

---

---

**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**

**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
Y AGROPECUARIAS**

---

---

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**DEPENDENCIA FISIOLÓGICA Y ESTRUCTURAL  
DEL AGAVE (*Agave tequilana*) Weber var. azul A LA  
SIMBIOSIS DE HONGOS MICORRÍZICOS  
VESÍCULO ARBUSCULAR**

**Por**

**JULIA ZAÑUDO HERNÁNDEZ**

**Tesis presentada como requisito parcial para obtener el grado de**

**MAESTRO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS (ÁREA DE ECOLOGÍA)**

**LAS AGUJAS, ZAPOPAN, JALISCO  
DICIEMBRE 2001**



**DEPENDENCIA FISIOLÓGICA Y ESTRUCTURAL DEL AGAVE (*Agave tequilana*)  
Weber var. azul A LA SIMBIOSIS DE HONGOS MICORRIZICOS VESICULO  
ARBUSCULAR.**

Por

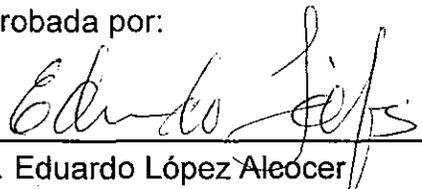
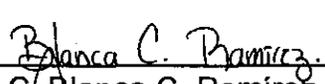
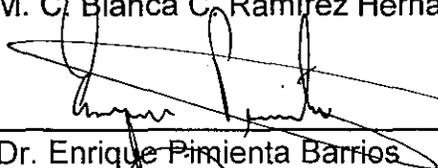
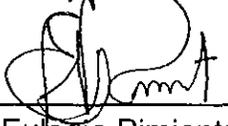
**JULIA ZAÑUDO HERNÁNDEZ**

Tesis presentada como requisito parcial para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(ÁREA DE ECOLOGÍA)**

**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA  
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS  
DICIEMBRE DE 2001**

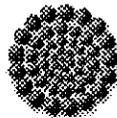
Aprobada por:

 Dr. Eduardo López Aleocer	Asesor	<u>5 Dic / 2001</u> Fecha
 M. C. Blanca C. Ramírez Hernández	Asesor	<u>5 dic '01</u> Fecha
 Dr. Enrique Pimienta Barrios	Sinodal	<u>5 de dic 01</u> Fecha
 Dr. Eulogio Pimienta Barrios	Director	<u>5 dic 01</u> Fecha
 Dr. Eulogio Pimienta Barrios	Presidente del Posgrado	<u>5 dic 01</u> Fecha

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Ecofisiología Vegetal del Departamento de Ecología. División de Ciencias Biológicas y Ambientales del CUCBA, Universidad de Guadalajara, y fue financiado por las siguientes instituciones:

**Czeslawa Prywer Lidzbarska. Asociación civil**

**VALLE DE MATITAN, S. P. de R. I.**



**SOP - CONACYT**

*Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología*

M É X I C O 

**PROYECTO: EFECTO DE LAS MICORRIZAS VESICULO ARBUSCULAR EN LA  
RESPUESTA ESTRUCTURAL Y FISIOLÓGICA DE PLANTAS CAM DE  
IMPORTANCIA ECONOMICA. CLAVE 28818-B**

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres y hermanos por el apoyo paciencia y confianza que siempre me han brindado.

Al Dr. Eulogio Pimienta Barrios director de esta tesis por considerarme parte de su grupo de investigación, por tenerme mucha paciencia y guiarme en mi vida profesional

A Carlos por darme siempre sus opiniones y apoyo incondicional.

A todas las personas que colaboraron para realizar este trabajo. A todos mis compañeros de laboratorio Maru, Luis, Gloria, Emmanuel, Javier, Blanca y la lista enorme de personas que permanecieron en el laboratorio, por la amistad y los ratos agradables sobre todo durante las mediciones de fotosíntesis.

A mis asesores Dr. Eduardo López Alcocer, M.C. Blanca Ramírez Hernández.

A los integrantes de mi comité Dr. Enrique Pimienta Barrios, M.C. Martín Huerta Martínez, que además comparto una buena amistad con ellos, y M.C. Salvador Hurtado De la Peña.

## Índice de contenido

RESUMEN	vi
SUMMARY	vii
INTRODUCCION	1
REVISIÓN DE LITERATURA	
Clasificación y descripción botánica del agave tequilero ( <i>Agave tequilana</i> )	3
El cultivo del agave	4
Metabolismo de <i>Agave tequilana</i>	5
Productividad del <i>Agave tequilana</i>	5
Las micorrizas	5
Clasificación de los hongos micorrícicos vesículo arbuscular (MVA)	7
Mecanismos de colonización	8
Características fisiológicas de la planta hospedera en función de la simbiosis micorrícica	9
MATERIALES Y METODOS	
Sitio de colecta y establecimiento del experimento	11
Evaluación del desarrollo de la colonización por hongos MVA	12
Evaluación del crecimiento vegetativo	12
Estudio anatómico	13
Medición estacional de la fotosíntesis	13
Análisis estadístico	13
RESULTADOS	14
DISCUSION	30
CONCLUSIONES	35
BIBLIOGRAFIA	36

## INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Fenofases y tiempo de colonización de raíces por micorrizas en <i>Agave tequilana</i>	15
Figura 2. Asimilación neta instantánea de CO <sub>2</sub> durante 24 h en plantas jóvenes de <i>Agave tequilana</i> a los 5 días de "achicalar", y los 10 días de "achicalar".	17
Figura 3. Asimilación neta diaria de CO <sub>2</sub> durante 24 h en plantas jóvenes de <i>Agave tequilana</i> inoculadas con el hongo micorrícico <i>Glomus fasciculatum</i>	19
Figura 4. Asimilación neta diaria de CO <sub>2</sub> durante 24 h en plantas jóvenes de <i>Agave tequilana</i> inoculadas con el hongo micorrícico <i>Glomus intraradices</i>	20
Figura 5. Asimilación neta diaria de CO <sub>2</sub> durante 24 h en plantas jóvenes de <i>Agave tequilana</i> sin inocular hongos micorrícicos	21
Figura 6. Relación entre la temperatura con la asimilación neta CO <sub>2</sub> en plantas jóvenes de <i>Agave tequilana</i> .	27
Tabla 1. Variación estacional en la Asimilación neta diaria (And) y la Tasa máxima de asimilación (Tma) durante 24h en <i>Agave tequilana</i> .	23
Tabla 2. Porcentaje de colonización de raíces finas por vesículas, hifas, y arbusculos de hongos MVA en plantas de <i>Agave tequilana</i> durante el periodo julio-agosto de 1999.	24
Tabla 3. Porcentaje de colonización de raíces finas por vesículas, hifas, y arbusculos de hongos MVA en plantas de <i>Agave tequilana</i> durante el periodo julio-agosto de 2000.	25
Tabla 4. Porcentaje de colonización de raíces finas por vesículas, hifas, y arbusculos de hongos MVA en plantas de <i>Agave tequilana</i> durante el periodo septiembre-octubre de 2000.	26
Tabla 5. Crecimiento, morfología y anatomía en la hojas de <i>Agave tequilana</i> , durante el periodo de julio-agosto de 1999.	28
Tabla 6. Crecimiento, morfología y anatomía en la hojas de <i>Agave tequilana</i> , durante el periodo de julio-agosto de 2000.	29

## RESUMEN

El cultivo de *Agave tequilana*, es uno de los más importantes para el estado de Jalisco, debido al aumento de la demanda nacional e internacional del "tequila", sin embargo, este cultivo ha sido afectado por pérdidas causadas por diversos factores como el inapropiado uso de agroquímicos, daños causados por plagas y enfermedades, y por el bajo precio de las "piñas" durante 1996-1998. Para satisfacer la demanda del "tequila" se requiere incrementar la superficie cultivada, y llevar a cabo un manejo sustentable del cultivo, reduciendo la aplicación de fertilizantes y plaguicidas. Una alternativa para este propósito es el manejo de la rizosfera, como es el caso de la simbiosis de hongos micorrícicos. Este tipo de simbiosis beneficia a la planta aumentando la eficiencia en la absorción de agua y minerales, aumenta el crecimiento, y la eficiencia fotosintética, en algunos casos también suprimen enfermedades radicales. Este estudio fue realizado de marzo de 1999 a noviembre de 2000, y el objetivo principal fue generar conocimiento básico en las respuestas fotosintética y anatómica foliar estacional en plantas jóvenes de *A. tequilana* inoculadas con hongos micorrícicos: *Glomus fasciculatum* (*Gf*) y *G. intraradices* (*Gi*), durante dos años y medio. En la primera parte del trabajo se realizó una medición basal de asimilación de CO<sub>2</sub> en las plantas después que fueron transplantadas para determinar el comportamiento de las plantas después de cierto tiempo que se les deja a las plantas sin ser transplantadas, se encontró que las plantas que no son transplantadas de inmediato (plantas que tenían diez días) tienen menor eficiencia en la asimilación de CO<sub>2</sub>. En las siguientes evaluaciones de asimilación de CO<sub>2</sub> se encontró un efecto positivo hacia las plantas con micorriza comparado con las no micorrizadas, resaltando un incremento de asimilación en las plantas con *Gi* con 166 mmol m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> de asimilación neta promedio durante el experimento a diferencia de las plantas con *Gf* que fue de 96 mmol m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> y el Testigo (T) de 94 mmol m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>. El crecimiento de las hojas también fue mayor en las plantas con *Gi*, así como la anatomía de la hoja, aunque el porcentaje de colonización total en *Gf* en agosto de 1999 fue mayor (59%) que en *Gi* (16%). En el segundo año (2000) el porcentaje de colonización fue similar en ambas especies (71%), presentando en este año estructuras de arbusculos. En relación a la anatomía foliar, se observaron

diferencias entre tratamientos en el segundo año, la principal diferencia fue el grosor de clorénquima, el cual fue mayor en las hojas de las plantas inoculadas con los hongos *Gf* y *Gi* que en el testigo.

## SUMMARY

*Agave (Agave tequilana) Weber var. azul* is one of the most economical important crop in Jalisco state due that it had experimented an increase in the land area dedicated to its cultivation as result of its high demand for the production of the drink named "tequila". Actually the crop management system is highly dependent of high rates and inappropriated use of fertilizers and pesticides. In addition, the severe injury caused by the presence of insect and diseases pests also had lead to an increase in the use of plaguicides, which in turn had caused severe unbalance on soil biological cycles, that support the sustainable management of soils. Actually, agave growers claim for a sustainable management systems based on low use of fertilizers and pesticides. An alternative technology is the management of the rhizosphere, in particular the mycorrhizal symbiosis. The mycorrhizal symbiosis can improve the uptake of soil water and mineral, may increase plant growth and photosynthesis, and would reduce the injury caused by root diseases. This study was conducted from 1999 to 2000 and the main objective was generate basic knowledge on seasonal CO<sub>2</sub> uptake, growth and leaf anatomical characteristics responses on young *A. tequilana* plants previously inoculated with *Glomus fasciculatum (Gf)* and *Glomus intraradices (Gi)*. A leaf basal CO<sub>2</sub> uptake measurement after plants were transplanted registered highest uptake rates than those immediately transplanted. Following evaluations of CO<sub>2</sub> uptake were realized plants inoculated with *Gi* showed higher CO<sub>2</sub> uptake rate (166 mmol m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>) than those inoculated with *Gf* (96 mmol m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>) and the control (94 mmol m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>). Also leaf length resulted higher on those plants inoculated with *Gi* as well as chlorenquima thickness was found, nevertheless in august of 1999 root colonization was higher with *Gf* (59%) than *Gi* (16%). On the second year (2000), root colonization percentage was similar for both fungi species (71%), and they showed arbuscules. Also plant leaf showed an increased chlorenquima thickness on those plants inoculated with both *Gf* and *Gi* fungi than the control.

## INTRODUCCION

El cultivo del agave "azul" (*Agave tequilana* Weber), es importante para la región de Los Altos, Centro y Sur este de Jalisco, particularmente en la última década, debido a la gran demanda nacional e internacional que ha alcanzado el "tequila", sin embargo, este aumento se vió afectado por las pérdidas de cultivos por los daños causados por plagas y enfermedades, y por el bajo precio de las "piñas" durante 1996-1998, por lo que para satisfacer la demanda se requiere incrementar la superficie de cultivo (Consejo Regulador del Tequila, 1999). Para lograr el desarrollo de una agricultura sustentable, es necesario generar nuevas tecnologías que contribuyan a estabilizar los rendimientos (Vandermeer, 1995), entre los cuales destacan aquellas que reducen el uso de fertilizantes, manejo de productos que generen materia orgánica, y reducir las prácticas agrícolas. Una alternativa importante es el manejo de la rizosfera, como es el caso de la simbiosis de hongos micorrícicos (Hoffman y Carroll, 1995). Este tipo de simbiosis generalmente es considerada como una relación mutualista, con una transferencia bidireccional de nutrimentos. El hongo depende de los fotosintatos proporcionados por el hospedero, y el micelio externo del hongo incrementa la capacidad de la planta para obtener los recursos del suelo (i.e. agua, minerales; Lambers et al., 1998; Smith y Read, 1997). Estas condiciones benefician la fotosíntesis aumentando la actividad fotosintética la cual es importante para el funcionamiento de la simbiosis micorrícica. En algunos casos suprimen las enfermedades radicales (Smith y Read, 1997), y permite reducir la aplicación de agroquímicos sin afectar el rendimiento (Smith y Smith, 1996; Lambers et al., 1998). Esta simbiosis también, mejora la tolerancia a la sequía, facilita la toma radical de minerales que presentan baja movilidad como el fósforo, reduce el período de estancia en el vivero o invernadero antes del trasplante, facilita el establecimiento de árboles jóvenes durante la reforestación de suelos degradados y el proceso de colonización en procesos de sucesión temprana (Salisbury y Ross, 1992; Lambers et al., 1998).

Sin embargo, las prácticas agrícolas tradicionales, como son la labranza, y aplicación de agroquímicos, afectan el establecimiento de esta simbiosis, por lo que las especies cultivadas, por lo general presentan bajos grados de simbiosis, lo cual las ha hecho más dependientes a la aplicación de agua y fertilizantes. Proponemos la hipótesis que la recuperación del establecimiento de la simbiosis micorrícica en estas especies, ayudará a reducir la aplicación de energía antropogénica, beneficiando el funcionamiento y la eficiencia en la toma de recursos del aire y del suelo por *A. tequilana*.

## REVISION DE LITERATURA

### **Clasificación y descripción botánica del agave tequilero (*Agave tequilana*).**

El agave tequilero o agave azul forma parte de la familia *Agavaceae* (Gentry, 1982; Valenzuela, 1994) que es endémica de América y se distribuye en el sur de Canadá, México, Centroamérica, norte de Sudamérica e islas del Caribe (Valenzuela, 1994). Esta familia ha tenido muchos cambios en su clasificación, algunos autores la unen sus géneros con miembros de las familias *Liliaceae* y *Amaralidaceae*. La familia *Agavaceae* tiene dos subfamilias *Yuccoideae* (yucas) y *Agavoideae* (agaves), los agaves pertenecen a la tribu *Agaveae*, al subgénero *Agave* y la especie del agave tequilero *tequilana*

**Superorden:** Liliannae

**Orden:** Aspargales

**Familia:** Agavaceae

**Subfamilia:** Agavoideae

**Tribu:** Agaveae

**Género:** *Agave*

**Subgénero:** *Agave*

**Especie:** *tequilana*

Es una planta surculosa que se extiende radialmente, de 2.2 a 2.8 m de altura (cuando tiene inflorescencia). Su tallo es grueso y corto, de 30 a 50 cm de altura al madurar. Las hojas son lanceoladas, acuminadas y de fibras firmes rígidamente estiradas, cóncavas de 90 a 120 cm, de color glauco de azulado a verde grisáceo. El margen de las hojas es de recto a ondulado o repando; los dientes son de tamaño regular, espaciados de color café claro a oscuro, sus ápices son delgados, curvos o flexos con base piramidal. La espina generalmente es corta de uno a dos centímetros de largo, su base es ancha café obscura. La inflorescencia es una panícula densamente ramosa a lo largo de 20 a 25 umbelas de flores verdes y estambres rosados. Las flores son de 68 a 75 mm de largo con

bracteolas sobre los pedicelos. Ovario cilíndrico con cuello corto, casi terminado en punta sobre la base de 32 a 38 mm de largo. Tubo floral de 10 mm de ancho. Tépalos desiguales lineares erectos pero rápidamente flojos en la anthesis de 25 a 28 mm. Los filamentos miden de 45 a 50 mm de largo doblados hacia adentro junto al pistilo, insertos cerca de la base del tubo de cinco a siete milímetros; las anteras son de 25 mm de largo. El fruto es una cápsula ovada a ligeramente cuspidada (Gentry, 1982).

### **El Cultivo del Agave.**

Desde hace un milenio, los indígenas mexicanos aprendieron a extraer la savia de las largas y carnosas hojas del agave (*Agave salmiana*, y a fermentarla para después producir una bebida ligeramente alcohólica llamada pulque. Durante el imperio azteca, se utilizaba únicamente como bebida ritual de los sacerdotes, para mitigar el sufrimiento de los que iban a ser sacrificados a los dioses, como privilegio de los ancianos, y como recompensa para los guerreros que habían demostrado su valentía (Luna, 1991; Pfeiff, 1995; Valenzuela, 1997).

A diferencia de los indígenas, los invasores españoles eran grandes bebedores y ansiaban algo más fuerte que el pulque. Habían traído consigo el conocimiento del proceso de destilación (que adquirieron de los moros) y descubrieron que varias especies del género *Agave* (entre ellas la de *Agave tequilana*) producían un licor fuerte y transparente denominado mezcal, y fue hasta 1893, cuando una bebida de mezcal producido en el pueblo de Tequila, Jalisco ganó un premio en la Feria Mundial de Chicago con el nombre de "brandy de mezcal" tomó fama la bebida y en 1910 una bebida similar pero nombrada "vino tequila" mereció un trofeo en San Antonio, Texas, y el nombre de "tequila" se permaneció para nombrar a la bebida. Desde entonces fue cuando *Agave tequilana* comenzó a cultivarse a gran escala. Ahora el 90% del "tequila" se exporta a Alemania, Australia, Brasil, Canadá, Estados Unidos, Francia, Inglaterra, Japón, Puerto Rico y Sudáfrica, (Luna, 1991; Pfeiff, 1995).

### **Metabolismo de *Agave tequilana*.**

*Agave tequilana* presenta metabolismo ácido de las crasuláceas (MAC), este tipo de metabolismo se encontró por primera vez en plantas de la familia Crassulacea por lo que a las plantas que lo tienen se les denomina plantas CAM (por sus siglas en inglés). Este tipo de metabolismo se caracteriza por la apertura nocturna de estomas para la toma de CO<sub>2</sub> y el cierre diurno de estos para evitar pérdida de humedad. El agave, al igual que otras plantas MAC almacenan el CO<sub>2</sub> fijado (por la enzima fosfoenol piruvato carboxilasa-PEPcase) en la oscuridad en vacuolas en forma de ácidos orgánicos, por lo que tienden a un aumento en la acidez durante la noche, se ha encontrado que las temperaturas nocturnas cálidas reducen la actividad de la enzima (Pimienta et al., 2000), por lo que disminuye la producción y acumulación de azúcares en tejidos de reserva (Pimienta et al., 1999). Este tipo de metabolismo es un mecanismo de adaptación de las plantas de zonas áridas para facilitar la fotosíntesis y ahorra agua (Nobel y Hartsock, 1976; Kluge, 1979; Nobel, 1994).

### **Productividad del *Agave tequilana*.**

Se ha encontrado que la productividad del agave avanza conforme a la edad de la planta, siendo más acelerado en los dos primeros años, y en el último año (de siete a ocho) disminuye el peso seco en las hojas y las raíces para concentrarse el crecimiento en el tallo, y se estima que plantas de un año producen 2.49 kg m<sup>-2</sup> de peso seco de hojas formadas, plantas de tres años producen 2.24 kg m<sup>-2</sup>, y plantas de seis años producen 2.11 kg m<sup>-2</sup> (Nobel y Valenzuela, 1986). Esta productividad es similar a otras especies de agave (Nobel, 1985).

### **Las micorrizas.**

La asociación micorrícica es aquella que se realiza entre algunos hongos benéficos del suelo y las raíces de la mayoría de las plantas. El término micorriza se refiere a la asociación entre un hongo benéfico y las raíces de plantas

superiores el que se involucra el intercambio de nutrientes del suelo. Esta asociación es considerada como simbiosis mutualística, ya es altamente interdependiente, en la que la planta hospedera recibe nutrimentos minerales via micelio fungal (micotrofismo), y el hongo heterotrófico obtiene compuestos de carbono de la fotosíntesis (Harley y Smith, 1983).

Entre los beneficios que las plantas reciben con esta simbiosis están: reducción del periodo de estancia en el vivero o invernadero antes del trasplante, mejoramiento de la capacidad fotosintética, aumento de la tolerancia al estrés hídrico al aumentar la absorción de agua en suelos secos y absorción de nutrimentos minerales en suelos donde la difusión de iones disminuye por el contenido bajo de humedad; y el fósforo se encuentra insoluble como fosfato de calcio (Cui y Nobel, 1992; Smith y Smith, 1996).

Esto ha hecho posible que estas especies presenten productividad biológica y agronómica similar a la que se reporta para especies frutales que se desarrollan en ambientes más favorables, con tecnología moderna y requieren de alta aplicación de energía antropogénica (Barbera et al., 1992).

Se han descrito cinco tipos de micorizas:

- Ectomicorriza, la cual se caracteriza por la presencia de la red de Harting en la corteza y comúnmente se encuentran en árboles leñosos.
- Ericales, estas comparten características de ectomicorizas y arbusculares. Se clasifican en tres tipos: ericoidal, arbotoide y monotropoide.
- Ectoendomicorizas, estas también forman red de Harting y su colonización intracelular es similar a la arbutoide. Se forman sólo con algunas géneros de la familia Pinaceae.
- Micorizas de orquídea, en este tipo de micorriza el hongo provee de carbono a la planta hospedera.
- Micorriza arbuscular, esta presenta estructuras intracelulares que se forman en las células corticales de la raíz como arbusculos y vesículas, por lo cual recibe ese nombre.

De estos tipos la micorriza, la arbuscular es la más común, se forma en las raíces de la mayoría de las plantas y son simbioses obligados, pertenecen a la subdivisión Zigomicotina, a la clase Zygomycetes y al orden Glomales, en el que se encuentran dos familias:

- Glomaceae con los géneros *Sclerocystis*, *Glomus*, *Acaulospora*, *Entrophospora*
- Gigasporaceae con los géneros *Gigaspora* y *Scutellospora* (Schenck y Pérez, 1990).

### **Clasificación de los hongos micorrícicos vesículo arbúscular (MVA).**

En 1990 Morton y Benny realizan una clasificación del orden Glomales en la que la familia Endogonaceae no está incluida. Esta clasificación está basada en la descripción de algunos tipos de esporas, si se generan terminal, intercalada o lateralmente de una o más hifas.

**Orden:** Glomales

• **Suborden:** Glomineae

**Familia:** Glomaceae

**Géneros:** *Glomus*

*Sclerocystis*

**Familia:** Acaulosporaceae

**Géneros:** *Acaulospora*

*Entrophospora*

• **Suborden:** Gigasporineae

**Familia:** Gigasporaceae

**Géneros:** *Gigaspora*

*Scutellospora*

### **Mecanismos de colonización.**

Los hongos micorrícicos vesículo arbusculares (MVA) son biotrofos obligados (los cuales derivan nutrientes de la planta hospedera). La adaptación celular depende de procesos de reconocimiento modulados y coordinados molecularmente por ambos simbiositas. El intercambio de señales y reconocimiento entre la planta hospedera y el hongo inicia antes del contacto físico, ya que los metabolitos exudados por las raíces hospederas, incrementan la germinación de las esporas y el crecimiento fúngico, a diferencia de las plantas no hospederas (Gianinazzi-Pearson, 1996). El proceso de infección de la raíces hospederas está caracterizado por distintos estadios que involucran cambios morfogénicos en el hongo como son: germinación de la espora, diferenciación de hifas, formación del apresorio, penetración radical, crecimiento intercelular y formación del arbusculo (Giovannetti, et al., 1994).

La germinación de la espora y la diferenciación de las hifas puede ocurrir en ausencia de raíces, esta fase es crucial en el ciclo de vida ya que de este depende la sobrevivencia, habilidad, rapidez y eficiencia de infectar al hospedero. El apresorio es considerado el punto de reconocimiento del hongo y el potencial hospedero, puede formarse hasta en 36 h después de la interacción con la raíz hospedera (Giovannetti y Citeresi, 1993).

La colonización de hongos MVA influye comúnmente en la nutrición de la planta, especialmente en la nutrición de fósforo, el cual tiende a ser relacionado con el crecimiento y el desarrollo, aunque esta respuesta no es muy favorable en niveles altos de fósforo (Gianinazzi y Schüepp, 1994).

En el crecimiento de la hifa es rápido y hacia adentro del parénquima cortical, donde el micelio inter o intracelular prolifera a lo largo de la raíz, debido a que las células de la epidermis e hipodermis que tienen contacto con las primeras estructuras de infección no muestran modificaciones citológicas significativas o respuestas de defensa (Brundrett et al., 1985).

El desarrollo fúngico culmina con la diferenciación de haustorios intracelulares llamados arbusculos (característicos de ésta simbiosis), los cuales

se pueden formar durante los primeros 4 días, que después le sigue la formación de vesículas. Los arbusculos tienen un papel clave en el intercambio recíproco de nutriente entre la planta hospedera y el hongo MVA (Smith y Smith, 1990). Sin embargo, son estructuras efímeras y un arbusculo individual alcanza su desarrollo completo en algunos días, después comienza su senescencia (Alexander et al., 1988).

El desarrollo de los sistemas de agricultura en años recientes, se ha caracterizado por la adición de cantidades excesivas de fertilizantes, fungicidas herbicidas, etc., empleados para incrementar la producción, disminuye los efectos de la colonización micorrícica y la actividad de microorganismos del suelo, afectando la fertilidad del suelo, ya que se afecta el ciclo de minerales (Bethlenfalvay y Lidermann, 1992). Las micorrizas son importantes en la captura de minerales el ciclo de nutrientes. El manejo y aplicación de micorrizas, permite conservar los recursos naturales del suelo para hacer uso racional de estos conservando así la fertilidad y la estructura del suelo por períodos prolongados, disminuye la contaminación y desgaste del suelo por erosión, alcanzando una alta producción protegiendo la estructura y diversidad de las comunidades de plantas naturales.

### **Características fisiológicas de la planta hospedera en función a la simbiosis micorrícica.**

En cuanto a la simbiosis micorrícica arbuscular, la integración de ambos simbioses toma lugar a diferentes niveles: 1) estructural, definido por la formación del arbusculo, un proceso en el cual el hongo modifica ciertas células para formar una estructura hospedero-hongo en el plasmalema; 2) fisiológica y bioquímica, donde la integración es principalmente expresada por cambios en el intercambio de nutrientes propios de la raíz cuando son colonizadas por el hongo (Azcón-Aguilar y Bago, 1994). Como anteriormente se mencionó, la simbiosis micorrícica tiene efectos estructurales y fisiológicos. Estos cambios pueden verse en características de los tejidos y en los procesos bioquímicos involucrados en el

intercambio de nutrientes, así como el intercambio metabólico y las modificaciones enzimáticas, los cuales son indicativos de un alto grado de integración fisiológica. Por lo que las propiedades fisiológicas de la planta hospedera son determinantes para una adecuada formación y funcionamiento de la micorriza. No obstante, la simbiosis micorrícica está controlada por una serie de mecanismos en la planta y está modulada por las condiciones ambientales.

Una de las principales características fisiológicas de la planta micorrizada es la alta actividad fotosintética, en el contexto de la relación fuente-demanda, ya que la formación y funcionamiento de la micorriza está regulada por el nivel de carbohidratos en la raíz, y el incremento en la actividad fotosintética se atribuye a la adquisición de fósforo del suelo, que únicamente es inducida por el hongo (Brown y Bethlenfalvay, 1988); en algunos casos la planta hospedera puede restringir la formación micorrícica cuando el costo de la simbiosis es más alto que el beneficio, cuando esto sucede no sólo el fósforo sino la luz intervienen en la disminución de la fotosíntesis, ya que se ha encontrado que la baja intensidad de irradiación reduce la proporción de la longitud de raíces micorrizadas, asimismo reduce la colonización micorrícica (Tester et al., 1986). Otra característica fisiológica es el crecimiento vegetativo, aunque la micorriza no lo promueve continuamente, la disminución temporal del crecimiento, es importante desde el punto de vista ecológico, ya que los recursos del suelo están sujetos a cambios temporales, dependiendo de la humedad del suelo y temperatura (Azcón-Aguilar y Bago, 1994).

## MATERIALES Y METODOS

### Sitio de colecta y establecimiento del experimento.

El experimento se llevó a cabo en las instalaciones del Departamento de Ecología del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara. Para este estudio se colectó suelo y plántulas de aproximadamente tres años de una plantación cultivada del predio "La Higuera" el cual se localiza a 10 Km del municipio de Amatitán Jalisco (de 20° 42' 30" a 20° 55' 15" latitud norte y de 103° 37' 40" a 103° 49' 30" longitud oeste a 1310 msnm). Las plantas fueron inoculadas con dos cepas de hongos micorrícicos vesículo arbuscular (MVA) al momento de ser transplantadas en cubetas de 20 L, colocando 100 g del inóculo (aproximadamente 500 esporas) por planta. Se tuvieron tres tratamientos; dos inóculos de cepas de hongos MVA de la colección del CINVESTAV-IPN, Unidad Irapuato de las especies de *Glomus fasciculatum* (Gf) y *Glomus intraradices* (Gi), y un testigo sin inocular (T). Cada tratamiento constó de seis repeticiones bajo un diseño completamente al azar. La inoculación se llevó a cabo vertiendo suelo del sitio de colecta (previamente desinfectado) hasta la mitad de la cubeta. Después se esparció el inóculo, y se colocó una planta por cubeta, después de haber sido inoculadas se les agregó más suelo, al final se les aplicó 1.5 L de agua. Durante los primeros tres meses (febrero a mayo de 1999) se les aplicó a cada planta 2 L de agua cada mes.

Los datos climáticos (temperaturas máximas y mínimas promedio mensuales y precipitación pluvial) se obtuvieron de septiembre de 1999 a noviembre de 2000, de tres estaciones climatológicas cercanas al área donde se instaló el experimento, y se llevó a cabo una interpolación de datos por medio del programa SIG-IDRISI (Eastman, 1993). Para complementar estas variables cada mes se registró en el sitio de instalación del experimento el flujo fotosintético de fotones (FFF; a longitudes de onda de 400 a 700 nm) las mediciones se realizaron cada 2 h. después de salir y antes de ocultarse el sol con un sensor cuántico Li-Cor Li-190s (Li-Cor, Lincoln, EN). Cada mes el contenido de humedad en suelo fue

determinado en 10 muestras colectadas de la zona de la rizosfera a 15 cm de profundidad en las plantas del experimento, los datos son expresados como porcentaje de contenido de agua  $[(\text{masa fresca}-\text{masa seca})/\text{masa seca} \times 100]$  (Torres, 1984).

### **Evaluación del desarrollo de la colonización por hongos micorrícicos vesículo arbúscular (MVA).**

Para evaluar el desarrollo del proceso de colonización por hongos MVA se colectaron raíces durante el verano que es cuando aparecen las raíces de "lluvia", las cuales son colonizadas por hongos MVA (Arceta et al., 1999). Estas se fijaron en una solución de formaldehído:ácido acético:alcohol (FAA) en una proporción 10:5:85 (v:v:v) (Jensen, 1962) para observaciones anatómicas y del proceso de colonización de las raíces por hongos MVA. Para observar el proceso de colonización por hongos MVA las raíces se aclararon en una solución de KOH (10%), y se ablandaron en un autoclave 10 minutos a 10 libras, después se decantó el KOH. Las raíces se lavaron con agua y se les añadió HCl (3%), para después teñirlas con azul de tripano (0.05%) en lactoglicerol (Phyllips y Hayman, 1970). El porcentaje de colonización micorrícica se evaluó en 10 segmentos de raíz de un 1 cm de longitud cada uno. Los segmentos teñidos fueron montados en portaobjetos con tres repeticiones y se examinaron en un microscopio sinóptico marca Zeiss a 10 y 40X. Se cuantificó el porcentaje de colonización considerando campos positivos aquellos que presentaran alguna estructura micorrícica (hifa, vesícula o arbúsculo) empleando el método descrito por McGonigle et al. (1990).

### **Evaluación del crecimiento vegetativo.**

La tasa de crecimiento se evaluó midiendo seis hojas de cada planta desde la base hasta el ápice de la hoja con la ayuda de un flexómetro, también para este caso se contaron el número de hojas desprendidas u hojas nuevas por planta.

### **Estudio anatómico.**

El estudio anatómico se llevó a cabo cortando segmentos de la parte media de las hojas, las cuales fueron fijadas en FAA (10:5:85, v:v:v) y se les hicieron cortes transversales con una navaja de rasurar, se tiñeron con azul de toluidina (0.5%) se les midió el grosor de parénquima y clorénquima examinándolos en un microscopio sinóptico marca Zeiss a 10 y 40X.

### **Medición estacional de la fotosíntesis.**

La fotosíntesis medida como asimilación neta de  $\text{CO}_2$  (An) se llevó a cabo a partir del 4 de marzo de 1999, 22 días después de la inoculación, y continuó una vez que inició la colonización por hongos MVA, registrando la medición de An cada dos meses de septiembre de 1999 a noviembre de 2000. La An se registró cada 2h durante 24h en cada fecha de medición. Para llevar a cabo esta medición se empleó un sistema portátil para medir fotosíntesis Li-Cor Li-6200 (Li-Cor, Lincoln, NE), cuya cámara de medición de  $250 \text{ cm}^3$  fue modificada, para poder registrar el intercambio de gases en una superficie laminar sucultenta, como es el caso de las hojas de *A. tequilana*. Esta modificación requirió el reemplazo de la cubierta semicilíndrica, dejando la parte de la cámara en forma de prisma con base rectangular, la que fue cubierta con una mica de plástico, dejando en un extremo una pequeña abertura rectangular de  $6 \text{ cm}^2$  ( $2 \text{ cm} \times 3 \text{ cm}$ ) cuyos bordes se cubrieron con hule-espuma (Pimienta-Barrios et al., 2000). Esta apertura se colocó en la superficie adaxial de la hoja presionando para evitar fugas.

### **Análisis estadístico.**

Los datos se analizaron estadísticamente por una ANOVA y cuando hubo diferencias significativas los promedios fueron separados por la prueba de DMS. Los datos fueron presentados como promedio  $\pm$  EE.

## RESULTADOS

En la figura 1 se presentan las fechas en que ocurren las principales fenofases en *A. tequilana*, también se presenta la variación estacional de los datos climáticos de la zona como son las temperaturas promedios extremas máximas y mínimas y precipitación pluvial, en esta figura se observa que *A. tequilana* produce hojas todo el año, tomando esta variable como evidencia de crecimiento vegetativo; sin embargo la formación de hojas es mayor en invierno, que es cuando se incrementa el número de hojas desprendidas; además que su crecimiento se intensifica en este periodo (Fig. 1a). La formación de raíces nuevas conocidas como raíces de lluvia ocurre en el verano, lo cual coincide con el periodo de lluvias (junio a octubre), y la colonización de estas raíces por hongos micorrícicos comienza a mitad de julio hasta finales de octubre (Figs. 1a y b).

La precipitación pluvial registrada durante el año 2000 fue de 1009 mm, sin embargo el mayor porcentaje de precipitación (86%) se registró de julio a octubre, y el periodo de sequía se prolongó de noviembre de 1999 a abril de 2000 (Fig. 1b). Las temperaturas promedio máxima y mínima descendieron a partir de noviembre, aunque esta disminución fue mas notable para las temperaturas mínimas, ya que el descenso fue de 10°C desde noviembre de 1999 a enero de 2000 que en promedio llegó hasta los 5°C, siendo diciembre muy frío con una temperatura de 3°C. Después del invierno ambos tipos de temperatura aumentan gradualmente, en este aumento es cuando se registra el periodo más caluroso (abril-mayo) alcanzando una temperatura de 34 °C. Una vez que inicia el periodo de lluvia a finales de mayo ambas temperaturas se estabilizan (Fig. 1b).

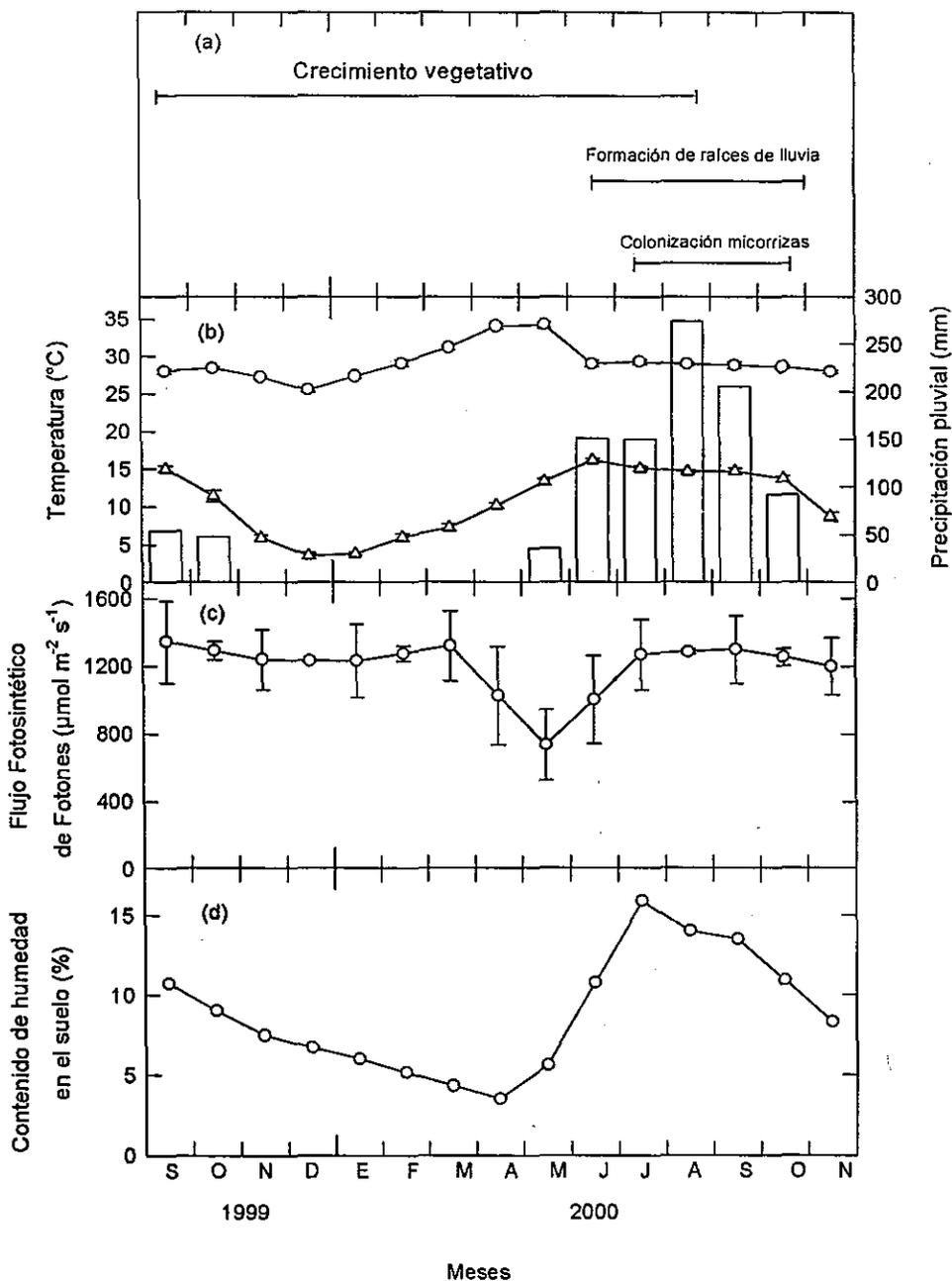


Figura 1. Fenofases y tiempo de colonización de raíces por micorrizas en *Agave tequilana* (a); temperatura promedio mensual mínima ( $\Delta$ ) y máxima (O), precipitación pluvial (barras) (b); flujo fotosintético de fotones promedio mensual (c); contenido de humedad (d) en la localidad de Las Agujas municipio de Zapopan, Jalisco. Promedios  $\pm$  ee (n=30).

El promedio de luz registrado durante el experimento fue de  $1187 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , observándose un descenso muy marcado a partir abril hasta junio (Figs. 1a y c), mientras que el contenido de humedad se incrementa a partir de este último mes que es cuando comienza el periodo de lluvias e inicia la formación de nuevas raíces posibles de colonizar (Figs. 1a y d), el contenido de humedad en promedio durante este tiempo fue de 13%, registrándose el mayor contenido en julio y agosto con 14% (Fig. 1d).

*Agave tequilana* es un planta que se ha sometido a un grado alto de manejo, desde la preparación del suelo (arado del subsuelo, arado, rastra, y encalado del suelo) que muchas veces ocasiona erosión, presentando pérdidas de humedad en los primeros años, provocando un desequilibrio de las condiciones químico-biológicas, lo cual conlleva a una pérdida de fertilidad y atraso en la adaptación de la planta al suelo. Entre otras actividades de manejo, el "barbeo" (corte de las hojas basales) y "tostoneo" (corte total del rizoma) de la semilla (plántula joven de agave) aunque tiene algunas ventajas como la eliminación u observación de avance de la enfermedad conocida como "clavo" (*Fusarium* sp.), somete a un estrés a la planta, ya que después de esta actividad se deja cicatrizar la herida mucho tiempo ("achicalado") (Valenzuela, 1997). En la Figura 2 se observa como el tiempo que tarda el "achicalado" afecta la fotosíntesis una vez que la planta es sembrada; las plantas que se "achicalaron" por 10 días tuvieron una asimilación neta diaria de  $256 \text{ mmol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  (Fig. 2a), y las plantas con cinco días presentaron una asimilación neta diaria de  $374 \text{ mmol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  (Fig. 2b); por lo que las plantas con menor tiempo de "achicalamiento" tuvieron una ganancia de carbono de 32% más que las de 10 días. En esta Figura también se observa que las plantas de 5 días registraron la asimilación neta instantánea de  $\text{CO}_2$  desde las 19h, alcanzandó hasta  $8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , mientras que las plantas de 10 días se mantuvieron cerca de cero y la asimilación se registró hasta las primeras horas del siguiente día (Figs. 2 a y b).

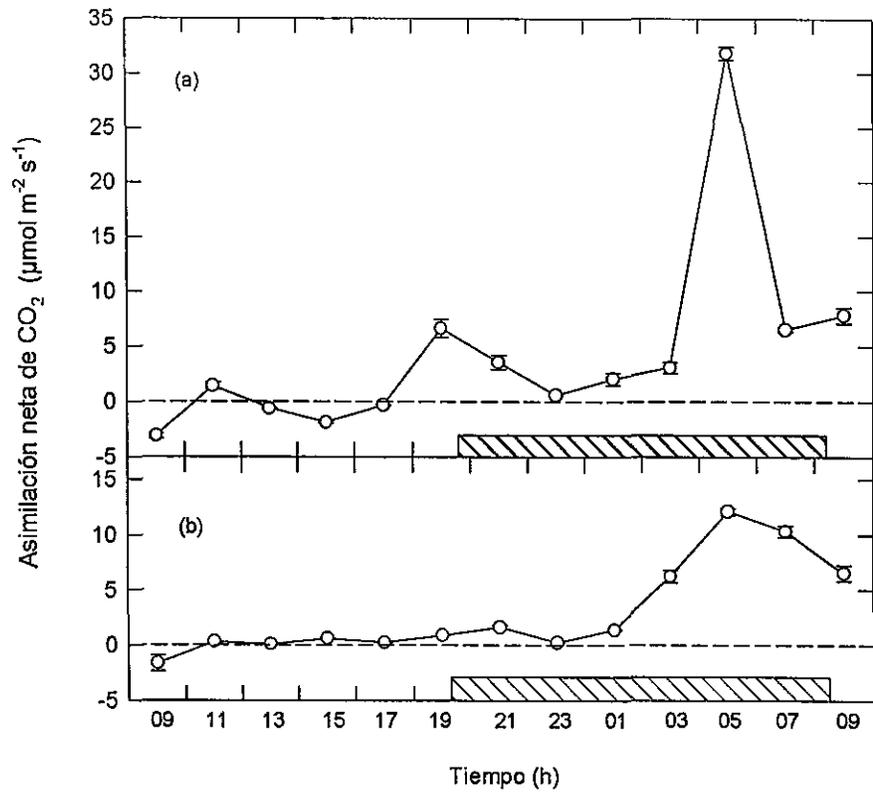


Figura 2. Asimilación neta instantánea de CO<sub>2</sub> durante 24 h en plantas jóvenes de *Agave tequilana* a los 5 días de "achicalar" (a), y los 10 días de "achicalar" (b). La barra con líneas diagonales indica el periodo nocturno.

La asimilación neta de CO<sub>2</sub> (An) para *A. tequilana* ocurre durante la noche (Figs. 3-5), los patrones estacionales mostraron diferencias en los meses de evaluación. En la mayoría de los meses fue notable la An positiva al final de la tarde continuando durante la noche y terminando durante las primeras horas del día, con excepción de noviembre de 1999 y marzo de 2000 en las plantas inoculadas con *Gf* (Fig. 3b y d), en noviembre para las plantas con *Gi* (Fig. 4b) y el testigo (Fig. 5b). La mayor tasa de asimilación de CO<sub>2</sub> durante el periodo del experimento se registró en septiembre de 1999 (Figs. 3a-5a), pero a partir de noviembre de 1999 a marzo de 2000 la An se mantuvo cercana a cero, y fue a partir de mayo de 2000 cuando en las plantas inoculadas con hongos micorrícicos incrementaron la fotosíntesis (Figs. 3e-5e) hasta noviembre de 2000, en estos meses las plantas estuvieron asimilando CO<sub>2</sub> hasta las primeras horas de la mañana, y la asimilación negativa fue muy baja.

La diferencia entre los tratamientos se observó de julio a noviembre de 2000, fecha en la que las plantas inoculadas con *Gi* (Figs. 4f-4h) mostraron una An superior a la registrada en *Gf* (Figs. 3f-3h) y el testigo (Figs. 5f-5h), sin embargo las plantas micorrizadas presentaron mayor asimilación que las no micorrizadas.

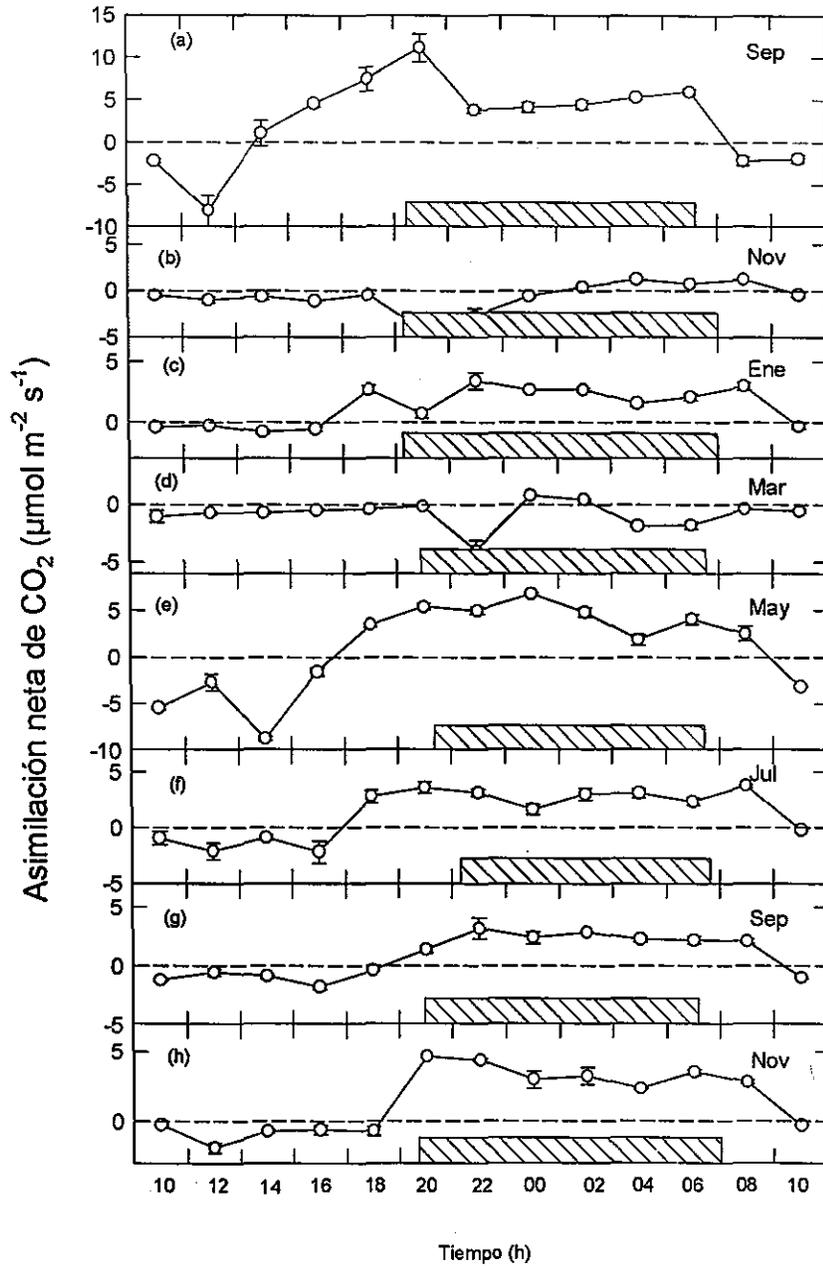


Fig. 3. Asimilación neta diaria de CO<sub>2</sub> durante 24 h en plantas jóvenes de *Agave tequilana* inoculadas con el hongo micorrícico *Glomus fasciculatum*, en 15-16 de septiembre de 1999 (a), 12-13 de noviembre de 1999 (b), 14-15 de enero de 2000 (c), 17-18 de marzo de 2000 (d), 30-31 de mayo de 2000 (e), 19-20 de julio de 2000 (f), 1-2 de septiembre de 2000 (g), y 29-30 de noviembre de 2000 (h). Los datos son promedios  $\pm$  EE (n=6).

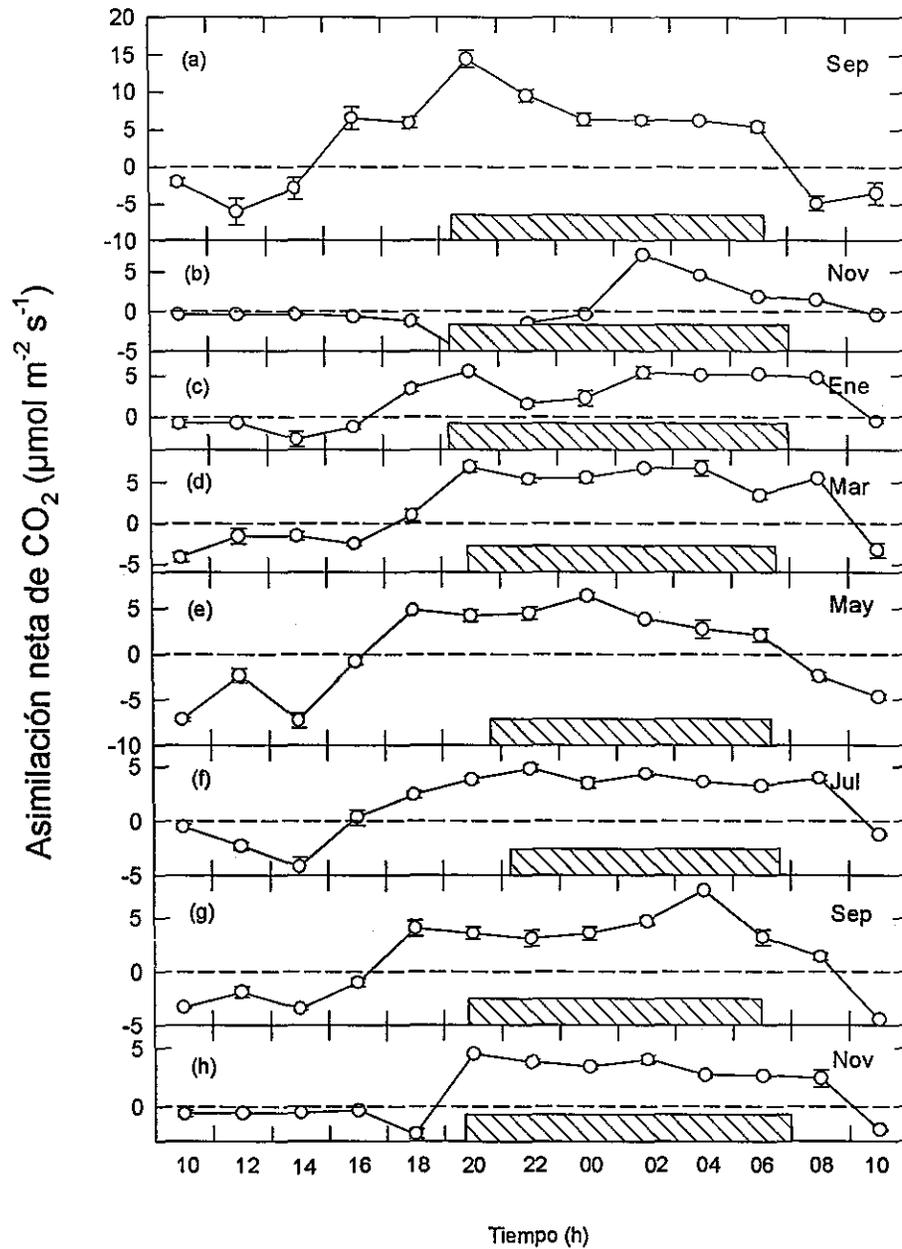


Fig. 4. Asimilación neta diaria de CO<sub>2</sub> durante 24 h en plantas jóvenes de *Agave tequilana* inoculadas con el hongo micorrícico *Glomus intraradices*, en 15-16 de septiembre de 1999 (a), 12-13 de noviembre de 1999 (b), 14-15 de enero de 2000 (c), 17-18 de marzo de 2000 (d), 30-31 de mayo de 2000 (e), 19-20 de julio de 2000 (f), 1-2 de septiembre de 2000 (g), y 29-30 de noviembre de 2000. Los datos son promedios  $\pm$  EE (n=6).

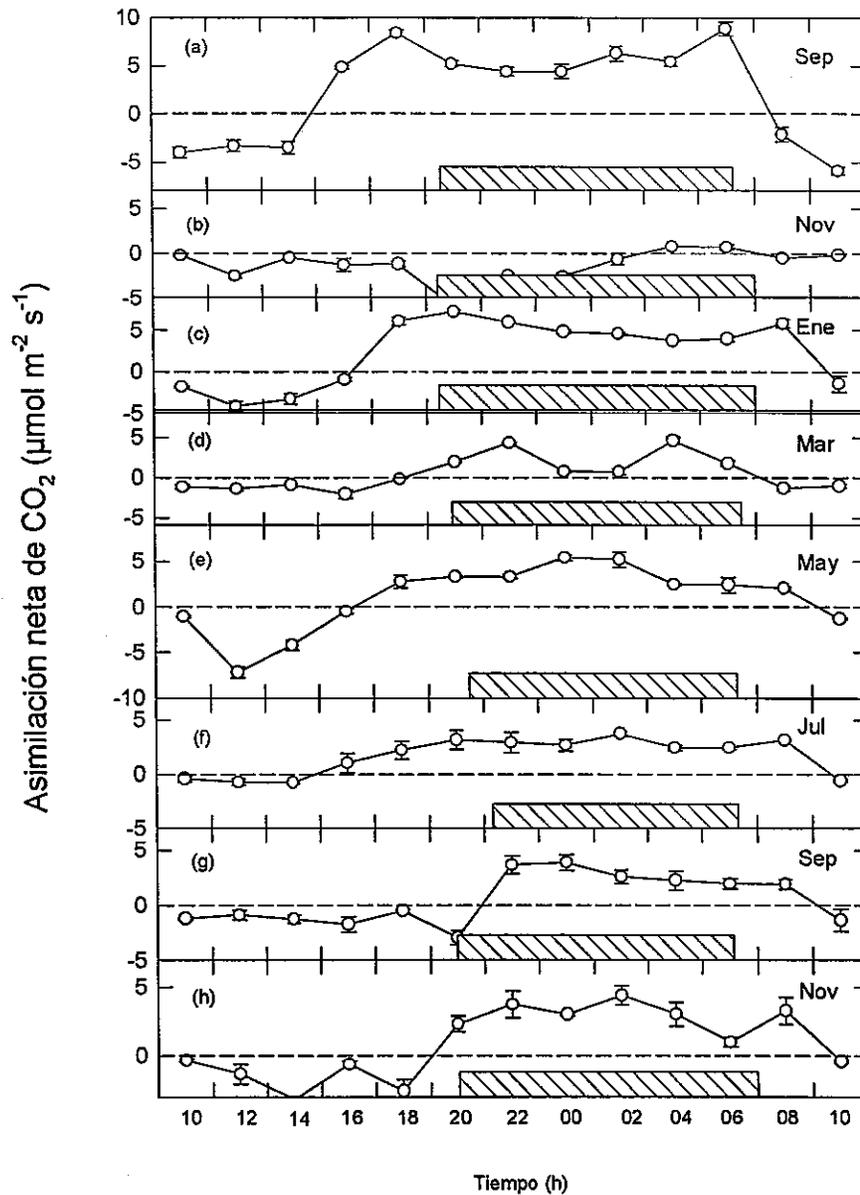


Fig. 5. Asimilación neta diaria de  $\text{CO}_2$  durante 24 h en plantas jóvenes de *Agave tequilana* sin inocular hongos micorrícicos en 15-16 de septiembre de 1999 (a), 12-13 de noviembre de 1999 (b), 14-15 de enero de 2000 (c), 17-18 de marzo de 2000 (d), 30-31 de mayo de 2000 (e), 19-20 de julio de 2000 (f), 1-2 de septiembre de 2000 (g), y 29-30 de noviembre de 2000. Los datos son promedios  $\pm$  EE (n=6).

En la tabla 1 se presentan los valores de la asimilación neta diaria de CO<sub>2</sub> (And) y la tasa máxima de asimilación CO<sub>2</sub> (Tma) de septiembre de 1999 a noviembre de 2000 en las plantas de *A. tequilana* inoculadas con las especies de hongos micorrícicos *Gf* y *Gi* en relación con el testigo. En esta tabla se observa que los valores de And fueron más altos en las plantas inoculadas con hongos micorrícicos que en el testigo, sin embargo en noviembre de 1999 la asimilación neta diaria fue negativa para las plantas inoculadas con la especie *Gf* y para el testigo, pero en enero de 2000 se incrementaron los valores de And aunque en este caso el testigo fue superior a los tratamientos, en este mes la especie de hongo que más estimuló la fotosíntesis fue *Gi*.

La Tma instantánea no mostró diferencias significativas entre los tratamientos durante el experimento, pero de noviembre de 1999 a marzo de 2000 fue menor que en el resto del año ( $4\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), después aumentó a partir de julio de 2000 cuando comenzó el periodo de lluvias y aparecen las raíces colonizables por los hongos micorrícicos, alcanzando en promedio  $6\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Para el invierno de 1999 (noviembre a marzo) la AND fue de  $78\text{ mmol m}^{-2} \text{d}^{-1}$  y para el verano de 2000 (julio-septiembre) fue de  $136\text{ mmol m}^{-2} \text{d}^{-1}$  (Tabla 1). Parte de este incremento se puede deber a que la planta requiere más energía metabólica para el transporte de minerales. Durante todo el experimento las plantas de *A. tequilana* tuvieron mejor respuesta fotosintética a la inoculación con la especie de *Gi* ya que se en estas plantas se registraron valores de Tma mayores con un 28% mas que en las inoculadas con *Gf*. El promedio anual de la And en las plantas con *Gi* fue de  $166\text{ mmol m}^{-2} \text{d}^{-1}$ , en las plantas con *Gf* fue  $96\text{ mmol m}^{-2} \text{d}^{-1}$  y las testigo  $94\text{ mmol m}^{-2} \text{d}^{-1}$ , por lo que en plantas con *Gi* fueron un 43% mas eficiente en la fotosíntesis que *Gf*, y al testigo superó casi 50%. La And positiva en *Gi* varió de  $28\text{ mmol m}^{-2} \text{d}^{-1}$  a  $320\text{ mmol m}^{-2} \text{d}^{-1}$  dependiendo de la época del año siendo mucho menor en el periodo de marzo a mayo época en que la planta sufrió un estrés por sequía (Figs. 1b y d; Tabla1).

Tabla 1. Variación estacional en la Asimilación neta diaria (And) y la Tasa máxima de asimilación (Tma) durante 24h en *Agave tequilana*.

FECHA	TRATAMIENTO	ASIMILACION NETA DIARIA (mmol m <sup>-2</sup> d <sup>-1</sup> )	TASA MAXIMA DE ASIMILACION (μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )
15-16 septiembre '99	<i>G. fasciculatum</i>	257.27ab	11.15ab
	<i>G. intraradices</i>	320.78a	14.43a
	Testigo	222.50b	8.84b
12-13 noviembre '99	<i>G. fasciculatum</i>	-34.69c	1.23b
	<i>G. intraradices</i>	28.00a	7.43a
	Testigo	-119.88b	0.71c
14-15 enero '00	<i>G. fasciculatum</i>	128.60c	4.20b
	<i>G. intraradices</i>	213.08b	5.50b
	Testigo	236.04a	7.20a
17-18 marzo '00	<i>G. fasciculatum</i>	-92.45c	0.77b
	<i>G. intraradices</i>	226.64a	6.88a
	Testigo	50.90b	4.58a
30-31 mayo '00	<i>G. fasciculatum</i>	150.35a	6.77a
	<i>G. intraradices</i>	79.53b	6.35a
	Testigo	65.54b	5.39a
19-20 julio '00	<i>G. fasciculatum</i>	122.29b	3.73b
	<i>G. intraradices</i>	187.03a	3.93b
	Testigo	126.36b	7.95a
1-2 septiembre '00	<i>G. fasciculatum</i>	84.28b	3.09b
	<i>G. intraradices</i>	116.72a	7.56a
	Testigo	96.48ab	3.86ab
29-30 noviembre '00	<i>G. fasciculatum</i>	150.40a	4.56a
	<i>G. intraradices</i>	156.28a	4.52a
	Testigo	77.91b	4.33a

Medias dentro de cada columna seguidas por diferente letra son diferencias significativas a  $P < 0.05$  según DMS.

La colonización de raíces de *A. tequilana* por hongos micorrícicos mostró diferencias significativas entre tratamientos, en las evaluaciones realizadas en julio y agosto de 1999. El tratamiento con mayor porcentaje de colonización fue *Gf* presentando un alto porcentaje en sus estructuras tanto de hifas como de vesículas comparado con *Gi* (Tabla 2). El porcentaje de colonización total durante el verano de 1999 se incrementó significativamente en un 49% de julio a agosto en *Gf* y 28% para *Gi*. Las estructuras micorrícicas de vesículas e hifas también se incrementaron en un 29 % para las dos especies de una fecha a otra, sin embargo para ambos tratamientos micorrizados el porcentaje de arbusculos fue cero (Tabla 2).

**Tabla 2. Porcentaje de colonización de raíces finas por vesículas, hifas, y arbusculos de hongos MVA en plantas de *Agave tequilana* durante el periodo julio-agosto de 1999.**

Tratamiento	Colonización (%)							
	Vesículas		Hifas		Arbusculos		Total	
	julio	agosto	julio	agosto	julio	agosto	julio	agosto
<i>G. fasciculatum</i>	44a	65a	20a	29a	0	0	40a	78a
<i>G. intraradices</i>	5b	7b	8b	11b	0	0	13b	18b
Testigo	0	0	0	0	0	0	0	0

Medias dentro de cada columna seguidas por diferente letra son diferentes significativamente a  $P < 0.05$  según DMS.

En el verano de 2000, el porcentaje de colonización micorrícica fue similar entre los tratamientos micorrizados tanto en el porcentaje total como en el de presencia de estructuras (Tabla 3). En este periodo las estructuras que más se observaron fueron hifas para las dos especies en estudio las cuales aumentaron en un 12% de julio a agosto, y se registró también la presencia de arbuscúlos representando un 10% de la colonización total.

**Tabla 3. Porcentaje de colonización de raíces finas por vesículas, hifas, y arbuscúlos de hongos MVA en plantas de *Agave tequilana* durante el periodo julio-agosto de 2000.**

Tratamiento	Colonización (%)							
	Vesículas		Hifas		Arbuscúlos		Total	
	julio	agosto	julio	agosto	julio	agosto	julio	agosto
<i>G. fasciculatum</i>	9a	12a	59a	67a	4a	7a	61a	65a
<i>G. intraradices</i>	7a	10a	57a	64a	5a	5a	59a	63a
Testigo	0	0	0	0	0	0	0	0

Medias dentro de cada columna seguidas por diferente letra son diferentes significativamente a  $P < 0.05$  según DMS.

Para este verano la evaluación del porcentaje de colonización micorrícica de prolongó hasta principios de otoño en octubre de 2000, y en esta se observó que para septiembre el porcentaje de estructuras continuó aumentando con

respecto a agosto (Tabla 4), este incremento fue del 30% para vesículas e hifas, pero en arbusculos el aumento sólo fue notable para las plantas con *Gi*, en las que se observó un 52% más con relación a agosto, y es a partir de octubre cuando la colonización se reduce hasta un 23%.

**Tabla 4. Porcentaje de colonización de raíces finas por vesículas, hifas, y arbusculos de hongos MVA en plantas de *Agave tequilana* durante el periodo septiembre-octubre de 2000.**

Tratamiento	Colonización (%)							
	Vesículas		Hifas		Arbusculos		Total	
	sept.	oct.	sept.	oct.	sept.	oct.	sept.	oct.
<i>G. fasciculatum</i>	21a	19a	83a	80a	8b	4b	90a	70a
<i>G. intraradices</i>	11b	10b	84a	81a	12a	8a	93a	72a
Testigo	0	0	0	0	0	0	0	0

Medias dentro de cada columna seguidas por diferente letra son diferentes significativamente a  $P < 0.05$  según DMS.

Con respecto a los factores que estuvieron relacionados con la colonización y fotosíntesis, en este trabajo encontramos que la temperatura del aire es uno de los factores que más influye en la An (Fig. 6). La asimilación de CO<sub>2</sub> está muy relacionada con la temperatura del aire ya que las tasas más altas fueron registradas entre los 10 y 20 °C y las temperaturas superiores a 25 °C tienden a disminuir la An. Estos valores revelan que existe una alta correlación entre la temperatura y la asimilación de CO<sub>2</sub> con una  $r^2 = 0.5$  a  $p \leq 0.5$ .

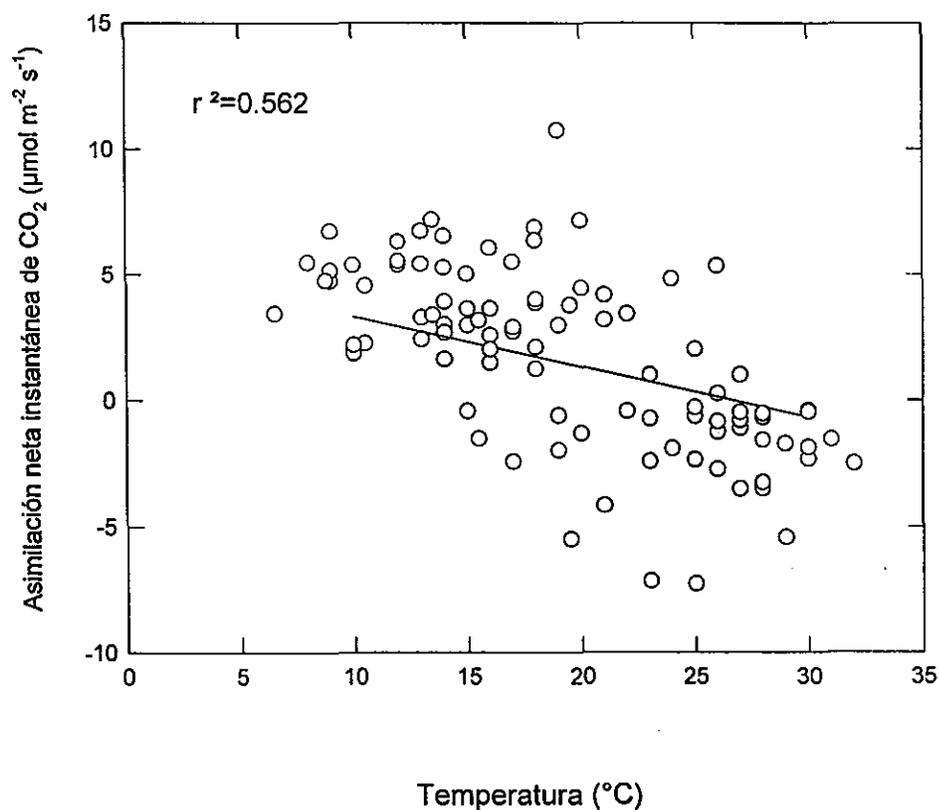


Figura 6. Relación entre la temperatura con la asimilación neta CO<sub>2</sub> en plantas jóvenes de *Agave tequilana*.

En cuanto al crecimiento, morfología y anatomía de las hojas de *A. tequilana*, en el largo y número de hojas desprendidas no hubo diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos durante el periodo de julio-agosto de 1999 que fue el periodo de mayor crecimiento, sin embargo en las plantas micorrizadas se registró un mayor crecimiento con respecto al testigo. El ancho y grosor de las hojas tampoco mostraron diferencias estadísticas. Para ambas variables los datos registrados fueron superiores en el testigo que en las plantas con hongos MVA; aunque en las plantas inoculadas con *Gi* fueron ligeramente más altos que en *Gf* y el testigo. Estadísticamente los valores del grosor de clorénquima fueron similares en las plantas inoculadas con los hongos *Gf* y *Gi*, pero fueron superiores al testigo (Tabla 5).

**Tabla 5. Crecimiento, morfología y anatomía en la hojas de *Agave tequilana*, durante el periodo de julio-agosto de 1999.**

Tratamiento	Número	Largo (cm)	Ancho (cm)	Grosor (mm)	Gros. Clorénquima (mm)
<i>G. fasciculatum</i>	16a	46b	4.93a	2.1a	1.7a
<i>G. intraradices</i>	13a	52a	4.54a	2.6a	1.6a
Testigo	12a	54a	4.89a	2.3a	0.9b

Medias dentro de cada columna seguidas por diferente letra son diferentes significativamente a  $P < 0.05$  según DMS.

Para en el segundo año de evaluación durante el periodo de julio-agosto de 2000 si se registraron diferencias en las variables morfológicas (largo de hojas) y anatómicas (grosor de clorénquima) (Tabla 6); aunque no hubo diferencias en el número de hojas, éste se duplicó con respecto al año anterior. El largo de las hojas fue superior en las plantas inoculadas con el hongo *Gi*, que en las plantas con *Gf* y el testigo. El ancho en las plantas inoculadas con *Gf* y *Gi* estadísticamente fue similar, pero ambos tratamientos fueron superiores al testigo, y en el grosor de las hojas no hubo diferencias estadísticamente. En contraste con el primer año de evaluación, el grosor de clorénquima fue superior en las plantas con *Gi* en un 20%, con respecto al testigo, pero fue estadísticamente similar con el tratamiento de *Gf* (Tablas 5 y 6).

**Tabla 6. Crecimiento, morfología y anatomía en la hojas de *Agave tequilana*, durante el periodo de julio-agosto de 2000.**

Tratamiento	Número	Largo (cm)	Ancho (cm)	Grosor (mm)	Gros. Clorénquima (mm)
<i>G. fasciculatum</i>	28a	43ab	4.1a	2.7a	0.5ab
<i>G. intraradices</i>	26a	46a	4.2a	2.7a	0.8a
Testigo	25a	38b	3.4b	2.0a	0.3b

Medias dentro de cada columna seguidas por diferente letra son diferentes significativamente a  $P < 0.05$  según DMS.

## DISCUSION

Al igual que en otras plantas que presentan metabolismo ácido de las crasuláceas (plantas MAC) como *Stenocereus queretaroensis* y *Opuntia ficus-indica*, *Agave tequilana* forma raíces finas llamadas "raíces de lluvia" (Arceta et al., 1999; Gibson y Nobel, 1986; Pimienta-Barríos y Nobel, 1998). Las "raíces de lluvia" son las que son colonizadas por hongos micorrízicos (Nobel, 1994; Pimienta-Barríos y Nobel, 1998), por lo que la colonización por hongos MVA en *A. tequilana* solo se lleva a cabo en el verano.

Las temperaturas ambientales que se registraron en el sitio de estudio pueden ser consideradas como favorables para *A. tequilana* (Pimienta-Barríos et al., 2001), con excepción a las temperaturas bajas ( $\leq 5$  °C) que prevalecieron durante el otoño y el invierno, lo cual causó daño en el tejido fotosintético, y por consiguiente en la asimilación de CO<sub>2</sub>. Este cambio de temperaturas fue brusco por lo que no fue posible que las plantas experimentales se aclimataran rápidamente. Estas temperaturas también se han registrado como no favorables para el establecimiento de los hongos MVA (Bethlenfalvay et al., 1984; Raju et al., 1990). El promedio de luz que se registró durante el experimento fue similar a las registradas por Arceta, et al. (1999), pero ligeramente alta comparado con otros estudios en *A. tequilana* (Pimienta-Barríos et al., 1999), en *Stenocereus queretaroensis* y *Opuntia ficus-indica* (Pimienta-Barríos et al., 2000), sin embargo los valores promedios mensuales son considerados como favorables para la fotosíntesis (Pimienta-Barríos et al., 1999, 2000) y para el establecimiento de la colonización de hongos MVA (Miller, 1987).

Las condiciones de humedad del suelo obtenidas en este trabajo son similares a las encontradas por Bethlenfalvay et al. (1984), lo cual incrementa la disponibilidad de los recursos del suelo y al mismo tiempo aumenta la superficie explorada por las raíces micorrizadas, y por consiguiente la absorción de minerales (principalmente fósforo) para el desarrollo y crecimiento de las plantas

(Cui y Nobel, 1992; Gianinazzi y Schüepp, 1994; Smith y Smith, 1996; Smith y Read, 1997; Aguilera, 1998).

La mayor tasa fotosintética que se registró en los hijuelos poco después de ser transplantados ocurrió durante las primeras horas del día (3 y 7 hrs), tiempo en que las temperaturas son más favorables para la fotosíntesis (12-16 °C; Pimienta-Barrios et. al., 1999; 2001). Estos resultados se obtuvieron aún cuando las plántulas se colocaron en la sombra un tiempo menor que el recomendado para el manejo de plántulas (dos a tres semanas; Valenzuela, 1997).

Con respecto a las mediciones de la asimilación de CO<sub>2</sub> por tratamientos se observa que la inoculación con hongos micorrícicos favoreció la And de *A. tequilana*. En la mayoría de las fechas se detectó que el hongo micorrícico *Gi* incrementó la toma de carbono en comparación con *Gf* y con el testigo. Este tipo de respuesta se ha registrado *Agave deserti* (Bethlenfalvay et al., 1984; Brown y Bethlenfalvay, 1988), *Zea mays*, *Festuca rubra* y *Poa pratensis* (Enkhtuya et al., 2000), *Musa sapientum* (Plenchette, 2000) y *Sorghum bicolor* (Raju et al., 1990), especies que como *A. tequilana* también son monocotiledoneas; y en cítricos (Nemec et al., 1981)

Para el caso de las plantas con hongos micorrícicos varios investigadores han encontrado que durante las primeras etapas de colonización, el hongo se comporta como parásito y no como simbiote (Allen, 1996; Smith y Smith, 1996; Gianinazzi y Schüepp, 1994), sobre todo en etapas de sucesión vegetativa (Titus y Del Moral, 1998). Asimismo, cuando la temperatura y la intensidad de luz son bajas el efecto de los hongos MVA sobre el crecimiento de la planta hospedera es negativo, ya que la fotosíntesis se reduce y el consumo de carbono por el hongo puede ser excesivo comparado con la toma de fósforo por la planta debido a que en estas condiciones la formación de arbusculos se ve afectada más que la colonización total (So y Smith, 1988; Miller, 1987), ya que la simbiosis micorrícica induce altas velocidades de respiración en la interfase suelo-raíz lo que representa un alto costo de carbono para la planta (Peng et al., 1993; Graham et al., 1996).

A pesar de que en invierno la fotosíntesis fue muy baja, una vez que las raíces de las plantas fueron colonizadas por hongos micorrícicos en el verano se incrementó la And. Este aumento en la actividad fotosintética se puede deber a que la planta requiere más energía metabólica (respiración y transporte de minerales), para otras biosíntesis, así como el desarrollo de nuevas hojas o brotes (Larcher, 1995; Salisbury y Ross, 1992). Parte de la respuesta en el incremento de la asimilación de CO<sub>2</sub> en las plantas de *A. tequilana* se atribuye a que esta depende fisiológicamente del hongo micorrícico. La dependencia micorrícica está definida como el incremento de biomasa en peso seco de las plantas micorrizadas comparada con la biomasa de las plantas no micorrizadas (Lambers, 1998). Aunque en este trabajo el incremento se evaluó en términos fotosintéticos, ya que es a partir de este proceso del cual derivan los principales componentes de la biomasa principalmente carbohidratos (Salisbury y Ross, 1992; Larcher, 1995). Además las micorrizas comúnmente aumentan la actividad fotosintética. No obstante el efecto de las micorrizas en las fotosíntesis ha sido poco estudiada en condiciones de campo (Mathur y Vyas, 1995). Se ha reportado que los hongos micorrícicos incrementan el crecimiento, debido a que la micorriza produce cambios en la producción y repartición de la fotosíntesis (Syvertsen y Graham, 1990).

La And varió de 28 mmol m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> a 320 mmol m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>, lo cual difiere de los datos obtenidos por Pimienta-Barrios et al. (1999) en *A. tequilana*, en plantas maduras en condiciones de campo. Este autor reporta que la And más baja fue de 141 mmol m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> y la más alta de 921 mmol m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>; con respecto a estos resultados cabe mencionar que en el experimento que realizamos no se aplicaron fertilizantes ni riego y no se realizaron podas, en contraste con el trabajo realizado en las plantas maduras las cuales fueron sometidas a un manejo intensivo. De esta manera, las condiciones en que se llevó a cabo este trabajo fue para que los hongos micorrícicos expresaran su capacidad de toma de recursos del suelo con un manejo mínimo.

En el primer periodo de evaluación *Gf* fue la especie en la que se registró mayor porcentaje de colonización de las raíces en comparación con *Gi*, sin embargo esta última fue la que presentó mayor actividad fotosintética. En ambos tratamientos micorrizados no se encontraron arbuscúlos, probablemente se deba a que estas estructuras son de ciclo muy corto (de 4 a 5 días), por lo que probablemente los muestreos no coincidieron con la presencia de esta estructura micorrícica. Los arbuscúlos, en comparación con hifas y vesículas, son consideradas como estructuras efímeras, y se relaciona como un tipo de control de la planta sobre la morfogénesis del hongo dentro de sus raíces (Alexander et al., 1988), además que la proporción arbusculo-vesículas puede estar relacionada con los cambios de estación (Titus y Leps, 2000).

Con relación a los factores que estuvieron relacionados con la colonización y fotosíntesis, la temperatura fue uno de ellos, ya que las mejores tasas de asimilación de CO<sub>2</sub> ocurrieron entre los 10 a 20°C, temperaturas han sido reportadas como óptimas (20 y 25°C) y en las que se ha encontrado mejor respuesta de colonización (Bethlenfalvay et al., 1984; Raju et al., 1990). Esta relación puede deberse a que el hongo le proporciona a la planta minerales, por lo que ésta requiere de producir más fotosintatos para mantener al hongo lo que se conoce como compatibilidad funcional, (Zhu et al., 2000).

Por otro lado, la morfología y anatomía de las hojas de *A. tequilana*, muestran que las plantas micorrizadas se benefician en el aumento en el grosor de clorénquima con respecto a las no micorrizadas. La morfología y el número de hojas desprendidas no mostró diferencias significativas entre los tratamientos durante el periodo de mayor crecimiento (julio-agosto de 1999), estos resultados pueden deberse a que la simbiosis micorrícica en las primeras etapas principalmente se realiza el establecimiento y reconocimiento del hongo y la planta (Allen, 1996; Smith y Smith, 1996). Los resultados obtenidos para la segunda evaluación de la anatomía y morfología revelan que la mayoría de las plantas que crecen en condiciones de aridez desarrollan adaptaciones anatómico-fisiológicas aumentando el tejido de parénquima en empalizada y reduciendo el

parénquima esponjoso para disminuir la cantidad de superficie interna expuesta al aire y a la evaporación (Esau, 1976) para condiciones de estrés hídrico, además que las plantas micorrizadas estimulan el incremento de las variables fisiológicas y anatómicas en comparación de las que no lo están, lo cual indica que la simbiosis micorrícica prepara a la planta para soportar este estrés (Bildusas et al., 1986; Davies et al., 1993) tanto en condiciones de campo como de invernadero, asimismo que se ha encontrado que las hojas de las plantas hospederas modifican sus tejidos engrosándolos para tener una mayor superficie de receptividad de luz (Imhof, 1999); por lo que se puede deducir en este trabajo que el aumento en grosor de clorénquima ayudó a soportar la sequía del primer año de establecimiento del experimento y permitió que la tasa fotosintética fuera mayor en el tratamiento micorrizado. En ambos periodos las diferencias morfológicas y anatómicas entre los tratamientos no fueron marcadas, pero las plantas inoculadas con *Glomus intraradices* estadísticamente presentaron las tasas mas altas de An y mayores valores de las características anatómicas y morfológicas que el proporcionan mejores condiciones para soportar condiciones de estrés, estos resultados fueron similares a los que se encontraron en plantas de fresa por Guerrero (1999), pero difieren de los encontrados por Amal de Silva et al. (1996) con la misma especie de hongo micorrícico también en fresa.

## CONCLUSIONES

La temperatura del aire, la intensidad de luz, y el contenido de agua en el suelo son los factores que más influyen en la fotosíntesis y en la colonización de hongos micorrícicos, ya que bajo condiciones moderadas de luz y temperaturas se obtienen mejores resultados en la actividad fotosintética y mayor porcentaje de colonización en *Agave tequilana*.

El manejo de las plantas de *Agave tequilana* influye en la actividad fotosintética por lo que para disminuir problemas por estrés es necesario mantener a las plantas fuera de cualquier factor que pueda aumentar el estrés hídrico, y disminuir el periodo de cicatrización, asimismo reducir las prácticas agrícolas ya que estas afectan la colonización de hongos micorrícicos.

La asimilación de CO<sub>2</sub> en las plantas de agave estuvo relacionadas con el porcentaje de colonización y con las temperaturas moderadas, y aunque las condiciones ambientales fueron iguales *Agave tequilana* solo respondió a la especie de hongo *G. intraradices*, esta especificidad es propia de cada especie de planta y hongo (compatibilidad funcional). Durante el primer período de crecimiento de *Agave tequilana* (en el primer año de experimento) la asimilación de CO<sub>2</sub> y el porcentaje de colonización de hongos MVA fue baja probablemente debido a que en las primeras etapas de colonización el hongo y la planta se están reconociendo y actúa como parásito.

La anatomía de *Agave tequilana* se vio favorecida por la colonización, ya que el tejido fotosintético aumento en los tratamientos con micorrizas que en el testigo, este aumento lo hace la planta para tener mayor superficie de receptividad y asimilar mas CO<sub>2</sub>. Estos resultados son comparables con previos estudios.

**BLIBLIOGRAFIA**

- Aguilera, G. L. I. 1998. Influencia de las micorrizas arbusculares en el crecimiento, desarrollo e intercambio gaseoso de *Zea mays* L. (maíz) y *Capsicum annuum* L. (chile ancho). Tesis doctoral. CINVESTAV-IPN, Unidad. 101p.
- Alexander , T., R. Meier, R. Toth, y H. C. Weber. 1988. Dynamics of arbuscule development and degeneration in mycorrhizas of *Triticum aestivum* L. and *Avena sativa* L. with reference to *Zea mays* L. *New Phytol.* 110: 363-370.
- Allen, F. M. 1996. The ecology of mycorrhizae. Cambridge Press. 184p.
- Amal de Silva, K., K. Patterson y J. Mitchell. 1996. Endomycorrhizae and growth of "sweetheart" strawberry seedlings. *HortScience.* 31 (6): 951-954.
- Arceta, G. I. E., E. Pimienta-Barrios, J. Zañudo-Hernández, V. Olalde. 1999. Caracterización fenológica y fisiológica de una población silvestre de pitayo *Stenocereus queretaroensis* (Weber) Buxbaum asociada con micorrizas vesiculo-arbusculares. *Agrociencia.* 33(1): 91-98.
- Azcón-Aguilar, C. y C. Bago. 1994. Physiological characteristics of the host plant promoting an undisturbed functioning of the mycorrhizal symbiosis. *In:* Gianinazzi, S. y H., Schüepp (eds). Impact of arbuscular micorrizas on sustainable agriculture an natural ecosystems. Ed. Birkhäuser Verlag. Switzerland. pp47-59.
- Barbera, G. F., F. Carimi, y P. Inglese. 1992. Physical, morphological and chemical changes during fruit development and ripening in three cultivars of prickly pear, *Opuntia ficus-indica* (L). Miller. *J. Hort. Sci.* 67:307-312.

- Barker, S. J., D. Tagu, y G. Delp. 1998. Regulation of root and fungal morphogenesis in mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiol.* 116: 1201-1207.
- Bethlenfalvai, G. J., S. Dakessin, y R. S. Pacovsky. 1984. Mycorrhizae in a southern California desert: ecological implications. *Ca. J. Bot.* 62: 519-524.
- Bethlenfalvai, G. J., y R. G. Lidermann. 1992. Mycorrhizae in sustainable agriculture. *Am. Soc. Agron. Special publication 54*, Madison, WI.
- Bildusas, I. J., R. K. Dixon, F. L. Pflieger y E. L. Stewart. 1986. Growth, nutrition and gas exchange of *Bromus inermis* inoculated with *Glomus fasciculatum*. *New Phytol.* 109: 167-170.
- Brundrett, M. C., L. Piché, y R. I. Peterson. 1985. A developmental study of the early stages in vesicular-arbuscular mycorrhiza formation. *Can. J. Bot.* 63: 184-194.
- Brown, M. S. y G. J. Bethlenfalvai. 1988. The *Glycine-Glomus-Rhizobium* symbiosis. VII. Photosynthetic nutrient-use efficiency in nodulated mycorrhizal soybeans. *Plant Physiol.* 86:1292-1297.
- Consejo Regulador del Tequila. 1999. Anuario estadístico de producción del sistema agave-tequila. Guadalajara, Jalisco. México.
- Cui, M. y P. S. Nobel. 1992. Nutrient status, water uptake and gas exchange for three desert succulents infected with mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 122: 643-649.

- Davies, F.T. Jr., J. R. Potter y R. G. Linderman. 1993. Drought resistance of mycorrhizal pepper plants independent of leaf P concentration-response in gas exchange and water relations. *Physiol. Plantarum*. 87: 45-53.
- Enkhtuya, B., J. Rydlová y V. Vosátka. 2000. Effectiveness of indigenous and non-indigenous isolates of arbuscular mycorrhizal fungi in soils degraded ecosystems and man-made habitats. *Appl. Soil. Ecol.* 14: 201-211.
- Eastman, J. R. 1993. IDRISI Ver. 4.1. Technical Reference. Clark University-Graduate School of Geography. Massachusetts, USA. 229p.
- Esau, K. 1976. Anatomía vegetal De. Omega. Barcelona, España. 779p.
- Gentry, H. S. 1982. Agaves of continental North America. University of Arizona Press, Tucson Arizona. pp382-586.
- Gianinazzi-Pearson, V. 1996. Plant cell responses to arbuscular mycorrhizal fungi: getting to the roots of the symbiosis. *The Plant Cell*. 8:1871-1883.
- Gianinazzi, S. y H., Schüepp. 1994. Impact of arbuscular micorrizas on sustainable agriculture an natural ecosystems. Ed. Birkhäuser Verlag. Switzerland. 226 p.
- Gibson, A. C. y P. S. Nobel. 1986. The cactus Primer. Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts. 240p.
- Giovannetti, M. y A. S. Citeresi. 1993. Time-course of a pre-ressorium formation on host plants by arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycol. Res.* 97:1140-1142.

- Giovannetti, M., C. Sbrana, y C. Logi. 1994. Early processes involved in host recognition by arbuscular mycorrhizal fungi. *New phytol.* 97:227-284
- Guerrero, G. N. K. 1999. Fisiología y anatomía de plantas de fresa micropropagadas y micorrizadas. Tesis de Maestría. CINVESTAV-IPN, Unidad. 76p.
- Graham, J. H., D. L. Drouillard, y N. C. Hodge. 1996. Carbon economy of sour orange in response to different *Glomus* spp. *Tree Physiol.* 16: 1023-1029.
- Harley, J. L. y S. E. Smith. 1983. Mycorrhizal symbiosis. Academic Press. New York.
- Hoffman, C. A. y C. R. Carroll. 1995. Can we sustain the biological basis of agriculture?. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 26: 69-92.
- Imhof, S. 1999. Anatomy and mycotrophy of the achlorophyllous *Afrothismia winkleri*. *New Phytol.* 144: 533-540.
- Jensen, W. A. 1962. Botanical histochemistry. W. H. Freeman and Co. San Francisco, CA. 260p.
- Kluge, M. 1979. Photosynthesis II photosynthetic, carbon metabolism and related process, The flow of carbon in Crassulacean acid Metabolism (CAM). *In: Gibbs, M. y E. Latzko. Encyclopedia of plants physiology. New series. Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo. Tomo 2. Ed Springer-Verlag. pp 113-125.*
- Lambers, H., F. S. Chapin III, y T. L. Pons. 1998. Plant physiological ecology. Springer-Verlag. New York. 540p.

- Larcher, W. 1995. Physiological plant ecology. 3a edición. Springer-Verlag Press. 506p.
- Luna, R. 1991. La historia del tequila, de sus regiones y sus hombres. Consejo Nacional para la Cultura y las Artes. México, D.F. 302p.
- Mathur, N. y A. Vyas. 1995. Influence of mycorrhizae on net photosynthesis and transpiration of *Ziziphus mauritiana*. J. Plant physiol. 147: 328-330.
- McGonigle, T. P., M. H. Miller, D. G. Evans, G. L. Fairchild y J. A. Swan. 1990. A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytol. 115:495-501.
- Miller, R. M. 1987. The ecology of vesicular-arbuscular mycorrhizae in grass- and shrub-lands. In: Safir, G. Ecophysiology of VA mycorrhizal plants CRC Press, Boca Raton. pp135-171.
- Nemec, S., J. A. Menge, R. G. Platt, y E. L. V. Johnson. 1981. Vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with citrus in Florida and California and notes on their distribution and ecology. Mycologia. 73: 112-125.
- Nobel, P. S. 1985. PAR, water and temperature limitations on the productivity of cultivated *Agave fourcroydes* (henequen). J. Appl. Ecol. 22: 157-173.
- Nobel, P. S. 1994. Remarkable agaves and cacti. Cambridge University Press. New York. USA. 166p.
- Nobel, P. S. y T. L. Hartsock. 1976. Watering converts a CAM plants to daytime CO<sub>2</sub> uptake. Nature. 262 (5569): 574-576.

- Nobel, P. S. y A. G. Valenzuela. 1986. Environmental responses and productivity of the CAM plant, *Agave tequilana* W. *Agricultural Forest Meteorology*. 39: 319-334.
- Peng, S., D. M. Eissenstat, J. H. Graham, K. Williams, y N. C. Hodge. 1993. Growth depression in mycorrhizal citrus at high-phosphorus supply. *Plant Physiol*. 101: 1063-1071.
- Phyllips, J. M. y D. S. Hayman. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 55:158-161.
- Pfeiff, M. 1995. El tequila, regalo del sol. *Selecciones del Reader's digest*. México. pp59-65.
- Pimienta-Barrios, E. y P. S. Nobel. 1998. Vegetative, reproductive, and physiological adaptations to aridity of pitayo (*Stenocereus queretaroensis* (Weber Buxbaum). *Econ. Bot.* 52: 391-401.
- Pimienta-Barrios, E., C. Robles-Murguía, J. A. Ruíz-Corral, P. S. Nobel, y J. García-Galindo. 1999. Regiones térmicas óptimas y marginales para el cultivo de *Agave tequilana* en el estado de Jalisco. Ed. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jalisco. 47p.
- Pimienta-Barrios, E., J. Zañudo, E. Yopez, E. Pimienta-Barrios, y P.S. Nobel. 2000. Seasonal variation of net CO<sub>2</sub> uptake for cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) and pitayo (*Stenocereus queretaroensis*) in a semi-arid environment. *J. Arid. Env.* 44: 73-83.

- Pimienta-Barrios, E, C. Robles-Murguía, y P. S. Nobel. 2001. Net CO<sub>2</sub> uptake for *Agave tequilana* in a warm and a temperate environment. *Biotropica*. 33(2): 312-318.
- Plenchette, C. 2000. Receptiveness of some tropical soils from banana fields in Martinique to the arbuscular fungus *Glomus intraradices*. *Appl. Soil. Ecol.* 15:253-260.
- Raju, P. S., R. B. Clark, J. R. Ellis, y J. W. Maranville. 1990. Effects of VA-mycorrhizal fungi on growth and mineral uptake of sorghum at different temperatures. *Plant and soil*. 121: 165-170.
- Salisbury, F. B. y C. W. Ross. 1992. *Plant Physiology*. 4<sup>th</sup> edition. Wadsworth, Belmont, CA. 759p.
- Schenck, N. C. y Y. Pérez. 1990. *Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi*. 3a edition.
- Smith, S. E. y F. A. Smith. 1990. Structure and function of the interfaces in biotrophic symbiosis as they related to nutrient transport. *New Phytologist*. 114-138.
- Smith F. A. y S. E. Smith. 1996. Mutualism and parasitism: Diversity in function and structure in the "arbuscular" (VA) mycorrhizal symbiosis. *Advances in Botanical Research*. Vol. 22. pp 1-43.
- Smith, S. E. y D. J. Read. 1997. *Mycorrhizal symbiosis*. 2<sup>a</sup> ed. Academic Press. San Diego, Cal. USA. pp 11-32.

- So, C. L. y S. E. Smith. 1988. Mycorrhizal growth responses: interactions between photon irradiance and phosphorus nutrition. *New Phytol.* 108: 305-314.
- Syvertsen, J. P. y J. H. Graham. 1990. Influence of vesicular arbuscular mycorrhizae and leaf age on net gas exchange of Citrus leaves. *Plant Physiol.* 94: 1424-1428.
- Tester, M., S. E. Smith, F. A. Smith y N. A. Walker. 1986. Effects of photon irradiance on the growth of shoots and roots, on the initiation of mycorrhizal infection and on the growth units in *Trifolium subterraneum* L. *New Phytol.* 103: 375-390.
- Titus, H. J. y R. Del Moral. 1998. The role of mycorrhizal fungi and microsites in primary succession on St. Helens. *Amer. J. of Bot.* 85(3): 370-375.
- Titus, H. J. y J. Leps. 2000. The response of arbuscular mycorrhizae to fertilization, mowing, and removal of dominant species in diverse oligotrophic wet meadow. *Amer. J. Bot.* 87(3): 392-401.
- Torres, R. E. 1984. Manual de conservación de suelos agrícolas. Ed. Diana. México. 180p.
- Valenzuela, Z. A. G. 1994. El agave tequilero, su cultivo e industrialización. Monsanto. Guadalajara, Jalisco. México. pp9.
- Valenzuela, Z. A. G. 1997. El agave tequilero, su cultivo e industria. Litteris editores. 204p.
- Vandermeer, J. 1995. The ecological basis of alternative agriculture. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 26: 201-224.

Zhu, Y. G., A. S. Laidlaw, P. Christie y M. E. R. Hammond. 2000. The specificity of arbuscular mycorrhizal fungi in perennial ryegrass-white clover pasture. *Agr. Eco. Env.* 77: 211-218.