of them were growing as epiphytes. Tidal pools and rocky platforms presented the highest cover, evidence of a different flora and/or favorable growing conditions.

It is not surprising that most of the species found are characterized by having wide distribution, as the MTP is under the

influence of the California Current and the equatorial system (Badan-Dangon 1998). Transition zones are known for their high species richness (Bolton et al. 1991). Murray et al. (1980) analyzed the California algal flora, and noticed that red and brown algae species richness increase from north to south, with maximum diversity below Point Conception. This results, not only from the different oceanographic regions, but also from habitat heterogeneity. Dominance of red algae an reduction in the number of brown algae along the Baja California peninsula has been reported by Sánchez-Rodríguez et al. (1989), Mateo-Cid et al. (1993), and Aguilar-Rosas et al. (1990). Serviére-Zaragoza (1993), reported the coexistence of tropical and subtropical species of the family Gelidiaceae in the southern Jalisco.

During 1997, water temperatures of 4 °C above normal were recorded as a result of the ENSO (Trasviña et al. 2000). The negative effects of El Niño on the giant kelp beds of California have been documented by Zimmerman & Robertson (1985), Tegner & Daylton (1991), and Tegner et al. (1996), among others. It is evident that a flora whose species have broad distributions, has better possibilities of enduring the thermal stress imposed by this oceanographic event. The presence of warmer waters might have favored the presence of *Giffordia saundersii*, a tropical species that was recorded for the first time in the coast of Jalisco during this study.

The presence of many species with wide distribution flora for the MTP was also confirmed by the use of Cheney's (1997) coefficient, as most of its values were between 3 and 6, corresponding to a mixed flora (tropical and temperate elements) (Table 7). While Murray et al. (1980) reported an increase in Cheney's coefficient from 4.2 at 41–42° N to 5.3 at 32 – 33° N, we found the same value, 4.1, at both extremes of the MTP, but intermediate values could be as low as 2.3 (Table 6). We consider that the 2.3 value for Guerrero results more from the bias imposed by a

reduced number of studies, than from the presence of a temperate flora.

This limitation also has an effect in the floristic affinity analysis, as it is difficult to understand how the two neighboring states of Chiapas and Oaxaca, have such a low similarity value (35.64), while Oaxaca and Jalisco have a high value (93.88) (Table 7 & Fig. 6). It is evident that there is urgent need for an intensive monitoring program along the MTP, before any further interpretations can be made.

Acknowledgements

We thank R. Gilliam, C. Barilotti, J. Sidik-Bujang and M. Harker for critical review of the manuscript.

References

- Abbott I.A. & Hollenberg G. J.** 1976. *Marine algae of California*. Stanford University Press, Stanford, California. 827 pp.
- Aguilar-Rosas R., Aguilar-Rosas L. E. & Ramos-Jardón N. A.** 1990. Análisis biogeográfico del orden Laminariales (Phaeophyta) en las costas de la península de Baja California, México. *Investigaciones Marianas CICIMAR* 5:107–121.
- Badan-Dangon A.** 1998. Coastal circulation from the Galápagos to the Gulf of California Coastal Segment (7,E) In: pp. 315–343. *The Sea, Volume 11* (Ed. A.R. Robinson & K.H. Brink), John Wiley & Sons, Inc. New York.
- Bolton J. J., Stegenga H. & Anderson R. J.** 1991. The seaweeds of False Bay. *Transactions of the Royal Society of South Africa* 47:605–610.
- Cheney D. F.** 1977. R & C/P –A new an improved ratio for comparing seaweed floras. *Journal of Phycology* 13 (Supplement):12.
- Clarke K. R.** 1993. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Australian Journal of Ecology* 18:117–143.
- Clarke K. R. & Green R. H.** 1988. Statistical design and analysis for a biological effects study. *Marine Ecology Progress Series* 46:213–226.
- Clarke K. R. & Warwick R. M.** 1994. *Change in marine communities: An approach to statistical analysis and interpretation*. Natural Environment Research Council, U.K. 144 pp.
- Dawson E. Y.** 1953a. Marine red algae of Pacific Mexico. I. Bangiales to Corallinaceae. Subf. Corallinoideae. California. *Allan Hancock Pacific Expedition* 17:1–239.
- Dawson E. Y.** 1954. Marine red algae of Pacific Mexico. II. Cryptonemiales (Cont.) *Allan Hancock Pacific Expedition* 14:241–397.
- Dawson E. Y.** 1958. Notes on Pacific coast marine algae VII. *Bulletin of the Southern California Academy of Science* 57(2):65–80.
- Dawson E. Y.** 1960. Marine red algae of Pacific Mexico. III. Cryptonemiales, Corallinaceae subf. Melobesioideae. *Pacific Naturalist* 2:1–125
- Dawson E. Y.** 1961. Marine red algae of Pacific Mexico. IV. Gigartinales. *Pacific Naturalist* 2:191–341.
- Enciso-Padilla I., Aguilar-Ramírez N., Mora-Navarro M. R. & Gaspar-Figueroa A.** 1995. Macroalgas de la zona intermareal de Melaque, Jalisco. México. *Boletín del Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara* 3:41–52.
- González-González J.** 1992. *Estudio florístico ecológico de ambientes y comunidades algales del litoral rocoso del Pacífico Tropical Mexicano*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. 167 pp.
- González-González J.** 1993. Comunidades algales del Pacífico Tropical In: *Biodiversidad marina y costera de México* (Ed. by S. I. Salazar-Vallejo & N. E. González), 420–443 pp. CONABIO & CIQRO, México.
- Hernández-Herrera R. M.** 2000. *Estructura de las comunidades algales intermareales de la costa sur de Jalisco, México*. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de investigación Científica y Educación Superior de Ensenada (CICESE) Ensenada Baja California, México. 95 pp.
- Huerta-Múzquiz L. & Mendoza-González C.** 1985. Algas marinas de la parte sur de la Bahía de La Paz, Baja California Sur. *Phytologia* 59:35–57.
- León-Álvarez D. & González-González J.** 1993. Algas Costrosas del Pacífico Tropical. In: *Biodiversidad marina y costera de México*, (Ed. S. I. Salazar-Vallejo & N. E. González), pp. 456–474. CONABIO & CIQRO, México.
- León-Tejera H., Fragoso D. León-Álvarez D., Candelaria C., Serviére-Zaragoza**

- E. & González-González J.** 1993. Characterization of tidal pool algae in the Mexican Tropical Pacific coast. *Hidrobiologia* **260/261**:197–205.
- Ludwing, J. A. & Reynolds J. F.** 1988. *Statistical Ecology*. John Wiley & Sons, New York. 337 pp.
- Lüning K.** 1993. Environmental and internal control of seasonal growth in seaweeds. *Hidrobiologia* **260/261**:1–14.
- Mateo-Cid L. E. & Mendoza González A. C.** 1991. Algas marinas bentónicas de la costa del estado de Colima, México. *Acta Botánica Mexicana* **13**:9–30.
- Mateo-Cid L. E. & Mendoza González A. C.** 1992. Algas Marinas Bentónicas de la Costa Sur de Nayarit, México. *Acta Botánica Mexicana* **20**:13–28.
- Mateo-Cid L. E., Sánchez I. R., Rodríguez E. M. & Casas V. M. M.** 1993. Estudio florístico de las algas marinas bentónicas de Bahía Concepción, Baja California Sur, México. *Ciencias Marinas* **19**:41–60.
- Mathieson A. C.** 1989. Phenological patterns of Northern New England seaweeds. *Botánica Marina* **32**:419–438.
- Mendoza González A. C., Mateo-Cid L. E. & Huerta-Muzquiz. L.** 1994. Algas Marinas bentónicas de Mazatlán, Sinaloa, México. *Acta Botánica Mexicana* **27**:99–115.
- Murray S. N., Littler M. M & Abbott I. A.** 1980. Biogeography of the California marine algae with emphasis on the Southern California Island. In: *The California Island: Proceedings of a Multidisciplinary Symposium* (Ed. by D.M. Power), pp. 325–339. Santa Barbara Museum of Natural History, Santa Barbara California.
- Norris J. N. & Johansen H. W.** 1981. Articulated coralline algae of the Gulf of California, México, I: Amphiroa Lamoureaux. *Smithsonian Contributions in Marine Sciences* **9**:1–29.
- Núñez-López R. A.** 1996. *Estructura de la comunidad de macroalgas de la laguna San Ignacio, Baja California Sur México* (1992–93). Tesis Maestría en Ciencias. CICIMAR. Instituto Politécnico Nacional. 99 pp.
- Sánchez-Rodríguez I., Fajardo C. L. & Oliverio P. C.** 1989. Estudio florístico estacional de las algas en Bahía Magdalena, Baja California Sur, México. *Investigaciones Marinas CICIMAR* **4**:16–35.
- Sears J. R. & Wilce R. T.** 1975. Sublitoral benthic marine algae of southern Cape Cod and adjacent Islands: seasonal periodicity, associations, diversity and floristic composition. *Ecological Monographs* **45**:365–377.
- Serna-Paredes J.** 1996. *Variación estacional de la comunidad algal de un canal de corrientes en Playa Las Cuatas, Guerrero*. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. 130 pp.
- Serviére-Zaragoza E.** 1993. *Descripción y análisis de la ficoflora del litoral rocoso de Bahía de Banderas, Jalisco-Nayarit*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. 146 pp.
- Serviére-Zaragoza E., Rodríguez-Vargas D. & González-González J.** 1993. Ficoflora de la región de Bahía de Banderas, Jalisco-Nayarit. In: *Biodiversidad marina y costera de México*. (Ed. S.I. Salazar-Vallejo & N.E. González) pp.745–485. CONABIO & CIQRO México.
- Taylor W. R.** 1945. Pacific marine algae of the Allan Hancock. Expeditions to the Galapagos Island. *Allan Hancock Pacific Expeditions* **12**:1–528.
- Tegner M. J. & Dayton P. K.** 1991. Sea urchins, El Niño, and the long term stability of Southern California kelp forest communities. *Marine Ecology Progress Series* **77**:49–63.
- Tegner M. J., Dayton P. K., Edwards P. B. & Risler K. L.** 1996. Is there evidence for long-term climatic change in Southern California kelp forest? *California Cooperative Oceanic Fisheries Investigation Reports* **37**:111–126.
- Tittley I.** 1985. Zonation and seasonality of estuarine benthic algae: artificial embankments in the River Thames. *Botanica Marina* **28**:1–8.
- Trasviña A., Lluch-Cota D., Filonov A.E & Gallegos A.** 2000. Oceanografía y El Niño. In: *Los impactos de El Niño en México* (Ed. by Magaña R.V.) pp. 69–101. Dirección General de Protección Civil. Secretaría de Gobernación, México.
- Waaland J. R.** 1977. *Common seaweeds of the Pacific coast*. Pacific Search Press, Washington. 120 pp.
- Whittaker, R. H.** 1975. *Communities and ecosystems*. MacMillan Publishing, Co., New York. 385 pp.
- Wolfe J. M. & Harling M. M.** 1988a. Tidepools in Southern Island, U. S. A. I. Distribution and seasonality of macroalgae. *Botanica Marina* **31**:525–536.

- Wolfe J. M. & Harling M. M.** 1988b. Tidepools in Southern Island, U. S. A. II. Species diversity and similarity analysis of macroalgal communities. *Botanica Marina* **31**:537–546.
- Wynne M. J.** 1986. A Checklist of the tropical and subtropical western Atlantic. *Canadian Journal of Botany* **64**:2239–2281.
- Zimmerman R. C. & Robertson D. L.** 1985. Effects of El Niño on local hydrography and growth of the giant kelp, *Macrocystis pyrifera*, at Santa Catalina Island, California. *Limnology & Oceanography* **30**:1298–1302.

Recibido el 13 de julio de 2005
Aceptado el 21 de octubre de 2005

Servicios ambientales de un sistema silvopastoril de *Eucalyptus saligna* en *Panicum maximum*

Zoe G. Acosta Gutiérrez, José Plasencia Fraga y Alexander Espinosa Vázquez

Centro de Investigaciones de Medio Ambiente de Camagüey.

Cisneros No. 105 (altos) e/ Angel y Pobre. C.P. 70 100 Camagüey, Cuba. Telefax: (53) (32) 298268

Correo electrónico: zoe@cimac.cmw.inf.cu

Resumen: Se evaluó durante tres años, el comportamiento de la dinámica de la fauna así como el crecimiento y desarrollo de los árboles y su influencia en la retención de carbono y el contenido de materia orgánica del suelo; en un sistema silvopastoril de tres ha, ubicado en la región de Jimaguayú en Camagüey, Cuba, donde se estableció *Eucalyptus saligna* sobre un pastizal de *Panicum maximum*. La fauna incrementó en el tiempo, por lo que al final del estudio se había registrado un total de: 4 phyla, 8 clases, 26 órdenes y 102 especies. Los indicadores ecológicos de abundancia relativa y riqueza ponderada se elevaron de 13 a 60 y de 2 a 6 respectivamente. Al final del experimento se obtuvo que el diámetro de los árboles a la altura del pecho se incrementó de 1.72 cm hasta 6.29 cm (3.66 veces como promedio) mientras que la altura de las plantas incrementó de 0.33 m a 11.0 m (33.3 veces como promedio). Estos valores se correspondieron con una biomasa de 91.6 - 127.7 ton de materia seca/ha, lo que equivale a 45.8 - 63.8 ton de carbono/ha. El contenido de materia orgánica en el suelo resultó superior en la época de lluvias en comparación con el período poco lluvioso y manifestó una tendencia a disminuir hacia los estratos inferiores. El contenido de materia orgánica en el suelo fue de 380 t/ha lo cual implica 190 t de C/ha y 570 t de C para todo el sistema. Se concluye que la introducción de árboles en el pastizal, mejoró las condiciones del suelo, incrementó la retención de carbono y favoreció el desarrollo de la diversidad biológica así como la estabilidad ecológica del ecosistema.

Abstract: During three years, the dynamics of the fauna as well as the growth and development of the trees, and their influence in the retention of carbon and the content of organic matter in the forest floor were evaluated in a silvopastoral system of *Eucalyptus saligna* and *Panicum maximum*, located in the region of Jimaguayú, Camagüey, Cuba. By the end of the study the faunal diversity increased to a total of four phyla, eight classes, 26 orders and 102 species. The ecological indicators of relative abundance and richness wealth rose from 13 to 60 and from 2 to 6 respectively. The diameter of the trees at chest height increased from 1.72 cm to 6.29 cm (on an average of 3.66 times the original diameter) while the height of the trees increased from 0.33 m to 11.0 m (on an average of 33.3 times the original height). These increments correspond with a biomass of 91.6-127.7 tons of dry matter/ha, which is equal to 45.8-63.8 tons of carbon/ha. The content of organic matter in the forest floor was greater in the rainy season in comparison to the drier season and it was less in the inferior strata. The content of organic matter in the forest floor was 380 tons/ha which implies 190 t of C/ha and 570 t of C for the whole system. The study showed that the introduction of trees in the grassland, improved the conditions of organic matter in the forest floor, increased the retention of carbon and favored the development of biological diversity as well as the ecological stability of the ecosystem.

Introducción

En la actualidad se reconoce, que el deterioro ambiental y el impacto socio-económico adverso que hoy predomina en el sector agropecuario de América Latina, es el resultado de un uso inadecuado de los recursos naturales así como de la aplicación incorrecta de sistemas, técnicas y tecnologías; todo lo cual deviene en la necesidad extrema de asumir estrategias de mitigación que permitan reconvertir la realidad agropecuaria hacia una actividad sustentable.

El uso de los árboles en los sistemas ganaderos ya sea como cercas vivas o como fuente alternativa de alimento verde para el ganado en época de baja producción de pastos, forma parte de la tradición cultural en muchas regiones de América Latina. Sin embargo, en las últimas décadas se han desarrollado diversas opciones que ponen de manifiesto la conveniencia de extender dicha práctica atendiendo a los beneficios que tributa no sólo a la ganadería, sino también al ambiente y al productor.

Dentro de los principales servicios ambientales que brindan los árboles y los arbustos está la recuperación y mejoramiento de los suelos, la contribución a los ciclos locales de agua y nutrientes donde se destacan la fijación del N₂ y la movilización del fósforo en suelos ácidos (Ibrahim M. y H. Andrade 2000), el mantenimiento, conservación y recuperación de la diversidad biológica (Murgueitio E. y Z. Calle 1999) y la captura de CO₂, considerada como una gran contribución para la mitigación de los fenómenos climáticos de cambios globales (Ibrahim M. y H. Andrade 2000; Pomareda C. 2000).

Objetivo

El propósito del presente trabajo consistió en evaluar el comportamiento de la dinámica de la fauna así como el crecimiento y desarrollo de los árboles y su influencia en la retención de carbono y el

contenido de materia orgánica del suelo; en un sistema silvopastoril (SSP) donde se estableció *Eucalyptus saligna* sobre un pastizal de *Panicum maximum*; para contribuir con ello, al conocimiento de los servicios ambientales de dicho sistema y a la extensión del mismo en la región.

Materiales y métodos

El trabajo se desarrolló en la región de Jimaguayú que tiene su centro en los 21°8'2" lat N y 77°30'55" long W, según el Mapa Geográfico General de la Provincia de Camagüey, Cuba, escala 1:50 000 (Instituto de Geografía 1989). La localidad donde se estableció el sistema se denomina UBPC "Primero de Enero" y pertenece a la Empresa Pecuaria Triángulo 1.

Se sembraron 3 ha (con una densidad de (2×4) para 3700 árboles) de *Eucalyptus saligna* en un pastizal de *Panicum maximum* dedicado al desarrollo del ganado ovino, sobre suelo Pardo Típico sin carbonato que según clasificación taxonómica citada por Paretas (1990), se ubican dentro de los Inceptisoles. Los árboles se sembraron de posturas, con una altura inicial de 0.33±0.07m y alcanzaron una supervivencia del 98%.

Tanto para la fauna como para los árboles y en los tres años que duró el estudio, se establecieron dos muestreos anuales, uno en la época de las lluvias (mayo–octubre) y otro en época poco lluviosa (noviembre–abril).

Para determinar los cambios de la fauna en el sistema, se tomaron en consideración grupos zoológicos focales (invertebrados: moluscos e insectos; vertebrados: reptiles y aves), además de la fauna edáfica, como indicador excepcional de la dinámica de la biodiversidad en el recurso más directamente afectado: el suelo.

Los muestreos se realizaron entre las 8:00 a.m. y las 12:00 a.m., momento en el cual se manifiesta la máxima actividad de la fauna.

De acuerdo con Marshall y col. (1994), para los invertebrados se utilizaron varios métodos de muestreo: colecta mediante red entomológica (jameo) por transectos (3) de 50 m de largo y 2 m de altura, transecto lineal de 100 m para conteo de lepidópteros (Fontenla 1987) y el método de colecta directa mediante pinzas y red entomológica.

Todos los especímenes colectados fueron conservados en alcohol al 70 % para su posterior identificación, preparación y montaje en el laboratorio.

Para el monitoreo de los moluscos se utilizó el método de conteo directo de moluscos vivos en parcelas (3 aleatorias) de 0.25 m². En el caso de la fauna edáfica se empleó el método de parcelas 0.04 m² y profundidades de 0.05 y 0.10 m (González 1984) colectando toda la tierra y hojarasca para luego en el laboratorio extraer la macrofauna presente.

En el estudio de los reptiles se aplicó el método de muestreo por transectos de 1 m de largo y para las aves el recuento en Punto con Radio Fijo.

Los indicadores ecológicos que se determinaron fueron la Riqueza Ponderada (RP) y la Abundancia Relativa (AR) (Odum 1974) las cuales se calculan de la forma siguiente:

$$RP = S(\sqrt{N})^{-1}$$

donde:

S; Número total de especies presentes.

N; Número total de individuos capturados.

$$AR = N T^{-1}$$

donde:

N; Número total de individuos capturados.

T; Tiempo de muestreo.

Para la estimación del carbono retenido por el SSP se midió el diámetro a la altura del pecho (DAP) y la altura, en 50 plantas de *E. saligna* siguiendo un transecto tomado al azar.

Para determinar la biomasa de las ramas y hojas se utilizó el modelo

matemático planteado por Rodríguez y col. (2004) y para la del fuste la fórmula basal empleada comúnmente en estimaciones de madera en plantaciones forestales.

$$V = \pi \cdot d^2 \cdot h/4$$

donde:

d; DAP

h; Altura hasta el inicio de la copa.

Para el cálculo del carbono se siguieron los criterios de Campos y col. (2004) quienes consideraron que el 50% de la biomasa seca es un estimado aceptable.

Para determinar el porcentaje de materia orgánica en el suelo se tomaron 5 muestras de 50 cm de profundidad con un muestreador tubular de 4 cm de diámetro. Cada muestra se dividió en los siguientes estratos: sup.-10cm, 10-20 cm, 20-30 cm, 30-40 cm y 40-50 cm. El porcentaje de materia orgánica se determinó por incineración a 550 °C durante 4 horas.

Assumiendo que 1 ha de suelo a 10 cm de profundidad contiene 1 000 TM, se determinó el contenido de carbono secuestrado en forma de materia orgánica de la siguiente forma:

$$C_c = C_p \times 1\,000\,000$$

donde:

C_c; Contenido de carbono en el suelo (kg·ha⁻¹)

C_p; Proporción de carbono en el suelo (%)

Resultados y discusión

Los resultados generales con respecto a los taxones encontrados durante el estudio se muestran en la tabla 1. En la misma se aprecia un mayor número de invertebrados, en comparación con los vertebrados sin embargo, se considera que esto es de esperar debido al tamaño real de este grupo en la naturaleza por lo que estos resultados no significan que el establecimiento del sistema favorezca un incremento de estos grupos zoológicos.

Tabla 1. Resultados generales para los diferentes taxones encontrados durante los muestreos de fauna.

Taxones	Invertebrados	Vertebrados	Total
Phylum	3	1	4
Clase	5	3	8
Orden	17	9	26
Especies	83	19	102

El análisis del comportamiento de los indicadores ecológicos anuales durante el transcurso del experimento (Tabla 2) demuestran un incremento en los valores de AR y RP. Teniendo en cuenta que la AR es indicador de esfuerzo de captura, el incremento en sus valores demuestra un incremento en la abundancia de organismos o lo que es lo mismo un incremento en la diversidad biológica, que alcanza sus máximos valores al cabo del tercer año de establecido el sistema silvopastoril.

Por otra parte el indicador RP, que permite evaluar la diversidad biológica en base a la relación de la cantidad de especies contra el número total de individuos arrojó un incremento para la riqueza de especies (Tabla 2) en el transcurso de los tres años de estudio, encontrándose los mayores valores en el tercer año.

El análisis del comportamiento de AR entre épocas (Fig.1) pone de manifiesto una tendencia a la estabilidad para los valores calculados de este indicador en la medida que se estableció el sistema. Un comportamiento similar se encontró para el indicador RP (Fig.2).

Tabla 2. Resultados de los Índices ecológicos Abundancia Relativa (AR) y Riqueza ponderada (RP) analizados por año.

Índices Ecológicos	1er año	2do año	3er año
AR	13	41	60
RP	2	3	6

El DAP de la plantas de *E. saligna* se incrementó de 1.72 cm en el 2002 a 6.29 en el 2004, es decir, en sólo tres años las plantas aumentaron su diámetro 3.66 veces (Fig. 3). Comportamiento similar mostró la altura de las plantas, la cual aumentó de 0.33 m en el 2002 a 11.0 m en el 2004, lo que representó un aumento de 33.3 veces (Fig. 4).

Estos valores, atendiendo al modelo matemático empleado, corresponden a una biomasa de 91.6 – 127.7 ton de materia seca/ha, lo que equivale a 45.8 – 63.8 ton de carbono/ha.

Si consideramos que la región de Jimaguayú cuenta con un área de alrededor de 500 km² que precisa ser reforestada (Acosta, Z. y G. Reyes 2003) y se decidiera extender en la misma la tecnología de los SSP con la especie bajo estudio, entonces el

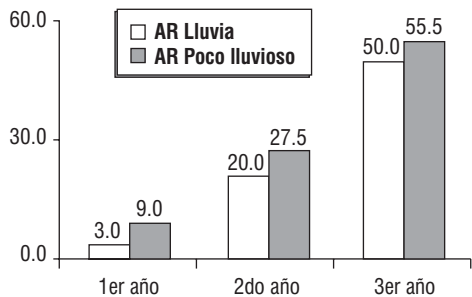


Figura 1. Gráfica del comportamiento de la Abundancia Relativa (AR) en las dos épocas del año.

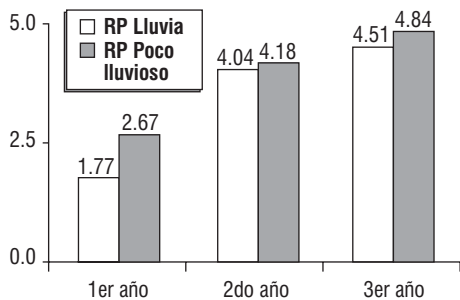


Figura 2. Gráfica del comportamiento de la Riqueza Ponderada (RP) en las dos épocas del año.

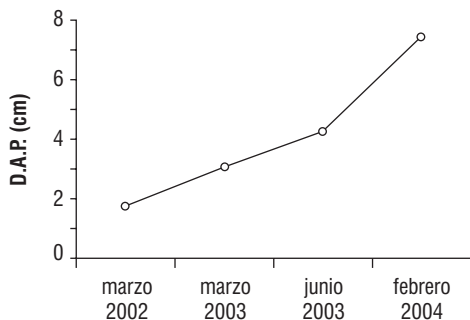


Figura 3. Diámetro a la altura del pecho (D.A.P.).

carbono retenido ascendería a $2.29 - 3.18 \times 10^6$. Estos cálculos se pueden considerar un subestimado, ya que los mismos se hicieron a partir de árboles de sólo 3 años y no se incluyó el pasto asociado al sistema ni se tuvieron en cuenta los aportes al secuestro de la biomasa subterránea.

Por otra parte, el porcentaje de materia orgánica en el suelo mostró un incremento de la época de seca a la de lluvia y se aprecia una tendencia de los valores a disminuir con la profundidad. (Fig. 5).

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Botero (2001) y López (1998), quienes reportan la alta variabilidad, así como las tendencias a disminuir hacia los estratos inferiores y aumentar con la edad del sistema.

El contenido de materia orgánica en el suelo fue de 380 t/ha lo cual implica 190 t de C/ha y 570 t de C para todo el sistema.

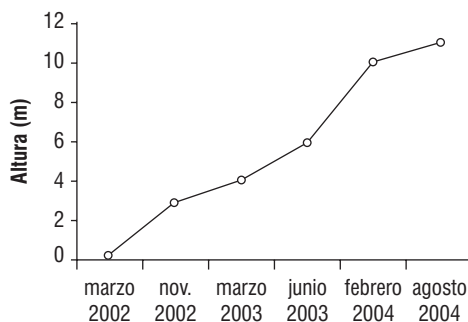


Figura 4. Altura de las plantas de *E. saligna*.

Extrapolando el resultado para el área que precisa ser reforestada en el municipio Jimaguayú, el total de carbono retenido en el suelo pudiera estar en el orden de 9.5×10^6 t utilizando la misma especie.

Considerando la biomasa de los árboles y del suelo, el carbono retenido en el SSP alcanzó la cifra de 707.4 ton en los 3 primeros años.

Conclusiones

La introducción de árboles de Eucaliptos saligna en el pastizal de Panincum maximum favoreció el desarrollo de la diversidad biológica y contribuyó a la estabilidad de la misma en el ecosistema así como mejoró las condiciones del suelo e incrementó la retención de carbono.

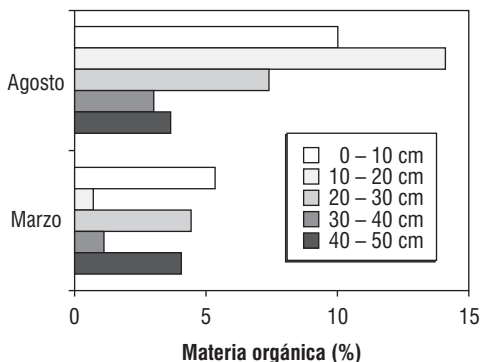


Figura 5. Cambios en la materia orgánica del suelo.

Referencias

Acosta, Z. y G. Reyes. 2003. Identificación de áreas susceptibles para el desarrollo de sistemas silvopastoriles. *Ibugana* 10(1-2): 23-30.

Botero, J. A. 2001. Contribución de los sistemas ganaderos tropicales al secuestro de carbono. II Conferencia electrónica "Agroforestería para la producción animal en América Latina" (FAO-CIPAV) Oct-Nov., 2001. (<http://w.w.w. virtualcentre. org/es>).

- Campos, M., H. Machado, H. Wencomo y G. Pentón.** 2004. Estudios preliminares sobre fijación de carbono en sistemas de pastoreo de la provincia de matanzas. Memorias del VI Taller Internacional Silvopastoril "Los árboles y arbustos en la ganadería". CD Room 959-16-0285-1.
- Fontenla, J. L.** 1987. Aspectos comparativos estructurales de tres comunidades de mariposas (Lepidoptera: Rhopalocera) en Cuba. *Poeyana* (337): 1–20.
- González, R.** 1989. *Estudio comparativo de la hojarasca y del suelo de dos ecosistemas forestales de la Sierra del Rosario*. Serie zoológica No 2. Reporte de Investigaciones del Instituto de Ecología y Sistemática. Academia de Ciencias de Cuba.
- Ibrahim M. y A. Hernán.** 2000. Restauración de la productividad y conservación de la biodiversidad en pasturas degradadas. CATIE (Turrialba, Costa Rica). En: *ReCovering Paradise: Making Pasturelands Productive for People and Biodiversity Proceedings of the First International Workshop on Bird Conservation in Livestock Production Systems*. American Birds Conservancy. Editor: Luis G. Naranjo Airlie, Virginia, USA. Abril 13.
- Instituto de Geografía, Academia de Ciencias de Cuba.** 1989. Mapa Geográfico General. En: *Atlas de Camagüey*. Editorial Academia, La Habana, pp. 2–3.
- López, A.** 1998. *Cuantificación del carbono almacenado en el suelo de un sistema silvopastoril en la zona Atlántica de Costa Rica*. Tesis Mag. Sc. CATIE, Turrialba, Costa Rica, 50 pp.
- Marshall, S. A, R.S. Anderson, R.E. Roughley, V. Behan-Pelletier, V. y H.V. Danks.** 1994. Terrestrial arthropod biodiversity: planning study and recommended sampling techniques. *Bulletin of the Entomological Society of Canada* 26(1), supplement. 33 pp.
- Murgueitio E. y Z. Calle.** 1999. Diversidad biológica en la ganadería bovina colombiana. En: *Agroforestería para la producción animal en América Latina*. Memorias de una conferencia electrónica realizada de abril a septiembre de 1998. Estudio FAO Producción y Sanidad Animal 143, Roma, pp. 53–88.
- Odum, E. P.** 1974. *Ecología*. W. B. Saunders Company, Philadelphia, 639 pp.
- Paretas, J.J.** 1990. *Ecosistemas y regionalización de pastos en Cuba*. Ministerio de la Agricultura, 178 pp.
- Pomareda C.** 2000. Perspectivas de los mercados y oportunidades para la inversión en ganadería. En: *Intensificación de la Ganadería en Centroamérica - Beneficios Económicos y Ambientales*. Editores: Carlos Pomareda y Henning Steinfeld. CATIE, FAO, SIDE. San José, Costa Rica, pp. 55–76.
- Rodríguez, J., C. A. M. Vidal, H. Ríos y P. Facundo.** 2004. *Evaluación de biomasa de copa en plantaciones de Eucalyptus saligna smith. de la empresa forestal integral Macurije, Pinar del Río, Cuba*. Tercer Congreso Forestal de Cuba. III Simposio Internacional de Técnicas Agroforestales.

Recibido el 4 de julio de 2005
 Aceptado el 14 de octubre de 2005

Biología celular y molecular de las poliaminas: monografía de los conocimientos básicos

Ramón Reynoso Orozco¹, Jorge Iván Delgado Saucedo¹, Ana María Puebla Pérez², Carlos Calvo Méndez³, Pablo Arteaga Nieto³ y Anne Santerre¹

¹Departamento de Biología Celular y Molecular, CUCBA, Universidad de Guadalajara, km 15.5 carretera a Nogales, Zapopan 45110, Jalisco., AP 3982, México. Correo-e: rreynoso@cucba.udg.mx; asanter@cucba.udg.mx; ivanovith@yahoo.com

²Centro de Investigaciones Biomédicas de Occidente, IMSS, Sierra Mojada, número 800 Col. Independencia, Guadalajara 44340, Jalisco, México. Correo-e: ampuebla@cencar.udg.mx

³Instituto de Investigación en Biología Experimental, Facultad de Química, Universidad de Guanajuato, Apartado Postal #187, Guanajuato 36000, Guanajuato, México. Correo-e: calvoc@quijote.ugto.mx

Resumen: La presente revisión expone, la biología celular y molecular de las aminas biogénicas, putrescina (Pu), espermidina (Spd) y espermina (Spm) en donde se presentan los conocimientos existentes previos al uso de la ingeniería genética que ha aportado información desconocida antes de usar ratones genéticamente modificados.

Palabras clave: Poliaminas, Putrescina, Espermidina, Espermina, Ornitina descarboxilasa (ODC).

Abstract: This revision explains the cellular and molecular biology of the biogenic amines, putrescine (Pu), spermidine (Spd) and spermine (Spm) including what is presently known about them as well as new information prior to experiments with genetically modified mice

Estudio de las poliaminas y su historia

Las poliaminas (PAs) fueron descubiertas mientras se estudiaba a las sustancias que contienen nitrógeno. Las PAs más abundantes en la naturaleza son: putrescina (Pu), espermidina (Spd) y espermina (Spm) y la cadaverina, que también es importante por encontrarse en forma natural en múltiples organismos (Wallace 2003). Actualmente se siguen descubriendo otras PAs, con estructuras químicas diferentes o en forma cíclica, con distintas funciones, por ejemplo en insectos se ha descrito toda una gama de PAs macrocíclicas con funciones de defensa (Schröder et al. 1998).

La descripción del metabolismo de las PAs, que son compuestos esenciales para el crecimiento y la supervivencia de los organismos (Tsirka y Coffino 1993), inició en los años 40 con el uso de bacterias y el estudio de vías de la descarboxilación de los aminoácidos (in vitro) en sistemas no

celulares. En el período comprendido de 1940 a 1946 Gale estableció que el contenido de la Pu se relaciona directamente con la descarboxilación de la arginina, entre otros aminoácidos. Posteriormente en *Escherichia coli*, el mismo autor descubrió a la Ornitina Descarboxilasa (ODC, EC 4.1.1.17) y a una Arginin Descarboxilasa (ADC) que produce agmantina en un paso previo a la síntesis de Pu (Cohen 1998). Se establecen así las bases para describir las vías biosintéticas de las PAs en procariontes.

El interés por estudiar a las PAs creció rápidamente y con el desarrollo del campo de la biología molecular se presentaron datos científicos que involucraron a las PAs tanto en la replicación y reparación del DNA, como en la síntesis y procesamiento de RNA, en la síntesis de proteínas, así como también en aspectos metabólicos,

diferenciación y crecimiento celular en múltiples especies y enfermedades, incluyendo al cáncer y padecimientos de tipo parasitario (Wallace 2003; Cohen 1998).

Las poliaminas más estudiadas

Las poliaminas: putrescina, espermidina y espermina son aminas alifáticas ubicuas, de bajo peso molecular y altamente catiónicas en condiciones fisiológicas (Dawson et al. 1986). Entre las múltiples funciones que se les adjudican a las PAs podríamos mencionar que en la superficie celular se unen de manera no covalente a sitios aniónicos específicos y estabilizan las membranas. Dicha unión se realiza en sitios aniónicos de inositol fosforilado involucrados en las cascadas de señalización, donde las PAs modulan pasos enzimáticos definidos. En mitocondrias de células de mamífero, cuya producción anaeróbica de ATP requiere Ca^{2+} , la acumulación de Spm y Ca^{2+} amortigua la concentración citosólica de Ca^{2+} y regula así la actividad enzimática general dentro del organelo (Cohen 1998).

Interacciones PAs-ácidos nucleicos

INTERACCIONES PAs-DNA

Dado que el DNA es un poli-electrolito con cargas negativas, establece interacciones de tipo electrostático con las PAs (Bloomfield 1997). Además del contacto de neutralización, las PAs interaccionan con las bases de los ácidos nucleicos, colocadas en los surcos mayores y menores y efectúan interacciones multi-sitio según el ambiente iónico y contenido de agua (Feuerstein 1991; Korolev 2004).

La Spd facilita la compactación del DNA y la actividad de las topoisomerasas, favorece su resistencia a la DNAasa I y otras nucleasas, pero lo mantiene transcripcionalmente activo, lo cual se comprueba si se adiciona RNA polimerasa de *Echerichia coli* (Cohen 1998).

Las tres PAs pueden incrementar la

temperatura media de fusión (T_m) del DNA, dependiendo de su concentración, hasta por 40°C en soluciones bajas en sales (10 mM Na^+ y K^+) comparado con aquellas sin PAs (Tabor 1962; Thomas y Bloomfield 1984).

Un estudio de inmunofluorescencia (anti-Spm) en células mitóticas, mostró la acumulación de Spm en los cromosomas (Sauve et al. 1999). Por lo tanto, la organización estructural y condensación de la cromatina incluye tanto a las PAs como a las histonas y proteínas no histonas. Durante el ciclo celular un estudio inmunohistoquímico, mostró que tanto la Spm, como la Spd se asocia a cromosomas mitóticos altamente empaquetados (Sauve et al. 1999; Hougaard et al. 1987). Así éstos y otros estudios indican que la condensación del DNA inducida por las PAs es importante para las funciones celulares in vivo (Thomas y Thomas 2001). Por otro lado, en estudios de simulaciones de dinámica molecular se ha determinado las interacciones de iones como el Na^+ y una PA sintética como diaminopropano(2^+), comparando a la Pu, Spd y Spm (Korolev et al. 2001 y Korolev et al. 2002), se demostraron que Spd y Spm se unen con relativa afinidad baja en el surco mayor de la cromatina en la interfase del ciclo celular (Korolev et al. 2004).

Otro fenómeno interesante asociado con las interacciones PAs-DNA es la habilidad de ciertas secuencias de DNA para sufrir transiciones conformacionales en la presencia de PAs (Behe y Felsenfeld 1981; Thomas y Messner 1988). Estos cambios en la conformación del DNA-B o DNA-Z, afectarían la reactividad del DNA con las proteínas, carcinógenos y otras moléculas que se unen a él. Así, las PAs promueven la formación de la estructura cuaternaria del DNA, mediante la neutralización de las cargas negativas en los grupos fosfato del DNA, reduce el requerimiento de energía para la formación de la doble hélice, facilitando las interacciones proteína-DNA (Feuerstein et al. 1986 y 1989).

Por cristalografía de rayos X se muestra una unión estrecha de la Spm con el DNA en la conformación DNA-Z. La Spm se enrolla alrededor del DNA en contactos iónicos tanto con las cargas negativas de los fosfatos (Fig. 1), como con los contactos hidrofóbicos de las bases nitrogenadas (Egli et al. 1991).

Los trabajos de simulaciones de dinámicas moleculares han llevado, entre otros aspectos, a la conclusión de que Spd y Spm se unen con baja afinidad, de manera relativa a sitios en el surco mayor. Korolev y su grupo proponen que en condiciones naturales o in vivo esto puede ser importante, dado que la mayoría de las proteínas regulatorias usan una distribución de donadores y aceptores de uniones de hidrógeno específicos de secuencia en el surco mayor para leer y unirse en el DNA. Aunado al hecho que cantidades milimolares de Spd y Spm son las más comunes en células eucariotas y se encuentran concentradas en la cromatina del núcleo celular (Korolev et al. 2004). Estudios de transcripción del DNA circular provocada por estrés, muestran que la rigidez y el enrollamiento del DNA inducidos por la interacción de las PAs dentro de los surcos menores del DNA, no pudieron ser simulados por otros policationes como: polilisina, poliarginina o histonas (Peng y Jackson 2000).

LAS PAS EN LA TRADUCCIÓN

Las PAs interactúan de la misma manera con el RNAt en función de las cargas y de la estructura específica de las aminos (Cohen 1998d). El metabolismo de PAs y su importancia para la síntesis de proteínas en las bacterias termófilas, se considera como un avance en la evolución de los microorganismos que permitió la diversidad de los RNAt de los organismos procariontes, el cual dio origen al RNAt de los eucariontes (Thomas y Thomas 2003). En distintos modelos de experimentación se ha demostrado la participación de las PAs en la estructura del RNAt y en las etapas principales del proceso de síntesis

proteica como son: formación del complejo de iniciación, crecimiento y el de terminación de la cadena peptídica (Cohen 1998e).

Las PAs incrementan la unión de «poliuridilato» o poli(U) a las subunidades 30S del ribosoma (Stryer 1981). Aunque existe una probable competencia de Spd por los sitios de unión del Mg^{++} , no es posible la traducción sin este elemento. En *Bacillus thuringiensis* y *Thermophilus thermophilus* se demostro la absoluta dependencia de las PAs en la síntesis de proteínas. En múltiples sistemas tanto in vitro como in vivo se ha comprobado la importancia de estas moléculas en la traducción y en fenómenos adicionales en procariontes, así como sus efectos sobre polímeros del interior de la célula.

La Spd participa en la interacción de las subunidades que forman a la subunidad 70S en *E. coli*, lo cual sugiere un papel asociativo con Mg^{++} en la organización de los ribosomas (Cohen 1998).

Distribución biológica.

Las PAs se encuentran en todos los organismos, lo cual demuestra que su función dentro de la célula es imprescindible y por lo tanto se han mantenido durante la evolución (Babear y Gerner 2003). En los organismos superiores, como mamíferos, se ha descrito a las enzimas biosintéticas de éstas moléculas en todos los tejidos (Pegg et al. 2003). Dado que son requeridas en la división celular, su distribución dentro del organismo se favorece en aquellos tejidos y órganos que se encuentran en crecimiento o división activa (Jeevanandam et al. 1997).

En el lumen intestinal, las PAs se absorben rápidamente después que han llegado con los alimentos (Uda et al. 2003); posteriormente, se distribuyen hacia los órganos a través de la circulación (Bardócz et al. 1993; Benamouzig et al. 1995; Milovic 2001). Las PAs derivadas de los alimentos, enterobacterias o de otros orígenes se absorben por difusión pasiva a través de una ruta paracelular (Bardócz et al. 1993 y

Milovic 2001). La Pu es la PA de mayor concentración en el intestino, comparada con Spd y Spm, pero en los tejidos las tres están presentes (Benamouzig et al. 1995). La Pu se utiliza como fuente de energía en el interior del intestino, la sangre y tejidos después de degradarse por la diamino oxidasa (Pryme y Bardócz 2001 y Bardócz et al. 1993).

En el riñón de ratones sanos se encuentra una cantidad alta de ornitina descarboxilasa (ODC), por lo que se considera un órgano blanco para estudiar el efecto de cualquier tratamiento sobre su actividad. La Pu que sintetiza dicha enzima es de excreción, más que utilizada en el metabolismo y se considera un residuo de deshecho. La Spd y la Spm se encuentran en niveles más elevados, lo que sugiere que estas moléculas son útiles en la fisiología del riñón (Kobayashi et al. 2003).

Homeostasis de las PAs

VÍAS DE INCORPORACIÓN Y EXCRECIÓN DE LAS PAs

Los niveles intracelulares de PAs alcanzan un equilibrio a través de la biosíntesis, la degradación, la excreción y la incorporación de aminos. Algunos de los mecanismos reguladores de dicho equilibrio en los compartimentos celulares de PAs son únicos. La vida media de la ODC (síntesis) y de la AdoMet (catabolismo) son de 5 a 60 minutos, lo que permite que la célula regule de manera rápida sus niveles de PAs por biosíntesis y degradación, por otro lado la ODC es la única enzima que no requiere de ubiquitinación para ser degradada por el proteasoma 26S. Además, las células presentan un sistema eficiente de excreción y de incorporación de PAs exógenas, en su forma acetilada, ya que cuando se encuentran en exceso podrían ser tóxicas (Wallace 2001).

METABOLISMO DE LAS PAs

En eucariontes, las PAs se sintetizan a partir de ornitina, un aminoácido secundario que se forma de arginina por acción

de la enzima arginasa; a la ornitina se le “retira” el grupo carboxilo (COOH) y en su lugar se “adiciona” un grupo amino (NH₂) para formar a la Pu en una reacción catalizada por la ornitina descarboxilasa (ODC), una de las enzimas limitantes del metabolismo de las PAs. La Pu (NH₂-(CH₂)₄-NH₂) y la adenosil metionina [Ado-S (CH₃)CH₂CH₂CH₂NH₂] sirven como sustratos para la enzima espermidina sintasa y generan a la triamina Spd [NH₂-(CH₂)₃-NH-(CH₂)₄-NH₂]; dicha Spd y otra adenosil metionina son utilizadas por la espermina sintasa y así dar origen a la tetramina Spm (NH₂-(CH₂)₃-NH-(CH₂)₄-NH-(CH₂)-NH₂), la última PA de la vía biosintética. La metionina es adenilada por la enzima S-adenosil-metionina descarboxilasa (AdoMetDC) y algunos autores proponen a esta enzima, como limitante para la síntesis de PAs además de la ODC dado que representa la única manera de introducir metionina en forma de grupos amino propil (Almurd et al. 2000) para el metabolismo de las PAs (Urdiales et al. 2001). Una vía catabólica de las PAs, se desarrolla al adicionar un grupo acetilo en la posición N¹ de Spm o Spd por acción de la enzima espermidina/espermina N¹-acetiltransferasa (SSAT). Esta enzima es limitante del catabolismo, dada su importancia en el control de los niveles de PAs celulares (Urdiales et al. 2001; Casero et al. 2003). La Spd y la Spm acetiladas son sustrato de la poliamino-oxidasa (PAO), que es dependiente de flavin-adenina dinucleótido oxidasa y las transforma en Pu o Spd (Fig. 1), en forma retrospectiva, además de 3-acetamido propanal y H₂O₂ (Wang et al. 2001).

ESTRUCTURA DE LA ODC

La descarboxilación de la ornitina para producir Pu es dependiente de fosfato de piridoxal (PLP). En mamíferos (Cuadro I), la ODC se encuentra en el citosol y es rápidamente degradada, pero si es truncada en su aminoácido 37 del extremo carboxilo terminal, adquiere mayor estabilidad sin afectar su actividad. La regulación de su

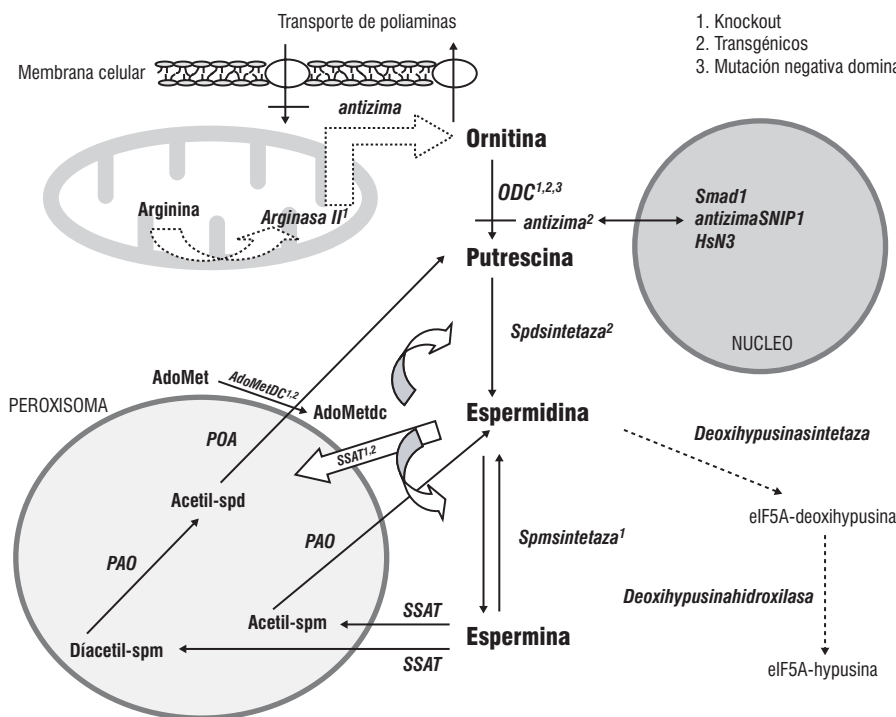


Figura 1. El metabolismo de las poliaminas. ODC, ornitina descarboxilasa; Spd, espermidina; AdoMetDc, S-adenosilmetioninadecarboxilasa; dcAdoMet, AdoMet descarboxilada; Spm, espermina; SSAT, espermidina/espermina N1-acetiltransferasa; PAO, poliaminoxidasa; SMO, esperminoxidasa; Eif5a, factor eucariótico de iniciación 5 A. Los números en superíndice indican las modificaciones genéticas a los genes correspondientes. Adaptado de Jäne, 2004.

actividad es por mecanismos de control transcripcional, traduccional y post-traduccional. En eucariotes, la ODC es activa como homodímero (106 kDa); en la interfase de los dos monómeros. Hacia el extremo N-terminal de una de las subunidades, se forma el sitio de unión de PLP y en el C-terminal de la otra subunidad se encuentra el sitio de interacción del sustrato (ornitina).

La modulación de su actividad incluye:

- 1) Regulación de la transcripción del gen de *odc*
- 2) Modificación post-transcripcional de la ODC
- 3) Control de la estabilidad, regulada por retroalimentación negativa

En ratón y en otros vertebrados, la actividad de la ODC es diferente en unos órganos comparada con otros, por lo que el papel de ésta enzima es más crítico en unos tejidos que en otros (Tsirka y Coffino 1993).

Henningsson et al. (citado por Nishioka 1996) encontraron incremento en el peso del riñón (hipertrofia) de ratones macho inducido por testosterona y describieron por primera vez una cantidad alta de ODC en este órgano y una consecuente excreción alta de Pu; lo anterior facilitó el aislamiento de la enzima. La administración de testosterona incrementó mil veces la cantidad de ODC, así como de su RNAm en ratones castrados, sin incrementar la cantidad de DNA (Nishioka 1996). Además, el inhibidor específico de la

Cuadro I. Propiedades de la ODC purificada de diferentes mamíferos

Fuente	Actividad específica (mmol14CO ₂ /min/mg)	Purificación plegada	Mr (Subunidad)
Riñón de ratón	22-70	2,000-10,000	53,000
Células de ratón	-	-	51,150
Hígado de rata	19-24	350,000-710,000	50,000-55,000 (2)
Células RAW264 múrinas	35	ca. 8,000	55,000 (2)
Hígado humano	-	-	51,150

(Número de subunidades), Mr masa molecular relativa (peso molecular). Adaptado de Pegg y citado por Cohen (1998).

ODC la difluorometil ornitina (DFMO) no impidió el crecimiento del riñón y los andrógenos también tuvieron efecto sobre la ODC renal en ratones hembras (Cohen 1998f). Éstas herramientas y el desarrollo de las técnicas de biología molecular, permitieron la expresión de la proteína recombinante de ratón en *Escherichia coli* (Poulin et al. 1992) y después la determinación de la estructura de la ODC del ratón.

El control del contenido de PAS depende también de la inducción de la antizima (AZ), la cual aumenta cuando se incrementan los niveles de PAS. La AZ se une a la ODC induciendo cambios conformacionales que expone un sitio oculto en el C-terminal de uno de los dos monómeros que la hace fácil de degradarse por el proteasoma 26S. La degradación de la ODC es mediada por la unión de la antizima 1 (AZ1), que ofrece un mecanismo de regulación postraduccional activado cuando la cantidad de ODC aumenta (Murakami et al. 1992 y Murakami et al. 2000). En humano y ratón se aislaron dos elementos o sitios de unión para la AZ, conocidos como de "degradación basal" que se encuentran en el extremo C-terminal de la ODC y corresponden a los residuos 376-424 y 422-461 (Almud et al. 2000).

La AZ1 inactiva a la ODC al unirse a uno de los monómeros impidiendo la formación del homodímero activo (Feith et al. 2001), además de catalizar su degradación por el proteasoma 26S sin

ubiquitinación y dependiente de ATP (Murakami et al. 1992). La antizima 2 (AZ2) se descubrió en 1998, su gen es similar al de AZ1 y el producto resultante de su traducción tiene 189 aminoácidos y 54% de homología con la AZ1. La AZ2 de humano y de ratón difieren por un sólo aminoácido. También se ha reportado que la AZ2 tiene un patrón de expresión 16 veces menos abundante que AZ1 e inhibe a la ODC sin acelerar su degradación (Ivanov et al. 1998).

Actualmente se conocen tres tipos de AZ, distinguidas como 1, 2 y 3; las dos primeras están presentes en numerosos tejidos de mamíferos y el RNAm de la AZ2 es menos abundante que la AZ1. Por otro lado, la AZ3 está restringida a células germinales en los testículos de mamíferos (Ivanov et al. 2000).

Genética del gen *odc*

Para los años 70's, ya se habían secuenciado los genes que codifican para ODC de levaduras, tripanosoma, hámster, rata, ratón y humano. El gen de la ODC en estos organismos consiste de 12 exones y 11 intrones. En la región promotora existen sitios de unión de factores transcripcionales: una caja TATA, un elemento CRE sensible a AMPc, un sitio de unión Sp1, un sitio de unión AP-1, un elemento sensible a estrógenos, un elemento sensible a glucocorticoides y un sitio de unión al complejo del factor transcripcional

cMyc/Max (Cohen 1971). Actualmente se sabe que en *Plasmodium falciparum* AdoMetDC y ODC, se codifican en secuencia y con un mismo marco de lectura abierta. Por otro lado, si se comparan los sitios activos de la ODC de humano, ratón y tripanosoma se observan secuencias muy conservadas (Almud et al. 2000).

Con base en la clonación del cDNA del gen *odc*, fue posible describir y comparar la secuencia de aminoácidos de la proteína correspondiente en organismos representativos de la escala biológica. Se observan similitudes de más del 90% entre mamíferos, 81% con *Xenopus*, con *Trypanosoma* 69%, *Neurospora* 42% y 40% con levadura. Dada la homología de los sitios activos de la enzima, el DFMO tiene efecto sobre la ODC de diferentes organismos y aunque al principio se utilizó como un indicador de la existencia de la enzima activa (Tsirka y Coffino 1993). Pegg y McCann (1982) reportaron el mecanismo de inhibición irreversible.

En mutantes de *Echerichia coli*, se identificaron los sitios de unión para el DFMO y del PLP. El aminoácido de la ODC que sufre una modificación provocada por el DFMO se localizó, y se determinó el mecanismo de acción del PLP, donde el PLP se une a un residuo lisil y forma una base de "Schiff" con el mismo. En todos los eucariontes en que se ha estudiado, el cofactor se une al aminoácido *Lys 69* el cual se encuentra en una secuencia conservada de 7 aminoácidos -PFYAVKC- (Poulin et al. 1992). Concentraciones altas de agentes tiol-reductantes como el ditioneitol (DTT) mantienen la actividad de ODC (Pegg y Williams-Ashman 1981). La descarboxilación de la ODC por la DFMO facilitó la determinación y ubicación del aminoácido de unión del inhibidor que corresponde a Cys 360 (Poulin et al. 1992; Tsirka y Coffino 1993). Además, el trabajo de Poulin y Coffino, por medio de estudios espectrales y de estabilidad muestra que una vez que se realiza la unión covalente de la DFMO a la ODC, el PLP no se detecta en el aducto de la proteína (Poulin et al. 1992).

Por otro lado, se demostró que en sistemas in vitro, la actividad de la ODC se conserva aún después de desnaturalizarla y no requiere de agentes exógenos (Tsirka y Coffino 1993).

CONTROL DE LOS NIVELES INTRACELULARES.

Para mantener los niveles óptimos de PAS dentro de la célula existen diferentes mecanismos, además de la regulación de su metabolismo (biosíntesis y catabolismo), que permiten percatarnos de la trascendencia de estas moléculas.

Para obtener PAS, la célula puede sintetizarlas o introducirlas a través de transportadores específicos en la membrana celular. Para eliminar exceso de las mismas, puede iniciar mecanismos de interconversión y excreción (Thomas y Thomas 2003). La vía catabólica de las PAS es parte de un sistema de interconversión (Pu \leftrightarrow Spd \leftrightarrow Spm); un fenómeno general en los organismos superiores (Jeevanandam y Petersen 2001). Esta vía es una secuencia de reacciones que produce Spd y Spm a partir de Pu y que degrada a las PAS de nuevo, pero en dirección opuesta con la acetilación y oxidación de sus derivados, respectivamente. La acetilación permite reducir el número de cargas positivas de las PAS y por tanto sus interacciones con las cargas aniónicas de distintas moléculas. La excreción celular de PAS acetiladas en orina es un mecanismo que ayuda a disminuir concentraciones intracelulares ya sea por: tratamiento con análogos, estrés oxidativo u otros daños (Thomas y Thomas 2003; Zahedi et al. 2003). Ésto último es muy importante ya que así, el nivel de PAS corporales se refleja en la excreción urinaria (Jeevanandam y Petersen 2001).

A pesar de todos los conocimientos generados y aquí expuestos se puede decir que las funciones celulares de las PAS naturales aún no se conocen en su totalidad y que finalmente son imprescindibles para el crecimiento y proliferación de las células de mamíferos. Los estudios experimentales con ratas y ratones modificados

genéticamente han traído nueva información sobre la participación de las PAs en varios procesos fisiológicos y fisiopatológicos (Jänne et al. 2004) y propone un nuevo entendimiento de su participación en dichos fenómenos y donde se incluye un papel causal más que asociado en el desarrollo del cáncer (Gerner y Meyskens 2004).

Referencias bibliográficas

- Almurd, J. J., M. A. Oliveira, A.D. Kern, N. V. Grishin, M. A. Phillips y M. L. Hackert. 2000. Crystal structure of human Ornithine Decarboxylase at 2.1 Å resolution: structural insights to antizyme binding. *J. Mol. Biol.* **295**: 7–10.
- Babbar, N. y Gerner E. W. 2003. Polyamines as modifiers of genetic risk factors in human intestinal cancers. *Biochem. Soc. Trans.* **31**(2): 388–392.
- Bardócz, S., G. Grant, D. S. Brown, A. Ralph y A. Pusztai. 1993. Polyamines in food - implications for growth and health. *J. of Nutritional Biochem.* **4**: 66–71.
- Behe, M. y Felsendfeld G. 1981. Effects of methylation on a synthetic polynucleotide: the B to Z transition in poly(dG-m⁵dC) x poly(dG-m⁵dC). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 1619–1623.
- Benamouzig, R., S. Mahe, C. Luengo, J. Rautureau y D. Tome. 1995. Fasting and postprandial polyamine concentrations in the human digestive lumen. *Am. J. Clin. Nutr.* **65**: 766–770.
- Bloomfield, V. A. 1997. DNA condensation by multivalent cations. *Biopolymers* **44**: 269–282.
- Casero Jr., R. A., Y. Wang, T. M. Stewart, W. Devereux, A. Hacker, R. Smith y P.M. Woster. 2003. The role of polyamine catabolism in anti-tumour drug response. *Biochemical Society Transactions* **31**(2): 361–365.
- Cohen, S. S. 1998. *A guide to the polyamines*. Oxford University Press. pp. 94–118.
- Cohen, S. S. 1971. *Introduction to the polyamines*. Prentice-Hall, inc. Englewood Clifss, New Jersey. pp. 1–2.
- Dawson, R. M., D. C. Elliot, W. H. Elliot y K. M Jones. 1986. *Data for biological research*, 3rd edition. Oxford: Clarendon Press.
- Egli, M., L. D. Williams, Q. Gao y A. Rich. 1991. Structure of the pure-spermine form of Z-DNA (magnesium free) at 1.0 Å resolution. *Biochemistry* **30**: 11388–11402.
- Feith, D. J., L. M. Shantz y A. E. Pegg. 2001. Targeted antizyme expression in the skin of transgenic mice reduces tumor promoter induction of ornithine decarboxylase and decreases sensitivity to chemical carcinogenesis. *Cancer Research* **61**: 6071–6081.
- Feuerstein, B. G., N. Pattabiraman y L. J. Marton. 1989. Molecular dynamics of spermine-DNA interactions: sequence specificity and DNA bending for a simple ligand. *Nucleic Acids Res.* **17**: 6883–6892.
- Feuerstein, B. G., N. Pattabiraman y L. J. Marton. 1986. Spermine-DNA interactions: a theoretical study. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 5948–5952.
- Gerner, E. W. y F. L. Meyskens. 2004. Polyamines and cancer: old molecules, new understanding. *Nature Reviews* **4**: 781–792.
- Hougaard, D. M., L. Bolund, K. Fujiwara y L. I. Larsson. 1987. Endogenous polyamines are intimately associated with highly condensed chromatin in vivo. A fluorescence cytochemical and immunocytochemical study of spermine and spermidine during the cell cycle and in reactivated nuclei. *Eur. J. Cell Biol.* **44**: 151–155.
- Ivanov, I. P., R. F. Gesteland y J. F. Atkins. 1998. A second mammalian antizyme: conservation of programmed ribosomal frameshifting. *Genomics* **52**: 119–129.
- Ivanov, I. P., A. Rohrwasser, D. A. Terreros, R. F. Gesteland y J. F. Atkins. 2000. Discovery of a spermatogenesis stage-specific ornithine decarboxylase antizyme: Antizyme 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**(9): 4808–4813.
- Jänne, J., L. Alhonen, M. Pietilä y A. Keinänen. 2004. Genetic approaches to the cellular functions of polyamines in mammals. *Eur. J. Biochem.* **271**: 877–894.
- Jeevanandam, M. y Petersen S. R. 2001. Clinical role of polyamine analysis: problem and promise. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* **4**(5): 385–396.
- Jeevanandam, M., N. J. Holaday, C. K. Begay y S. R. Petersen. 1997. Nutritional efficacy of a spermidine supplemented diet. *Nutrition* **13**(9): 788–794.

- Kobayashi, M., Y. J. Xu, K. Samejima, H. Goda, M. Niitsu, M. Takahashi y Y. Hashimoto.** 2003. Fate of orally administered ¹⁵N-labeled polyamines in rats bearing solid tumors. *Biol. Pharm. Bull.* 26(3): 285-288.
- Korolev, N., A. P. Lyubarstev, L. Nordenskiöld y A. Laaksonen.** 2001. Spermine: an "invisible" component in the crystals of B-DNA. A grand canonical Monte Carlo and molecular dynamics simulation study. *J. Mol. Biol.* 308: 907-917.
- Korolev, N., A. P. Lyubarstev, A. Laaksonen y L. Nordenskiöld.** 14 may 2004. A molecular dynamics simulation study of polyamine-and-sodium-DNA. Interplay between polyamine binding and DNA structure. *Euro. Biophys. J. with Biophys. Letters*. Publicado en línea: 10.1007/s00249-004-0410-7.
- Korolev, N., A. P. Lyubarstev, A. Laaksonen y L. Nordenskiöld.** 2002. On the competition between water, sodium ions, and spermine in binding to DNA. A molecular dynamics computer simulation study. *Biophys J.* 82: 2860-2875.
- Milovic, V.** 2001. Polyamines in the gut lumen: bioavailability and biodistribution. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 13: 1021-1025.
- Murakami, Y., S. Matsufuji, S. Hayashi, N. Tanahashi y K. Tanaka.** 2000. Degradation of Ornithine decarboxylase by the 26S proteasome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 267: 1-6.
- Murakami, Y., S. Matsufuji, T. Kameji, S. Hayashi, K. Igarashi, T. Tamura, K. Tanaka y A. Ichihara.** 1992. Ornithine decarboxylase is degraded by the 26S proteasome without ubiquitination. *Nature* 360: 597-599.
- Nishioka, K.** 1996. Circulating polyamines as biological markers for cancer. En: *Polyamines in cancer: basic mechanisms and clinical approaches*. Pp. 233-245. Editorial Chapman & Hall.
- Pegg, A. E.** 1988. Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth and as a target for chemotherapy. *Cancer Research* 48: 759-774.
- Pegg, A. E. y P. P. McCann.** 1982. Polyamine metabolism and function. *Am J. Physiol.* 243: 212-221.
- Pegg, A. E., D. J. Feith, L. Y. Y. Fong, C. S. Coleman, T. G. O'Brien y L. M. Shantz.** 2003. Transgenic mouse models for studies of the role of polyamines in normal, hypertrophic and neoplastic growth. *Biochemical Society Transactions* 31(2): 356-360.
- Pegg, A. E. y Williams-Ashman, H. G.** 1981. en *Polyamines in biology and medicine* (Morris, D. R. y Marton, L. J., Editores). Pp. 3-42, Marcel Dekker, Nueva York.
- Pegg, H. F. y Jackson V.** 2000. In vitro studies on the maintenance of transcription-induced stress by histones and polyamines. *J. Biol. Chem.* 275: 657-668.
- Poulin, R., L. Lu, B. Ackermann, P. Bey y A. E. Pegg.** 1992. Mechanism of the irreversible inactivation of mouse ornithine decarboxylase by a-difluoromethylornithine. *J. Biol. Chem.* 267: 150-158.
- Pryme, I. F. y Bardócz S.** 2001. Anti-cancer therapy: diversion of polyamines in the gut. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 13: 1041-1046.
- Sauve, D. M., H. J. Anderson, J. M. Ray, W. M. James y M. Roberge.** 1999. Phosphorylation-induced rearrangement of the histone H3 NH₂ terminal domain during mitotic chromosome condensation. *J. Cell Biol.* 145: 225-235.
- Schröder, F. C., J.J. Farmer, A.B. Attygalle, S. R. Smedley, T. Eisner y J. Meinwald.** 1998. Combinatorial chemistry in insects: a library of defensive macrocyclic polyamines. *Science* 281: 228-231.
- Stryer, L.** 1981. *Biochemistry*, Segunda Edición. Editorial Freeman. Pp. 622-624.
- Tabor, H.** 1962. The protective effect of spermidine and other polyamines against heat denaturation of deoxyribonucleic acid. *Biochemistry* 1: 496-501.
- Thomas, T. J. y Messner R. P.** 1988. Structural specificity of polyamines in left handed Z-DNA formation. Immunological and spectroscopic studies. *J. Mol. Biol.* 201: 463-467.
- Thomas, T. J. y V. A. Bloomfield.** 1984. Ionic and structural effects on the thermal helix-coil transition of DNA complexed with natural and synthetic polyamines. *Biopolymers* 23: 1295-1306.
- Thomas, T. y T. J. Thomas.** 2003. Polyamine metabolism and cancer. *J. Cell. Mol. Med.* 7(2): 113-126.
- Thomas, T. y T. J. Thomas.** 2001. Polyamines in cell growth and cell death: mechanisms and therapeutic applications. *Cell Mol. Life Sci.* 58: 244-258.
- Tsirka, S. y P. Coffino.** 1993. Dominant negative mutants of Ornithine

- Decarboxilase. *The Journal of Biological Chemistry* **267**(32): 23057–23062.
- Uda, K., T. Tsujikawa, Y. Fujiyama y T. Bamba.** 2003. Rapid absorption of luminal polyamines in rat small intestine ex vivo model. *Journal of Gastroenterology & Hepatology* **18**: 554–559.
- Urdiales, J. L., M. A. Medina. y L. Sánchez-Jiménez.** 2001. Polyamines metabolism revisited. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* **13**: 1015–1019.
- Wallace, H. y R. Caslake.** 2001. Polyamines and colon cancer. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* **13**: 1033–1039.
- Wallace, H. M.** 2003. Polyamines and their role in human diseases an introduction. *Biochemical Society* 354–355.
- Wang, Y., W. Devereux., P. M. Woster, T. M. Stewart, A. Hacker y R. A. Casero.** 2001. Cloning and characterization of a human polyamine oxidase that is inducible by polyamine analogue exposure. *Cancer Res.* **61**: 5370–5373.
- Zahedi, K., Z. Wang, S. Barone, A. E. Prada, C. N. Kelly, R. A. Casero, N. Yokota, C. W. Porter, H. Rabb y M. Soleimani.** 2003. Expression of SSAT, a novel biomarker of tubular cell damage, increase in kidney ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Physiol. (Renal. Physiol.)* **284**: F1046–1055.

Recibido el 27 de mayo de 2005
Aceptado el 22 de septiembre de 2005

Hábitos de estudio en alumnos con problemas de reprobación en el Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara

Ma. de Jesús Rimoldi Rentería¹, Ricardo Ulloa Azpeitia² y Miguel Carbajal Soria¹

¹Departamento de Ciencias Ambientales, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Guadalajara.

²Maestría en Enseñanza de las Matemáticas, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingeniería. Universidad de Guadalajara.

Correo electrónico: rrm15514@ cucba.udg.mx, rulloa @ccip.udg.mx, csm01047@ cucba.udg.mx

Resumen: El fracaso escolar es un problema presente en los diversos niveles educativos, incluye la reprobación entre otros. La Universidad de Guadalajara y específicamente el Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA), no escapa a esta situación. Este trabajo busca incidir en el problema a través de la identificación de los hábitos de estudio en alumnos con problemas de reprobación. Se identificaron dos muestras de estudiantes para un estudio cuasi-experimental. Un grupo con problemas de reprobación y otra sin ellos y con un buen desempeño académico, se diseñó e implementó un cuestionario. Se encontró que tanto uno como otro grupo presentaron una pobre utilización de estrategias de estudio, sin embargo se encontró una mayor eficiencia en las habilidades desarrolladas por los estudiantes de buen rendimiento. Los resultados evidencian que los estudiantes de buen desempeño exhibieron un mejor control cognitivo en a) procesamiento de textos y b) el tiempo real asignado al estudio. Se encontró en este último grupo una motivación mayor en comparación con el grupo de bajo rendimiento. El grupo de bajo desempeño atribuye sus resultados a factores como la falta de concentración entre otros.

Abstract: Academic deficiency is a current problem at a wide variety of academic levels. This, in part, is reflected in the number of failures. In the Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, this is a common problem. Via a quasi-experimental study, two groups of students were selected. One group was characterized by a high rate of failure, while the other group included students with good levels of academic performance and no problems of failure. A questionnaire was designed and distributed. Our results showed that students in both groups had poor study habits. However, there was evidence of a higher level of efficiency in skills developed by the students with good grades. Results indicated that the students with better grades exhibited better concentration in analysis of texts and designated more time to study and were more motivated in their studies. The lower performance group attributed its performance to factors such as lack of concentration, among others.

Introducción

No obstante el conocimiento de la de reprobación, existe un vacío de información fiable y específico de cada contexto educativo, por lo que ha de abordarse el problema desde el contexto que lo produce, (Carbajosa 1988). Debido al carácter acumulativo del fracaso escolar, conforme

los estudiantes avanzan es mayor su magnitud, destacando en ellos dificultades para entender, interpretar y aplicar los conocimientos (Molina 1997).

Diversos autores aluden a deficiencias encontradas en los hábitos de estudio de los alumnos, como una de las

causas en el abandono escolar y reprobación entre otros problemas, ocasionados por hábitos de estudio deficientes. (Archete 1999); (Bandiera et al. 1995).

El objetivo del presente trabajo fue el de identificar los hábitos de estudio en alumnos con problemas de reprobación y en estudiantes que no presentan esta situación en el CUCBA. Y se planteó como hipótesis, que el problema de reprobación en el CUCBA se encuentra estrechamente relacionado con los hábitos de estudio.

Materiales y métodos

El presente trabajo se llevó a cabo con alumnos de las tres divisiones (Biología, Agronomía y Veterinaria) del CUCBA, de los cuales fueron elegidos dos grupos, uno con promedio igual o mayor a 85 puntos sobre 100¹ (buen rendimiento) y otro de estudiantes con promedio igual o menor a 84 puntos sobre 100 (bajo rendimiento). En los dos casos se consideró que hubiesen cursado cuando menos 150 créditos.

Las muestras fueron integradas por 30 estudiantes en cada grupo, para la identificación de los hábitos de estudio se elaboró un instrumento el cual fue validado a través de un estudio clínico con alumnos del centro universitario, así como con la revisión del mismo por maestros especialistas en investigación educativa. Dicho instrumento quedó integrado por 33 reactivos, mismos que fueron distribuidos en las siguientes áreas: administración del tiempo, concentración, habilidades para la lectura y procesamiento de textos y logro y atribuciones.

El método que se utilizó fue un diseño cuasi-experimental. La diferencia más importante entre los diseños experimentales y los cuasi-experimentales reside en que en el segundo caso se estudian grupos específicos, es decir no han sido

seleccionados al azar. Mantienen un control parcial aceptable (Collado y Lucio 1998).

Resultados y discusión

De los datos obtenidos destacan los referentes a la elaboración de resúmenes, estrategia considerada como evaluativa, ya que se requiere abstraer la macro estructura del texto presentando la información como un nuevo texto coherente.

Aún cuando en los dos grupos es esta una actividad desarrollada con la misma frecuencia, la diferencia la hace la calidad de los resúmenes, ya que partir de estos, según los resultados obtenidos, los alumnos retienen las ideas principales. Por lo anterior resulta imprescindible la claridad de los mismos, elemento que en 12 (40.00%) de los alumnos de bajo rendimiento no está presente, mientras que en los alumnos de buen rendimiento solo en 2 (6.67%) mencionaron no poseer esta característica.

La planeación de actividades tiene que ver con el establecimiento del propósito de la lectura y con la manera de enfrentar el proceso de comprensión; es una actividad fundamental ya que determina el abordaje del texto y la regulación y evaluación del proceso.

El establecimiento de un plan es una carencia evidente en alumnos de bajo rendimiento, ya que solo 5 (16.67%) lo realiza, El monitoreo de las actividades es decisivo en el proceso de aprendizaje y está presente en función de los objetivos de la lectura, comparativamente un 25% menos, en el caso de bajo rendimiento, realiza esta actividad.

Uno de los factores relevantes para predecir los resultados de rendimiento escolar, son los sentimientos académicos de competencia; se observó que 13 (43.33%) y 6 (20.00%) de los alumnos de bajo rendimiento atribuyeron sus resultados

¹ Se consideraron 85 puntos sobre 100 debido a que a partir de este promedio disminuía significativamente la frecuencia en la reprobación.

académicos a una “falta de concentración” y “falta de claridad” respectivamente. En cambio, las atribuciones en los resultados académicos de los alumnos de buen rendimiento fueron 17 (56.67%), a “su manera de estudiar funciona” y 7 (23.33%) lo atribuyó a “una pobre investigación”.

Conclusiones

En general existe una pobre utilización de estrategias de estudio, en los dos grupos estudiados. Se encontraron diferencias en las habilidades de estudio para la elaboración de resúmenes, dentro del procesamiento de textos, ya que el bagaje conceptual es mayor en alumnos de buen rendimiento, así como por poseer el elemento básico de claridad en los resúmenes elaborados, lo cual influye decisivamente en su eficiencia ante la lectura. La eficiencia es mayor en el grupo de alumnos de alto rendimiento en áreas de la “elaboración de un plan y monitoreo de actividades”, ello repercute en el rendimiento como actividades que guían el proceso.

“El tiempo real de estudio” y “concentración”, fueron elementos diferen-

ciales en los dos grupos: los alumnos de bajo rendimiento dedican menor tiempo y la concentración es menor en estos alumnos, lo cual influye decisivamente en los resultados obtenidos.

La estima de los alumnos de bajo rendimiento es baja, ello por las atribuciones que este grupo hace de sus resultados.

Bibliografía

- Arteche, M.** 1999. 6 sep.1999. *La mejor receta para crear hábitos de estudio*. <http://www.../06.18.3a.CRO.LOMEJOR.html> (2 sep.2001)
- Bandiera, M., Dupré, F., Lanniello, M.G. y Vicentini, M.** 1995. Una investigación sobre habilidades para el aprendizaje científico. *Revista Enseñanza de las Ciencia* **13**: 46-54.
- Carbajosa, D.** 1988. El fracaso escolar. Una perspectiva de análisis del fracaso escolar. *Cuadernos del CESU* **11**: 33-42.
- Molina, G. S.** 1997. *El fracaso en el aprendizaje escolar*. España: Aljibe. Pp. 51-73
- Sampieri, H.R., Collado, F.C. y Lucio, B. P.** 2000. *Metodología de la investigación*. México: Mc Graw Hill. Pp. 163-169.

Recibido el 19 de enero de 2005

Aceptado el 30 de agosto de 2005

Aislamiento e identificación de *Rhizobium* en *Lupinus* silvestres por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Mariana Martínez Pelayo¹, Hugo Castañeda Vázquez, Juan Manuel Moreno Martínez¹, Mario Ruiz López² y Carlos Álvarez Moya³

¹División de Ciencias Veterinarias, Departamento de Medicina Veterinaria y Unidad de Morfología de alta resolución; ²Departamento de Botánica y Zoología; ³Depto de Biología Celular y Molecular. CUCBA Km. 15.5 Carr. Guadalajara-Nogales, Las Agujas, Zapopan, Jal. C.P. 45110 Tel y Fax: 3682-05 74

Resumen: El género *Rhizobium* tiene la capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico, infectando principalmente a las leguminosas. Sin embargo, no es el único que tiene esa capacidad, también están *Bradirhizobium*, *Sinorhizobium*, *Arzhorhizobium* y otros. Con el fin de identificar las diferentes especies bacterianas existen técnicas bioquímicas, pero no son muy confiables. Con el desarrollo de la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), se ha logrado identificar de forma rápida y eficaz las especies, géneros y familias de bacterias, amplificando el gen de 16S ARNr. En esta investigación se amplificó el gen de 16S ARNr, de 28 cepas de *Rhizobium*, aisladas de cuatro especies de *Lupinus* silvestres (*L. montanus* Kunth, *L. rotundiflorus* M. E. Jones, *L. reflexus* Rose y *L. stipulatus* J. Agardh) colectadas en diferentes localidades del estado de Jalisco. Una vez aisladas e identificadas bioquímicamente, se realizó la extracción del ADN, enseguida la PCR y el corrimiento electroforético en gel de agarosa, resultando en bandas de 308 pb (gen 16S ARNr). Se concluye que las bacterias pertenecen al género *Rhizobium* y que este desempeña un papel importante en la nodulación y fijación del nitrógeno por los *Lupinus* silvestres en Jalisco.

Palabras clave: *Lupinus*, *Rhizobium*, PCR, fijación de Nitrogeno.

Abstract: *Rhizobium* infects mainly legumes and has the capacity to fix atmospheric nitrogen. Nevertheless, it is not the only bacterial genus that has this capacity: some others are *Bradirhizobium*, *Sinorhizobium*, *Arzhorhizobium*, and others. The biochemical techniques employed to identify the different bacterial species are not very reliable. With the development of the PCR techniques (Polymerase Chain Reaction) rapid and effective identification of species, genera and families of bacteria, are possible through the amplification of the 16S RNAr gene. In this study 28 strains of *Rhizobium* bacteria were isolated and observed from four wild *Lupinus* species (*L. montanus* Kunth, *L. rotundiflorus* M. E. Jones, *L. reflexus* Rose and *L. stipulatus* J. Agardh) collected in several localities in the state of Jalisco. Once isolated and identified biochemically an extraction of DNA was carried out for each of the bacterial strains in order to search for the 16S RNAr gene. Once the PCR and the electrophoresis in agarose gel were performed, bands of 308 pb (gene 16S ARNr) were evident. Consequently, we conclude consequently that all the strains belonged to the genus *Rhizobium* and it plays an important role in the nodulation and nitrogen fixation of these wild *Lupinus* in Jalisco.

Key Words: *Lupinus*, *Rhizobium*, PCR., Nitrogen fixation.

Introducción

Dentro de los macronutrientes para las plantas, el nitrógeno es de especial importancia. En términos de cantidades de masa, es el cuarto de los bioelementos, después de carbono (C), oxígeno (O) e hidrógeno (H). De poder fijar nitrógeno, el hombre no necesitaría ingerir proteínas (Martínez-Romero y cols. 1998). Existe una relación estrecha entre el suministro de nitrógeno y el aumento de la biomasa (Larcher 1995). La fijación del nitrógeno es un proceso altamente demandante de energía, con un consumo de al menos 16 mol de ATP por cada mol de N_2 fijado. En leguminosas, el problema de la gran demanda de O_2 para fijar N_2 , se resuelve por tres mecanismos: una gran cantidad de proteína atrapadora de O_2 «leghemoglobina» para facilitar el flujo de O_2 a la bacteria simbiótica mientras se mantiene una concentración de O_2 extremadamente baja y no tóxica; un alto consumo de O_2 respiratorio; y por último, una barrera de difusión variable que controla la entrada de O_2 a la parte central donde está la infección de dicha bacteria (Dalton y cols. 1998).

De todos los seres vivos, sólo un centenar de géneros de bacterias están capacitados para fijar nitrógeno del aire. Se estima que los rizobios llevan a cabo la fijación del 50 al 70% del nitrógeno. Entre las especies que lo fijan hay cianobacterias (por ejemplo; *Anabaena* y *Nostoc*), arqueobacterias (*Methanococcus*), bacterias grampositivas (*Frankia* y *Clostridium*), enterobacterias (*Klebsiella*) y otras proteobacterias (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azospirillum* y *Acetobacter*, entre otras) (Martínez y cols. 1998). En apariencia, existe una gran diversidad de bacterias capaces de nodular leguminosas además de las que se han reconocido con anterioridad (Fenton 1994). Las bacterias del género *Rhizobium* (familia Rhizobiaceae), son un grupo de microorganismos genéticamente diversos y heterogéneos desde el punto de vista fisiológico, que están en una misma clasificación en virtud de su capacidad para

nodular plantas de la familia Leguminosae (Dalton y cols. 1998). La interacción simbiótica entre las plantas leguminosas y los rizobios resulta en el desarrollo de un nuevo órgano en las raíces: 'el nódulo', en el que estos organismos proveen nitrógeno fijado al hospedero a cambio de carbono y protección. Para establecer esta relación mutualista, la planta hospedera y los rizobios deben intercambiar continuamente señales moleculares (Dalton y cols. 1998; Martínez-Romero y cols. 1998). En general, la familia de estas bacterias se divide en dos grupos, de acuerdo con sus características de crecimiento. En uno se ubican las bacteria que tienen crecimiento rápido. En el segundo las de crecimiento lento (Ferrera-Cerrato y cols. 1993). Su clasificación también se basa con la afinidad del hospedero (Jordan 1984). En la actualidad las relaciones filogenéticas se pueden determinar de manera más fácil y con mayor detalle y profundidad (Barrera-Necha 1996). Los marcadores moleculares y bioquímicos se utilizan como herramienta para evaluar la validez de la clasificación taxonómica en muchos organismos (Menkir y cols. 1997). Se ha demostrado que es preferible identificar especies de *Rhizobium* utilizando el gen 16S de ARNr (Fenton 1994). Con pocas excepciones los genes de ARNr son similares en longitud en el reino bacteriano, y contiene regiones bastante conservadas, así como regiones que varían de acuerdo a las especies y las familias (Zhang y cols. 2001). Las especies del género *Rhizobium* tienen una enorme variación fenotípica, las técnicas de identificación bioquímica e inmunológica son lentas y en ocasiones variables, además de su baja confiabilidad. Por otro lado, los métodos que utiliza el análisis genómico son rápidos y más confiables que aquellos que se basan en las características fenotípicas. Entre estos, se ha utilizado la amplificación de una región del gen 16S ARNr, el cual es una herramienta diagnóstica muy confiable para la identificación de bacterias. La estructura primaria del ARNr incluye secuencias

variables y secuencias conservadas, características de diferentes grupos taxonómicos, confiables incluso hasta la categoría específica de bacterias (Aguilar y cols. 2001; Chen y cols. 2000; Corich y cols. 2001; Gao y cols. 2001; Khbaya y cols. 1998; Laguere y cols. 1994; Menkir y cols. 1997; Volpin y Phillips 1998; Wang y Martínez-Romero 1998; Zhang y cols. 2001).

La asociación planta-*Rhizobium* implica fenómenos bioquímicos y de reconocimiento altamente específicos, junto con una expresión génica y una diferenciación celular coordinada de ambos simbiontes (Barrera-Necha 1996). Por tanto, es importante investigar la diversidad genética y la efectividad simbiótica de poblaciones indígenas de rizobios, para comprender mejor la respuesta de inoculación (Chen y cols. 2000).

En México, las especies del género *Lupinus* crecen de manera silvestre en muchos estados y al igual que la mayoría de las otras leguminosas forman nódulos en sus raíces, donde se lleva a cabo la fijación biológica del nitrógeno por la asociación simbiótica que surge entre estas plantas y las bacterias del género *Rhizobium*, donde ambas se ven beneficiadas (Barrera-Necha, 1996). La región occidente de la república alberga numerosas especies de *Lupinus silvestres* que varía, de acuerdo a la opinión de los estudiosos de ese género, entre 15 a 20 (McVaugh 1987).

Se conocen rizobios que nodulan otras especies de leguminosas y en otros países. Por ejemplo, se encontraron rizobios del género *Bradyrhizobium* que nodulan leguminosas silvestres en el Mediterráneo y encontraron variabilidad entre ellos en el gen 16S ARNr (Quatrini y cols. 2002) En Argentina, Aguilar y cols. (2001), analizaron nódulos de *Phaseolus vulgaris* y compararon también el gen 16S ARNr, y descubrieron que la especie *Rhizobium etli* es predominante en sus muestras, aunque también se encontró gran variabilidad dentro de la especie. Por su parte, Gao y cols. (2001), realizaron un

estudio en China en el que amplificaron los genes 16S y 23S de ADNr y encontraron que los géneros *Agrobacterium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium*, nodulan a *Astragalus adsurgens* Pall.

En la variante *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, se han hecho numerosos estudios a causa de su amplia distribución tanto geográfica como de hospedero. En Alemania, Zhang y cols. (2001), encontraron esa cepa nodulando a *Vicia hirsuta* y *Pisum sativum*, extraídas de suelos que habían sido restaurados con alfalfa; las cepas fueron tipificadas utilizando los genes 16S y 23S de ADNr. Por otro lado, en Italia también se encontró gran permanencia de esta cepa del género *Rhizobium* nodulando plantas de chícharo (Corich y cols. 2001).

En Paraguay, Chen y cols. (2000), encontraron especies de *Rhizobium* en soya y los tipificaron por medio del gen 16S de ARNr. Por su parte, Khbaya y su equipo, aislaron 10 cepas de *Rhizobium* de cuatro especies de *Acacia* en diferentes lugares de Marruecos, utilizando el mismo gen (Khbaya y cols. 1998).

En México, específicamente en Cuernavaca, se aislaron cepas de los géneros de *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium* de *Sesbania herbacea* y de suelos inundados; y se identificaron por medio del gen 16S de ARNr (Wang y Martínez-Romero 2000).

Varios autores reportaron que en plantas que se consideraban infectadas por cepas de crecimiento lento, encontraron que también lo estaban por bacterias de crecimiento rápido, como en la soya (*Glycine max.*) (Scholla y Elkan, 1984, Keyser y cols. 1982; Broughton y cols. 1984), loto (*Lotus peduncularis*) (Cooper 1982), lupino (*Lupinus densiflorus*) (Jordan, 1984).

Asimismo, Schilnkert-Miller y Pepper (1988), encontraron que *Lupinus* de Baja California eran infectados por cepas bacterianas de crecimiento rápido, aunque su estudio fue exclusivamente fisiológico y bioquímico.

La producción de inoculantes para leguminosas es un proceso establecido en diferentes partes del mundo. Debido a su aplicación en el campo, conduce a una asociación simbiótica que tiene la capacidad de sustituir de manera parcial la fertilización nitrogenada y aumentar la producción de algunos cultivos de leguminosas. (Ferrera-Cerrato y cols. 1993).

Los microorganismos presentan diferentes actividades fisiológicas, que han permitido a los investigadores su clasificación. Para ello, se han desarrollado sistemas que se basan en la actividad fisiológica que una cepa de bacterias tiene en ciertos tipos de medios. En general, las características elegidas deberían ser fáciles de determinar. Aunque estos esquemas de identificación son confiables ya que se han desarrollado con especies de bacterias ya identificadas, las pruebas que se utilizan para cada tipo de bacterias, pueden variar en su resultado dependiendo del tamaño del inóculo, la temperatura de incubación, el tiempo de incubación, etcétera. Aunque estas pruebas son muy efectivas, pueden llegar a aportar falsos positivos o falsos negativos por los factores mencionados (Kendrew 1994).

Las pruebas que se aplican a *Rhizobium* consisten en observar la morfología macroscópica, así como la prueba con tinción de Gram. Su velocidad de crecimiento, es decir, si crece dentro de tres a cuatro días o de siete o más. Si producen ácido o álcali en medio extracto de levadura manitol agar azul de bromotimol (ELMABT), crecimiento en leche tornasolada, su motilidad en medio MIO y su reactividad con reactivos Byla y Benedict (Ferrera-Cerrato y cols. 1993). Los resultados esperados de estas pruebas se describen en el cuadro 1.

En el presente trabajo se planteó que la amplificación del gen 16S ARNr por PCR permitirá la identificación del género *Rhizobium* de *Lupinus* del estado de Jalisco. Teniendo como objetivo general la identificación bioquímica y molecular de

Cuadro 1. Características bioquímicas y morfológicas de las cepas del género *Rhizobium*.

Prueba bioquímica	Resultado
Tinción de Gram	Negativo
Crecimiento	Rápido
Producción de ácido o álcali	Viraje amarillo (acidez)
Leche Tornasolada	Sin crecimiento y producción superficial de suero
Motilidad	Positiva
Reactivos de Bylay Benedict	Negativo

cepas de *Rhizobium* aisladas a partir de lupinos silvestres (*Lupinus montanus*, *Lupinus stipulatus*, *Lupinus reflexus* y *Lupinus rotundiflorus*). De donde se desprenden los siguientes objetivos particulares: aislar las cepas de *Rhizobium* de *Lupinus* silvestres; identificar por pruebas bioquímicas las cepas de *Rhizobium*; identificar las cepas de *Rhizobium* por amplificación del gen ribosomal 16S ARN mediante la técnica de PCR y comparar los resultados obtenidos con las técnicas aplicadas.

Materiales y métodos

Para este estudio se realizaron varias expediciones a las regiones siguientes: Zona Norte (Mezquitic, Los Amoles, Sierra de Bolaños y Monte Escobedo, así como la Sierra de San Juan Capistrano) Sur de Jalisco (Cercanías de Zapotlán el Grande, antes Ciudad Guzmán), faldas del Volcán de Colima y Sierra de Tapalpa.

Las especies de *Lupinus* que se recolectaron fueron: *L. montanus*, *L. stipulatus*, *L. reflexus* y *L. rotundiflorus*. Las especies se identificaron mediante la monografía de McVaugh (1987), y con posterioridad verificada por un especialista.

PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA, TINCIÓN Y AISLAMIENTO

Las pruebas realizaron a los nódulos aislados fueron; observar la morfología macroscópica, así como la prueba de

tinción de Gram. Su velocidad de crecimiento, es decir, si crece dentro de tres a cuatro días, siete días o más. Si producían ácido o álcali en medio extracto de levadura manitol agar azul de bromotimol (ELMABT), crecimiento en leche tornasolada, su motilidad en medio MIO y su reactividad con reactivos Byla y Benedict.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó para amplificar una región conservada del gen 16S ARNr de *Rhizobium*. Los iniciadores utilizados amplifican un fragmento de 308 pb, que corresponden a las posiciones 20 a 43 del gen 16S ARNr de *Escherichia coli*, y corresponden a las posiciones 361-338 también de *E. coli*. La secuencia de ambos iniciadores se muestra a continuación en la cuadro 2 (Barrera-Necha 1996).

El PCR fue realizado en un volumen de 50 µg de ADN conteniendo de 0.5 a 1 µl de ADN con una concentración de 50 ng/ml en densidad, 1.5 µM de MgCl₂, 50 mM de KCl, 20 mM de cada uno de los desoxirribonucleotidos trifosfatos, 1.25 U de Taq DNA polimerasa, 0.5 uM de cada uno de los iniciadores.

El PCR fue realizado con una desnaturalización inicial de 4 minutos a 94 °C, seguido por 30 ciclos que constan de 1 minuto a 94 °C, 2 minutos a 65 °C, 2.5 minutos a 72 °C y una extensión final de 7 minutos a 72 °C.

Posteriormente al PCR se tomó una alícuota de 5 µl para visualizar los productos de amplificación, esto se hizo en la siguiente forma.

En un gel de agarosa al 2% en amortiguador TBE 1 X. Se prepararon las

muestras para cargar 6 µl por pozo (5 µl del amplificado y 1 µl de Buffer de carga). Colocando en el primer carril el marcador de peso molecular que tenía pesos desde 100 hasta 1000 pb, el cual sirvió de referencia para visualizar los productos de amplificación de 308 pb, para enseguida se realizar la electroforesis.

Posteriormente, se realizó una tinción del gel en una solución de Bromuro de etidio. Con el objetivo de verificar la capacidad de infección de las cepas utilizadas se seleccionaron al azar 2 cepas de *Rhizobium* para preparar inóculo por el método descrito por Ferrera-Cerrato y col. (1993).

Resultados y discusión

De las cuatro especies de *Lupinus* se aislaron 28 cepas de *Rhizobium* que resultaron 100% positivas en la prueba de velocidad de crecimiento, que nos ayudó a establecer que las cepas con las que trabajamos eran *Rhizobium* y no *Bradirrhizobium* (Schlinkert-Miller y Pepper 1998; Ferrera-Cerrato y col. 1993). En la prueba de tinción de Gram y actividad ante los reactivos de Byla y Benedict también el 100% de las cepas dieron el resultado esperado, negativo para ambas pruebas. En el caso de la producción de ácido en medio ELMABT y la motilidad en medio MIO sólo el 78.57% dieron este resultado. En el caso de la prueba de la leche tornasolada el 87.57% fueron negativos. Estos resultado arrojaron dudas en la identificación precisa de la bacteria (Kendrew, 1994). En el caso del PCR el resultado fue el 100% de bacterias positivas a *Rhizobium*, lo que nos indica que esta

Cuadro 2. Secuencia de iniciadores utilizados para amplificar el gen 16S ARNr de *Rhizobium*

Nombre	Secuencia	Número de b
Primer Y1	5'-TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC-3'	(24b)
Primer Y2	5'-CCCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'	(24b)

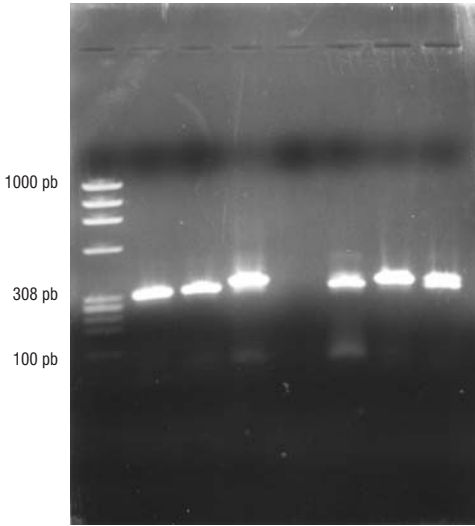


Figura 1.- Electroforesis en gel de agarosa de *Rhizobium* aislado de Lupinos. Carril 1 marcador de peso molecular; carril 5 testigo, agua destilada; en los demás carriles gen 16 S ARNr.

prueba es rápida, sencilla y eficaz. Además se pudo ver que tanto las pruebas bioquímicas y el PCR se complementan en la identificación bacteriana (Dickinson y col. 1995). También se pudo observar que el gen ARN ribosomal 16S es de fácil aplicación por estar conservado y da lugar a una fácil diferenciación de bacterias. Tomando en cuenta que en el 100% de las plantas muestreadas se observó la presencia de *Rhizobium* se puede decir que este género está ampliamente difundido en el estado de Jalisco, al contrario que en el estado de Morelos (Wang y Martínez-Romero 2000; Barrera-Necha 1996).

Conclusiones

Del presente trabajo se concluye lo siguiente, las cepas estudiadas coincidieron con lo esperado en el caso del método de pruebas bioquímicas, demostrando pertenecer al género *Rhizobium*. En la prueba de velocidad de crecimiento, las cepas resultaron tener crecimiento rápido

probando ser *Rhizobium*. Los resultados de algunas pruebas bioquímicas arrojaron dudas para asegurar que todas las cepas pertenecieron al género *Rhizobium*. El total de las cepas aisladas de las cuatro especies de *Lupinus* estudiadas resultaron positivas a la prueba de PCR amplificando el gen 16S de ARNr. La utilización de la técnica de PCR confirmó que el total de las cepas estudiadas pertenecieron al género *Rhizobium*. De acuerdo con lo observado en este trabajo, se reafirma que el PCR es una herramienta sensible, específica y rápida que permite la identificación de géneros bacterianos. La técnica de PCR resulta más efectiva sobre las prueba bioquímicas ya que presenta pocas dudas en los resultados, a diferencia de las prueba bioquímicas. Las cepas en estudio de *Lupinus* tienen una relación muy estrecha con el género de bacterias fijadoras de nitrógeno *Rhizobium*.

Bibliografía

- Aguilar, O. M., Lopez, M.V, Riccillo, P. M.** 2001. The diversity of rhizobia nodulating beans in Northwest Argentina as a source of more efficient inoculant strains. *J Biotechnology* **91** (2-3): 181-188.
- Barrera-Necha, Laura Leticia.** 1996. *Diversidad genética de las cepas mexicanas de Bradyrhizobium symbiontes de Lupinus sp.* Instituto Politécnico Nacional. México.
- Broughton W.J., Keycke, N; Heiner-Meyer Z. A. y Pankhurst C. E.** (1984). Plasmid linked nif and nod genes in fast growing rhizobia that nodulate *Glicine max., Psophocarpus tetragonolobus* and *Vigna unguiculata*. **Proceedings of the National Academy of Science** **81**: 3093-3097.
- Chen L. S; Figueredo A; Pedrosa F. O; Hungria M.** 2000. Genetic characterization of soybean rhizobia in Paraguay. *Applied and Environmental Microbiology* **6**(1): 5099-5103.
- Corich V; Giacomini A; Carlot M; Simon R; Tichy H.V; Squartini A; Nuti M.P.** (2001). Comparative strain typing of *Rhizobium leguminosarum* by viciae natural populations. *Can. J. Microbiol.* **47**(6): 580-584.

- Dalton D.A; Joyner S. L; Becana M; Iturbide-Ormaetxe I; Chatfield J.M.** 1998. Antioxidant defenses in the peripheral cell layers of legume root nodules. *Plant Physiology* **116**: 37-43.
- Dickinson J.H.; Kroll R. G; Grant K. A.** 1995. The direct application of the polymerase chain reaction to DNA extracted from foods. *Letters in Applied Microbiology* **20**: 212-216.
- Fenton, M.** 1994. En: <http://gallfrey.taranaki.ac.nz/~mfenton/BIOLOGY/rhiz1994.htm>
- Ferrera-Cerrato R; González-Chavez M.C. A; Rodríguez-Mendoza Ma N.** 1993. *Manual de Agromicrobiología*. Primera Edición. Ed. Trillas. México.
- Gao J; Terefework Z; Chen W; Lindstrom K.** 2001. Genetic diversity of rhizobia isolated from *Astragalus adsurens* growing in different geographical regions of China. *J Biotechnology* **91**(2-3): 155-168.
- Jordan D. C.** 1984. *Berey's Manual of Determinative Bacteriology* (N. R. Krieg. ED) vol 1. Williams & Wilkins, Baltimore. Pp. 234-244.
- Kendrew J.** 1994. *The encyclopedia of molecular biology*. Primera edición. Ed. Blackwell Science Ltd. Oxford.
- Keyser H. H; Bohloot B. B; Hu T. S; Weber D. F.** 1982. Nodulatin efficiency of legume inoculation as determined by intrinsic antibiotic resistance. *Applied and Environmental Microbiology* **43**: 636-642.
- Khbaya B; Neyra M; Normad P; Zerhari K; Filali-Maltouf A.** 1998. Genetic diversity and phylogeny of rhizobia that nodulate *Acacia* spp. in Morocco assessed by analysis of rRNA genes. *Applied Environmental Microbiology* **64** (12): 351-357.
- Laguerre G; Allard M; Revoy F; Amarger N.** 1994. Rapid identification of Rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S RNAr genes. *Applied and Environmental Microbiology* **60**(1): 56-63.
- Larcher W.** 1995. *Physiological Plant Ecology*. Tercera Edición. Ed. Springer-Verlag. Berlin.
- Martínez-Romero E; Palacios R; Mora J.** 1998. Cepas mejoradoras de *Rhizobium*. *Investigación y Ciencia* **265**: 14-19; España.
- McVaugh, R.** 1987 *Flora Novo-Galiciana: A Descriptive Account of the Vascular Plants of Western Mexico*. Vol. 5: Leguminosae. Ed. The University of Michigan Press. Michigan.
- Menkir A; Goldsbrough P; Ejeta G.** 1997. RAPD based assessment of genetic diversity in cultivated races of sorghum. *Crop Science* **37**: 564-569.
- Quatrini P; Scaglione G; Cardinale M; Caradonna F; Puglia A. M.** 2002. *Bradyrhizobium* sp. Nodulating the Mediterranean shrub Spanish broom (*Spartium junceum* L.) *Applied Microbiology* **92**(1): 13-21.
- Rzedowski, J. y Calderón de Rzedowski, G.** 1979. *Flora Fanerogámica del Valle de México*. Primera Edición. Segunda Reimpresión. Ed. Compañía Editorial Continental, S. A. México D.F.
- Scholla M. H; Elkan G. H.** 1984. *Rhizobium fredii* sp. nov., a fast-growing species that effectively nodulates soybean. *International Journal of Systematic Bacteriology* **34**: 384-386.
- Schlinkert-Miller M; Pepper I. L.** 1998. Physiological and biochemical characteristics of a fast-growing strain of Lupin rhizobia isolated from the sonoran desert. *Soil Biol. Biochem.* **20**(3): 319-322.
- Wang E. T; Martínez-Romero E.** 2000. *Sesbania herbacea-Rhizobium huautlense* nodulation in flooded soils and comparative characterization of *S. herbacea*-nodulating rhizobia in different environments. *Microb. Ecol.* **40**(1): 25-32.
- Zhang X. X; Kosier B; Priefer U. B.** 2001. Genetic diversity of indigenous *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* isolates nodulating two different host plants during soil restoration with alfalfa. *Mol. Ecol.* **10**(9): 2294-2305.

Recibido el 17 de julio de 2004
Aceptado el 8 de noviembre de 2005

Luz María Villarreal de Puga*

José Luis Leal Sanabria

Presidente del Colegio de Jalisco

De los muchos libros biográficos que he tenido la fortuna de leer a lo largo de mi vida, pocos encierran los sentimientos de gratitud, reconocimiento y admiración hacia su personaje como el que escribieron al *alimón*, como suele decirse, los maestros Servando Carvajal, Roberto González Tamayo y Adriana Patricia Miranda Núñez.

Es un libro en el que campea la gratitud del alumno hacia el maestro, el guía, el tutor y preceptor que lo lleva a uno de la mano por los caminos de la vida.

Abundan las expresiones de reconocimiento a una obra admirable, paradigmática en el ámbito universitario, capaz de dejar huella y de sentar los fundamentos de una opción de carrera.

Sobre todo, permea a lo largo del libro la admiración por el sabio y por la sabiduría; por la capacidad intelectual del maestro; por su determinación de seguir adelante, no obstante los avatares que en la vida personal y profesional que tengan que sortearse.

No se trata, en este caso específico, de recorrer y retomar las vivencias de cualquier personaje, sino los de una mujer ejemplar que ha mostrado su amor y su cariño no sólo por nuestra tierra, también por sus flores, sus árboles y fauna: hablamos precisamente de la Doctora Luz María Villarreal de Puga, la *Maestra Puga*, como cariñosamente la llamamos.

Al recorrer las páginas del libro, dos cosas llamaron mi atención por inusuales: primero, que en el colofón se dejó testimonio de haberse terminado de imprimir «...en mayo de 2004, en la víspera de la entrega del Doctorado *Honoris Causa*... » constando la edición de mil ejemplares de los cuales, indica el colofón «...100 en pasta dura numerados y firmados por Luz María Villarreal de Puga... »

En segundo lugar, me impactó una fotografía publicada en la página 39, tomada en 1998 durante un receso de los trabajos del *VII Congreso Latinoamericano de Botánica*. En ella aparecen, ambos de pie, la Maestra Puga y el Doctor José Sarukhán Kermez, quien fuera Rector de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y después Coordinador Nacional de la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). Considero un reconocimiento inapreciable la atención que este hombre sabio está prestando a las palabras de su no menos ilustre interlocutora.

Apuntes para una biografía es el subtítulo que los autores eligieron para su libro. Y lo han hecho de manera acertada, no porque estemos hablando de un personaje secundario en el índice jalisciense de onomásticos, sino porque todos quienes conocemos a la Maestra Puga sabemos que los hallazgos sobre su dimensión humana, académica y científica irán develando sus secretos conforme transcurra el tiempo.

*Discurso del Licenciado José Luis Leal Sanabria con motivo de la presentación del libro «Luz María Villarreal de Puga - Apuntes para una biografía», y los volúmenes 6, número 1-2 y 7, número 1, de la Revista de la *Scientia-CUCBA*, en la sala José Luis Martínez del Fondo de Cultura Económica, el 14 de julio de 2005.

No es ninguna casualidad que en esta ocasión coincida la presentación del libro con la del número inicial del Volumen siete de una revista de ciencias hecha y diseñada por científicos amantes del campo de investigación en el que explayó sus inquietudes, aplicó sus conocimientos y cimentó su sabiduría la Doctora Villarreal de Puga.

Es para mi motivo de gratitud que la Universidad de Guadalajara, mi Alma Máter, me haya invitado a participar en este evento, y que la invitación se me haya hecho llegar a través de las autoridades del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Institución a la que nuestra homenajeada aportó mucho de su generoso caudal humano y científico.

De la Maestra Puga señala el licenciado don Raúl Padilla López, en la presentación de la obra en cuestión, que ocupa un lugar de primer orden entre los prestigiados profesores e investigadores que han ocupado el claustro universitario, al lado de gente no menos distinguida como doña Irene Robledo García, Enrique Díaz de León, Jorge Matute Remus, Mario Rivas Souza y el Padre Severo Díaz Galindo. «*La Maestra es símbolo de los valores más elevados de la vida universitaria. Su pasión por la enseñanza ha hecho historia y creó toda una escuela que se consolida día por día...*» concluye Padilla López.

En la introducción a los *Apuntes para una biografía* leemos que:

«*Una de sus ocupaciones, quizás la más relevante según el decir de la Maestra es la académica y de acuerdo a sus propias palabras se siente orgullosa ... de haber formado a generaciones de profesionales dedicados con éxito a la botánica... a los que continúa motivando en su trabajo cotidiano de investigación...*»

Su dedicación a la enseñanza, sin duda una de las actividades más nobles del campo profesional, no la limitó la Maestra Puga a la aplicación exigente y mecánica del proceso de enseñanza aprendizaje. Ella, fundamentalmente, es una educadora, que con su ejemplo y su afán conduce a sus alumnos a cambiar conductas y cimentar vocaciones.

Sus merecimientos humanos, científicos y académicos la hicieron acreedora a múltiples reconocimientos cuya valía es indiscutible.

Recibió el *Doctorado Honoris Causa* por la Universidad de Guadalajara, considerado el mayor reconocimiento en el ámbito académico estatal.

Se hizo acreedora al *Premio Jalisco 1996 de Ciencias Naturales* que otorga el Gobierno del Estado por su amplio conocimiento de la botánica regional y nacional.

Al entregarle esta distinción junto a otros seis ilustres jaliscienses, el Presidente Ernesto Zedillo Ponce de León externó su propio reconocimiento:

«*... Cada uno de quienes hoy reciben el Premio Jalisco ha contribuido por su propio camino a la grandeza de Jalisco y de México.*

Cada uno por sus propios medios ha hecho mejor nuestra vida. Ha abierto horizontes a nuestra mirada. Ha ayudado a afianzar nuestro lugar en el mundo.

Cada uno ha sabido ser fiel a su vocación y ha dedicado su vida con entrega ejemplar a perseguir sus propios sueños, a superar sus propios retos, a dar alcance a sus propias metas de investigación.

Entre los siete premiados hay, sin embargo, mucho en común. Los siete han trabajado con pareja

intensidad en búsqueda de la excelencia.

Los siete han aportado su esfuerzo con el mismo fervor para construir y afianzar nuestra identidad, para darnos un rostro propio, para hacer sonar nuestra voz...»

Además, mereció el *Premio al Mérito Científico* otorgado el año 2001 por la Fundación Pedro Sarquís; en 1999 recibió el reconocimiento de los tapatíos con la medalla *Ciudad de Guadalajara* que le entregó su Presidente Municipal, señor licenciado Francisco Javier Ramírez Acuña; mientras que en 1994 el señor Presidente de la República la consideró digna receptora del *Premio Mérito Nacional Forestal y de Vida Silvestre en la Categoría de Fomento a la Flora*.

Sin embargo, con toda la importancia que estas preseas tienen en el ámbito social, profesional y académico, considero que la distinción por la que mayor orgullo debe sentir la Maestra Puga, es el hecho de que trece especies y una variedad de plantas vasculares llevan su nombre como reconocimiento a su labor en el estudio de la flora del estado de Jalisco.

Al propio Sarukhán Kermez se le distinguió, por primera vez, con la presea *Magnolia Pugana*, bautizada así en honor a Luz María Villarreal de Puga.

Este reconocimiento fue acordado por las autoridades de nuestra Universidad con la intención de reconocer los 43 años que la Maestra Puga ha dedicado a coleccionar especies vegetales a lo largo y ancho de Jalisco.

Magnolia Pugana será entregada a todos los visitantes que asistan como conferencistas a la Cátedra biodiversidad Enrique Beltrán.

Durante las últimas décadas, la Maestra Villarreal de Puga ha realizado un extraordinario esfuerzo en favor de la conservación de los recursos naturales del estado de Jalisco.

Principal promotora para la formación de la Reserva de la Biosfera de la Sierra de Manantlán, de donde surgió el famoso *maíz perenne*, ahora se ha fijado como meta la formación de una nueva Reserva de la Biosfera, esta vez en San Sebastián del Oeste.

Al celebrar el 24 de mayo de 2003, la Vigésima Quinta Ceremonia de Reconocimiento y Estímulo a Estudiantes Sobresalientes la Universidad de Guadalajara la dedicó a la Maestra Emérita Luz María Villarreal de Puga, que a lo largo de su trayectoria ha demostrado la vitalidad y el humanismo necesarios para enfrentar los retos de la vida.

«...Maestra universitaria comprometida con su vocación y bióloga entusiasta que ha impulsado significativamente la investigación botánica dentro de esta Casa de Estudios...» se lee en la reseña que de dicha ceremonia elaboró la Gaceta Universitaria.

En ocasión posterior, la Doctora Villarreal de Puga lanzaría este alentador mensaje:

«A todos los estudiantes les recomiendo ... que como universitarios se esfuerzen siempre por ser mejores seres humanos ...»

Su fecunda labor como docente, promotora de la investigación botánica e investigadora ella misma y como ciudadana preocupada por los problemas de la sociedad la ha llevado a participar en varias sociedades científicas y asociaciones no gubernamentales, lo que da constancia de su inquietud por el desarrollo y difusión de

las ciencias biológicas, así como de su afán por la conservación del medio ambiente, de los recursos naturales y el respeto a los derechos de las mujeres.

Los autores de *Apuntes para una biografía*, mencionan la destacada participación que ha correspondido a la Maestra Puga en el desarrollo del Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara, desde sus primeros años de actividades hasta su consolidación como una institución reconocida en el ámbito nacional e internacional. Leamos:

«Para valorar con justicia la labor realizada por la maestra debemos tomar en cuenta que en la época en que ella se incorporó al Instituto de botánica, en nuestro país prácticamente no se daba apoyo a las actividades científicas, ya que estaban fuertemente centralizadas; el poco dinero disponible se quedaba en la instituciones de la capital y casi nada, era destinado a provincia. En estas condiciones, formar, desarrollar y mantener una institución, requirió de gran esfuerzo, de excepcional capacidad de gestión y negociación, pero sobre todo de coraje, pasión y dedicación; atributos reunidos en la persona de la Maestra Puga...»

Nuestra sociedad y muy especialmente la Universidad de Guadalajara, tienen plena conciencia del vigor de su arte y de sus tradiciones, así como de la importancia que tienen la investigación y la difusión de los hallazgos y descubrimientos de nuestros científicos. Por eso mismo procura resguardar, difundir y alentar las más altas manifestaciones de estos ámbitos del quehacer humano.

Estas inquietudes de los universitarios jaliscienses han encontrado eco y respuesta en todos los Centros, en cada uno de los cuales este interés se manifiesta con la

filmación de documentales, la grabación de discos y videos, así como la edición de libros, periódicos y revistas hasta formar un acervo del que todos en la comunidad universitaria nos sentimos orgullosos y defendemos como un valioso patrimonio que da voz a alumnos y docentes.

En el Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, que es la casa de la Maestra Puga, desde diciembre de 1999 se edita la revista de difusión científica *Scientia-CUCBA* que hoy celebra el inicio de su séptimo volumen dedicándolo al distinguido investigador y Maestro Emérito don Roberto González Tamayo.

El primer editor de la revista fue el Dr. Juan de Jesús Taylor Preciado, actual rector del CUCBA, quien fuera relevado como Editor Jefe por el también Doctor don Servando Carvajal a partir del tercer volumen.

En la presentación que del primer número de la Revista hiciera el Maestro en Ciencias Salvador Mena Munguía, Rector entonces del CUCBA, expresaba:

«Scientia CUCBA, es una contribución de los investigadores del Centro es consecuencia de la necesidad sentida de dar a conocer la gran productividad con que se cuenta y, aunque pretende un formato ágil y de fácil lectura como uno de sus objetivos, no sacrifica el rigor científico y la calidad académica; ... Es de manera global, un espacio innato para la difusión de avances científicos en las ciencias naturales y otras disciplinas relacionadas con ellas. Esperamos que sus objetivos se logren y que la revista se signifique como una alternativa para las colaboraciones científicas de manera permanente...»

Del cumplimiento de estos objetivos trazados por el Maestro Mena Munguía, y que han hecho suyos sus dos Editores Jefe, da cuenta el hecho de haberse publicado 63 artículos con la muy valiosa colaboración de 180 investigadores, de los cuales 119 laboran en diversos departamentos del propio CUCBA, mientras que 47 pertenecen a otras instituciones nacionales y 14 de ellos provienen de Rusia, Estados Unidos, Haití y Cuba.

Este impresionante número de colaboradores y colaboraciones se cierra

con la presentación en este momento, de un número monográfico producto de los trabajos de investigación de la Doctora Luz María González Villarreal, que además del talento y la vocación heredó de su señora madre, la Maestra Puga, el amor y cariño por la vida en toda la extensión de la palabra.

Agradezco al CUCBA y a todos los presentes, la generosidad de su atención.

scientia-CUCBA

Tiraje

500 ejemplares

Diseño e impresión

TAGIT

Tecnología y Aplicaciones Gráficas
Saulo Cortés / José Manuel Sánchez
Enrique Díaz de León 514-2b
Guadalajara 44170, Jalisco.

Tel. (33) 3825-8528 **Fax** (33) 3825-8545
tagit@idex.com.mx | *tagit.idex.com.mx*