



Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez

---

---

**“EVALUACIÓN DE BIOFERTILIZANTES EN LA SOBREVIVENCIA DE  
PLANTAS DE AGAVE AMERICANA L. OBTENIDOS POR  
MICROPROPAGACIÓN”**

**RESIDENCIA PROFESIONAL**

**INGENIERÍA QUÍMICA**

**ELABORO:**

ORQUIDIA SEMIRAMIS PASCACIO ZENTENO

**ASESOR INTERNO:**

DR. FEDERICO ANTONIO GUTIÉRREZ MICELI

**REVISORES:**

Q.B.P EUCARIO ZENTENO VELASCO

ING. LUIS ALBERTO JIMENEZ ZEBADUA

TUXTLA GUTIÉRREZ CHIAPAS

DICIEMBRE 2012

## CUADRO DE CONTENIDO

LISTA DE ILUSTRACIONES.....	i
LISTA DE CUADROS.....	ii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. JUSTIFICACIÓN.....	3
3. OBJETIVOS.....	4
3.1 Objetivo General.....	4
3.2 Objetivos Específicos.....	4
4. CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DE TRABAJO.....	5
5. PROBLEMA A RESOLVER.....	5
6. ALCANCES.....	5
7. LIMITACIONES.....	5
8. ANTECEDENTES.....	6
8.1 Agave.....	6
8.1.1 Importancia histórica y aprovechamiento.....	6
8.1.2 Descripción de la planta.....	7
8.1.3 Distribución.....	7
8.1.4 Taxonomía.....	8
8.1.5 Morfología, fisiología y entorno.....	8
8.2 <i>A. americana</i> L.....	9
8.2.1 Descripción de <i>A. americana</i> L.....	9
8.3 Biofertilizantes.....	11
8.3.1 Producción orgánica.....	11
8.3.2 Diversidad microbiana.....	12
8.4 Hongo Micorrizico Arbuscular.....	14

8.4.1 Características generales de los Hongos micorrizicos arbusculares .....	14
8.4.2 Clasificación de los Hongos micorrizicos arbusculares.....	16
8.4.3 Desarrollo de la simbiosis planta-hongo .....	17
8.5 Vermicomposta .....	20
8.6 Clorofila .....	23
8.6.1 Fotosíntesis .....	23
8.6.2 Procesos básicos de la fotosíntesis.....	23
8.6.3 El cloroplasto.....	23
8.6.4 Reacciones Luminosas.....	24
8.7 Publicaciones Recientes.....	28
9. MATERIALES Y METODOS .....	30
9.1 Materiales biológicos.....	30
9.1.1 Material Vegetal .....	30
9.1.2 Hongo micorrizico arbuscular .....	30
9.1.3 Vermicomposta .....	30
9.1.4 Unidades experimentales.....	31
9.2 Diseño experimental.....	31
9.3 Aclimatación .....	33
9.3.1 Obtención de explantes micropropagados de <i>A. americana L.</i> .....	33
9.3.2 Limpieza y desinfección de los explantes.....	33
9.3.3 Preparación de las unidades experimentales .....	33
9.3.4 Siembra y aclimatación.....	33
9.4 Evaluación del contenido de clorofila .....	35
9.4.1 Medición de parámetros físicos de las plántulas de <i>A. americana L.</i> .....	35
9.4.2 Clorofila .....	36
9.5 Análisis estadísticos de los resultados.....	36

10. RESULTADOS .....	37
10.1 Medición de parámetros físicos de las plántulas de <i>A. americana</i> L. ....	38
10.1.2 Peso Fresco. ....	40
10.1.3 Altura de la planta .....	41
10.1.4 Diámetro de tallo .....	42
10.1.5 Número de hojas .....	43
10.1.6 Longitud de raíz.....	44
10.1.7 Área foliar total.....	45
10.1 Evaluación de contenido de clorofila.....	46
11. DISCUSIÓN.....	52
12. CONCLUSIÓN .....	54
13. BIBLIOGRAFIA .....	55
14. ANEXOS .....	59
14.1 Anexo A. Tabla del área foliar por hoja en los 9 tratamientos.....	59
14.2 Anexo B. Tabla fotografías de plántulas de <i>A. americana</i> L. ....	63

## LISTA DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Plantas de <i>Agave americana</i> de la región de Comitán, Chiapas.....	10
Ilustración 2. La taxonomía actual del HAM con ejemplos de las esporas producidas por diferentes géneros en el suelo (Quilambo, 2003). .....	16
Ilustración 3. Arbúsculo y vesículas de HMA en raíces colonizadas (Barrer, 2009) .....	18
Ilustración 4. Tipos de asociación micorrizica arbuscular (Barrer, 2009). .....	19
Ilustración 5. Dos modos de la transferencia energética tras la fotoexcitación (Mathews et al., 2001). .....	26
Ilustración 6. Transferencia de energía de resonancia en un complejo de captación de luz (Mathews et al., 2001) .....	27
Ilustración 7. <i>A. americana</i> L. obtenido micropropagadas por organogénesis indirecta. ..	30
Ilustración 8. Muestras en la cámara bioclimática cubiertas con bolsas de polietileno .....	34
Ilustración 9. Muestras en el invernadero cubiertas con bolsas de polietileno perforadas.	34
Ilustración 10. Muestras en el invernadero sin bolsas de polietileno. ....	35
Ilustración 11. Grafica de densidad suavizada para peso fresco (PF) .....	41
Ilustración 12. Grafica de densidad suavizada para peso fresco (PF) .....	42
Ilustración 13. Grafica de densidad suavizada para diámetro de tallo (DT) .....	43
Ilustración 14. Grafica de densidad suavizada para número de hojas (NH).....	44
Ilustración 15. Grafica de densidad suavizada para longitud de raíz (LR) .....	45
Ilustración 16. Grafica de densidad suavizada para área foliar total (AFT) .....	46
Ilustración 17. Efectos estandarizados del contenido de clorofila en plántulas de <i>A. americana</i> L.....	49
Ilustración 18. Grafica de efectos del HMA y la vermicomposta sobre el contenido de clorofila de las plántulas de <i>A. americana</i> L.....	50
Ilustración 19 Gráfica de superficie de respuesta para estimar los efectos de los HMA y la vermicomposta en el contenido de clorofila de las plántulas de <i>A. americana</i> L.....	51

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Principales usos de importancia socioeconómica y agroecológica del <i>Agave</i> (García <i>et al.</i> , 2010) .....	6
Cuadro 2. La clasificación taxonómica actual del género <i>Agave</i> . (Ruíz, 2012) .....	8
Cuadro 3. Ubicación de localidades con plantaciones de <i>A. americana</i> (Reynoso <i>et al.</i> 2012). .....	11
Cuadro 4. Trabajos aplicativos del empleo de HMA en micropropagación (Kapoor <i>et al.</i> , 2008).....	15
Cuadro 5 Composición de la vermicomposta. ....	30
Cuadro 6 Factores y niveles que se utilizaron en el diseño de tratamientos.....	31
Cuadro 7 Diseño experimental.....	31
Cuadro 8. Datos obtenidos en la medición de los parámetros de crecimiento. ....	38
Cuadro 9. Resumen estadístico de peso fresco (PF).....	40
Cuadro 10. Resumen estadístico de altura de la planta (AT) .....	41
Cuadro 11. Resumen estadístico de diámetro de tallo (DT) .....	42
Cuadro 12. Resumen estadístico de número de hojas (NT) .....	43
Cuadro 13. Resumen estadístico de longitud de raíz (LR).....	44
Cuadro 14. Resumen estadístico del área foliar total (AFT) .....	46
Cuadro 15. Datos obtenidos en la medición de clorofila .....	47
Cuadro 16. Análisis de varianza para comparar las medias de los resultados del contenido de clorofila de los explantes de <i>A. americana</i> L. ....	49
Cuadro 17. Valor óptimo para maximizar el contenido de clorofila en una región indicada. ....	51

## 1. INTRODUCCIÓN

De entre las numerosas familias botánicas que constituyen la clase Monocotiledóneas (plantas de un solo cotiledón) las Agaváceas resaltan por su utilidad (Valencia, 2009). México es considerado centro de origen y de diversidad de los agaves. No se tiene claro cuántas especies se han documentado actualmente, pero se considera que el 75% de todas las especies se encuentran en nuestro país y 55% crecen exclusivamente aquí, lo que muestra la gran importancia biológica dentro del territorio nacional (García *et al.*, 2010).

Los agaves han tenido y tienen una gran importancia económica y cultural para numerosos pueblos indígenas y mestizos, que los han aprovechado durante siglos como fuente de alimento, bebida, medicina, combustible, cobijo, ornato, fibras duras extraídas de las hojas (ixtle), abono, construcción de viviendas y elaboración de implementos agrícolas, entre otros usos (Mendoza, 2007). Los Agaves son plantas siempre verdes cuyas características fisiológicas y morfológicas les confieren una notable capacidad de adaptación a los ambientes más hostiles. Es precisamente por esa razón que la distribución de este género se localiza principalmente en las zonas áridas y semiáridas de México, siendo Oaxaca, Durango, Puebla, Sonora, Chihuahua, Coahuila y Jalisco los estados de la república donde se encuentran principalmente (Ruíz, 2012).

El agave es utilizado actualmente para la elaboración de aguamiel y pulque, además de bebidas alcohólicas destiladas (tequila y mezcal), así como para la obtención de fibras, alimento, ornamentales y en la construcción, entre otros (Gómez *et al.*, 2008). El *Agave americana* L. es una planta originaria de Centro América, en el Estado de Chiapas, el proceso de obtención del licor a partir de estos taxones se restringe a la región de Comitán, motivo que ha ocasionado que en los últimos años se demanden más ejemplares, para así garantizar la disponibilidad de las plantas adultas requeridas para la producción de licor comiteco por la empresa Comiteco Balun Canan. Sin embargo, su reproducción natural por hijuelos es muy baja, por ello se ha hecho énfasis en la necesidad de programas de mejoramiento en agaves. El cultivo de tejidos vegetales es una de las aplicaciones más importantes de la biotecnología moderna en la horticultura como alternativa a esta problemática. La micropropagación es una técnica tradicional que permite una rápida producción de alta calidad, libre de enfermedades y períodos de tiempo relativamente cortos de material plantado (Kapoor *et al.*, 2008).

Se ha reportado que las plántulas micropropagadas tratadas con hongos micorrízicos arbusculares (HMA) mejoran el rendimiento de la planta y juegan un papel importante para garantizar la salud de las plántulas (Rai, 2001). Existen varios trabajos que demuestran los efectos benéficos del HMA en la mejora del crecimiento y desarrollo *in vitro* en la floricultura, horticultura y especies de árboles forestales (Kapoor *et al.*, 2008). La simbiosis micorrízica arbuscular es una asociación mutualista formada entre las plantas y una amplia variedad de hongos del *phylum Glomeromycota*. La simbiosis del HMA está asociada con una serie de beneficios adicionales para la planta, incluyendo la adquisición de nutrientes minerales, tales como nitrógeno y la resistencia a una variedad de stress (Kapoor *et al.*, 2008).

Un recurso utilizado en la agricultura es el uso de vermicomposta, debido a los efectos en la dinámica de nutrientes y a la estructura sobre el suelo, aumentando significativamente el crecimiento vegetal y conservando en mejor estado las características físicas y químicas del suelo (Sudhakar *et al.*, 2002). Existen pocos estudios que han examinado las respuestas de las plantas al uso o sustitución de vermicomposta al suelo (Chan & Griffiths, 1988; Edwards & Burrows 1988; Wilson & Carlile 1989; Mba 1996; Buckerfield & Webster 1998; citado por (Atiyeh *et al.*, 2000). La mayoría de estos estudios confirmaron que la vermicomposta tiene efectos benéficos sobre el crecimiento vegetal; tanto si se utilizan como aditivos de la tierra o como componentes de medios hortícolas, mejorando así la germinación de semillas y el desarrollo y crecimiento de las plantas (Atiyeh *et al.*, 2000).

Es por ello, que el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto sinérgico de vermicomposta y un hongo micorrizico arbuscular en la sobrevivencia de plántulas de *Agave americana L.* obtenidas por micropropagación.

## 2. JUSTIFICACIÓN

En México el género agave es considerado un grupo vegetal de gran importancia debido a su gran valor económico, social, cultural y agroecológico. Desafortunadamente, muchas de estas especies han sido descuidadas desde los puntos de vista de aprovechamiento sustentable y conservación, ya que en muchos casos se han tenido una reducción peligrosa de sus poblaciones debido a la sobreexplotación de materiales silvestres y al crecimiento muy lento de estas plantas, dichos factores hacen a los agaves difíciles de multiplicar masivamente por métodos convencionales. Una alternativa prometedora para la resolución de estos problemas es la técnica llamada micropropagación *in vitro* y su aclimatación; la micropropagación *in vitro* permitirá obtener un mayor número de plantas en menor tiempo, las cuales tendrán características similares a la planta madre, poseerán un sistema radical desarrollado, tendrán una mejor nutrición y serán más sanas a comparación con las que son producidas comúnmente en campo. La siguiente etapa crucial es la aclimatación la cual consiste en someter a la planta a factores naturales a los que no habían sido sometidas antes. Dentro de los factores naturales, nos detendremos en el factor suelo, por ser este determinante en la sustentabilidad del sistema, sin un suelo saludable no podemos tener una producción sustentable.

El uso indiscriminado e irracional de productos agroquímicos en sistemas agrícolas a ocasionado el deterioro y contaminación permanentes de los suelos y los sistemas hídricos, ante esta problemática en los últimos años han surgido enfoques alternativos como la agricultura orgánica, que está dirigida al manejo de los recursos disponibles en una forma racional y natural utilizando biofertilizantes, evitando así el uso de componentes sintéticos, tales como fertilizantes, pesticidas y agroquímicos en general que deterioran el suelo.

Por lo cual en el presente trabajo se realizó la evaluación de biofertilizantes en la sobrevivencia de plantas de *A. americana* L. obtenidas por micropropagación, con el objetivo de evaluar el efecto sinérgico de vermicomposta y hongo micorrizico arbuscular, sentando las bases de las concentraciones adecuadas de estos biofertilizantes y maximizando el desarrollo de la planta.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo General**

Evaluar el efecto sinérgico de vermicomposta y hongo micorrizico arbuscular en la sobrevivencia de plántulas de *Agave americana L.* obtenidas por micropropagación.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- I. Establecer el diseño experimental para evaluar el efecto sinérgico de vermicomposta y hongo micorrizico arbuscular.
- II. Evaluar el contenido de clorofila en *A. americana L.* implementando el efecto sinérgico de vermicomposta y hongo micorrizico arbuscular durante un periodo de seis meses.

#### **4. CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DE TRABAJO**

La investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivos de Tejidos Vegetales, así como también en el invernadero del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, ubicado en carretera Panamericana Km. 1080 de la Ciudad de Tuxtla Gutiérrez.

#### **5. PROBLEMA A RESOLVER**

- La baja sobrevivencia de las plántulas micropropagadas de *A. americana* L. que presentan en la aclimatación en invernadero.
- El lento crecimiento de las plántulas de *A. americana* L. obtenidas por micropropagación.
- La falta de información relacionada con la utilización de vermicomposta y hongos micorrízicos arbusculares en *A. americana* L.

#### **6. ALCANCES**

La aclimatación en invernadero de *A. americana* L. micropropagadas mediante vermicomposta y hongo micorrizico arbuscular ayudara directamente a la empresa Balun Canan a sentar las bases para iniciar el desarrollo de los protocolos para la optimización del desarrollo del Agave en campo; contribuyendo así con el aumento en número de esta planta y asegurando su permanencia en el estado. De esta manera se podrán fortalecer, en el futuro, las plantaciones de maguey comiteco que puedan garantizar la disponibilidad de la materia prima para la producción de licor.

#### **7. LIMITACIONES**

- La principal limitante del proyecto es en la etapa final, en la obtención de plantas de *A. americana* L. en invernadero, las dos principales características que deben de poseer son: elevada sanidad y alta calidad antes de trasplantarlas a campo. Es por ello, que los HMA son de gran importancia durante la aclimatación en invernadero, ya que son ellos, los que les confieren estas características a las plantas, asegurando así, su sobrevivencia en campo.

## 8. ANTECEDENTES

### 8.1 Agave

#### 8.1.1 Importancia histórica y aprovechamiento

En México, los agaves han tenido y tienen una gran importancia económica y cultural para numerosos pueblos indígenas y mestizos, que los han aprovechado durante siglos como fuente de alimento, bebida, medicina, combustible, cobijo, ornato, fibras duras extraídas de las hojas (ixtle), abono, construcción de viviendas y elaboración de implementos agrícolas, entre otros usos (Mendoza, 2007).

Los agaves fueron una de las primeras plantas aprovechadas por los pobladores de Mesoamérica para alimentarse, de lo cual se hallan restos en cuevas en el Valle de Oaxaca, el de Tehuacán y en Coahuila se recuperaron cordeles de ixtle y sandalias elaboradas con fibras de maguey. El empleo como alimento y fibras pervive en México desde hace por lo menos siete mil años (Mendoza, 2007).

**Cuadro 1. Principales usos de importancia socioeconómica y agroecológica del Agave (García *et al.*, 2010)**

USOS	1. PRODUCTOS	• PARTE DE LA PLANTA
Alimentación	2. Azúcar 3. Guisos 4. Dulce 5. Mixiotes 6. Gusanos blancos 7. Gusanos rojos 8. Pan de pulque 9. Tortillas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tallo (piña)</li> <li>• Flores y frutos (cápsulas frescas)</li> <li>• Escapo floral (quiote)</li> <li>• Hojas</li> <li>• Cutícula del cogollo</li> <li>• Hojas</li> <li>• Tallo (piña)</li> </ul>
Bebidas	10. Aguamiel, miel, atole de aguamiel, 11. Pulque, Mezcal, Tequila, Sotol, 12. Bacanora 13. Vinagre 14. Jarabe.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tallo (piña)</li> </ul>
Agrícola	15. Cerca viva 16. Evitar erosión como formadora de suelo 17. Abono orgánico (fertilizante) 18. Planta líder de ecosistemas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Planta completa</li> <li>• Planta completa</li> <li>• Composta de hojas</li> <li>• Planta completa</li> </ul>
Forraje	19. Bovinos 20. Caprinos 21. Porcinos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hojas</li> <li>• Escapos florales,</li> <li>• Flores</li> <li>• Bagazo.</li> </ul>

### **8.1.2 Descripción de la planta**

Los agaves son plantas perennes, con hojas dispuestas en espiral y arregladas en rosetas en el ápice de un tallo, el cual puede ser corto y apenas sobre pasar unos centímetros del suelo, o bien, ser largo y erecto —en este caso llega a medir hasta tres metros de altura. Las hojas por lo general son suculentas, fibrosas, con la base dilatada y carnosa; su forma varía de lineal a lanceolada u ovada; las de las especies más pequeñas no sobrepasan veinte gramos de peso, mientras que las de los agaves pulqueros son las más grandes del género, llegando a pesar más de treinta kilos cada una. Los márgenes exhiben una gran diversidad morfológica, los dientes córneos sobresalen como proyecciones de tejido, o bien se ubican sobre una banda córnea continua, mientras que en otras es filífero y se desprende en delgadas fibras o bien muestra dienteillos microscópicos, semejantes a filosas sierras. La hoja casi siempre tiene una espina al final del ápice que puede medir desde algunos milímetros hasta cinco centímetros. El color de las mismas se presenta en tonos de verde y glauco o amarillos, rojizos o violetas. El pedúnculo floral tiene brácteas que se reducen en tamaño desde la base hasta el ápice. Las flores tienen diferentes grados de suculencia, son bisexuales, tubulares, con ovario ínfero, poseen seis tépalos de coloración verdoso-amarillenta en muchas especies, aunque las hay de color amarillo intenso y rara vez tienen tonos rojizos o violetas; los estambres son seis, muy largos, ya que sobrepasan a los tépalos, al igual que el estilo. Las flores son protándricas, es decir, los estambres se desarrollan y maduran antes que los carpelos. El fruto es una cápsula seca, trilocular, con semillas dispuestas en dos hileras por lóculo, que son negras, aplanadas y rodeadas por un ala corta en su parte distal redondeada (Mendoza, 2007).

### **8.1.3 Distribución**

El género *Agave* es originario de Mesoamérica, distribuyéndose desde los 34° Latitud Norte hasta los 60° Latitud Sur; coincidiendo en nuestro país el centro de origen con el centro de diversidad de especies. Los *Agaves* son plantas que pueden encontrarse en gran diversidad de hábitats, desde los valles y planicies hasta cerros y laderas pedregosas, incluyendo lugares montañosos de gran altitud (García *et al.*, 2010).

México es considerado centro de origen y de diversidad de los agaves. No se tiene claro cuántas especies se han documentado actualmente, algunos autores mencionan que se han reconocido 166, otros 200 y algunos más mencionan hasta 273 , diferentes especies de agaves (magueyes) en el continente americano, distribuidas una pequeña parte de Estados Unidos, México, América Central y América del Sur. Se considera que el 75% de todas las especies se encuentran en

nuestro país y 55% crecen exclusivamente aquí, lo que muestra la gran importancia biológica del territorio nacional para los agaves (García *et al.* , 2010).

#### 8.1.4 Taxonomía

En la taxonomía clásica se le ubica en la familia *Amaryllidaceae*, subfamilia *Agavoideae*. El género *Agave* es el más grande de esta familia, comprendiendo aproximadamente, doscientas setenta y cinco especies. Sin embargo, Hutchinson (1979) lo ubicó dentro del orden *Agavales* y específicamente en la familia *Agavaceae*, en donde se incluye el género *Agave*. Este género incluye, de la nomenclatura tradicional, géneros que pertenecen a la familia *Liliacea* y otros a la *Amaryllidacea*. En esta nomenclatura, el subgénero *Agave* lo integran 12 secciones con 82 especies, 21 subespecies y 23 variedades. En total 197 taxas (García *et al.* , 2010).

**Cuadro 2. La clasificación taxonómica actual del género *Agave*. (Ruíz, 2012)**

<b>Reino:</b>	<i>Plantae</i>
<b>División:</b>	<i>Angiosperma</i>
<b>Clase:</b>	<i>Monocotiledóneas</i>
<b>Orden:</b>	<i>Agavales</i>
<b>Familia:</b>	<i>Agavaceae</i>
<b>Género:</b>	<i>Agave</i>
<b>Subgénero:</b>	<i>Agave</i>

#### 8.1.5 Morfología, fisiología y entorno

Los agaves son plantas xerófitas, adaptadas a vivir en condiciones climáticas desfavorables, con largos periodos de sequía y altas temperaturas. Los agaves poseen estrategias para sobrevivir en ambientes secos o periódicamente secos, especialmente en el suelo, con fuertes fluctuaciones de temperatura entre el día y la noche, las cuales tienden a limitar la pérdida de agua por transpiración y a acumularla en tejidos especializados (Mendoza, 2007).

El desarrollo de succulencia en las hojas es una de sus adaptaciones más notables, ya que el agua almacenada durante la época de lluvias permite que las plantas sobrevivan durante algún tiempo en ausencia de suministro de agua del exterior, lo que ocurre cuando las condiciones del suelo son tales, que la raíz ya no es capaz de extraerla de él (Mendoza, 2007).

El sistema de la raíz de los agaves es superficial, lo cual facilita la absorción de agua de lluvia, generalmente escasa, que sólo humedecen la superficie del suelo; de tal manera que la probabilidad de supervivencia de una roseta en sequías

prolongadas depende del volumen de agua y de los carbohidratos almacenados durante la época favorable. Asimismo, en época seca el agua almacenada ayuda a mantener las reacciones bioquímicas y la apertura de estomas para la asimilación de carbono (CO<sub>2</sub>), aún en condiciones prolongadas de sequía, que pueden durar hasta siete años. El abundante desarrollo de fibras en los tejidos de las hojas mantiene su rigidez durante los periodos de pérdida de agua, logrando con esto que no se deformen los tejidos; esta función se complementa con la presencia de dientes en el margen y una espina terminal (Mendoza, 2007).

Son varias las características de los agaves que les permiten evitar una excesiva transpiración; una reducción en la superficie que transpira en relación con el volumen total del órgano, la presencia de una cutícula gruesa en la epidermis de la hoja, la acumulación de cera en la superficie y la presencia de estomas de naturaleza compleja que aseguran una protección adicional contra la evaporación durante los periodos de sequía. El excesivo calentamiento de la lámina foliar disminuye con el arreglo de las hojas en el espacio (filotaxia) y la orientación favorece la sombra de unas sobre las otras. El bandeo de las hojas con segmentos alternantes claros y oscuros se debe a las variaciones en el grosor de la cutícula y, aparentemente, se origina por condiciones irregulares de crecimiento, que dependen de las condiciones climáticas (Mendoza, 2007).

El metabolismo ácido crasuláceo (CAM), típico de algunos géneros y familias de plantas que crecen en zonas con altas temperaturas, constituye una especialización fisiológica en los agaves, a la cual se combina una alta radiación y baja humedad. Las plantas con metabolismo CAM tienen transpiración nocturna, abren sus estomas en la noche, fijan el carbono en ácidos orgánicos, principalmente ácido málico, que se acumulan en las vacuolas; durante el día el ácido málico es descarboxilado y se obtiene carbono, el cual es utilizado por la planta para la producción de carbohidratos. El metabolismo CAM permite obtener ganancias netas de carbono con una pérdida mínima de agua. Por lo menos diecisiete taxa de agaves tienen este tipo de metabolismo, entre ellos algunas especies económicamente importantes, como *Agave americana*, *A. fourcroydes*, *A. lechuguilla* y *A. tequilana* (Mendoza, 2007).

## **8.2 A. americana L.**

### **8.2.1 Descripción de *A. americana* L.**

Pertenece al grupo *Americanae* propuesto por Gentry (1982). Se reconoce por la siguiente combinación de caracteres morfológicos. Rosetas hasta 2 m de alto, 2.5-3.0 m de diámetro. Hojas 1.5-2.0 m de largo, 15-25 cm de ancho, lanceoladas a algo espatuladas, erectas o algo recurvadas, acanaladas en el haz, glaucas, superficie ligeramente áspera, margen ondulado a crenado; dientes sobre

mamilas, en la parte media de 0.5-1.0 cm de largo, 0.6-1.2 cm de ancho, rectos o recurvados; espina terminal 3.5-4.0 cm de largo. Inflorescencia paniculada, laxa, 6-9 m alto, contorno general ovalado, fértil desde la mitad o el tercio superior, ramas primarias 20-35, 1-1.2 m largo; pedúnculo verde-glauco, brácteas del pedúnculo 30-60 cm largo, base hasta 10 cm ancho, triangulares, cactáceas, margen entero, espina 1-1.5 mm largo. Flores 6-7.5 cm largo, hipocrateriformes, verde-amarillentas; tépalos 2.5-3.5 cm largo, oblongos, gruesos, tubo del perigonio 1-1.5 cm largo, ovario 2.5-3 cm largo, cuello 2-5 mm; estambres con filamentos 5.5-8.0 cm largo, insertos en la parte media del tubo. Cápsulas 4.0-5.5 cm largo, 2.0-2.5 cm ancho; semillas 9- 10 mm largo, 7-8 mm ancho, negras.

La variedad cultivada en los alrededores de Comitán es semejante a *Agave americana* var. *americana*, sin embargo, difiere de ella en que las hojas no son reflejas en la mitad superior de la lámina. Se requieren más estudios morfológicos y moleculares de la especie en toda su área de distribución, para proponer una posible división infraespecífica (Reynoso *et al.* 2012).



**Ilustración 1. Plantas de *Agave americana* de la región de Comitán, Chiapas**

En Chiapas se observó en los municipios de Venustiano Carranza, Comitán de Domínguez y Las Rosas. Las localidades, las coordenadas geográficas, la altitud y el mapa de distribución, se muestran en la siguiente Cuadro.

**Cuadro 3. Ubicación de localidades con plantaciones de *A. americana* (Reynoso et al. 2012).**

<b>Localidad</b>	<b>Municipio</b>	<b>Latitud Norte</b>	<b>Latitud Oeste</b>	<b>Altitud (msnm)</b>
<b>Agua Bendita</b>	Venustiano Carranza	16°14'28.4''	92°25'30.5''	632
<b>Chacajolcom</b>	Comitán	16°18'17.59''	92°11'08.56''	1820
<b>Ejido las Flores</b>	Comitán	16°13'19.4''	92°08'54.5''	1715
<b>Los Riegos</b>	Comitán	16°18'21.1''	92°07'29.5''	1605
<b>NE de la ciudad de Comitán</b>	Comitán	16°15'40.7''	92°08'11.5''	1643
<b>San José de las Rosas</b>	Comitán	16°23'58.2''	92°12'46.6''	2251
<b>Tuilaito Punta de Diamante</b>	Comitán	16°16'24.0''	92°09'56.1''	1858
<b>Yalpalé</b>	Las Rosas	16°19'40.6''	92°24'36.5''	1010

### **8.3 Biofertilizantes**

#### **8.3.1 Producción orgánica**

La utilización de microorganismos ha sido considerada como elemento importante en la agricultura, mediante el entendimiento de su actividad en las propiedades del suelo y en la planta misma. El hombre no solo modificó la diversidad vegetal al utilizar sistemas de producción de monocultivos, sino que también realizó cambios en las comunidades microbianas que se interrelacionan en el suelo; estos cambios fueron significativos por la expresión de enfermedades producidas por microorganismos del suelo y se acentuaron cuando se inició el uso de pesticidas para erradicar los agentes causales. Aunado a esto fue la implementación de la revolución verde "cuya consigna" era el incremento de la producción agrícola mediante la aplicación de fertilizantes y otros productos químicos para el control de plagas y enfermedades. De manera paralela, se fueron presentando mayores problemas en los cultivos, originados por la generación de resistencia de los microorganismos patógenos a los pesticidas. En este sentido, se crearon diferentes manejos alternativos para el control de plagas y enfermedades, el uso de microorganismos antagonistas que, además de permitir la reducción de la incidencia de enfermedades, contribuyen en la regulación y equilibrio de las comunidades microbianas tanto edáficas como de la planta. No obstante el beneficio que la planta aporta a los microorganismos, estos mediante su actividad propician efectos en la estimulación del crecimiento y desarrollo por su asociación libre o simbiótica, así como protección contra microorganismos patógenos. Es tal la repercusión que han tenido los microorganismos, que ya existen en el mercado productos denominados biofertilizantes cuyos beneficios no sólo se enfocan al crecimiento vegetal, sino que también pueden ser elementos importantes en la

estabilidad de los agro ecosistemas y del ambiente, ya que su aplicación influye directamente en la disminución de la aplicación de pesticidas que participan como agentes de contaminación (Alarcón *et al.*, 2000).

### **8.3.2 Diversidad microbiana**

La diversidad microbiana propicia la búsqueda de microorganismos con actividad fisiológica específica. Así encontramos bacterias y hongos benéficos que mediante su uso es factible la obtención de incrementos significativos en el crecimiento vegetal y otros beneficios paralelos.

#### **8.3.2.1 Bacterias**

Las bacterias que colonizan la raíz de las plantas (rizobacterias) pueden ser categorizadas con base a efectos deletéreos, benéficos o neutros en lo que respecta a la nutrición y sanidad radical.

- Fijadores de nitrógeno: Desde el punto de vista agronómico, la fijación biológica del nitrógeno es un recurso renovable que puede provocar la disminución de aplicaciones de fertilizantes nitrogenados, cuyo impacto ambiental (aguasuelo- atmósfera) se traduce en aspectos de contaminación. El uso de inoculantes a base de bacterias gram-negativas de los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* o *Azorhizobium*, ha sido una herramienta importante para la estimulación en la capacidad de captar nitrógeno atmosférico en plantas. Existen bacterias de vida libre que se asocian al sistema radical de diversas gramíneas y su actividad propicia la fijación de nitrógeno en estas plantas y la promoción del crecimiento. Géneros bacterianos como *Azospirillum*, *Beijeriackia*, *Derrxia*, *Azotobacter*, *Enterobacter* y *Klebsiella*, han sido descritos en asociación con gramíneas como maíz, trigo, caña de azúcar, arroz, pastos tropicales y en otros cultivos como papaya, algodón y chile.
- Solubilizadores de fósforo: Especial interés se le ha dado a bacterias con capacidad de solubilizar fosfatos inorgánicos en forma de compuestos de aluminio, fierro y calcio, cuya composición química limita la disponibilidad y absorción de fósforo por las plantas. La actividad de estas bacterias consiste en la secreción de ácidos orgánicos y enzimas cuya acción libera el fosfato atrapado en los aniones  $Al^+$ ,  $Fe^+$  y  $Ca^{++}$ , de tal modo que el fósforo queda libre para ser asimilado por las plantas. Como ejemplo de estas bacterias benéficas, se tienen *Enterobacter agglomerans* y diversas especies del género *Bacillus*, las cuales tienen la capacidad de solubilizar fosfatos a partir de fuentes inorgánicas insolubles y fitato.

### **8.3.2.2 Hongos**

A pesar de existir en la naturaleza seis tipos definidos de asociaciones simbióticas que forman micorrizas en las plantas terrestres solo dos de ellas representan alternativa de uso en los sistemas de producción de plantas. Una es la simbiosis micorrízica arbuscular y la otra es la simbiosis ectomicorrízica, ambas difieren en los cambios morfológicos radicales que se generan por la asociación de los hongos que forman micorriza.

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) son visibles únicamente al microscopio y no forman estructuras reproductivas del tipo sexual; además, su establecimiento no genera cambios en la morfología de la raíz de la planta hospedante.

Contrario a HMA, los hongos formadores de ectomicorriza (HCM) son visibles a simple vista cuando forman las estructuras hipogeas y epigeas, denominadas carpóforos. Estos hongos producen cambios apreciables en la morfología radical y pueden ser observados en raíces colonizadas por estos hongos.

La aplicación de hongos micorrízicos en las plantas, impacta en su desarrollo y crecimiento, por lo cual deberían utilizarse como elementos biofertilizantes y promotores del crecimiento vegetal.

### **8.3.2.3 Composteo y vermicomposteo**

Actualmente el manejo de desechos orgánicos a través de compostas y vermicompostas ha tenido fuerte impulso, sobretodo porque el producto de estos procesos se cataloga como fuente rica en nutrimentos y su aplicación a plantas puede contribuir significativamente en la estimulación o incluso inhibición del crecimiento y desarrollo vegetal. El composteo consiste en la conversión biológica de diversos residuos de origen orgánico con base en el control de temperatura y agua, principalmente. El material que resulta de este proceso permite ser utilizado como biofertilizante, ya que además de proporcionar nutrimentos para las plantas, contiene alto contenido de humus, por lo que es factible usarlo como mejorador de suelos.

La incorporación de la lombriz en este proceso (vermicomposteo) cuando el sustrato se mantenga estable en temperatura, permite que la descomposición del material se lleve a cabo y se obtenga un material con mayor calidad. Este proceso está relacionado con las transformaciones químicas, bioquímicas y microbiológicas que sufre la materia orgánica cuando pasa por el tracto intestinal de la lombriz.

Estos materiales orgánicos resultan muy atractivos para utilizarlos en los procesos agronómicos encaminados a la recuperación de zonas altamente perturbadas y degradadas como es el caso de suelos volcánicos endurecidos (tepetates). El manejo de la materia orgánica, rotaciones de cultivo, uso de leguminosas y complejos microbianos benéficos (*Rhizobium*, hongos micorrizicos arbusculares, etc.), en combinaciones adecuadas propician aumentos de la fertilidad de este tipo de suelos, así como considerables incrementos de los cultivos establecidos (Alarcón *et al.*, 2000).

## **8.4 Hongo Micorrizico Arbuscular**

### **8.4.1 Características generales de los Hongos micorrizicos arbusculares**

Los hongos micorrizicos arbusculares (HMA) son microorganismos del suelo que forman simbiosis con el 80% de las plantas terrestres, formando arbusculos, vesículas (en algunas especies) e hifas, dentro de las células corticales de las plantas que colonizan (Barrer, 2009).

Esta asociación se denomina micorriza arbuscular y se encuentra bien documentado su efecto al incrementar el crecimiento de las plantas. Este efecto se atribuye al incremento en la asimilación de los nutrientes, especialmente del fósforo, la tolerancia al estrés, patógenos de la raíz y ambientes adversos en el suelo así como a la producción de sustancias promotoras del crecimiento. Los HMA incrementan el número y la actividad de los organismos benéficos del suelo como por ejemplo, los fijadores de nitrógeno y los solubilizadores de fosfato y como consecuencia, el crecimiento de las plantas se mejora (Oliva *et al.*, 2009)

La implementación de la fertilización ecológica como una forma de agricultura ecológica sostenible, donde se utilizan abonos verdes, humus, compost, o microorganismos beneficiosos, en este caso los HMA, para movilizar y reciclar nutrientes y aprovechar la fertilidad del suelo, es importante y de gran interés como una alternativa ecológica de la cual se van a generar mejores resultados que los obtenidos por el uso de fertilizantes convencionales (Barrer, 2009).

Existen varios trabajos que demuestran los efectos benéficos del HMA en la mejora del crecimiento y desarrollo *in vitro* en la floricultura, horticultura y especies de árboles forestales (Cuadro 4).

**Cuadro 4. Trabajos aplicativos del empleo de HMA en micropropagación (Kapoor *et al*, 2008)**

Nombre de la especie de la planta	Especie de HMA empleado	Referencia
<i>Coffea arabica</i> L.	<i>Gigaspora margarita</i>	Souza et al. (1991)
<i>Actinidia deliciosa</i> (Kiwi)	<i>Glomus</i> sp. Strain E3	Schubert et al. (1992)
<i>Anthyllis cytisoides</i> , <i>Spartium junceum</i>	<i>G. fasciculatum</i>	Salamanca et al. (1992)
Apple and Peach rootstocks	<i>Glomus</i> sp. Strain A6	Sbrana et al. (1992)
<i>Tetraclinis articulata</i>	<i>G. fasciculatum</i>	Honrubia and Morete (1992)
Apple (M9, M26, Golden)	<i>G. fasciculatum</i> , <i>G. mosseae</i> , <i>G. intraradices</i>	Branzanti et al. (1992)
<i>Persea Americana</i> (Avocado)	<i>G. fasciculatum</i>	Vidal et al. (1992)
<i>Persea americana</i>	<i>G. deserticola</i> , <i>G. mosseae</i>	Azcon-Aguilar et al. (1992)
<i>Platanus acerifolia</i>	<i>G. fasciculatum</i>	Tisserant and Gianinazzi-Pearson (1992)
<i>Prunus avium</i> , <i>Spiraea vulgaris</i> , <i>Syringa japonica</i>	<i>G. aggregatum</i> , <i>G. deserticola</i>	Arines and Ballester (1992)
<i>Phoenix dactylifera</i>	<i>G. fasciculatum</i> , <i>G. intraradices</i> (LPA8), <i>Glomus</i> isolate (LPA21)	Bouhired et al. (1992)
<i>Allium cepa</i>	<i>Gigaspora rosea</i> , <i>Glomus mosseae</i>	Rancillac et al. (1996)
<i>Annona cherimoya</i>	<i>G. deserticola</i>	Azcon-Aguilar et al. (1996)
Crab apple cv. Marjatta	<i>G. claroides</i> , <i>G. fistulosum</i>	Uosukainen and Vestberg (1996)
<i>Fragaria vesca</i> (Strawberry)	<i>G. fistulosum</i>	Cassels et al. (1996)
<i>Pyrus communis</i>	<i>Glomus</i> sp.	Rapparini et al. (1996)
<i>Tetraclinis articulata</i>	<i>G. fasciculatum</i>	Morte et al. (1996)
<i>Juglans regia</i> (Walnut)	<i>G. mosseae</i> , <i>G. intraradices</i>	Dolcet-Sanjuan et al. (1996)
<i>Leucaena leucocephala</i>	<i>G. fasciculatum</i>	Naqvi and Mukerji (1998)
<i>Leucaena leucocephala</i>	<i>G. fasciculatum</i> , <i>G. microcarpum</i>	Puthur et al. (1998)
<i>Casuarina equisetifolia</i>	<i>G. mosseae</i>	Mark et al. (1999)
<i>Musa</i> spp. cv. Pacovan	<i>Acaulospora scrobiculata</i> , <i>G. clarum</i> , <i>G. etunicatum</i>	Yano-Melo et al. (1999)
<i>Syngonium podophyllum</i> and <i>Dracaena</i> sp.	<i>Glomus</i> , <i>Gigaspora</i> , <i>Scutellospora</i> spp.	Gaur and Adholeya (1999)
<i>Fragaria X ananassa</i> cv. Elvira	<i>G. clarum</i> , <i>G. etunicatum</i> , <i>G. intraradices</i> , <i>Gi. rosea</i> , <i>Gi. gigantea</i> , <i>G. margarita</i> , <i>Scutellospora calospora</i> , <i>S. heterogama</i> , <i>S. persica</i>	Taylor and Harrier (2001)
<i>Opuntia albicarpa</i> Scheinvar Reyna	<i>G. albidum</i> , <i>G. diaphanum</i> , <i>G. claroides</i>	Estrada-Luna and Davies (2001)
<i>Lilium</i> sp. (Asiatic hybrid 'Gran Paradiso')	<i>G. intraradices</i> isolates	Varshney et al. (2002)
<i>Musa</i> spp. cv. Grand Naine	<i>G. intraradices</i>	Declerck et al. (2002)
Potato cv. Goldrush	<i>G. etunicatum</i>	Yao et al. (2002)
<i>Citrus limon</i> L. Burm. "Zagara Bianca"	<i>G. mosseae</i> (BEG 116), <i>Glomus</i> sp.	Quatrini et al. (2003)
<i>Echinacea pallida</i>	<i>G. mosseae</i> , <i>Gigaspora ramisporophora</i> , <i>Scutellospora fulgida</i> , <i>Entrophospora columbiana</i>	Lata et al. (2003)
<i>Capsicum annuum</i> L. (Chile ancho pepper) cv. San Luis	<i>G. albidum</i> , <i>G. claroides</i> , <i>G. diaphanum</i>	Estrada-Luna and Davies (2003)
<i>Musa</i> spp. cv. Grande Naine	<i>G. proliferum</i> , <i>G. versiforme</i> , <i>G. intraradices</i>	Jaizme-Vega et al. (2003)
<i>Diospyros kaki</i> "Rajo"	<i>G. intraradices</i> , <i>G. mosseae</i>	Marin et al. (2003)
<i>Ficus benjamina</i>	<i>G. mosseae</i>	Srinath et al. (2003)
<i>Podophyllum peltatum</i> L. (Mayapple)	<i>Entrophospora columbiana</i> , <i>G. mosseae</i> , <i>Gigaspora ramisporophora</i> , <i>Scutellospora fulgida</i>	Moraes et al. (2004)
<i>Vitis vinifera</i> L.	<i>G. mosseae</i> , <i>G. manihotis</i> , <i>G. deserticola</i> , <i>Gigaspora gigantea</i> , <i>Acaulospora laevis</i>	Singh et al. (2004)
<i>Curcuma zeodaria</i> ROSCOE	<i>G. etunicatum</i>	Miachir et al. (2004)
<i>Ipomoea carnea</i> ssp. <i>Fistulosa</i> (Bush morning glory)	<i>Gigaspora rosea</i> , <i>G. deserticola</i> , <i>G. intraradices</i> , <i>G. mosseae</i> , <i>G. etunicatum</i> , <i>G. monosporus</i> , <i>G. brasilianum</i>	Carpio et al. (2005)
Banana cv. Grade Naine	<i>G. manihotis</i>	Rodríguez-Romero et al. (2005)
<i>Rosa hybrida</i> L., cv. New Dawn	<i>G. intraradices</i>	Piniór et al. (2005)
<i>Annona cherimola</i> Mill.	<i>G. mosseae</i> , <i>G. manihotis</i> , <i>Scutellospora heterogama</i> , <i>Gigaspora gigantea</i> , <i>Entrophospora colombiana</i> , <i>Acaulospora laevis</i> , <i>A. sorbiculata</i>	Padilla and Encina (2005)
<i>Vitis vinifera</i> L.		Krishna et al. (2006)

### 8.4.2 Clasificación de los Hongos micorrizicos arbusculares

Los hongos que forman estas asociaciones son miembros de los zygomycetos y su clasificación actual está dentro del mismo orden, Glomales (Harrison, 1998).

Hay dos tipos de micorrizas que se conocen hoy en día: ecto y endomicorriza. Las ectomicorrizas se caracterizan por un crecimiento fúngico extracelular en la corteza de las raíces. Las endomicorrizas se caracterizan por el crecimiento de hongos inter- e intracelular en corteza de las raíces, la formación de estructuras fúngicas específicas, denominadas vesículas y arbusculos. Esta característica le da al crecimiento endomicorriza el nombre alternativo, micorrizas arbusculares vesiculares. Los hongos micorrizicos arbusculares (HMA) pertenecen a la clasificación taxonómica orden llamada glomales, que actualmente cuenta con 6 géneros (Quilambo, 2003).

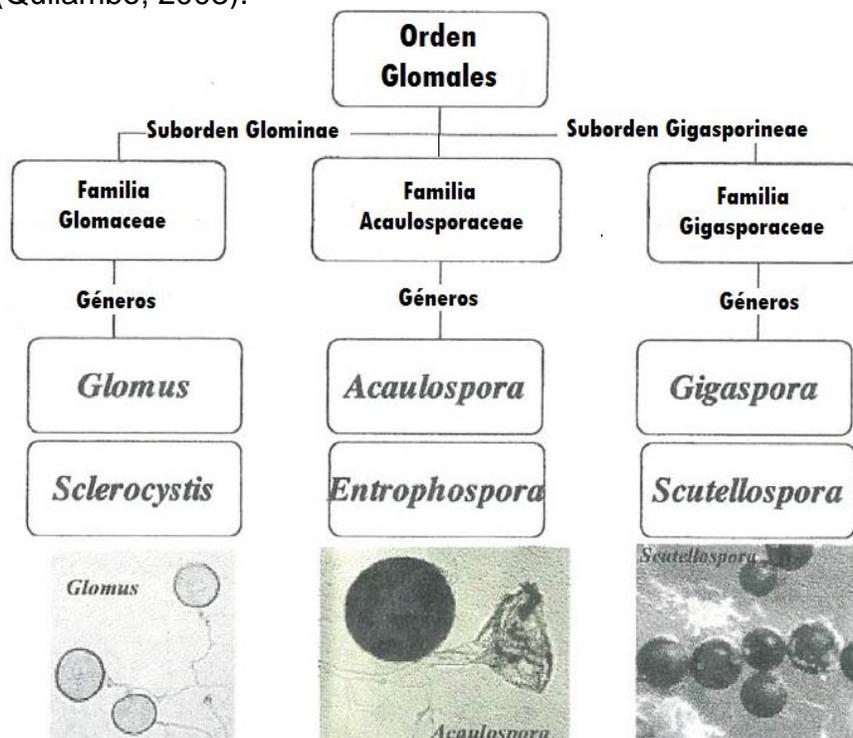


Ilustración 2. La taxonomía actual del HAM con ejemplos de las esporas producidas por diferentes géneros en el suelo (Quilambo, 2003).

**Glomus:** En este género las esporas se producen en el ápice de las hifas o intercaladas en el micelio. Las esporas maduras conservan restos del micelio que les dio origen en forma de una “hifa de sostén” que en el punto de unión con la espora es recta o cónica. La germinación en este género se da por la emergencia de una o varias hifas que atraviesan las paredes de la espora o bien por el lumen de la hifa sostén. Este género está representado por más de 100 especies de

HMA y por lo tanto, es el que tiene mayor número de especies en el grupo. (Cuevas et al., 2003).

**Sclerocystis:** En este género las esporas forman agrupaciones de esporas mas o menos compactas, conocidas como esporocarpos, los cuales se caracterizan por presentar una masa semicompacta de hifas en su parte central, llamada plexo. De este género se conocen 8 especies (Cuevas et al., 2003).

**Entrophospora:** en este caso las esporas se producen intercaladamente a la hifa de sostén, que en uno de sus ápices se ensancha o infla a manera de globo formando lo que se conoce como sáculo. La germinación se da a partir de una estructura conocida como “orbe de germinación”. Se conocen solo 7 especies de este género (Cuevas et al., 2003).

**Acaulospora:** En este genero las esporas se producen de manera lateral a la hifa de sosten, la cual se encuentra ensanchada en su apice. Presentan la estructura conocida como “orbe de germinacion”, de este genero se conocen alrededor de 30 especies en el mundo (Cuevas et al., 2003).

**Gigaspora:** Las espóra de este genero se producen apicalmete a partir de una hifa de sosten ligeramente ensanchada en su apice, a manera de bulbo. La ultima característica importante del genero es que previamente a la germinacion se produce un estrato interno adicional, altamenet papilado, conocido como “estrato germinal”. Se conocen alrededor de 15 especies de este género en el mundo (Cuevas et al., 2003).

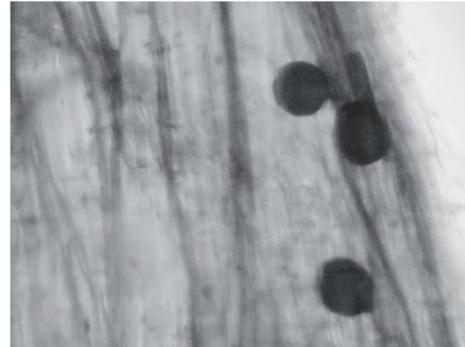
**Scutellospora:** Las esporas se producen apicalmente a partir de una hifa de sosten en forma de bulbo. La germinacion es a partir de una estructura especializada denominada “escudo de germinacion”, que es, de hecho , lo que da el nombre al genero. Se conocen alrededor de 30 especies de este género (Cuevas et al., 2003).

#### **8.4.3 Desarrollo de la simbiosis planta-hongo**

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) se caracterizan por presentar un crecimiento intra e intercelular en la corteza de la raíz y por formar dos tipos de estructuras, arbusculos (Ilustración. 3a) y vesículas (Ilustración. 3b). Los arbusculos son hifas que se dividen dicotómicamente, son invaginados por la membrana plasmática de las células corticales y presentan periodos de vida cortos, mientras que las vesículas son estructuras de almacenamiento que se forman en la parte terminal de las hifas (Barrer, 2009)



a) Arbúsculo desarrollado



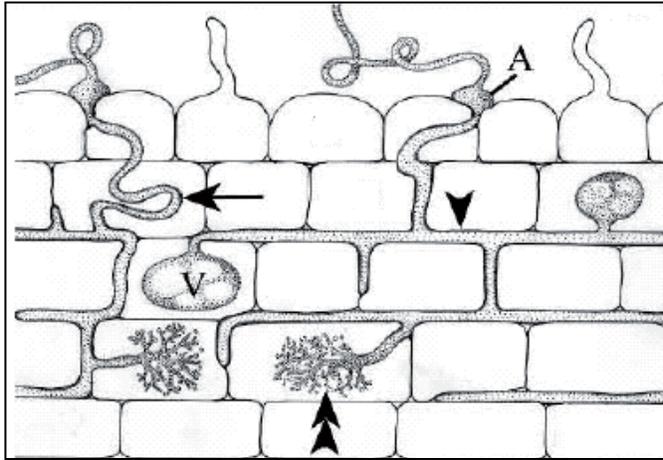
b) Vesículas en raíces de palma de aceite.

### **Ilustración 3. Arbúsculo y vesículas de HMA en raíces colonizadas (Barrer, 2009)**

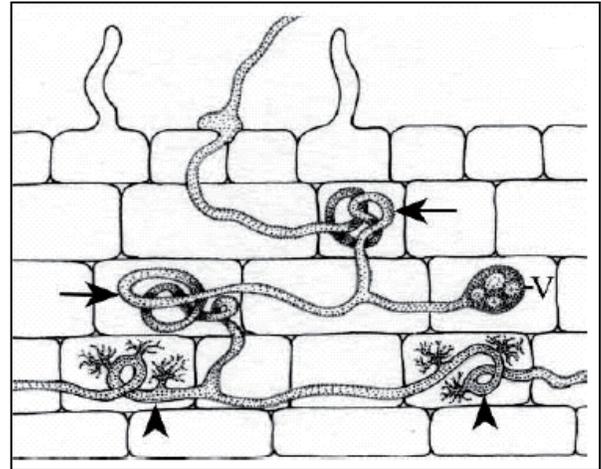
Las hifas externas pueden ser de tres tipos según su morfología y las funciones que llevan a cabo: Las hifas infectivas, son las que inician los puntos de colonización en una o varias raíces; las hifas absorbentes son las que se encargan de explorar el suelo para la extracción de nutrientes y las hifas fértiles son las que llevan las esporas. Pueden observarse dos tipos morfológicos de colonización, el tipo “Arum” (Ilustración. 4a), donde las hifas presentan crecimiento intercelular y los arbúsculos se encuentran dentro de las células corticales de la raíz; y el tipo “Paris” (Ilustración. 4b) en el cual las hifas presentan crecimiento intracelular al igual que los arbúsculos, pero forman enrollamientos cuando están dentro de la célula (Barrer, 2009).

El crecimiento del hongo de manera asimbiótica se da entre una o dos semanas hasta que hace contacto con la raíz del hospedero, formando una estructura llamada apresorio por donde penetrarán las hifas a las células corticales de la raíz, para formar los arbúsculos e incrementar el área de contacto entre la planta y el hongo. Cuando las plantas son invadidas por microorganismos del suelo, se inician una serie de cambios fisiológicos y bioquímicos que no ocurren cuando un HMA coloniza la planta, esto soporta la hipótesis de que el hongo emite señales que reconoce la planta para que esta no inicie una reacción de defensa. Adicionalmente, la planta también libera compuestos de naturaleza volátil o difusible (exudados) que estimulan el crecimiento de la hifa en diferentes puntos de control mientras se da la colonización fúngica (Barrer, 2009).

a) Tipo Arum



b) Tipo Paris



**Ilustración 4. Tipos de asociación micorrizica arbuscular (Barrer, 2009).**

a) Tipo Arum, caracterizado por hifas que crecen de forma intercelular (cabeza de flecha). b) Tipo Paris, caracterizado por hifas con crecimiento intracelular (cabeza de flecha). Se aprecian vesículas (v); el apresorio (A); hifas (flechas) y arbuscúlos (dos cabezas de flechas).

#### 8.4.3.1 Señales del desarrollo de la simbiosis del HMA

La formación de la simbiosis requiere un desarrollo coordinado tanto de la planta como el hongo, esto se observa con un intercambio de señales. Como las esporas de los HAM son capaces sólo de la germinación y en ausencia de la planta limitan el crecimiento de hifas, parece probable que las señales de las plantas son esenciales para las etapas iniciales de la simbiosis. Los exudados de radiculares han demostrado que bajas concentraciones de ciertos compuestos, flavonoides / isoflavonoides estimulan el crecimiento y la ramificación de las hifas de los HMA, también son capaces de promover el crecimiento de hifas. Los flavonoides, en particular los isoflavonoides tienen actividad estrogénica y fue demostrado que el estrógeno 17 $\beta$ -estradiol estimula el crecimiento de hifas de los HMA, de una manera similar a la del isoflavonoide biocanina A; mientras que los anti estrógenos inhiben competitivamente a la biocanina A-mediada por la estimulación del crecimiento (Harrison, 1998).

A pesar de la evidencia de que los flavonoides / isoflavonoides promueven el crecimiento de estos hongos es poco probable que sean esenciales para el desarrollo de la asociación simbiótica, como por ejemplo, maíces mutantes que carecen flavonoides y estos siguen siendo capaces de formar la simbiosis. Además es poco probable que los isoflavonoides sean una señal universal, ya que se encuentran en un sólo subconjunto de las plantas capaces de formar simbiosis.

En su lugar, estos compuestos probablemente señalan la presencia del hongo en la raíz como respuesta del aumento de crecimiento y ramificación de las hifas (Harrison, 1998).

En contacto con la raíz, el hongo se diferencia formando apresorios en la superficie de las células epidérmicas. Estas estructuras sólo se han observado en las raíces de las plantas que no se forman sobre superficies sintéticas, incluso en presencia de crecimiento estimulantes de exudados. Los apresorios sólo se forman en fragmentos de la epidermis de la pared celular y no en las paredes celulares de otras partes de la raíz como la corteza. Así, la siguiente tarea será para nombrar el componente(s) específico de la pared celular que desencadena la respuesta. Después de la formación de apresorios, el hongo penetra la raíz y procede a colonizar la corteza para formar Arbuscúlos (Harrison, 1998).

### **8.5 Vermicomposta**

El uso de materia orgánica como estiércol de animales, desechos humanos, residuos de alimentos, desechos de jardín, lodos de aguas residuales y composta ha sido reconocido en la agricultura como beneficioso para el crecimiento vegetal, la producción y el mantenimiento de la fertilidad del suelo. Los nuevos enfoques para el uso de abonos orgánicos en la agricultura han demostrado ser medios eficaces para mejorar la estructura del suelo, la mejora de la fertilidad del suelo y el aumento de los rendimientos de los cultivos. La materia orgánica es una excelente fuente de nutrientes que se encuentran disponibles para las plantas y su adición al suelo podía mantener altas poblaciones microbianas y actividades con incremento en valores de C como biomasa, respiración basal, y el cociente metabólico ( $qCO_2$ ). El importante papel en el suelo y su efecto potencialmente positivo sobre los rendimientos de los cultivos han hecho de las mejoras orgánicas un componente valioso de la fertilización agrícola y los programas de gestión de la agricultura alternativa. Las formas de la materia orgánica utilizadas incluyen los residuos de cultivos como cultivos de cobertura, entre otros (Norman *et al.*, 2005).

El compostaje tradicional de los residuos de materia orgánica ha sido conocido durante muchos años, pero los nuevos métodos de compostaje termófilico se han vuelto mucho más populares en el tratamiento de residuos orgánicos recientemente, puesto que eliminan algunos de los efectos perjudiciales de los residuos orgánicos en el suelo. El compostaje ha sido reconocida como un proceso de bajo coste y ambientalmente racional para el tratamiento de muchos residuos orgánicos. Además, la rápida descomposición y temperaturas elevadas durante el compostaje producen una homogeneidad relativa, libre de olores, libre de patógenos y fácil de manejar el producto (Norman *et al.*, 2005).

Bevacqua y colaboradores (1993) reportaron que los suelos tratados con abono presentaron menores valores de pH y los niveles elevados de materia orgánica, nutrientes primarios, y sales solubles. En estudios de cultivos, Bryan y colaboradores (1991) encontraron que los tomates cultivados en suelos tratados con abono presentaban mayores rendimientos. Maynard (1989) también reporta aumentos en el rendimiento de frutos de plantas modificadas en suelos con abono en comparación con las que crecen en el suelo sin tratar. Además, el compostaje y abono se ha informado que suprimen patógenos de las plantas. Hoitink y colaboradores (1986) informó que los suelos con abonos fueron los causantes de la supresión de la transmisión de enfermedades de las plantas, tales como *Pythium* y *Rhizoctonia*. Los abonos también se han reportado que mejoran el desarrollo de la población de nematodos beneficiosos tales como *cephaloids* y *rhabditids* (nematodos saprófagos).

Un proceso relacionado con el compostaje que pueden mejorar la utilización beneficiosa de los residuos orgánicos es el vermicomposteo. Es un proceso no termófilico por el cual los materiales orgánicos son convertidos por lombrices y microorganismos en suelos ricos con un aumento considerable en la actividad microbiana y la disponibilidad de nutrientes (Norman *et al.*, 2005).

Las vermicompostas son productos derivados de la degradación biológica acelerada de residuos orgánicos por lombrices y microorganismos. Las lombrices de tierra consumen y fragmentan de los residuos orgánicos a partículas más finas pasándolos y derivan su alimento de microorganismos que crecen sobre ellos. El proceso acelera la velocidad de descomposición de la materia orgánica, altera las propiedades físicas y químicas del material, con lo cual conduce a un efecto de humidificación en la que está completamente la materia orgánica inestable oxidada y estabilizada (Albanell *et al.*, 1988).

El producto final, conocido comúnmente como vermicomposta es muy humificada a través de la fragmentación de los materiales orgánicos por lombrices de arena colonizados por microorganismos. Las vermicompostas están finamente divididas de turba como materiales de alta porosidad, aireación, drenaje y retención de agua (Edwards *et al.*, 1988). Ellos han aumentado considerablemente áreas de superficie, proporcionando más micrositos para organismos microbianos descomponedores, proporcionar una fuerte adsorción y retención de nutrientes (Norman *et al.*, 2005).

Las vermicompostas han sido descritas por varios autores como humus similares a los materiales y se ha investigado con bastante profundidad su grado de humidificación. La capacidad humificante de lombrices de tierra, en la producción

de las vermicompostas, se reportó por Businelli *et al.* (1984) después de *Lumbricus rubellus* procesó una gama de mezclas: vaca y estiércol de conejo, ganado y estiércol de caballo, vaca y estiércol de oveja y abono de residuos municipales. Elvira *et al.* (1996) informó que la velocidad de humificación se incrementó significativamente en los lodos de papel de pulpa trabajado por *Eisenia andrei*. Las transformaciones en compuestos húmicos por el paso a través del intestino de la lombriz reveló que los índices de humificación de la materia orgánica ingestada fueron intensificadas durante el tránsito intestinal de la lombriz.

Entre sus atributos químicos superiores, se demostraron que las vermicompostas, especialmente los de las fuentes de desechos de origen animal, por lo general contiene más elementos minerales que los medios comerciales para crecimiento de plantas, y muchos de estos elementos se cambiaron a formas más que podrían ser fácilmente absorbido por las plantas, tales como nitratos, fósforo, y potasio. Orozco *et al.* (1994) (citado por Norman *et al.*, 2005) reportaron que la pulpa de café, incrementó la disponibilidad de nutrientes como el fósforo, el calcio y el magnesio, después de procesar por *Eisenia fetida*. El fósforo fue 64% mayor en vermicomposta que en el material orgánico original, esto sugiere que es debido al aumento en la actividad de la fosfatasa de la acción directa de las enzimas intestinales e indirectamente por la estimulación de microorganismos.

La cantidad y calidad de los nutrientes en vermicomposta se puede explicar por la mineralización acelerada de la materia orgánica, la ruptura de polisacáridos y una mayor velocidad de humificación alcanzada durante el vermicompostaje (Albanell *et al.*, 1988).

La vermicomposta tiene muchas propiedades biológicas excepcionales. Son ricos en bacterias, actinomicetos, hongos y bacterias que degradan celulosa. Además, Tomati *et al.* (1983) encontraron que las piezas de tierra degradadas por lombrices, obtenidos después de la digestión de lodos, eran ricos en microorganismos, especialmente bacterias. Nair *et al.* (1997) (citado por Norman *et al.*, 2005) compararon los microorganismos asociados con vermicomposta con los abonos tradicionales. Los vermicomposta tenían poblaciones mucho más grandes de bacterias ( $5,7 \times 10^7$ ), hongos ( $22,7 \times 10^4$ ) y actinomicetos ( $17,7 \times 10^6$ ) en comparación con aquellos en las compostas convencionales. Las excelentes propiedades físico-químicas y biológicas del vermicomposta los hacen excelentes materiales como aditivos a los medios de contenedores de efecto invernadero, fertilizantes orgánicos o enmiendas del suelo para cultivos hortícolas diferentes.

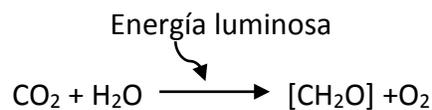
## 8.6 Clorofila

### 8.6.1 Fotosíntesis

La inversa de la reacción de oxidación de los hidratos de carbono la realizan las plantas, las algas y algunos microorganismos, utilizando la energía de la luz solar para proporcionar la enorme cantidad de energía libre requerida. Este proceso se denomina fotosíntesis (Mathews *et al.*, 2001).

### 8.6.2 Procesos básicos de la fotosíntesis

La reacción fotosintética se escribe de forma muy general de la siguiente manera:



En donde [CH<sub>2</sub>O] indica un hidrato de carbono general.

Dado que la combustión de los hidratos de carbono para producir CO<sub>2</sub> es un proceso oxidativo, la conversión del CO<sub>2</sub> en hidratos de carbono debe comportar una reducción del carbono. En la reacción precedente, el H<sub>2</sub>O es el agente reductor último, como ocurre en las plantas, la mayoría de las algas y las cianobacterias (Mathews *et al.*, 2001).

La energía luminosa no puede utilizarse directamente para impulsar esta reacción, y el H<sub>2</sub>O no reduce al CO<sub>2</sub> directamente en ninguna de las circunstancias conocidas. El proceso global que se describió, está separado tanto químicamente como físicamente en dos subprocesos en todos los organismos fotosintéticos. En el primer subproceso, en una serie de pasos denominados reacciones luminosas, se utiliza la energía de la luz solar para llevar a cabo la oxidación fotoquímica del H<sub>2</sub>O. Con esta oxidación se consiguen dos cosas. En primer lugar, el agente oxidante NADP<sup>+</sup> se reduce a NADPH, produciendo equivalentes reductores, y se libera O<sub>2</sub>. En segundo lugar, parte de la energía de la luz solar se captura mediante la fosforilación del ADP para producir ATP. Este se denomina fotofosforilación. En el segundo subproceso, las denominadas reacciones oscuras de la fotosíntesis, el NADPH y el ATP producidos por las reacciones luminosas se utilizan para la síntesis reductora de los hidratos de carbono a partir de CO<sub>2</sub> y agua. A estas reacciones se las denomino inicialmente oscuras para resaltar que no requiere la participación directa de la energía luminosa (Mathews *et al.*, 2001).

### 8.6.3 El cloroplasto

En todas las plantas superiores y las algas, los procesos fotosintéticos están localizados en unas organelas denominadas cloroplastos. En las plantas, la

mayoría de los cloroplastos se encuentran en células situadas bajo la superficie de las hojas. La estructura interna de un cloroplasto posee una membrana externa, libremente permeable y una membrana interna con permeabilidad selectiva. La membrana interna encierra un material denominado estroma, dentro de los cuales están inmersas múltiples estructuras membranosas en forma de sacos planos, denominadas tilacoides. La división del trabajo dentro de un cloroplasto es sencilla. La absorción de la luz y todas las reacciones luminosas se producen dentro de las membranas tilacoides o sobre ellas (Mathews *et al.*, 2001).

## 8.6.4 Reacciones Luminosas

### 8.6.4.1 Absorción de la luz: el sistema de recogida de luz

#### La energía de la luz

La teoría mecano-cuántica de la radiación afirma que la luz tiene dos aspectos: el de onda y el de partícula. Podemos caracterizar un tipo determinado de radiación mediante su longitud de onda ( $\lambda$ ) o su frecuencia ( $\nu$ ); estos parámetros caracterizan los aspectos de *onda* de la luz. Si las ondas de una longitud  $\lambda$  llegan a un observador a una velocidad  $c$ , el número de ondas que pasan por segundo es la frecuencia,  $\nu$ . Así pues,

$$\nu = c / \lambda$$

en donde  $c$  es la velocidad de la luz  $3 \times 10^8$  m/s. La luz roja de un laser de neón tiene una longitud de onda de  $6.328 \times 10^{-7}$  m. Así pues su frecuencia es  $4.74 \times 10^{14}$  s<sup>-1</sup>. Pero para ver cómo puede obtenerse *energía* de la luz, es necesario considerar el aspecto de partícula de la radiación. Debemos considerar un haz de la luz como una corriente de partículas luminosas o fotones. Cada fotón tiene una unidad de energía asociada denominada cuanto. El valor energético de un cuanto, está relacionado con la frecuencia de la luz según la ley de Planck.

$$E = h \nu$$

en donde  $h$  es la constante de Planck,  $6.626 \times 10^{-34}$  Js. Así, el laser de neón de nuestro ejemplo puede proporcionar energía luminosa únicamente en cuantos, de  $3.14 \times 10^{-19}$  J, la magnitud más apropiada para nuestros fines es la energía de un mol ( $6.02 \times 10^{23}$ ) de fotones. Para la luz de un laser de neón, multiplicando la energía por fotón se obtiene 189 J. Un mol de fotones se denomina Einstein.

Cuando los fotones de la radiación infrarroja lejana se absorben por una molécula, pueden hacer poco más que estimular vibraciones moleculares, que percibimos como calor. En cambio, los fotones de la radiación ultravioleta lejana tienen energías capaces de romper enlaces covalentes.

La fotosíntesis depende principalmente de la luz de las regiones visibles e infrarrojas. La capacidad de utilizar la radiación de este margen ha tenido unas ventajas evolutivas claras para los organismos fotosintéticos (Mathews *et al.*, 2001).

### **Los pigmentos de absorción de luz**

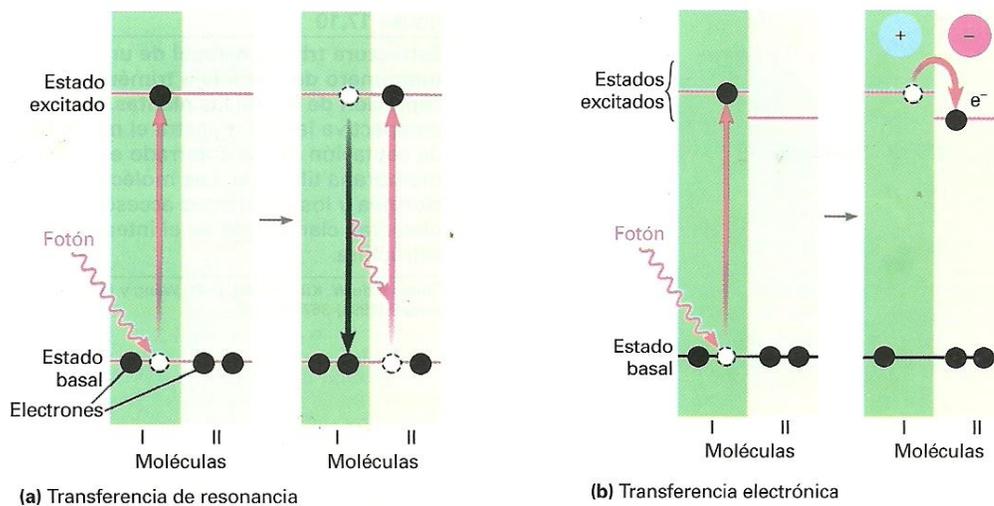
Para capturar la energía luminosa disponibles, los organismos fotosintéticos han desarrollado un conjunto de pigmentos que absorben de manera eficiente la luz visible e infrarroja próxima. A estos pigmentos se les denomina cromóforos, compuestos que absorben luz de una longitud de onda específica.

Los pigmentos más abundantes en las plantas superiores son la clorofila *a* y la clorofila *b*, las clorofilas *a* y *b* absorben intensamente la luz del azul oscuro y del rojo, la luz que no se absorbe sino que se refleja por los cloroplastos es verde, el color que asociamos con la mayor parte de las plantas en crecimiento (Mathews *et al.*, 2001).

### **Las estructuras de captación de la luz**

La clorofila y algunos pigmentos accesorios están contenidos en las membranas tilacoides del cloroplasto. Estas membranas contienen tan solo una pequeña fracción de los fosfolípidos comunes, mientras que son ricas en glucolípidos. También contienen gran cantidad de proteínas, y algunos de los pigmentos fotosintéticos están unidos a algunas de estas proteínas. Los ensamblajes de los pigmentos de captación de la luz en la membrana tilacoide, junto con sus proteínas asociadas, están organizados en fotosistemas bien definidos, unidades estructurales dedicadas a la tarea de absorber fotones de luz y recuperar parte de su energía en forma química. La primera parte de este proceso se produce en los que se denominan complejos de captación de luz. Cada uno de ellos es un complejo proteico de múltiples subunidades que contiene múltiples moléculas de pigmento antena (clorofilas) y un par de moléculas de clorofila que actúan como centro de reacción, atrapando los cuantos de energía por la absorción de luz.

Para comprender como funciona este sistema, debemos examinar con algo más de detalle lo que puede ocurrir cuando una molécula absorbe un cuanto de energía radiante. En un fotosistema la energía de excitación puede pasarse desde una molecular a otra adyacente, un proceso denominado transferencia de resonancia o transferencia de excitón. Otra posibilidad es que el propio electrón excitado pueda pasarse a una molécula cercana, con un estado de excitación ligeramente inferior, una reacción de transferencia electrónica. Ambos procesos son importantes para la fotosíntesis (ver ilustración 5) (Mathews *et al.*, 2001).



**Ilustración 5. Dos modos de la transferencia energética tras la fotoexcitación (Mathews et al., 2001).**

Para cada uno de los dos tipos de transferencia energética que se producen en un fotosistema, se muestra que una molécula que se excita a un estado de energía superior por la absorción de un fotón de radiación. (a) En la transferencia de resonancia la molécula I transfiere su energía de excitación a la molécula II, que sube a un estado de energía superior al tiempo que la molécula I desciende de nuevo al estado basal. (b) en la transferencia electrónica, un electrón excitado de la molécula se transfiere al estado excitado ligeramente inferior de la molécula II, haciendo que la molécula I pase a ser un catión y la molécula II un anión (Mathews et al., 2001).

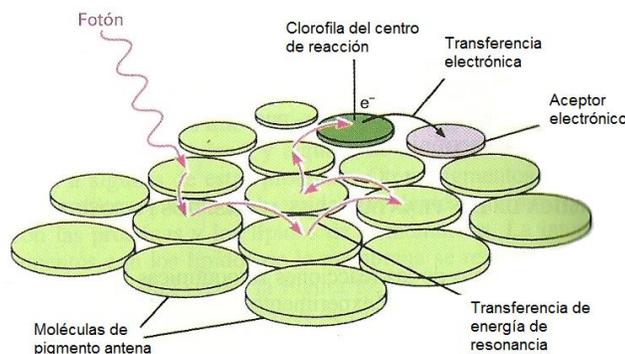
La pista que llevo finalmente al descubrimiento de que la transferencia de resonancia desempeñaba un papel importante en la fotosíntesis se debió a las determinaciones efectuadas por Robert Emerson y William Arnold. Estos investigadores demostraron que a pesar de que el sistema fotosintético del alga *Chlorella* actuara con una eficiencia máxima, tan solo se producía una molécula de O<sub>2</sub> por cada 2500 moléculas de clorofila. Ahora sabemos que la mayor parte de las moléculas de clorofila no intervienen directamente en el proceso fotoquímico, sino que actúan como moléculas antena de los complejos de captación de luz.

Las moléculas antena absorben fotones y la energía se pasa mediante transferencia de resonancia a las moléculas específicas de clorofila en un número relativamente reducido de centros de reacción. En otras palabras, la energía de un fotón absorbido por cualquier molécula antena de un fotosistema se desplaza de manera aleatoria por el sistema. Finalmente la energía encuentra su camino hacia una molécula de clorofila en el centro de reacción. Esta molécula es con las demás clorofilas, pero se encuentra en un entorno algo diferente, por lo que su nivel del estado energético excitado es algo inferior. En consecuencia, actúa como una trampa de cuantos de energía absorbidos por cualquiera de las demás

moléculas de pigmento. Es la excitación de este centro de reacción la que inicia el proceso fotoquímico real de las reacciones luminosas, puesto que pone en marcha una serie de transferencias electrónicas (ver ilustración 6) (Mathews *et al.*, 2001).

En otras palabras, la energía de un fotón absorbido por cualquier molécula antena de un fotosistema se desplaza de manera aleatoria por el sistema. Finalmente la energía encuentra su camino hacia una molécula de clorofila en el centro de reacción. Esta molécula es con las demás clorofilas, pero se encuentra en un entorno algo diferente, por lo que su nivel del estado energético excitado es algo inferior. En consecuencia, actúa como una trampa de cuantos de energía absorbidos por cualquiera de las demás moléculas de pigmento. Es la excitación de este centro de reacción la que inicia el proceso fotoquímico real de las reacciones luminosas, puesto que pone en marcha una serie de transferencias electrónicas (ver ilustración 6).

En otras palabras, la energía de un fotón absorbido por cualquier molécula antena de un fotosistema se desplaza de manera aleatoria por el sistema. Finalmente la energía encuentra su camino hacia una molécula de clorofila en el centro de reacción. Esta molécula es con las demás clorofilas, pero se encuentra en un entorno algo diferente, por lo que su nivel del estado energético excitado es algo inferior. En consecuencia, actúa como una trampa de cuantos de energía absorbidos por cualquiera de las demás moléculas de pigmento. Es la excitación de este centro de reacción la que inicia el proceso fotoquímico real de las reacciones luminosas, puesto que pone en marcha una serie de transferencias electrónicas (ver ilustración 6) (Mathews *et al.*, 2001).



**Ilustración 6. Transferencia de energía de resonancia en un complejo de captación de luz (Mathews *et al.*, 2001)**

La energía de excitación que se origina en un fotón de luz se desplaza de una molécula antena a otra hasta que llega a un centro de recepción. Allí, un electrón se transfiere a una molécula aceptora de electrones primaria y la energía queda atrapada (Mathews *et al.*, 2001).

## 8.7 Publicaciones Recientes

En los últimos años, las técnicas de micropropagación están siendo ampliamente utilizadas como una herramienta importante y ventajosa para la propagación rápida de diversas variedades de plantas. A pesar de que esta tecnología tiene varias aplicaciones exitosas, los problemas más comunes que se presentan son las bajas tasas de supervivencia y crecimiento deficiente mientras las plántulas son trasplantadas a las condiciones de campo.

La inoculación de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) a las raíces de las plántulas micropropagadas pueden llegar a ser un papel beneficioso en el post-trasplante, tal como lo reportó Meddad *et al.* (2010) en plantas micropropagadas de olivo (*Olea europaea* L.), las cuales fueron inoculadas con el género *G. mosseae* de HMA, haciendo una comparación con fertilización química usando Osmocote, para evaluar el efecto del crecimiento en estas, los resultados obtenidos indican un crecimiento significativo en las raíces de las plantas inoculadas con *G. mosseae*, en comparación con el de las plantas fertilizadas con Osmocote, este cambio en la raíz permitió una mayor utilización de los recursos del suelo y el fortalecimiento de la capacidad de la planta para resistir golpes y trasplante de estrés hídrico.

Así también la simbiosis mutualista entre HMA y la planta ayuda principalmente a la captación de N que se encuentra en el suelo y que no está disponible para las plantas, este fenómeno fue reportado por Leigh *et al.*, (2008) al implementar ecosistemas experimentales divididos en dos compartimientos, estos ecosistemas experimentales contenían, tanto plantas de *Plantago lanceolata* inoculadas con *Glomus hoi* y *Glomus intraradices*, así como también parcelas de material seco marcadas con  $^{15}\text{N}$  y  $^{13}\text{C}$ ; en un tratamiento fue permitido que las hifas, pero no las raíces, tuvieran acceso a las parcelas, mientras que en el otro tratamiento tanto las hifas como las raíces tenían limitado el acceso a las parcelas, se obtuvo que, hasta un tercio del N en las parcelas, era capturado por los HMA y transferido a la planta, mientras que un 20% del N de la planta pudo haber sido derivado de la parcela. Evidenciando así la importancia de los HMA en la captación de nutrientes de material orgánico.

Otro de los beneficios de los hongos micorrízicos arbusculares fue reportado por Wu *et al.* (2011) en plantas de melocotón inoculadas con *Glomus moseae*, *G. versiforme* y *Paraglomus occultu*, reportando mejora en el crecimiento de las plantas tal como altura, diámetro del tallo, brote, raíz y peso seco, así también mejora en la absorción de K, Mg, Fe y Z después de 100 días de inoculación con micorrizas.

Por otro lado se ha reportado que el uso de abonos orgánicos mejora la calidad, la estructura y la fertilidad del suelo, así como también ayuda a la retención de humedad y al aumento de diversidad microbiana (Azarmi et al. 2008). Las vermicompostas contienen la mayoría de los nutrientes que son necesarios para las plantas tales como son los nitratos, fosfatos, el calcio intercambiable y el potasio soluble; convirtiendo a las vermicompostas en una alternativa para facilitar y mejorar el desarrollo de las plantas. La influencia de la vermicomposta sobre las propiedades físicas y químicas del suelo fue investigado por Azarmi et al. (2008) en plantas de tomate (*Lycopersicum esculentum*), los resultados mostraron que la adición de vermicomposta aumenta el contenido de C, N, K, P, Ca, Zn y Mn total en suelo, en comparación con parcelas control así también los experimentos revelaron efectos positivos sobre las propiedades físicas y químicas del suelo, como la disminución del pH y la mejora en la densidad y porosidad del suelo. Para evaluar el efecto de la vermicomposta sobre el crecimiento y rendimiento de las plantas, Peyvast et al. (2008) evaluó los efectos de crecimiento, rendimiento y características químicas de la espinaca (*Spinacia oleracea*) a diferentes concentraciones de vermicomposta (0%, 10%, 20% y 30%). Los resultados mostraron que la adición de vermicomposta al suelo puede aumentar significativamente la altura de la planta y el número de hojas; las plantas con 10% de vermicomposta añadida al suelo reportaron una mayor área foliar, contenido de K,P, N, Ca, Mg en peciolo y hojas, así como también microelementos como Fe, Cu, Mn y Zn.

## 9. MATERIALES Y METODOS

### 9.1 Materiales biológicos

#### 9.1.1 Material Vegetal

Se utilizaron plántulas de *A. americana* L. micropropagadas por organogénesis indirecta, a 5 meses de haber sido enraizadas en el medio de cultivo MS, estas se encontraban contenidas en frascos de vidrio de 4.5cm diámetro por 6cm de altura.



Ilustración 7. *Agave americana* L. obtenido micropropagadas por organogénesis indirecta.

#### 9.1.2 Hongo micorrizico arbuscular

*Glomus fasciculatum* se obtuvo de la colección microbiana del Cinvestav-Irapuato (México). Los HMA fueron cultivados usando pasto Rhodes como cultivo trampa y arena-suelo (1:1) como sustrato. Las esporas de *G. fasciculatum* fueron recuperados de la rizosfera del pasto Rhodes. Cada planta de *A. americana* L. se inoculó con 200 esporas (1 g), 400 esporas (2 g) o 600 esporas (3g) de *G. fasciculatum*.

#### 9.1.3 Vermicomposta

La vermicomposta tuvo la siguiente composición:

Cuadro 5 Composición de la vermicomposta.

Parámetro	Composición
pH	8,25
Conductividad eléctrica	1,44 dS m <sup>-1</sup>
Capacidad de intercambio catiónico (CEC)	98.6 cmol kg <sup>-1</sup>

Fósforo total	341,4 mg kg <sup>-1</sup>
Fósforo extractable	472 mg kg <sup>-1</sup>
Materia orgánica	20,17%
Nitrógeno total	132 kg mg <sup>-1</sup>
Densidad aparente	0,69 g ml <sup>-1</sup>
Concentración de ácido húmico del contenido total del C en la vermicomposta	4,34%
Concentración de ácido fúlvico del contenido total del C en la vermicomposta	3,99%
Relación del humus y ácidos fúlvicos	1,08.

### 9.1.4 Unidades experimentales

Se utilizaron recipientes de poliestireno expandido, con las siguientes dimensiones: diámetro superior 8 cm, diámetro inferior 5 cm y profundidad 10 cm. En la parte superior de los recipientes se hicieron perforaciones circulares de aproximadamente 4 mm de diámetro.

### 9.2 Diseño experimental

El diseño de los tratamientos se realizó de acuerdo a un análisis de superficie de respuesta factorial 3 niveles: 3<sup>2</sup> con 5 repeticiones, teniendo un grupo control.

**Cuadro 6 Factores y niveles que se utilizaron en el diseño de tratamientos**

Factores	Niveles		
	-1	0	1
Vermicomposta	5%	10%	15%
Hongo micorrizico arbuscular	1gr	2gr	3gr

**Cuadro 7 Diseño experimental**

Repeticiones	VALORES CODIFICADOS		VALORES REALES	
	Vermicomposta (%)	HMA (gr/planta)	Vermicomposta (%)	HMA (gr/planta)
0.1	ST	ST	ST	ST
0.2	ST	ST	ST	ST
0.3	ST	ST	ST	ST
0.4	ST	ST	ST	ST
0.5	ST	ST	ST	ST
0.6	ST	ST	ST	ST

1.1	0	0	10	2
1.2	1	-1	15	1
1.3	-1	1	5	3
1.4	1	1	15	3
1.5	1	0	15	2
1.6	-1	-1	5	1
1.7	-1	0	5	2
1.8	0	-1	10	1
1.9	0	1	10	3
2.1	0	0	10	2
2.2	1	-1	15	1
2.3	-1	1	5	3
2.4	1	1	15	3
2.5	1	0	15	2
2.6	-1	-1	5	1
2.7	-1	0	5	2
2.8	0	-1	10	1
2.9	0	1	10	3
3.1	0	0	10	2
3.2	1	-1	15	1
3.3	-1	1	5	3
3.4	1	1	15	3
3.5	1	0	15	2
3.6	-1	-1	5	1
3.7	-1	0	5	2
3.8	0	-1	10	1
3.9	0	1	10	3
4.1	0	0	10	2
4.2	1	-1	15	1
4.3	-1	1	5	3
4.4	1	1	15	3
4.5	1	0	15	2
4.6	-1	-1	5	1
4.7	-1	0	5	2
4.8	0	-1	10	1
4.9	0	1	10	3
5.1	0	0	10	2
5.2	1	-1	15	1
5.3	-1	1	5	3
5.4	1	1	15	3

5.5	1	0	15	2
5.6	-1	-1	5	1
5.7	-1	0	5	2
5.8	0	-1	10	1
5.9	0	1	10	3
6.1	0	0	10	2
6.2	1	-1	15	1
6.3	-1	1	5	3
6.4	1	1	15	3
6.5	1	0	15	2
6.6	-1	-1	5	1
6.7	-1	0	5	2
6.8	0	-1	10	1
6.9	0	1	10	3

ST: Sin tratamiento.

### 9.3 Aclimatación

#### 9.3.1 Obtención de explantes micropropagados de *A. americana L.*

De las plántulas de *A. americana L.* micropropagadas *in vitro* se seleccionaron, para ser trasladadas a invernadero, las que contaban con más de dos hojas y poseían raíz, el procedimiento de extracción se realizó bajo condiciones de flujo laminar con la ayuda de un bisturí y pinzas estériles.

#### 9.3.2 Limpieza y desinfección de los explantes

Las raíces de los explantes fueron lavados con agua estéril para eliminar los restos del cultivo. Se sumergieron en una mezcla de 200 mL de solución bactericida (Captan 1 grL<sup>-1</sup>) y fungicida (Agri-mycin 1 grL<sup>-1</sup>) durante 10 min. Posteriormente se llevó a cabo las mediciones de los parámetros de crecimiento.

#### 9.3.3 Preparación de las unidades experimentales

Las muestras control y con tratamiento se sembraron en vasos de poliestireno con un volumen de 58gr de Peat Moss por unidad experimental, previamente humedecido. A las muestras pertenecientes al grupo control no se les agregó hongo micorrizico arbuscular ni vermicomposta. Los porcentajes utilizados en los tratamientos se especifican en la Cuadro 7.

#### 9.3.4 Siembra y aclimatación

En los tratamientos, los hongos micorrizicos arbusculares fueron ubicados de tal forma que se permitiera el contacto con las raíces de las plántulas. Las muestras

control y con tratamiento, fueron sembradas cubriendo perfectamente la raíz, la cual fue nuevamente desinfectada con solución fungicida (Agri-mycin 1 gL<sup>-1</sup>) y bactericida (Captan 1 gL<sup>-1</sup>). Por último las muestras se cubrieron con bolsas de polietileno y se les colocó una liga para evitar el flujo de aire. Las muestras se colocaron en una cámara bioclimática a 22 °C ± 2 (véase la ilustración 8) durante 4 semanas. Después fueron trasladadas al invernadero del ITTG, donde se realizó una perforación a las bolsas que cubrían las plantas para permitir el flujo de aire moderado (véase la ilustración 9). Transcurridos 11 días, se retiraron las bolsas concluyendo con esto la aclimatación (véase la ilustración 10). Las plántulas fueron regadas una vez a la semana con 30 mL de agua, y actualmente se mantienen en dicho invernadero.



**Ilustración 8. Muestras en la cámara bioclimática cubiertas con bolsas de polietileno**



**Ilustración 9. Muestras en el invernadero cubiertas con bolsas de polietileno perforadas.**



**Ilustración 10. Muestras en el invernadero sin bolsas de polietileno.**

## **9.4 Evaluación del contenido de clorofila**

### **9.4.1 Medición de parámetros físicos de las plántulas de *A. americana* L.**

Al término de la limpieza y desinfección de los explantes se llevó a cabo la primera medición de los parámetros físicos, después de 5 meses se registraron las nuevas mediciones de estos parámetros.

Para las variables de crecimiento se evaluó: peso fresco (PF), altura de la planta (AP), diámetro del tallo (DT), número de hojas (NH), longitud de raíz (LR), área foliar total (AFT), volumen radicular (VR), índice de área foliar (IAF), y tasa de crecimiento relativo (TCR).

Para el cálculo del área foliar se empleó la fórmula propuesta por Martínez (1987) (citado por Aristizábal, 2010) según la cual: Área foliar= Largo x ancho x 0.8. Se tomó medidas con una regla milimetrada a lo largo y ancho de cada hoja de los explantes, para obtener así el área foliar (AF) de cada una de las hojas, posteriormente se sumaron los resultados de AF todas las hojas por planta para después obtener un promedio de AF, siendo esta la área foliar total (AFT). Y posteriormente se calculó el índice del área foliar (IAF) con la siguiente expresión:

$$IAF = (AF_{\text{planta}}) / (A_{\text{suelo}}).$$

La altura de la planta (AT) fue obtenida al medir desde la base de la planta hasta la base del pecíolo de la última hoja emitida con una regla milimetrada. La tasa de crecimiento relativo se calculó mediante la siguiente fórmula.

$$TCR = (\ln A_2 - \ln A_1) / (T_2 - T_1)$$

El diámetro del tallo y la longitud de la raíz se midieron con un vernier digital. Para el caso del tallo se midió inmediatamente debajo de los cotiledones.

Para el volumen radicular, se tomó todo el sistema radicular fresco dentro de una probeta graduada de 500 ml con una precisión de 0.1 cc.

#### **9.4.2 Clorofila**

Se utilizó un medidor de clorofila Minolta® SPAD 502, el cual mide la concentración relativa de clorofila por medio de la luz transmitida a través de la hoja en 650 nm (longitud de onda fotosintéticamente activa) y 940 nm. Las mediciones se realizaron cada mes por 4 meses. Se seleccionó una hoja por cada tratamiento para monitorear el contenido de clorofila en unidades SPAD. Posteriormente para conocer la concentración de clorofila en  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  se utilizó la siguiente fórmula desarrollada por Coste et al., (2010).

$$\text{Chl}_i = \frac{117.1 * \text{SPAD}_i}{148.84 - \text{SPAD}_i}$$

#### **9.5 Análisis estadísticos de los resultados**

Para el análisis estadístico se empleó el software Statgraphics Plus versión 5.1 para realizar el análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existieron diferencias estadísticas significativas ( $p = 0,05$ ) entre los tratamientos evaluados por cada variable determinada y para estimar los coeficientes de las ecuaciones de regresión.

## 10. RESULTADOS

El análisis de crecimiento es ahora una herramienta ampliamente usada en áreas tan diferentes como en el fitomejoramiento, la fisiología de los cultivos y en la ecología de las plantas (Poortery Garnier, 1996). Se considera que el análisis de crecimiento representa el primer paso en el análisis de la productividad primaria. Su ventaja radica en la facilidad de obtención de los datos en los cuales se basa, como son el peso seco de plantas completas o de sus partes (hojas, tallos, vástagos) y las dimensiones del aparato asimilatorio (área foliar, área de hojas y tallos, contenido de clorofila, etc.) (Marín, 1989; Kvet *et al.*, 1971) (Citado por Criollo *et al.* 2009).

Taiz y Zeiger (2006) (Citado por Criollo *et al.* 2009) definen el crecimiento como un incremento constante en el tamaño de un organismo determinado por procesos de morfogénesis y diferenciación; el primero es el desarrollo de la forma o modelo de la célula u órgano, mientras que el segundo es el proceso por el cual las células cambian estructural y bioquímicamente para formar o adquirir funciones especializadas.

Ambos procesos se pueden medir mediante la tasa absoluta de crecimiento en función de la cantidad de materia seca y la tasa de funcionamiento de esta, en relación con la influencia del ambiente (Milthorpe y Moorby, 1982) (Citado por Criollo *et al.* 2009). Lambert *et al.* (1998) (Citado por Criollo *et al.* 2009) definen el crecimiento como un incremento en masa seca, volumen, longitud o área y, en alto grado, involucra la división, expansión y diferenciación celular. Öpik y Rolfe (2005) (Citado por Criollo *et al.* 2009) describen que el proceso de crecimiento, a un nivel del organismo, significa la multiplicación coordinada, incremento de tamaño y especialización de millones de células, todas ordenadas en posiciones exactas.

Es importante poder expresar la producción de un cultivo en términos de crecimiento. El análisis de crecimiento trata de explicar en términos matemáticos las variaciones de peso seco y del área foliar en función del tiempo. La estimación de los índices de eficiencia en el crecimiento requiere de la medición del peso seco total de las plantas, así como de sus diferentes órganos y área foliar, en intervalos de tiempo durante el desarrollo de la planta (Citado por Criollo *et al.* 2009) estas mediciones brindan una información más precisa acerca de la eficiencia de las plantas en la acumulación y transporte de asimilados que las mediciones de índole agronómica (Citado por Criollo *et al.* 2009).

Mediante el uso de prácticas agrícolas se provee a los cultivos de las condiciones más favorables para la expresión del mayor rendimiento potencial; dentro de dichas prácticas se destaca el manejo de la densidad de población. A través de esta práctica agrícola pueden incrementarse la producción de biomasa y el rendimiento de los cultivos, debido al aumento en el área foliar, el índice de área

foliar y la duración de la misma, ocasionado por el mayor número de hojas por unidad de superficie (Olalde *et al.*, 2000; Vilorio, 1998 y Cebula, 1995) (Citado por Criollo *et al.* 2009), ya que el tamaño y la duración del aparato fotosintético están relacionados con el rendimiento. Asimismo, el mayor crecimiento del dosel vegetal proporciona una mayor intercepción de luz, lo cual incrementa la fotosíntesis y producción de biomasa como resultado de un mayor aprovechamiento de los recursos hídricos y nutrimentales (Citado por Criollo *et al.* 2009).

### 10.1 Medición de parámetros físicos de las plántulas de *A. americana* L.

La medición de los parámetros físicos se llevo a cabo después de extraer las plántulas de las unidades *in vitro*. Se evaluaron los siguientes parámetros: peso fresco (PF), altura de la plata (AP), diámetro del tallo (DT), número de hojas (NH), longitud de raíz (LR), área foliar total (AFT). La distribución de las muestras para los tratamientos son mostradas en el cuadro 8 las cuales fueron agrupadas de la siguiente manera: muestras control del 0.1-0.6; tratamiento 1 integrado por las muestras 1.1, 2.1, 3.1, 4.1, 5.1 y 6.1 con una composición de 10% de vermicomposta y 2 gr de HMA; tratamiento 2 integrado por las muestras 1.2, 2.2, 3.2, 4.2, 5.2 y 6.2 con una composición de 15% de vermicomposta y 1 gr de HMA; tratamiento 3 integrado por las muestras 1.3, 2.3, 3.3, 4.3, 5.3 y 6.3 con una composición de 5% de vermicomposta y 3 gr de HMA; tratamiento 4 integrado por las muestras 1.4, 2.4, 3.4, 4.4, 5.4 y 6.4 con una composición de 15% de vermicomposta y 3 gr de HMA; tratamiento 5 integrado por las muestras 1.5, 2.5, 3.5, 4.5, 5.5 y 6.5 con una composición de 15% de vermicomposta y 2 gr de HMA; tratamiento 6 integrado por las muestras 1.6, 2.6, 3.6, 4.6, 5.6 y 6.6 con una composición de 5% de vermicomposta y 1 gr de HMA; tratamiento 7 integrado por las muestras 1.7, 2.7, 3.7, 4.7, 5.7 y 6.7 con una composición de 5% de vermicomposta y 2gr de HMA; tratamiento 8 integrado por las muestras 1.8, 2.8, 3.8, 4.8, 5.8 y 6.8 con una composición de 10% de vermicomposta y 1 gr de HMA y el tratamiento 9 integrado por las muestras 1.9, 2.9, 3.9, 4.9, 5.9 y 6.9 con una composición de 10% de vermicomposta y 3 gr de HMA.

**Cuadro 8. Datos obtenidos en la medición de los parámetros de crecimiento.**

Tratamientos	Muestras	Crecimiento (1° Medición)					
		PF (gr)	AP (cm)	DT (cm)	NH	LR (cm)	AFT (cm <sup>2</sup> )
Control	0.1	0.321	4.5	0.43	4	6.6	1.568
	0.2	0.198	3	0.6	5	7	1.096
	0.3	0.193	2.5	0.33	4	4	1.168
	0.4	0.414	2.6	0.668	4	3.5	0.32

	0.5	0.145	2.5	0.35	4	5	0.704
	0.6	0.322	3.2	0.43	3	3.5	0.688
<b>1</b>	1.1	0.341	2	0.4	3	5.5	1.48
	2.1	0.46	4.8	0.4	4	5.7	2.208
	3.1	0.419	2.1	0.45	4	11.5	1.344
	4.1	0.371	4.5	0.59	6	4.8	1.248
	5.1	0.649	4.1	0.474	3	6.5	4.656
	6.1	0.452	4.4	0.299	3	6.6	2.48
<b>2</b>	1.2	0.405	3.5	0.48	4	6	0.956
	2.2	0.405	3.3	0.34	4	9.2	2.356
	3.2	0.18	2.3	0.3	4	4.3	0.408
	4.2	0.522	4	0.57	1	4.5	0.16
	5.2	0.215	3.9	0.357	4	4.9	0.744
	6.2	0.388	3.3	0.271	1	3	1.088
<b>3</b>	1.3	0.509	5	0.67	4	4	1.44
	2.3	0.312	2.1	0.33	4	5.3	1.008
	3.3	0.295	4.1	0.47	6	5.2	1.032
	4.3	0.18	3	0.33	4	4.2	0.784
	5.3	0.466	3.1	0.412	4	3.6	2.944
	6.3	0.905	7.7	0.34	2	9.3	4.64
<b>4</b>	1.4	0.207	3.4	0.5	1	1.6	0.8
	2.4	0.417	2.8	0.4	2	5	0.224
	3.4	0.64	4.5	0.4	3	7.6	3.736
	4.4	0.209	3.3	0.33	3	4.3	0.704
	5.4	0.33	3.4	0.372	4	4.7	2.28
	6.4	0.566	5.1	0.286	3	8.5	4.52
<b>5</b>	1.5	0.258	2.2	0.55	3	8.1	0.96
	2.5	0.296	2.4	0.5	3	3.2	0.92
	3.5	0.374	4.6	0.26	3	7.5	2.344
	4.5	0.211	2.4	0.61	3	4.1	0.68
	5.5	0.376	2.5	0.542	2	5.5	1.088
	6.5	0.421	4.5	0.341	3	6.7	2.264
<b>6</b>	1.6	0.382	2.1	0.7	1	6.5	0.24
	2.6	0.252	2.6	0.4	3	7.2	1.144
	3.6	0.141	2.3	0.28	4	5.6	0.776
	4.6	0.178	3.5	0.37	3	6.4	0.832
	5.6	0.671	5.7	0.489	2	4.7	4.36
	6.6	0.47	3.4	0.386	2	3.8	1.416
<b>7</b>	1.7	0.219	2.1	0.3	1	6	0.224

	2.7	0.399	3.5	0.47	2	1.4	1.536
	3.7	0.361	4.2	0.5	3	2.9	1.952
	4.7	0.217	3.9	0.3	2	3.5	1.568
	5.7	0.424	3.5	0.305	3	6.7	1.752
	6.7	0.295	4.6	0.424	2	3.7	0.248
8	1.8	0.212	1.7	0.6	4	6.1	0.392
	2.8	0.235	2.7	0.26	3	3.8	0.656
	3.8	0.377	4	0.42	3	7.4	1.488
	4.8	0.605	3.8	0.5	3	4.2	2.76
	5.8	0.829	5.1	0.42	3	5	1.56
	6.8	0.607	6.3	0.32	3	6.4	3.896
9	1.9	0.153	2.9	0.34	1	3.4	0.168
	2.9	0.305	3	0.3	3	5.3	1.28
	3.9	0.129	2.4	0.4	3	7.7	0.72
	4.9	0.31	3.1	0.45	3	8	1.176
	5.9	0.754	4.5	0.292	3	5	2.552
	6.9	0.315	3	0.388	2	3.6	0.152

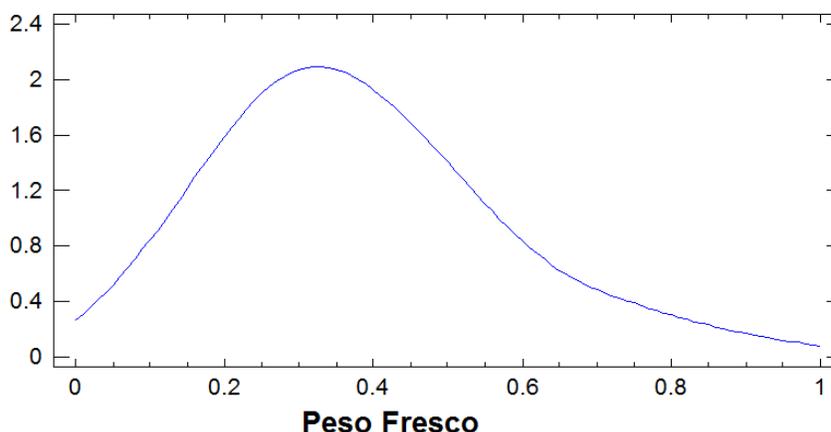
### 10.1.2 Peso Fresco.

En el cuadro 9 se presenta el resumen estadístico para peso fresco de los 9 tratamientos empleados para evaluar el efecto sinérgico de vermicomposta y hongo micorrizico arbuscular en *A. americana* L., se observa que el peso fresco vario desde 0.129 gr hasta 0.905 gr, teniéndose un rango de 0.776 gr lo cual indica que existe una variabilidad de 46.0158% según el coeficiente de variación, con un promedio de peso fresco de 0.381gr.

**Cuadro 9. Resumen estadístico de peso fresco (PF)**

Parámetro estadístico	Resultado
Recuento	54
Promedio	0.381833
Desviación Estándar	0.175704
Coeficiente de Variación	46.0158%
Mínimo	0.129
Máximo	0.905
Rango	0.776
Sesgo Estandarizado	2.91319
Curtosis Estandarizada	1.21548

En la ilustración 11 se puede observar que la curvatura esta ligeramente desplazada a la izquierda esto es debido a que el sesgo estandarizado tiene un valor de 2.91319 el cual se encuentra fuera del intervalo  $-2 +2$ , indicando con esto desviaciones significativas de la normalidad. El valor de curtosis estandarizada de 1.21548 indica que no existe una diferencia significativa en la normalidad, debido a que se encuentra dentro del intervalo  $-2 +2$ , presentando una homogeneidad y estiramiento medio observada en la ilustración 11.



**Ilustración 11. Grafica de densidad suavizada para peso fresco (PF)**

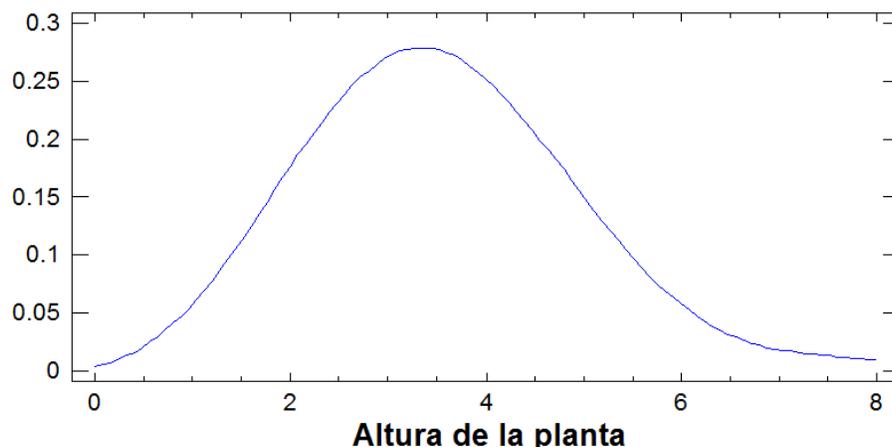
### 10.1.3 Altura de la planta

En el cuadro 10 se presenta el resumen estadístico para altura de la planta de los 9 tratamientos empleados para evaluar el efecto sinérgico de vermicomposta y hongo micorrizico arbuscular en *A. americana L.*, se observa que la altura de la planta vario desde 1.7 cm hasta 7.7 cm, teniéndose un rango de 6 cm lo cual indica que existe una variabilidad de 33.3307 % según el coeficiente de variación, con un promedio de altura de la planta 3.55926 cm.

**Cuadro 10. Resumen estadístico de altura de la planta (AT)**

<b>Parámetro estadístico</b>	<b>Resultado</b>
Recuento	54
Promedio	3.55926
Desviación Estándar	1.18632
Coefficiente de Variación	33.3307%
Mínimo	1.7
Máximo	7.7
Rango	6.0
Sesgo Estandarizado	2.9078
Curtosis Estandarizada	2.42196

En la ilustración 12 se puede observar que la curvatura esta ligeramente desplazada a la izquierda esto es debido a que el sesgo estandarizado tiene un valor de 2.9078 el cual se encuentra fuera del intervalo  $-2 +2$ , indicando con esto desviaciones significativas de la normalidad. Así también el valor de curtosis estandarizada se encuentra fuera de este rango, con un valor de 2.42196, indicando así que existe una diferencia significativa en la normalidad, presentando una homogeneidad y estiramiento ligeramente elevado observa en la ilustración 12.



**Ilustración 12. Grafica de densidad suavizada para peso fresco (PF)**

#### **10.1.4 Diámetro de tallo**

En el cuadro 11 se presenta el resumen estadístico para diámetro de tallo de los 9 tratamientos empleados para evaluar el efecto sinérgico de vermicomposta y hongo micorrizico arbuscular en *A. americana L.*, se observa que el diámetro del tallo vario desde 0.26 cm hasta 0.7 cm, teniéndose un rango de 0.44 cm lo cual indica que existe una variabilidad de 26.2753 % según el coeficiente de variación, con un promedio de diámetro de tallo de 0.410889 cm.

**Cuadro 11. Resumen estadístico de diámetro de tallo (DT)**

<b>Parámetro estadístico</b>	<b>Resultado</b>
Recuento	54
Promedio	0.410889
Desviación Estándar	0.107962
Coeficiente de Variación	26.2753%
Mínimo	0.26
Máximo	0.7

Rango	0.44
Sesgo Estandarizado	2.23164
Curtosis Estandarizada	-0.00800743

En la ilustración 13 se puede observar que la curvatura esta desplazada a la izquierda esto es debido a que el sesgo estandarizado tiene un valor de 2.23164 el cual se encuentra fuera del intervalo -2 +2, indicando con esto desviaciones significativas de la normalidad. Así también el valor de curtosis estandarizada se encuentra dentro de este rango, con un valor de -0.00800743, indicando así que no existe una diferencia significativa en la normalidad, presentando una homogeneidad y estiramiento ligeramente elevado observado en la ilustración 13.

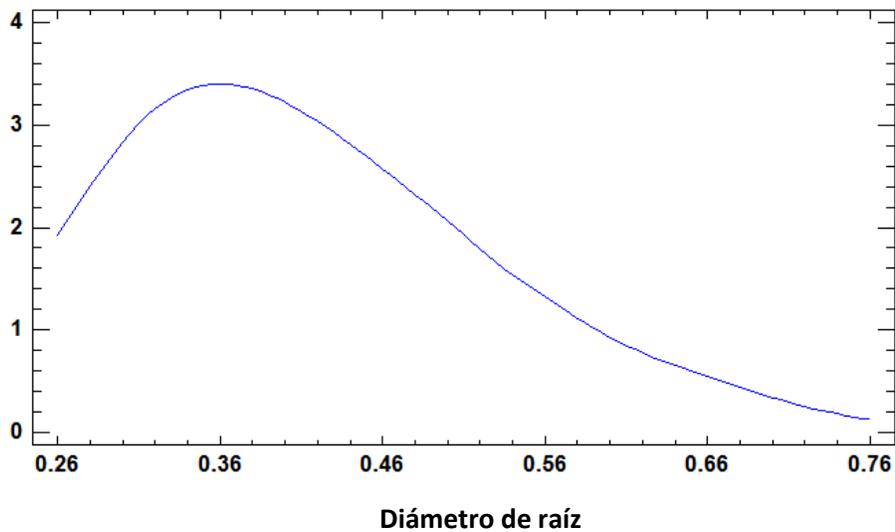


Ilustración 13. Grafica de densidad suavizada para diámetro de tallo (DT)

### 10.1.5 Número de hojas

En el cuadro 12 se presenta el resumen estadístico para numero de hojas de los 9 tratamientos empleados para evaluar el efecto sinérgico de vermicomposta y hongo micorrizico arbuscular en *A. americana L.*, se observa que el numero de hojas vario desde 1 hoja hasta 6 hojas, teniéndose un rango de 5 hojas lo cual indica que existe una variabilidad de 37.0659 % según el coeficiente de variación, con un promedio de numero de hojas de aproximadamente 3 hojas en cada planta.

Cuadro 12. Resumen estadístico de número de hojas (NT)

Parámetro estadístico	Resultado
Recuento	54

Promedio	2.96296
Desviación Estándar	1.09825
Coefficiente de Variación	37.0659%
Mínimo	1.0
Máximo	6.0
Rango	5.0
Sesgo Estandarizado	0.759055
Curtosis Estandarizado	1.37768

Se puede observar el sesgo estandarizado tiene un valor de 0.759055 y la curtosis estandarizada se reporta con un valor de 1.37768, los cuales se encuentran dentro del intervalo  $-2 +2$ , indicando con esto que los datos son provenientes de una distribución normal. En la ilustración 14 se muestra una curvatura simétrica tanto en el desplazamiento como en el alargamiento de esta, concluyendo con esto que no existen desviaciones significativas de la normalidad.

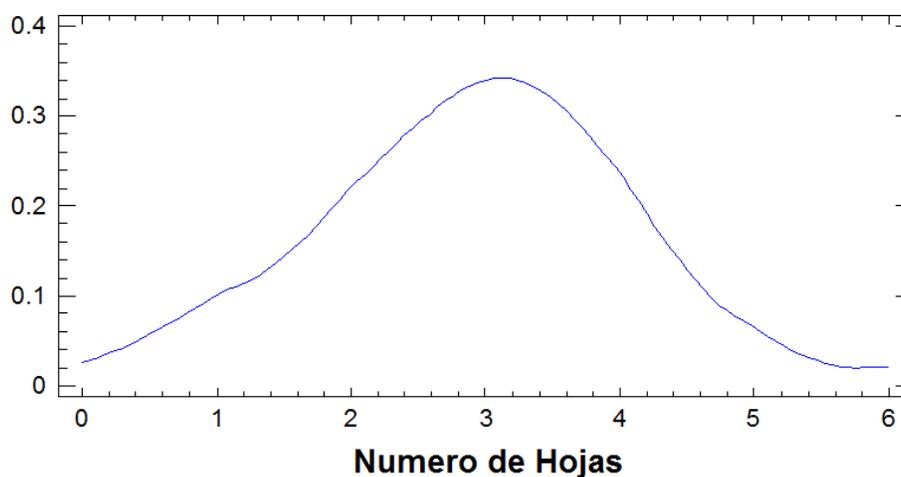


Ilustración 14. Grafica de densidad suavizada para número de hojas (NH)

### 10.1.6 Longitud de raíz

En el cuadro 13 se presenta el resumen estadístico para longitud de raíz de los 9 tratamientos empleados para evaluar el efecto sinérgico de vermicomposta y hongo micorrizico arbuscular en *A. americana L.*, se observa que longitud de raíz vario desde 1.4 cm hasta 11.5 cm, teniéndose un rango de 10.1 cm lo cual indica que existe una variabilidad de 35.8832 % según el coeficiente de variación, con un promedio de longitud de raíz de 5.46667cm.

Cuadro 13. Resumen estadístico de longitud de raíz (LR)

Parámetro estadístico	Resultado
Recuento	54
Promedio	5.46667
Desviación Estándar	1.96161
Coefficiente de Variación	35.8832%
Mínimo	1.4
Máximo	11.5
Rango	10.1
Sesgo Estandarizado	1.66113
Curtosis Estandarizada	1.03633

Se puede observar el sesgo estandarizado tiene un valor de 1.66113 y la curtosis estandarizada se reporta con un valor de 1.03633, los cuales se encuentra dentro del intervalo  $-2 +2$ , indicando con esto que los datos son provenientes de una distribución normal. En la ilustración 15 se muestra una curvatura simétrica tanto en el desplazamiento como en el alargamiento de esta, concluyendo con esto que no existen desviaciones significativas de la normalidad.

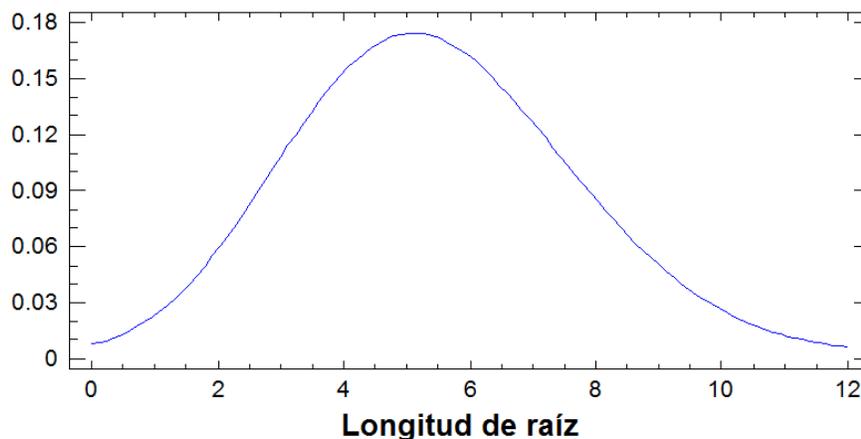


Ilustración 15. Grafica de densidad suavizada para longitud de raíz (LR)

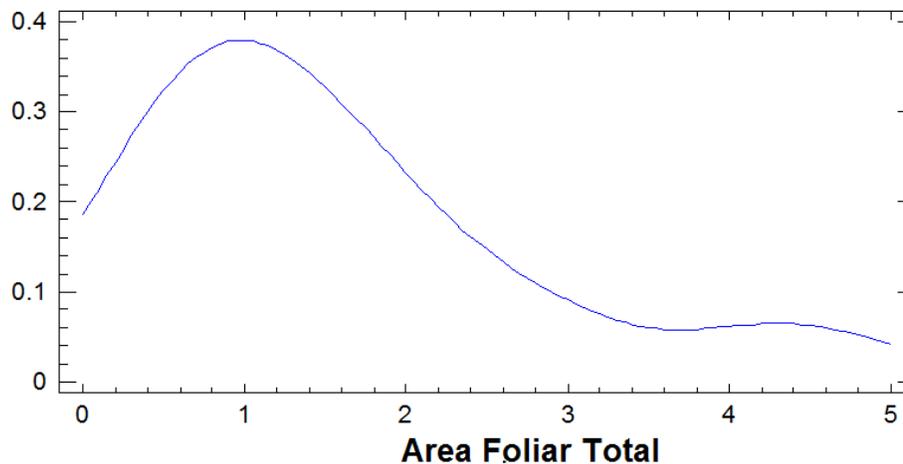
### 10.1.7 Área foliar total

En el cuadro 14 se presenta el resumen estadístico para el área foliar total de los 9 tratamientos empleados para evaluar el efecto sinérgico de vermicomposta y hongo micorrizico arbuscular en *A. americana L.*, se observa que el área foliar total vario desde 0.152 cm<sup>2</sup> hasta 4.656 cm<sup>2</sup>, teniéndose un rango de 4.504cm<sup>2</sup> lo cual indica que existe una variabilidad de 77.8197 % según el coeficiente de variación, con un promedio de longitud de raíz de 1.56193 cm<sup>2</sup>.

**Cuadro 14. Resumen estadístico del área foliar total (AFT)**

<b>Parámetro estadístico</b>	<b>Resultado</b>
Recuento	54
Promedio	1.56193
Desviación Estándar	1.21549
Coefficiente de Variación	77.8197%
Mínimo	0.152
Máximo	4.656
Rango	4.504
Sesgo Estandarizado	<b>3.61698</b>
Curtosis Estandarizada	<b>1.22727</b>

En la ilustración 16 se puede observar que la curvatura está completamente desplazada a la izquierda esto es debido a que el sesgo estandarizado tiene un valor de 3.61698 el cual se encuentra fuera del intervalo  $-2 +2$ , indicando con esto desviaciones significativas de la normalidad. Así también el valor de curtosis estandarizada se encuentra dentro de este rango, con un valor de 1.22727, indicando que no existe una diferencia significativa en la normalidad, presentando una homogeneidad y estiramiento ligeramente elevado observa en la ilustración 16.



**Ilustración 16. Grafica de densidad suavizada para área foliar total (AFT)**

### **10.1 Evaluación de contenido de clorofila.**

La medición de clorofila se realizó 45 días después de haber sembrado los explantes en las muestras, se utilizó un medidor de clorofila Minolta® SPAD 502, seleccionando una hoja por cada tratamiento para monitorear el contenido de

clorofila en unidades SPAD. Los datos obtenidos se muestran en el cuadro 15, reportándose el contenido de clorofila en unidades Spad. Coste y colaboradores en el 2010 realizaron un estudio del contenido de clorofila a las hojas de 13 especies de árboles de la selva tropical en la Guyana Francesa, para este estudio emplearon dos métodos de cuantificación de clorofila, obteniendo sus resultados en unidades SPAD y  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , con dichos resultados pudieron generar un modelo homográfico de la relación de las dos unidades. Este estudio es muy importante para este trabajo debido a que mediante este modelo inferimos la concentración de clorofila en unidades de  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ .

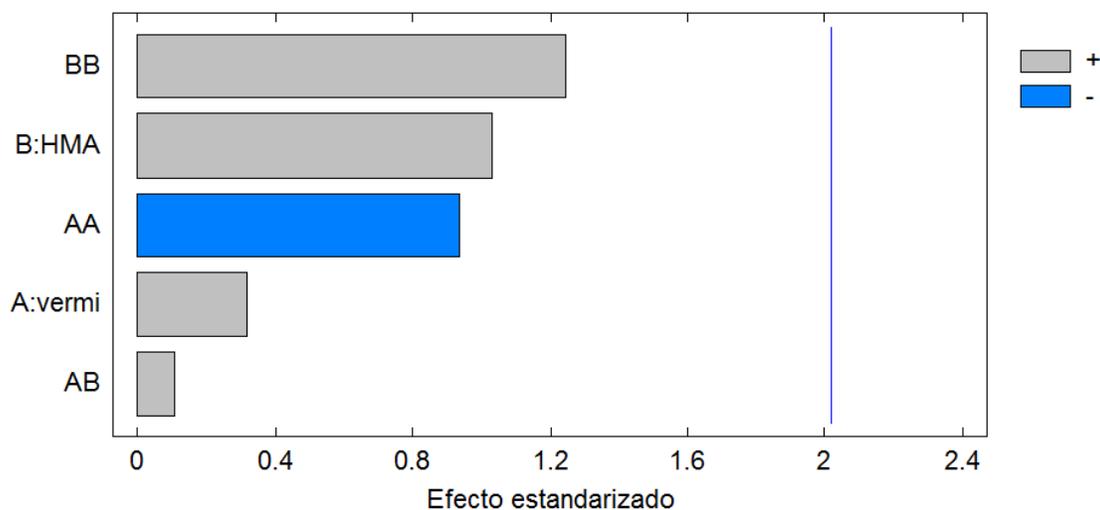
**Cuadro 15. Datos obtenidos en la medición de clorofila**

Tratamientos	Muestras	CONTENIDO DE CLOROFILA	
		Unidades Spad	Concentración de clorofila ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )
Control	0.1	32.9	33.22917026
	0.2	12.4	10.64233363
	0.3	27.7	26.77620934
	0.4	29.7	29.19145543
	0.5	18.1	16.21164143
	0.6	21.1	19.34249256
1	1.1	42.4	46.64637354
	2.1	38	40.14615662
	3.1	37.2	39.0193479
	4.1	24	22.51201538
	5.1	53.9	66.48083
	6.1	36.6	38.18478261
2	1.2	34.9	35.86791294
	2.2	30.2	29.80799056
	3.2	12.9	11.11218184
	4.2	19	17.13570548
	5.2	37.6	39.58072636
	6.2	33.8	34.40525035
3	1.3	30.2	29.80799056
	2.3	42.6	46.95463102
	3.3	28.7	27.97378059
	4.3	14.8	12.92957326
	5.3	46.4	53.04021866
	6.3	42.9	47.41919955
4	1.4	43.2	47.88640666
	2.4	27.6	26.65753877

	3.4	52.6	64.00103907
	4.4	20.6	18.81051154
	5.4	36	37.35909252
	6.4	40.8	44.22139948
<b>5</b>	1.5	21	19.23576345
	2.5	10.7	9.070291009
	3.5	16.2	14.30202051
	4.5	19	17.13570548
	5.5	13.9	12.062324
	6.5	30.4	30.05606214
<b>6</b>	1.6	24	22.51201538
	2.6	16.6	14.69948578
	3.6	0	0
	4.6	22.6	20.9637199
	5.6	45.3	51.2326637
	6.6	27.6	26.65753877
<b>7</b>	1.7	6.9	5.692475694
	2.7	11.6	9.897697464
	3.7	32.7	32.97029447
	4.7	33.6	34.1423117
	5.7	14.4	12.54269563
	6.7	9.9	8.343817475
<b>8</b>	1.8	19.8	17.96791692
	2.8	41	44.52058605
	3.8	18.8	16.92925254
	4.8	39.2	41.86720175
	5.8	10.9	9.25322604
	6.8	37.8	39.86293228
<b>9</b>	1.9	11.9	10.17591646
	2.9	26.3	25.13244655
	3.9	14.6	12.73584625
	4.9	44.6	50.10226401
	5.9	40.1	43.18291337
	6.9	14.2	12.35011884

El diagrama que se representa en la ilustración 17 es un diagrama de Pareto estandarizado, en el cual se representan los efectos divididos entre su error estándar, recordemos que el error estándar de un estadístico es una estimación de su desviación estándar, y esta a su vez es una estimación de la variación muestral que tiene dicho estimador, así el diagrama de Pareto estandarizado se

grafica la estimación de los efectos estandarizados (Gutiérrez et al. 2004). En la ilustración 17 se observa la grafica de Pareto para efectos estandarizados del contenido de clorofila en plántulas de *A. americana* L. encontrados 45 días después de haber sido sembrados en las muestras. Se encontró que ninguno de los factores evaluados tuvo un efecto estadístico significativo en el contenido de clorofila. Los grados de libertad del error es 42 y el cuadrado medio del error es de 170.013, por lo tanto calculando el punto crítico con  $p=0.05$  y con el uso de la Cuadro de distribución de t de student se obtiene un punto crítico de 2.04. Como ninguna de las barras supera la línea de punto crítico, entonces ningún factor tienen efecto estadístico significativo sobre el contenido de clorofila en plántulas de *A. americana* L.



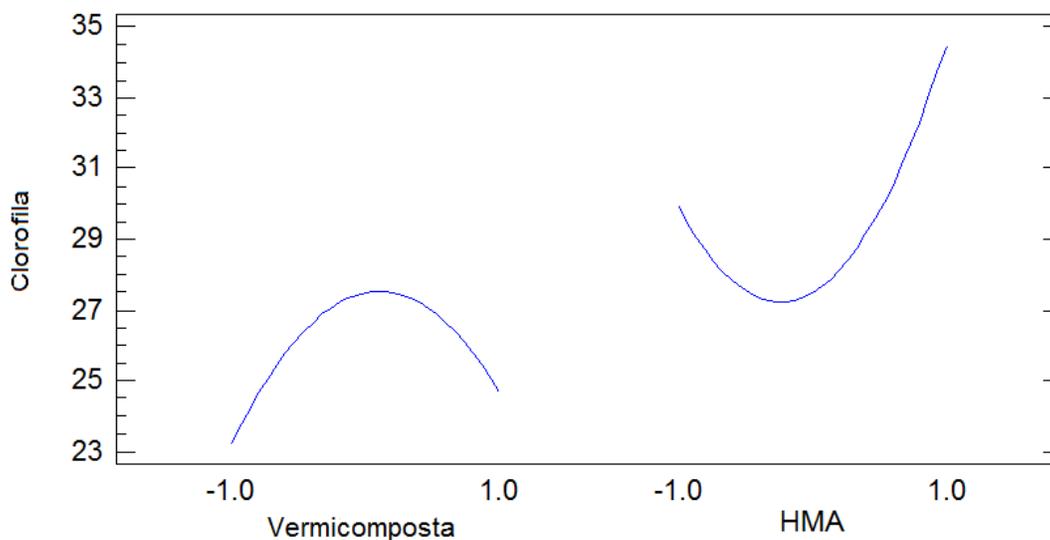
**Ilustración 17. Efectos estandarizados del contenido de clorofila en plántulas de *A. americana* L.**

Los efectos estandarizados presentados en el diagrama de Pareto se complementan con el análisis de varianza de los datos del cuadro 16, se presenta el análisis de varianza obtenido con los resultados del contenido de clorofila, se puede observar que ningún valor de p es menor o igual que 0.05, que fue la significancia estadística seleccionada, y por lo tanto se puede concluir que ni los HMA ni la vermicomposta influyeron sobre el contenido de clorofila, tampoco la interacción de estos factores y el cuadrático de los mismos.

**Cuadro 16. Análisis de varianza para comparar las medias de los resultados del contenido de clorofila de los explantes de *A. americana* L.**

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
A:vermi	17.405	1	17.405	0.10	0.7506
B:HMA	180.2	1	180.2	1.06	0.3091
AA	148.22	1	148.22	0.87	0.3558
AB	1.94988	1	1.94988	0.01	0.9152
BB	262.633	1	262.633	1.54	0.2208
bloques	373.043	5	74.6087	0.44	0.8188
Error total	7140.55	42	170.013		
Total (corr.)	8122.53	52			

En la ilustración 18 se muestra las graficas de los efectos del HMA y de la vermicomposta, se puede observar que los máximos porcentajes de contenido de clorofila se obtuvieron en las plántulas inoculadas con 3gr de HMA y que el 10% de vermicomposta fue el que promovió que las plántulas tuvieran el mayor contenido de clorofila.



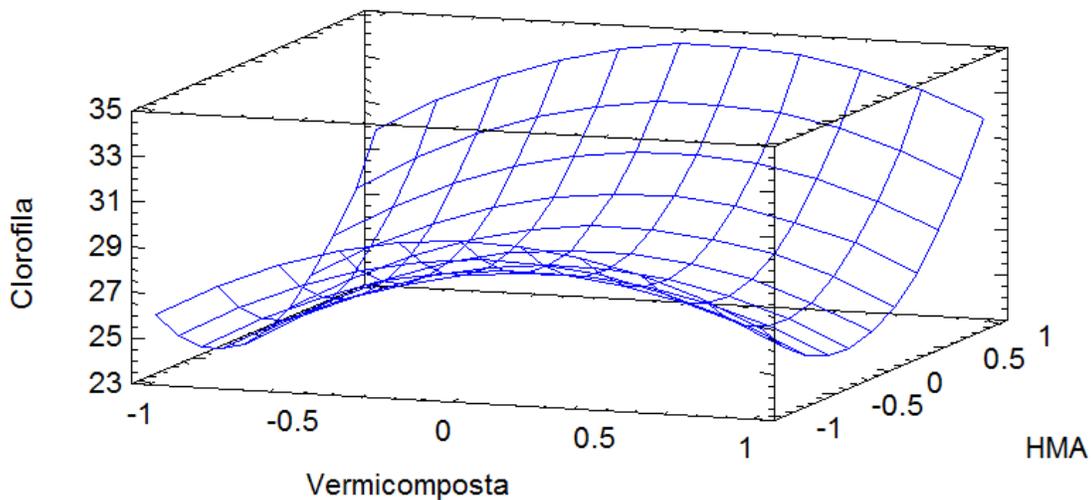
**Ilustración 18. Grafica de efectos del HMA y la vermicomposta sobre el contenido de clorofila de las plántulas de A. americana L.**

La ecuación de regresión que mejor ajusta los datos experimentales es:

$$CC = 27.9 + 1.38*V + 2.95*HMA - 4.22*V^2 + 0.71*V*HMA + 4.04*HMA^2 \dots \dots \dots (1)$$

En donde CC es el contenido de clorofila (Unidades Spad), HMA el hongo micorrizico arbuscular y V la vermicomposta. Las unidades de las variables son para el HMA gr y para la vermicomposta % con respecto al Peat Moss.

La grafica mostrada en la ilustración 19 se construye con la ecuación antes mencionada. Esta grafica sirve para evaluar el comportamiento del contenido de clorofila en función de los HMA y la vermicomposta para poder así localizar una región óptima que permita maximizar el contenido de clorofila de las plántulas, la región más óptima observada es con 3gr de HMA y con 10% de vermicomposta.



**Ilustración 19 Gráfica de superficie de respuesta para estimar los efectos de los HMA y la vermicomposta en el contenido de clorofila de las plántulas de *A. americana* L.**

En el Cuadro 17 se muestra la combinación de los niveles de los factores, la cual maximiza el contenido de clorofila sobre la región indicada, siendo para HMA el valor 3gr y para vermicomposta 10.7075 % los que maximizaran el efecto con un contenido de clorofila de 34.5444 unidades Spad ( $35.3919 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ )

**Cuadro 17. Valor óptimo para maximizar el contenido de clorofila en una región indicada.**

<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo</i>
Vermicomposta	-1.0	1.0	0.141586
HMA	-1.0	1.0	1.0

## 11. DISCUSIÓN

En el presente estudio se evaluó el efecto sinérgico entre HMA y vermicomposta, cuantificando el contenido de clorofila, en base al análisis estadístico de los datos obtenidos en los 9 tratamientos, que se pueden apreciar en el diagrama presentado en la ilustración 17, no hay un efecto significativo en el HMA ni en la vermicomposta, así como tampoco en la interacción de estos factores y el cuadrático de los mismos, sobre el contenido de clorofila. Estos resultados preliminares pueden deberse a que la evaluación del contenido de clorofila se realizó 45 días después de haberse llevado a cabo la siembra de las plántulas, se estima que el contenido de clorofila aumente con respecto al tiempo, esta relación fue analizada por Azarmi *et al.* (2009) quienes evaluaron el efecto de la vermicomposta estiércol de ovejas en propiedades cuantitativas y cualitativas de pepino (*Cucumis sativus* L.) cultivadas en invernadero, sus resultados mostraron que el contenido de clorofila se incrementó significativamente ( $P \leq 0,05$ ) en comparación con las parcelas control, para ambas variedades de pepino (*Cucumis sativus* L.) después de 30, 60 y 90 días del transplante. Otro factor que pudiese haber influido en que no se obtuviera un efecto significativo en el contenido de clorofila es que las plántulas solo fueron inoculadas con una sola cepa de HMA (*G. fasciculatum*), debido a que se ha reportado que existen diferencias en las concentraciones de contenido de clorofila en plantas tratadas cuando se inoculan cepas diferentes de HMA en comparación con las plantas control; este fenómeno fue documentado por Gogoi *et al.*, (2010) quienes evaluaron el crecimiento de piperácea (*Piper longum* L.) con cuatro diferentes cepas de HMA (*Glomus Maseae*, *G. fasciculatum*, *G. clarum* y *G. vestiforme*), resultando que el contenido de clorofila tuvo un efecto significativo en plantas inoculadas con *G. vestiforme* ( $1.163 \text{ mg g}^{-1}$ ) en comparación con las otras cepas de HMA.

El análisis estadístico sugiere que los máximos porcentajes de contenido de clorofila, mostrados en la ilustración 18 y en la ilustración 19, se obtuvieron con el tratamiento 9, en las plántulas inoculadas con el nivel más alto de HMA siendo este de 3gr y con el 10% de vermicomposta, con un contenido de clorofila de 34.5444 unidades Spad ( $35.3919 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). También los resultados obtenidos muestran que la concentración de clorofila en las plantas control fue de 23.65 unidades Spad ( $22.56 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), pudiéndose así observar que el contenido de clorofila aumento en un rango de 10. 89 unidades Spad comparado con el tratamiento 9. Efectos similares fueron mencionados por (Shivaputra *et al.*, 2004) donde fue evaluado el efecto individual y sinérgico de HMA y vermicomposta sobre el contenido de nitrógeno, fosforo y clorofila en hojas de papaya (*Carica papaya* L.), teniendo como resultado valores significativamente más altos de contenido de clorofila en plantas inoculadas con HMA con adición de

vermicomposta en comparación con los tratamientos control y los tratamientos adicionados solo con vermicomposta o solo con HMA. Esto sugiere que el contenido de clorofila aumentara con la adición de HMA y vermicomposta; ya que la asociación del HMA mejora la eficiencia fotosintética mediante la mejora de la nutrición de P, debido al efecto que presenta el P en las reacciones de asimilación de CO<sub>2</sub>, ya que la tasa de fotosíntesis está fuertemente influenciada por la concentración de P inorgánico en el cloroplasto demostrando con esto el aumento de la concentración de clorofila en las plantas inoculadas con HMA; y que el aumento de clorofila también se debe a la adición de vermicomposta debido a que es una rica fuente de nutrientes, humus-agrícolas, sustancias fijadoras de N-, y otros microorganismos beneficiosos.

## 12. CONCLUSIÓN

- El manejo de las condiciones ambientales predominantes controladas con el proceso de aclimatación redujo la pérdida de plántulas de *A. americana* L.
- No se encontró un efecto estadístico significativo del HMA ni de la vermicomposta, así como tampoco en la interacción de estos factores y el cuadrático de los mismos, sobre el contenido de clorofila en plantas de *A. americana* L. micropropagadas.
- Los máximos porcentajes de contenido de clorofila se obtuvieron con el tratamiento 9, con plántulas inoculadas con 3 g de HMA y que el 10% de vermicomposta.
- Los valores óptimos que maximizan el contenido de clorofila son de 3g de HMA y 10.3838% de vermicomposta.
- El empleo de la metodología de superficie de respuesta nos ayudó a encontrar las condiciones óptimas de contenido de clorofila en las plantas micropropagadas de *A. americana* L.

### 13. BIBLIOGRAFIA

Alarcón, A., & Cerrato, R. F. (2000). Biofertilizantes: Importancia y utilización en la agricultura. *Agricultura Técnica en México* , 26:191-203.

Aristizábal, M. L. (2010). Evaluación del crecimiento y desarrollo foliar del plátano hondureño enano (Musa AAB) en una región cafetera colombiana. *Agron.* , 16:23-30.

Atiyeh, R. M., Subler, S., Edwards, C., Bachman, G., & Shuster, J. D. (2000). Effects of vermicomposts and composts on plant growth in horticultural container media and soil. *Pedo biologia* , 44:579–590.

Azarmi, R., & Taleshmikail, M. T. (2008). Influence of vermicompost on soil chemical and physical properties in tomato (*Lycopersicum esculentum*) field. *African Journal of Biotechnology* , 7:2397-2401.

Barrer, S. E. (2009). El uso de hongos micorrizicos arbusculares como una alternativa para la agricultura. *Facultad de Ciencias Agropecuarias* , 7:124-127.

Bevacqua, R. a. (1993). Sewage sludge compost's cumulative effects on crop growth and soil properties. *Compost Science and Utilization.* , Spring 1993:34-37.

Bryan, H. a. (1991). Compost trials on vegetables and tropical crops. *Biocycle* , 32:36-37.

Businelli, M., Perucci, P., & Patumi, M. &. (1984). Chemical composition and enzymic activity of some worm casts. *Plant and Soil* , 80: 417-422.

Coste, S., Bartolo, C., Céline, L., Marco, É., Renaud, A., D., R. A., y otros. (2010). Assessing foliar chlorophyll contents with the SPAD-502 chlorophyll meter: a calibration test with thirteen tree species of tropical rainforest in French Guiana. *EDP Sciences* , 67:607p1-607p5.

Criollo, H. a. (2009). Efecto de la densidad de siembra sobre el crecimiento de plantas de rábano (*Raphanus sativus* L.) bajo invernadero. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* , 3:210-222.

Cuevas, L. H., Arguero, S. C., Chávez, P. G., Orea, Y. M., Romero, M. A., & Gallen, I. S. (2003). Hongos Micorrizógenos Arbusculares del Pedregal de San Ángel. México. 22

E. Albanell, J. P. (1988). Chemical changes during vermicomposting (*Eisenia fetida*) of sheep manure mixed with cotton industrial wastes. *Biology Fertility Soils* , 6:266-269.

Edwards, C. A., & Burrows, I. (1988). The potential of earthworm composts as plant growth media. *In Earthworms in Environmental and Waste Management Ed. C. A., Neuhauser, SPB Academic Publ. b.v* , 211-220.

Elvira, C. M. (1996). Bioconversion of solid paper-pulp mill sludge earthworms. *Bioresource Technology* , 57: 173-177.

García Herrera, E. J., Méndez-Gallegos, S. d., & Talavera-Magaña, D. (2010). El genero agave spp. en México: Principales usos de importancia socioeconómica y agrológica. *Revista Salud Pública y Nutrición, Edición Especial No. 5* , 5:110-113.

Gentry, H. (1982). Agaves of Continental North America. *Arizona University Press, Tucson.* , 670.

Gogoi, P., & R.K, a. S. (2010). Diferential effects of some arbuscular mycorrhizal inoculation on growth performance of *Piper loungum* L.(Piperaceae) under sterilized soil conditions. *Departament of Botany, Rajiv Gandhi University, Itanagar* , 4:119-125.

Gómez Ayala, R. d., Téllez-Luis, S. J., Ramírez de León, J. A., Jacques Hernández, C., & Vázquez Vázquez, . M. (2008). Aprovechamiento integral del *Agave americana* L. *UAM - Reynosa-Aztlán –UAT. Reynosa, Tam.* , 1-2.

Harrison, M. J. (1998). Development of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology* , 1:360-365.

Hoitink, H. &. (1986). Basis for the control of soilborne plant pathogens with composts. *Ann. Rev. Phytopathol* , 24: 93-114.

Hutchinson, J. (1979). The families of flowering plants. *Oxford University* , 3:968.

Kapoor, R., & Bhatnagar, D. S. (2008). Arbuscular mycorrhizae in micropropagation systems and their potential applications. *Scientia Horticulturae* , 116: 227–239.

Leigh, J., & Fitter, A. H. (2008). Arbuscular mycorrhizal fungi can transfer substantial amounts of nitrogen to their host plant from organic material. *New Phytologist* , 181:199–207.

Mathews, C. K., & VanHolde, y. K. (2001). Bioquímica. Madrid: McGraw-Hill. segunda edicion:650-659

Maynard, A. (1989). Agricultural composts as amendments reduce nitrate leaching. *Frontiers of Plant Science* , 24:2-4.

Meddad-Hamza, A., A. Beddiar, A. G., Lemoine, M. C., & Gianinazzi, C. K. (2010). Arbuscular mycorrhizal fungi improve the growth of olive trees and their resistance to transplantation stress. *African Journal of Biotechnology* , 9:1159-1167.

Mendoza, A. J. (2007). Los Agave de México. *Jardín Botánico, Instituto de Biología, Univesidad Nacional Atónoma de México* , 87:14-17.

Navarro Borrell, A., Rodés, R., & Ortega-Rodés, P. y. (2008). El estrés por temperatura provoca necrosis en tabaco negro; cuantificación por análisis de imágenes. *Revista Colombiana de Biotecnología* , 2:63-72.

Norman, Q., & Arancon, E. (2005). Effects of vermicompost on plant growth. *Soil Ecology Laboratory, The Ohio State University, Columbus, OH 43210 USA* , 8-10.

Oliva, V. F., Archila, M. A., Pérez, A. F., Solis, J. D., & Miceli, F. G. (2009). Influencia de los hongos micorrizicos arbusculares sobre el crecimiento de vitro plantulas de piña (*Ananas comosus* (L.) merr) con diferentes niveles de fósforo. *Gayana Botanica* , 66:1-9.

Peyvast, G., Olfati, J., & Forghani, S. M. (2008). Effect of vermicompost on the growth and yield of spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Journal of Food, Agriculture & Environment* , 6:110-113.

Quilambo, O. A. (2003). The vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *African Journal of Biotechnology* , 2:539-540.

Rai, M. K. (2001). Current advances in mycorrhization in micropropagation. *In Vitro Cell. Dev. Biol.Plant* , 37:158-167.

Reynoso Santos, R., García Mendoza, J. A., & López Báez, W. &. (2012). Identificación taxonómica de las especies de agave utilizadas para la elaboración del licor Comiteco en Chiapas. *Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación* , 1:5-6.

Ruíz, S. R. (2012). Micropropagación de Agave Americana L. por embriogénesis somática. *Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez* , 1-8.

Shivaputra, S., Patil, C., & Swamy, G. a. (2004). Cumulative effect of VAM fungi and vermicompost on nitrogen, phosphorus, potassium and chlorophyll content of papaya leaf. *Mycorrhiza News* , 16:15-16.

Sudhakar, G., LourduraJ, A. C., Rangasamy, A., & Velayutham, P. S. (2002). Effect of vermicompost application on the soil properties, nutrient availability uptake and yield of rice. *Agricultural reviews* , 23:127-133.

Valencia, J. C. (2009). Micropropagación de *Agave warelliana* (Baker, 1877). Xalapa, Veracruz, México: Universidad Veracruzana, Facultad de Biología. 5-18

Wu, Q.-S., & Zou, G.-H. L. (2011). Roles of arbuscular mycorrhizal fungi on growth and nutrient acquisition on peach (*prunus persica* L. batsch) seedlings. *The Journal of Animal & Plant Sciences* , 21:746-750.

## 14. ANEXOS

### 14.1 Anexo A. Tabla del área foliar por hoja en los 9 tratamientos.

AREA FOLIAR POR HOJA						
Tratamiento	Muestras	Numero de hoja	Largo (cm)	Ancho (cm)	Área Foliar (cm <sup>2</sup> )	Área Foliar Total (cm <sup>2</sup> )
Control	0.1	1	3.5	0.4	1.12	1.568
		2	1.4	0.4	0.448	
	0.2	1	2	0.4	0.64	1.096
		2	1.5	0.3	0.36	
		3	0.6	0.2	0.096	
	0.3	1	2.3	0.4	0.736	1.168
		2	1.8	0.3	0.432	
	0.4	1	1	0.2	0.16	0.32
		2	1	0.2	0.16	
	0.5	1	2	0.2	0.32	0.704
		2	1	0.2	0.16	
		3	0.7	0.2	0.112	
		4	0.7	0.2	0.112	
	0.6	1	2.2	0.3	0.528	0.688
2		1	0.2	0.16		
1	1.1	1	2.5	0.5	1	1.48
		2	1.2	0.4	0.384	
		3	0.6	0.2	0.096	
	2.1	1	4	0.3	0.96	2.208
		2	3.7	0.3	0.888	
		3	1.5	0.3	0.36	
	3.1	1	1.9	0.4	0.608	1.344
		2	2.4	0.3	0.576	
		3	1	0.2	0.16	
	4.1	1	3.2	0.4	1.024	1.248
		2	1.4	0.2	0.224	
	5.1	1	4.7	0.6	2.256	4.656
		2	4.3	0.5	1.72	
		3	1.7	0.5	0.68	
	6.1	1	4.1	0.4	1.312	2.48
		2	2.7	0.4	0.864	
		3	1.9	0.2	0.304	
	2	1.2	1	2	0.3	0.48
2			1.7	0.35	0.476	
2.2		1	3	0.4	0.96	2.356

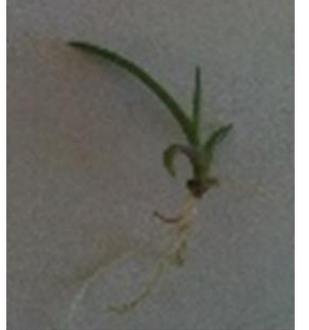
		2	2.7	0.35	0.756	
		3	2	0.3	0.48	
		4	1	0.2	0.16	
	3.2	1	1	0.1	0.08	0.408
		2	1	0.2	0.16	
		3	0.7	0.2	0.112	
		4	0.7	0.1	0.056	
	4.2	1	1	0.2	0.16	0.16
	5.2	1	3.1	0.3	0.744	0.744
	6.2	1	3.4	0.4	1.088	1.088
3	1.3	1	3.2	0.3	0.768	1.44
		2	4.2	0.2	0.672	
	2.3	1	1.5	0.3	0.36	1.008
		2	1.4	0.3	0.336	
		3	1.3	0.3	0.312	
	3.3	1	3.3	0.3	0.792	1.032
		2	1.5	0.2	0.24	
	4.3	1	2.3	0.1	0.184	0.784
		2	2.5	0.3	0.6	
	5.3	1	3.6	0.5	1.44	2.944
		2	1.3	0.4	0.416	
		3	2	0.4	0.64	
		4	1.4	0.4	0.448	
	6.3	1	6	0.7	3.36	4.64
		2	3.2	0.5	1.28	
	4	1.4	1	2.5	0.4	0.8
2.4		1	0.7	0.2	0.112	0.224
		2	0.7	0.2	0.112	
3.4		1	3.8	0.5	1.52	3.736
		2	4.5	0.5	1.8	
		3	1.3	0.4	0.416	
4.4		1	2.2	0.2	0.352	0.704
		2	1.1	0.4	0.352	
5.4		1	3.2	0.5	1.28	2.28
		2	1.2	0.2	0.192	
		3	3.1	0.2	0.496	
		4	1.3	0.3	0.312	
6.4		1	5.5	0.5	2.2	4.52
		2	4.5	0.6	2.16	
	3	2	0.1	0.16		

5	1.5	1	1.8	0.4	0.576	0.96
		2	1.6	0.3	0.384	
	2.5	1	1.4	0.4	0.448	0.92
		2	1.3	0.3	0.312	
		3	1	0.2	0.16	
	3.5	1	3.5	0.3	0.84	2.344
		2	3.7	0.4	1.184	
		3	2	0.2	0.32	
	4.5	1	1.7	0.3	0.408	0.68
		2	1.7	0.2	0.272	
	5.5	1	2.5	0.4	0.8	1.088
		2	1.2	0.3	0.288	
6.5	1	3.9	0.4	1.248	2.264	
	2	3.6	0.3	0.864		
	3	1.9	0.1	0.152		
6	1.6	1	1	0.3	0.24	0.24
	2.6	1	2.5	0.3	0.6	1.144
		2	1.6	0.3	0.384	
		3	1	0.2	0.16	
	3.6	1	2.2	0.2	0.352	0.776
		2	2	0.2	0.32	
		3	1.3	0.1	0.104	
	4.6	1	2.6	0.4	0.832	0.832
	5.6	1	5.5	0.5	2.2	4.36
		2	4.5	0.6	2.16	
	6.6	1	2.8	0.3	0.672	1.416
		2	3.1	0.3	0.744	
7	1.7	1	1.4	0.2	0.224	0.224
	2.7	1	3.4	0.3	0.816	1.536
		2	3	0.3	0.72	
	3.7	1	4	0.4	1.28	1.952
		2	2	0.4	0.64	
		3	0.4	0.1	0.032	
	4.7	1	2.8	0.4	0.896	1.568
		2	2.8	0.3	0.672	
	5.7	1	2.5	0.4	0.8	1.752
		2	3.4	0.3	0.816	
		3	1.7	0.1	0.136	
	6.7	1	1.2	0.2	0.192	0.248
2		0.7	0.1	0.056		

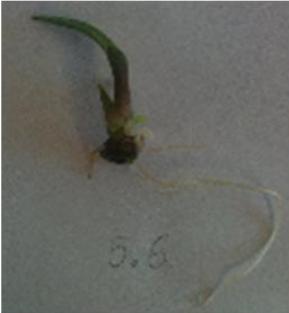
8	1.8	1	1.4	0.2	0.224	0.392
		2	0.7	0.3	0.168	
	2.8	1	3.1	0.2	0.496	0.656
		2	0.5	0.2	0.08	
		3	0.5	0.2	0.08	
	3.8	1	3.5	0.2	0.56	1.488
		2	4.6	0.2	0.736	
		3	2.4	0.1	0.192	
	4.8	1	2.5	0.6	1.2	2.76
		2	3	0.5	1.2	
		3	1.5	0.3	0.36	
	5.8	1	4	0.3	0.96	1.56
2		2.5	0.3	0.6		
6.8	1	5.1	0.5	2.04	3.896	
	2	4.3	0.4	1.376		
	3	2	0.3	0.48		
9	1.9	1	2.1	0.1	0.168	0.168
	2.9	1	2.6	0.4	0.832	1.28
		2	1.2	0.3	0.288	
		3	1	0.2	0.16	
	3.9	1	1.9	0.2	0.304	0.72
		2	1.5	0.2	0.24	
		3	1.1	0.2	0.176	
	4.9	1	2.5	0.3	0.6	1.176
		2	2.4	0.3	0.576	
	5.9	1	3.4	0.5	1.36	2.552
		2	3.5	0.3	0.84	
		3	2.2	0.2	0.352	
	6.9	1	1.1	0.1	0.088	0.152
		2	0.8	0.1	0.064	

**14.2 Anexo B. Tabla fotografías de plántulas de *A. americana* L.**

Tratamientos	MUESTRAS		
<b>0</b>	0.1	0.2	0.3
			
	0.4	0.5	0.6
			
<b>1</b>	1.1	2.1	3.1
			
	4.1	5.1	6.1
			

<b>2</b>	1.2	2.2	3.2
			
	4.2	5.2	6.2
			
	1.3	2.3	3.3
			
<b>3</b>	4.3	5.3	6.3
			
<b>4</b>	1.4	2.4	3.4

			
	4.4	5.4	6.4
			
	1.5	2.5	3.5
<b>5</b>			
	4.5	5.5	6.5
<b>6</b>			
	1.6	2.6	3.6

			
	4.6	5.6	6.6
			
	1.6	5.6	3.6
7			
	1.7	2.7	3.7
			
	4.7	5.7	6.7

			
	1.8	2.8	3.8
8			
	4.8	5.8	6.8
			
	1.9	2.9	3.9
9			

4.9



5.9



6.9

