

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

DIVISION DE CIENCIAS AGRICOLAS



BIOCONTROL DE *Fusarium oxysporum* Y PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO POR RIZOBACTERIAS EN *Agave tequilana* Weber Var. Azul

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

INGENIERO AGRÓNOMO

PRESENTA:

RAQUEL GUILLÉN CRUZ

ZAPOPAN, JALISCO MARZO DEL 2003.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS

Que me dio vida, salud y la oportunidad de disfrutar y compartir con mi familia y amigos una de las etapas mas felices de mi vida y porque nunca me dejó flaquear ni perder la fe en los momentos más difíciles.

A MI MADRE Y MIS HERMANOS

Por darme la libertad de elegir mi futuro, anhelando siempre mi preparación para enfrentarme a la vida y lograr así mi realización profesional. Siempre estarán en mi corazón.

A LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Por haber sido mi casa de estudios por medio del Centro Universitario de Ciencias Biologicas y Agropecuarias C.U.C.B.A.

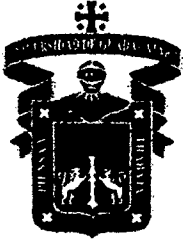
A MIS PROFESORES

Que directa o indirectamente participaron en mi formación profesional.

A MIS AMIGOS

A todos mis amigos del Laboratorio de Fitopatología y de CLM Santiago Ixc., por todo su apoyo y cariño.

Raquel Guillén Cruz.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS
BIOLOGICAS Y AGROPECUARIAS
CARRERA DE INGENIERO AGRONOMO
COMITE DE TITULACION

ING. ELENO FELIX FREGOSO
DIRECTOR DE LA DIVISION DE CIENCIAS AGRONOMICAS
PRESENTE

Con toda atención nos permitimos hacer de su conocimiento, que habiendo sido aprobada la modalidad de titulación: TESIS con el título:

" BIOCONTROL DE Fusarium oxysporum Y PROMOCION DE CRECIMIENTO POR RIZOBACTERIAS EN Agave tequilana Weber var. Azul. "

El cual fue presentado por él (los) pasante(s):

RAQUEL GUILLEN CRUZ

El Comité de Titulación, designó como director y asesores, respectivamente, a los profesores:

DR. GIL VIRGEN CALLEROS	DIRECTOR
M.C. RAMON RODRÍGUEZ RUVALCABA	ASESOR
M.C. CARLOS MANUEL DURAN MARTINEZ	ASESOR

Una vez concluido el trabajo de titulación, el Comité de Titulación designó como sinodales a los profesores:

DR. JOSE LUIS MARTINEZ RAMIREZ	PRESIDENTE
DR. FERNANDO SANTACRUZ RUVALCABA	SECRETARIO
M.C. AURELIO PEREZ GONZALEZ	VOCAL

Se hace constar que se han cumplido los requisitos que establece la Ley Orgánica de la Universidad de Guadalajara, en lo referente a la titulación, así como el Reglamento del Comité de Titulación.

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas, Zapopan, Jal. a 3 de marzo de 2003.

ING. RENE RODRIGUEZ VILLALOBOS
PRESIDENTE DELCOMITE DE TITULACION

M.C. SALVADOR GONZALEZ LUNA
SRIO. DEL COMITE DE TITULACION

**BIOCONTROL DE *Fusarium oxysporum* Y PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO
POR RIZOBACTERIAS EN *Agave tequilana* Weber Var. Azul**

INDICE

	Página
RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 Hipótesis.....	5
1.2 Objetivo general.....	5
1.2.1 Objetivos particulares.....	5
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
2.1 El cultivo del Agave (<i>Agave tequilana</i> Weber variedad Azul).....	6
2.1.1 Regiones cultivadas con agave tequilero en Jalisco.....	6
2.1.2 Taxonomía.....	7
2.1.3 Descripción botánica.....	7
2.2 Problemas Fitosanitarios.....	9
2.2.1 Plagas.....	9
2.2.2 Malezas.....	10
2.2.3 Enfermedades.....	11
2.2.3.1 Marchitez del agave causada por <i>Erwinia sp.</i>	12
2.2.3.2 Marchitez del agave causada por <i>Fusarium oxysporum</i>	13
2.3 Biología de <i>Fusarium oxysporum</i>	14
2.3.1 Síntomas de <i>Fusarium oxysporum</i> en Agave.....	14
2.3.2 Ciclo biológico de <i>Fusarium oxysporum</i>	15
2.4 Factores Ambientales en el desarrollo de la enfermedad.....	16
2.4.1 Temperatura.....	16
2.4.2 pH.....	17
2.4.3 Humedad.....	17

2.5 Sobrevivencia de <i>Fusarium</i>	18
2.6 Métodos de control de la enfermedad.....	18
2.6.1 Control genético.....	18
2.6.2 Control cultural.....	18
2.6.3 Control químico.....	19
2.6.4 Control biológico.....	19
2.6.5 Mecanismos de control biológico.....	21
2.6.5.1 Antibiosis.....	21
2.6.5.2 Competencia.....	22
2.6.5.3 Parasitismo.....	22
2.6.5.4 Resistencia sistémica inducida.....	23
2.6.5.5 Hipovirulencia.....	23
2.6.5.6 Biosurfactantes.....	23
2.6.6 Rizobacterias promotoras de crecimiento de las plantas (PGPR).....	24
2.6.7 Mecanismos de promoción de crecimiento.....	25
2.6.7.1 Producción de sideróforos.....	25
2.6.7.2 Producción de fitohormonas.....	26
2.6.7.3 Solubilización de minerales.....	26
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
3.1 Aislamiento de <i>Fusarium oxysporum</i>	27
3.2 Aislamiento de bacterias antagonicas.....	27
3.3 Aislamiento de rizobacterias promotoras del crecimiento (PGPR) en <i>Agave tequilana</i>	29
3.4 Bioensayo de PGPR sobre <i>Agave</i> en condiciones de invernadero.....	31
3.4.1 Diseño del experimento.....	32
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
5. CONCLUSIONES.....	45
6. BIBLIOGRAFIA.....	46
7. ANEXOS.....	52

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Plagas asociadas al cultivo del <i>Agave tequilana</i> Weber var. Azul.....	9
Cuadro 2.	Principales Malezas en las plantaciones de <i>Agave tequilana</i>	10
Cuadro 3.	Fitopatógenos asociados al cultivo del <i>Agave tequilana</i>	11
Cuadro 4.	Origen y número de las cepas de bacterias aisladas de plantas sanas de <i>Agave tequilana</i>	28
Cuadro 5.	Resultado de Unidades Formadoras de Colonias (UFC/ml) en la inoculación de plantas de <i>Agave tequilana</i> con rizobacterias promotoras de crecimiento (PGPR). Fecha de inoculación: Octubre 11, 2001	31
Cuadro 6.	Pruebas de inhibición <i>in vitro</i> por bacterias antagonicas a <i>Fusarium oxysporum</i> de <i>Agave tequilana</i>	33
Cuadro 7.	Pruebas de inhibición <i>in vitro</i> por rizobacterias promotoras de crecimiento (PGPR) de <i>Agave tequilana</i>	36
Cuadro 8.	Crecimiento radicular en <i>Agave tequilana</i> a un mes de inoculación con bacterias promotoras de crecimiento (PGPR). Fecha de evaluación: Noviembre 11, 2001	37
Cuadro 9.	Crecimiento radicular en <i>Agave tequilana</i> a dos meses de inoculación con bacterias promotoras de crecimiento (PGPR). Fecha de evaluación: Diciembre 11, 2001	40
Cuadro 10.	Unidades Formadoras de Colonias (UFC/ml) de Rizobacterias promotoras de crecimiento (PGPR) en la inoculación de los tratamientos	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Inhibición <i>in vitro</i> de <i>Fusarium oxysporum</i> por bacterias antagónicas.....	35
Figura 2.	Resultado de los tratamientos a un mes de inoculación con las rizobacterias promotoras de crecimiento de las plantas (PGPR) en <i>Agave tequilana</i>	38
Figura 3.	Comparación entre el Testigo y la bacteria 5 a un mes de inoculación.....	39
Figura 4.	Resultado de los tratamientos a dos meses de inoculación con las rizobacterias promotoras de crecimiento de las plantas (PGPR) en <i>Agave tequilana</i>	41
Figura 5.	Comparación entre el Testigo y la bacteria 5 a dos meses de inoculación.....	42

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue buscar bacterias antagónicas a *Fusarium oxysporum* y rizobacterias promotoras del crecimiento en las plantas utilizados en el control biológico y que puedan ser una alternativa como método de control preventivo para productores de *Agave tequilana* Weber var. Azul. Se hicieron aislamientos de *Fusarium oxysporum* en medio de cultivo PDAA a partir de muestras de tejido dañado en piñas y raíces de *Agave tequilana* en los municipios de Arenal, Amatitán, Tequila y Antonio Escobedo. El aislamiento de bacterias antagónicas se realizó en medio de cultivo AN y para la obtención de bacterias promotoras de crecimiento de las plantas (PGPR) se utilizaron los medios de cultivo PAF, TSB y DF en los mismos municipios. Los resultados mostraron que de 1250 cepas bacterias aisladas, solo cinco fueron capaces de inhibir el desarrollo micelial de *Fusarium oxysporum*, *in vitro*. Los aislamientos señalados con los números 3 y 103 mostraron mayor halo de inhibición sobre el hongo, mientras que las bacterias 13, 34 y 45 mostraron un menor halo de inhibición. Por otra parte, las bacterias promotoras de crecimiento señaladas con los números 3, 4, y 5 estimularon mayor crecimiento de masa radicular, mientras que las bacterias 1 y 2 tuvieron un efecto mínimo en relación al testigo.

1. INTRODUCCION

1. INTRODUCCIÓN

Uno de los más elegantes tipos de maguey que existen fue definido a finales del siglo XIX como *Agave tequilana*, es un cultivo de gran importancia para la industria tequilera, ya que es la materia prima cuya destilación da como producto final la bebida alcohólica denominada "Tequila", exquisito aguardiente que se ha convertido en la más famosa y representativa de las bebidas alcohólicas mexicanas. La demanda de esta bebida se ha incrementado notablemente en los últimos años tanto a nivel nacional como internacional, (Muriá, 2002).

Este refinado agave, como también se le llama desde hace casi dos siglos, y que significa "admirable" en griego, se encuentra más cómodo donde existe buen drenaje, un clima "semiseco" y sin cambios bruscos de temperatura, cuyo promedio no se aleje demasiado de los 20° centígrados. Conviene, además, que la lluvia sea aproximadamente de 1000 mm anual, que la altitud del terreno se acerque a los 1,500 msnm y que crezca bajo un cielo nublado entre 65 y 100 días al año. Los mejores suelos son los arcillosos, permeables y abundantes en elementos derivados del basalto, también ricos en fierro, cuya oxidación les da el color café o rojizo característico, (Muriá, 2002).

México es el mayor productor de agave en el mundo y Jalisco ocupa el primer lugar con una producción de 294.1 Ton., que se producen en un área de 50,000 ha., de donde se obtienen 83.3 millones de litros de tequila, de los cuales se exportan 41.8 millones de litros a varios países (C.R.T., 2002). En Jalisco, de acuerdo a la generación de agave, existen tres zonas productoras, las cuales se clasifican en Altos, Centro y Sur, estas representan una fuente importante de divisas y además, la industria del tequila es un soporte económico sustancial para numerosas familias en el estado y del país, (Rodríguez, 2002).

Las áreas de producción de agave con registro de Denominación de Origen en el país, conforme al "Acuerdo de Lisboa", exigen la delimitación de la zona geográfica productora y la delimitación de la exclusividad de las cualidades organolépticas del producto, atribuibles al medio geográfico, físico y humano de origen por lo que se estableció como

territorio de origen el comprendido por el estado de Jalisco y algunos municipios de los estados de Nayarit, Guanajuato, Michoacán y Tamaulipas, (Guerrero, 2002).

En Jalisco las zonas de acuerdo a la producción de agave se clasifican en Altos, Centro y Sur, también es el estado con denominación de origen ocupando el primer lugar como productor de agave, con una producción de 99'203,206 plantas que se producen en un área de 50,000 ha. (C.R.T., 2002). La demanda del tequila ha incrementado notablemente su producción y consumo tanto nacional como internacional; aumentando así la necesidad de materia prima, misma que se obtiene del cultivo del agave. Este cultivo representa un valor económico y social muy importante, ya que constituye una fuente importante de divisas para nuestro país, (Rodríguez, 2002).

Desafortunadamente, desde hace algunos años la industria del tequila atraviesa una gran crisis. El cultivo del agave ha sido severamente afectado por enfermedades. Algunos de los principales patógenos asociados al agave que se han identificado son: la bacteria del género *Erwinia sp.*, así como los hongos *Fusarium sp.* y *Pythium sp.* (Valenzuela, 1994). La pudrición del tallo en *Agave tequilana* Weber es causada por *Fusarium oxysporum* que se considera como una de las enfermedades más importantes en el cultivo (Luna, 1996). Este hongo dentro del periodo de incubación no produce síntomas iniciales, el patógeno infecta las raíces y avanza lentamente destruyendo el tejido vegetal. Debido a esto no son percibidos sino hasta que el hongo ha invadido grandes áreas de tejido, es hasta después que avanza la severidad de la enfermedad, que se presentan síntomas externos como: enrollamiento y decoloración de las hojas que contrasta con el azul típico de las plantas sanas. También causa una pudrición seca dejando una apariencia polvosa que avanza de las raíces hacia la piña, cuando la enfermedad es detectada en forma visual por los productores, el avance del hongo es tal que la muerte de la planta infectada es inminente, (C.R.T., 2001).

El principal control de este fitopatógeno se realiza con la aplicación de agroquímicos, método con una gran limitante debido al impacto ambiental que ocasiona, consecuencias como toxicidad al hombre, resistencia de ciertos patógenos, además de incrementar los

costos del cultivo, (Valenzuela, 1994). Ante esta situación, se han llevado a cabo algunos trabajos de investigación con la finalidad de establecer nuevas alternativas de control que produzcan un menor impacto ambiental, que permitan reducir significativamente el uso de plaguicidas, los cuales por su elevado costo, también representan una limitante para los productores, por esta razón demandan constantemente tecnologías adecuadas para el combate y control de estas enfermedades. Es importante encontrar alternativas para el control de las enfermedades, y lograr un manejo integrado del problema fitosanitario procurando que este sea eficiente y de bajo costo económico y ambiental. (Rodríguez, 2002).

El uso de microorganismos antagonicos en el control biológico se ha incrementado notablemente como una alternativa al uso de plaguicidas. Por otra parte las rizobacterias promotoras de crecimiento de las plantas incluyen un diverso grupo de bacterias obtenidas del suelo que puede estimular el crecimiento de las plantas en uno o más mecanismos. Es por esta razón la búsqueda de controladores biológicos, así como inductores del crecimiento de la planta en agave con una mayor producción a corto plazo del que se ha obtenido en la actualidad de una manera sustentable, (Kloepper, 1989).

Con este antecedente y con la importancia que representa para la industria tequilera el conocimiento sobre los factores que propician el desarrollo y la diseminación de las principales enfermedades en el cultivo del agave y la importancia que representa *Fusarium oxysporum* como patógeno, así como los diversos métodos de control, el presente trabajo contempla la siguiente hipótesis y objetivos.

1.1 Hipótesis

En la rizósfera de las plantas sanas de agave se encuentran bacterias antagónicas a *Fusarium oxysporum*, además de rizobacterias promotoras de crecimiento en las plantas de *Agave tequilana*.

1.2 Objetivo General.

Buscar bacterias antagónicas a *Fusarium oxysporum* y rizobacterias promotoras de crecimiento en *Agave tequilana*.

1.2.1 Objetivos Particulares.

- Buscar Rizobacterias antagónicas a *Fusarium oxysporum* aislado de *Agave tequilana* en condiciones *in vitro*.
- Aislar Rizobacterias promotoras de crecimiento en *Agave tequilana*.

2. REVISION DE LITERATURA

2. REVISION DE LITERATURA

2.1 El cultivo del agave (*Agave tequilana* Weber variedad Azul).

2.1.1 Regiones cultivadas con agave tequilero en Jalisco.

La región cultivada con mayor antigüedad corresponde a la de Tequila, también llamada región Centro. Está representada por los municipios de Tequila, Amatitán, Arenal, Ameca, Tala, Etzatlán y Hostotipaquillo, entre otros. La región de los Altos está constituida por los municipios de Tepatitlán, Arandas, Atotonilco, Zapotlanejo, Ayotlán, Acatic y Jesús María, principalmente. Ambas regiones conforman dos núcleos geográficos separados con sistemas de producción del agave muy diferentes. Las condiciones ambientales (clima y suelos), sociales, económicas y culturales definen patrones de cultivo diferentes aún tratándose de la misma especie vegetal. Las técnicas agrícolas varían con la región, rendimientos y características de la materia prima, (Valenzuela, 1994).

Se estima que el agave tequilero se cultiva en bajos porcentajes (10 por ciento) en los municipios del sur de Jalisco como Tonaya y Venustiano Carranza y en los municipios de Ixtlahuacán del Río, Tlajomulco y Jocotepec. Dentro de este bajo porcentaje también se ubican las plantaciones de los estados de Guanajuato, Michoacán, Nayarit y Tamaulipas. (Valenzuela, 1994).

2.1.2 Taxonomía.

Reino: Vegetal
División: Fanerógamas
Subdivisión: Angiospermas
Clase: Monocotiledóneas
Familia: Agavaceas
Género: *Agave*
Especie: *tequilana* Weber

El origen de la diversidad de variedades y morfoespecies de agave son el resultado de varias acciones, entre las que están: la selección de fenotipos sobresalientes en poblaciones nativas, la hibridación natural cuando algunos de éstos fenotipos coincidían en un mismo sitio y la dispersión de esta variación por los mismos habitantes, lo que semeja un caso de selección masal recurrente. Generalmente, la clasificación de las especies estuvo basada en características vegetativas y cuando se presentaban plantas con diferencias significativas se consideraban como nuevas especies, (Gil, 1997).

2.1.3 Descripción botánica.

Es una planta surculosa que se extiende radicalmente de 1.2 a 1.8 metros de altura. Su tallo es grueso, corto de 30 a 50 cm de altura al madurar. Las hojas de 90 a 120 x 8 a 12 cm lanceoladas, acuminadas, de fibras firmes, casi siempre rígidamente estiradas, cóncavas, de ascendentes a horizontales. Lo más ancho de las hojas se encuentra hacia la mitad y son angostas y gruesas hacia la base, generalmente de color glauco azulado a verde grisáceo. El margen de las hojas es recto a ondulado o repando; los dientes generalmente son de tamaño regular y espaciados irregularmente, en su mayoría de 3 a 6 mm de largo a la mitad de la hoja. Los ápices de los dientes son delgados, curvos o flexos desde poca altura de la base piramidal. Los dientes son de color café claro a oscuro, de 1 a 2 cm de separación; rara vez son remotos o largos. La espina por lo general es corta de 1 a 2 cm de largo, rara vez larga achatada o abiertamente surcada de arriba, su base es ancha, de color café obscura

decurrente o no decurrente. La inflorescencia es una panícula de 5 a 6 metros de altura y densamente ramosa a lo largo, con 20 a 25 umbelas largas difusas de flores verdes y estambres rosados. Las flores son de 68 a 75 mm de largo con bractéolas sobre los pedicelos de 3 a 8 mm de longitud. El ovario es de 32 a 38 mm de largo, cilíndrico con cuello corto, inconstricto, casi terminado en punta sobre la base. El tubo floral es de 10 mm de profundidad, de 12 mm de ancho, funeliforme y surcado. Los pétalos son desiguales de 25 a 28 mm de longitud por 4 mm de ancho, lineares, erectos pero rápidamente flojos en la anthesis, cambiando entonces a cafesosos y secos. Los filamentos miden de 45 a 50 mm de largo doblados hacia adentro junto al pistilo, insertados de 7 a 5 mm cerca de la base del tubo; las anteras son de 25 mm de largo. El fruto es una cápsula ovada a brevemente cuspidada (Gil, 1997).

2.2 Problemas fitosanitarios.

2.2.1 Plagas.

Los daños de los insectos en el agave son desde dos puntos de vista por alimentación directa y como vectores potenciales de enfermedades al ocasionar puertas de entrada de patógenos o introducirlos directamente (Luna, 1998).

Los daños causados por insectos de mayor incidencia en el cultivo de agave, son plagas de raíz, plagas de la cabeza y de las hojas (Valenzuela, 1994).

Cuadro 1. Plagas asociadas al cultivo del *Agave tequilana* Weber var. Azul. (Valenzuela, 1994).

Nombre común	Nombre científico
Plagas de la raíz:	
Larvas de gallina ciega	<i>Anomala sp.</i> , <i>Ciclocephala spp.</i> , <i>Macroductylus spp.</i> , <i>Phyllophaga spp.</i>
Diabrotica	<i>Diabrotica spp.</i>
Plagas de la cabeza:	
Barrenador	<i>Acentroneme hisperiaris.</i>
Picudo o mayate negro	<i>Scyphophorus acunpunctatus</i>
Plagas de las hojas:	
Grana o cochinilla	<i>Dactylopius coccus</i>
Escamas	<i>Aonidiella sp.</i> , <i>Lepidosaphes sp.</i>
Algodoncillo o piojo harinoso	<i>Planococcus harinoso</i>
Plagas del cogollo:	
Trips	<i>Frankliniella occidentalis</i>
Pulgones	<i>Rhopalosiphum maidis</i> , <i>Schizaphis graminum</i>

2.2.2 Malezas.

La eliminación de malezas es imprescindible en el manejo de este cultivo y es de suma importancia desde el establecimiento de la plantación. Además de hacer competencia al agave, las malezas aumentan los riesgos de incendios, heladas, plagas y enfermedades. Las malezas que predominan en las zonas mezcaleras son pastos, y en menor cantidad hierbas y arbustos de hoja ancha. Los zacates, por su magnitud, son las principales malezas por controlar, (Valenzuela, 1994).

Cuadro 2. Principales malezas en las plantaciones de *Agave tequilana*, (Valenzuela, 1994).

Nombre común	Nombre científico
Zacates:	
Mota	<i>Chloris virgata</i>
Pata de gallina	<i>Digitaria sanguinalis</i>
Horquetilla	<i>Brachiaria plantaginea</i>
Liendrilla	<i>Eragrostis mexicana</i>
Especies de hoja ancha:	
Quelite	<i>Amaranthus sp.</i>
Gallito	<i>Oxalis sp.</i>
Guajito	<i>Crotalaria pumila</i>
Carretilla	<i>Medicago sp.</i>
Gusanillo	<i>Dalea leporina</i>
Vaquerillo	<i>Sycios sp.</i>
Babosilla	<i>Sida rhombifolia</i>
Guías	<i>Ipomoea sp.</i>

2.2.3 Enfermedades.

El daño causado por enfermedades en las plantas, se observa a simple vista y es consecuencia del desarrollo de microorganismos dentro de ellas. Los patógenos (microorganismos dañinos) consumen de la planta sus alimentos y producen sustancias tóxicas que interfieren en su funcionamiento. La planta se defiende y en ocasiones la enfermedad sucumbe sola, pero en otras prosigue hasta llegar a ser crónica o letal (Valenzuela, 2002).

Virgen *et, al* (2002) reportan los siguientes fitopatógenos asociados al cultivo del *Agave tequilana* Weber variedad azul:

Cuadro 3. Fitopatógenos asociados al cultivo del *Agave tequilana* (Virgen *et, al* 2002).

Fitopatógeno		Parte afectada
Nombre común	Nombre científico	
Anillo rojo	<i>Erwinia sp</i>	Hojas
Marchitez bacteriana	<i>Erwinia sp</i>	Hojas y piña
Pudrición de raíz	<i>Fusarium oxysporum</i>	Raíces y piña
Pudrición de raíz	<i>Phytophthora sp</i>	Raíces
Mancha Anular	<i>Didymosphaeria sp</i>	Hojas
Mancha foliar	<i>Botryodiplodia sp</i>	Hojas
Mancha negra foliar	<i>Rhizoctonia solani</i>	Hojas
Viruela	<i>Pleospora sp</i>	Hojas
Virus	Virus no identificado	Hojas
Nemátodos	<i>Pratylenchus sp</i>	Raíces
Nemátodos	<i>Dorylaimus sp</i>	Raíces
Nemátodos	<i>Helicotylenchus sp</i>	Raíces

Algunos de los principales patógenos asociados al agave que se han identificado son: la bacteria del género *Erwinia sp*, así como los hongos *Fusarium sp.* y *Pythium sp.* (Valenzuela, 1994). La pudrición del tallo en *Agave tequilana Weber* es causada por *Fusarium oxysporum* (Luna, 1996). Entre los fitopatógenos más importantes de este cultivo sin duda alguna destacan aquellos asociados a la marchitez del agave, este síntoma se ha asociado a fitopatógenos tales como *Erwinia sp* y *Fusarium sp*, o bien por la acción de ambos fitopatógenos, (Martínez, *et. al*, 1998).

2.2.3.1 Marchitez del agave causada por *Erwinia sp*.

Esta enfermedad es sin duda alguna junto con la marchitez del agave causada por *Fusarium oxysporum*, el factor fitopatológico más importante en la producción del cultivo. No se tiene la certeza de que inicie por acción de insectos vectores que succionan los tejidos tiernos o si la agresividad de la bacteria hace posible su entrada aun sin ayuda de vectores. Los primeros síntomas se observan en el cogollo; las hojas cercanas a éste se marchitan y presentan ciertos puntos en relieve. La marchitez se torna general, en ocasiones acompañada con la pudrición del cogollo. Las tonalidades rosas y rojizas en las bases de las hojas aparecen como una falsa madurez. Esta enfermedad se acompaña de exudados de color rojizo en la base de las hojas (Ibarra, 2001).

Martínez *et al.* (1998) mencionaron que los síntomas típicos de la marchitez bacteriana son lesiones necróticas acuosas en las hojas que en la mayoría de los casos inician en la espina apical ó en las espinas laterales, estas lesiones avanzan hacia el centro de la hoja y en el centro del cogollo causando una pudrición descendente que llega hasta la piña y puede provocar la muerte de las mismas.

A la fecha se han aislado diferentes especies de bacterias asociadas a la pudrición del cogollo, entre ellas la más común es *Erwinia carotovora* misma que se ha diagnosticado en dicho síndrome. La bacteria es un bacilo corto de 1 a 3 micras y tiene flagelos peritricos, son anaerobios facultativos y causan un gran número de pudriciones acuosas. Generalmente las colonias son pequeñas y hundidas en el medio de cultivo CVP, (Vélez *et al.*, 1996).

El avance de *Erwinia carotovora* depende de la humedad que se forme en las hojas internas del cogollo, esto aparentemente se debe a la película de humedad que se forma sobre las hojas, la cual desplaza los niveles de oxígeno favoreciendo el desarrollo de la bacteria. Lo anterior se ha demostrado en la pudrición de tejido de tubérculos de papa provocado por *Erwinia carotovora*, encontrándose que esta es menor en condiciones de oxígeno adecuado (Maher y Kelman, 1983), considerándose que es más severa cuando existen condiciones bajas de oxígeno (Lund y Wyatt, 1972).

Así mismo, se ha mencionado que la severidad de esta enfermedad se incremento de manera mas notoria en predios infestados de maleza, ya que, la ventilación se ve disminuida, lo cual provoca un incremento en la humedad de las hojas del agave, con el consecuente avance de la pudrición, (Burton y Wigginton, 1970).

2.2.3.2 Marchitez del agave causada por *Fusarium oxysporum*.

El hongo responsable de esta enfermedad es *Fusarium oxysporum*. Algunos de los factores que favorecen el desarrollo de este patógeno en un gran número de cultivos son: pH, temperatura, nivel de humedad en el suelo y presencia de otros organismo que dañan las raíces (nemátodos, insectos, otros) y la fertilización (especialmente la nitrogenada), entre otros. (C.R.T. 2001).

Las especies del género *Fusarium* son consideradas entre los patógenos económicamente más importantes, dada la amplia gama de hospederos que ataca, causando severos daños en los cultivos, así mismo, este patógeno esta ampliamente distribuido localizándose en áreas templadas, tropicales y subtropicales así como en zonas frías. Algunas especies del género son además patogénicas al hombre, animales y otras producen importantes micotoxinas en muchos alimentos. (Agrios,1998).

El patógeno infecta las raíces y avanza lentamente destruyendo el tejido vegetal. Debido a que el hongo no es muy agresivo, la planta tiene tiempo de reaccionar produciendo

más raíces que reemplazan a las que han sido afectadas. Debido a esto, el daño o los síntomas no son percibidos sino hasta que el hongo ha invadido grandes áreas de tejido. Cuando la enfermedad es detectada en forma visual por los agricultores, el avance del hongo es tal que la muerte de la planta infectada es inminente. (Martínez, 2000).

2.3 Biología de *Fusarium oxysporum*.

Fusarium oxysporum produce tres tipos de esporas asexuales: microconidias, macroconidias, y clamidosporas, pueden ser unicelulares o bicelulares, y son el tipo de esporas más abundantes y frecuentemente producidas por el hongo en cualquier condición. Los macroconidios, están formados de tres a cinco células, gradualmente puntiagudas y curvadas hacia el final, estas esporas son comúnmente encontradas sobre la superficie de plantas muertas por este patógeno. Las clamidosporas son redondas, esporas gruesas, de pared celular gruesa, producidas de cualquier forma ya sea terminal o intercaladamente sobre micelio viejo o en macroconidias. Estas esporas pueden ser de una o dos células (Agrios, 1998).

En el medio de cultivo PDA, las diferentes formas especiales de *Fusarium oxysporum* pueden tener apariencia muy variada. En general, el micelio aéreo primero aparece blanco y puede cambiar a una variedad de colores, desde violeta a púrpura oscuro, según la raza (o forma especial) del hongo. Si los esporodoquios son abundantes, el cultivo puede aparecer en color crema o naranja, (Fuskey, 2000).

2.3.1 Síntomas de *Fusarium oxysporum* en Agave.

Fusarium oxysporum causa diversos síntomas en la planta como pudrición seca de raíces, marchitamientos y decoloración de las hojas. Las plantas son afectadas en todos los estados del desarrollo, incluso en los hijuelos de la planta madre. El agave, la fuente de inóculo, se encuentra en el suelo penetrando las raíces jóvenes o por las heridas producidas en las raíces adultas, crece en los tejidos radicales externos hasta llegar al tejido vascular en

forma axial, produciendo micelio que luego invade las raíces y posteriormente la piña, (Martínez, 2000).

Martínez *et al.* (1998) mencionan que el hongo *Fusarium oxysporum* produce síntomas iniciales tales como: encarrujamiento y decoloración de las hojas que contrastan con el azul típico de las plantas sanas, también provoca que las hojas se marchiten enrollándose hacia el centro de las mismas (encarrujamiento o acigarramiento), el patógeno causa una destrucción de las raíces y provoca una lesión rojiza en la piña, tanto el daño a raíces como a la piña causa una apariencia polvosa de los tejidos, esta avanza hacia la piña (muerte ascendente), provocando un desprendimiento fácil de la planta.

2.3.2 Ciclo biológico de *Fusarium oxysporum*.

Fusarium oxysporum es un hongo abundante y saprofitico activo en suelos y materia orgánica, y tiene la capacidad para sobrevivir en el suelo entre ciclos de siembra infectando los restos de las plantas.

El género *Fusarium*, está caracterizado en su ciclo de vida por diferentes fases, las cuales incluyen:

- **Fase I** (fase determinativa primaria), caracterizada por el éxito o la falla del patógeno en penetrar el tejido externo del hospedero.
- **Fase II** (fase determinativa secundaria), la cual consiste en el éxito o falla de la colonización del sistema vascular del hospedero.
- **Fase expresiva**, en la cual ocurre el desarrollo de síntomas del hospedero por el patógeno.
- **Senescencia o muerte del tejido hospedero por el patógeno.** Esto sucede debido al crecimiento del hongo dentro del tejido vascular de la planta, produciendo marchitez de las hojas, y eventualmente la muerte de la planta.
- **Producción de estructuras de resistencia por el patógeno.** Las Clamidosporas son rápidamente formadas e incorporadas dentro del suelo y sirve como propágulo para su siguiente diseminación.

- **Liberación de estructuras en el suelo.** Una vez que la superficie del tejido muerto, es abundantemente esporulada, estas esporas pueden ser usadas como nuevo inóculo para otra propagación del hongo.
- **Renovación de las estructuras de resistencia por crecimiento saprofítico, sobre restos orgánicos y exudados de raíces.**
- **Renovación por estructuras de resistencia por infecciones ocasionadas en raíces de hospederos y no hospederos** , (Virgen, 1998).

2.4 Factores ambientales en el desarrollo de la enfermedad.

Las condiciones ambientales son importantes en la infección y expresión de síntomas. La variabilidad genética del agave es poca para desarrollar variedades tolerantes, por ello es importante el entendimiento de numerosos factores ambientales para el mantenimiento de los niveles adecuados de producción. Las especies del género *Fusarium* son altamente variables por su composición genética y por los cambios en el ambiente en el que crece y son causa de cambios morfológicos. Factores tales como: la temperatura, huésped, pH, virulencia del patógeno, nutrientes del suelo y estado nutricional de la planta, microflora, humedad, oxígeno, entre otros, todos ellos influyen en la presión de la infección del patógeno al hospedero y por ende en la capacidad de resistencia del hospedero, ya que la manifestación y desarrollo de enfermedades se da cuando tres factores coinciden: una planta susceptible, un patógeno infectivo y un medio favorable. (Virgen, 1998).

2.4.1 Temperatura.

La temperatura tiene un marcado efecto sobre el desarrollo de los hongos incluyendo a *Fusarium*, la severidad de la enfermedad es máxima en suelos a temperaturas de 18-25°C y declina dramáticamente superior a los 30°C, (Virgen, 2000).

Bernal y López (2001), reportan que el desarrollo del micelio de *Fusarium oxysporum* aislado de *Agave tequilana* se favorece en temperaturas de 15 a 25°C. La germinación *in*

vitro de microconidios es óptima a temperaturas de 15 a 25°C, mientras que la germinación de macroconidios es mayor a una temperatura de 20°C, y finalmente la germinación de clamidosporas es favorable a una temperatura de 20 a 25°C.

2.4.2 pH.

El pH del suelo es un factor de suma importancia en el desarrollo de *Fusarium*, dado que este se ve favorecido en un rango de 4.5 a 6.5, teniendo un óptimo en la mayoría de las especies de 5.5 a 6.0, cualquier práctica que favorezca este pH, incrementará el daño causado por *Fusarium*, (Virgen, 1998).

Bernal y López (2001), reportaron que el desarrollo del micelio y la germinación de microconidios se favorecen a pH de 5.0 a 6.5, mientras que la germinación de macroconidios fue mayor a pH de 5.0 a 5.5, la germinación de clamidosporas fue favorable a pH de 5.0 a 5.5.

2.4.3 Humedad.

Fusarium crece al máximo en cualquier grado de humedad del suelo, sólo que en condiciones muy húmedas reduce la infección. Sin embargo la baja humedad favorece al patógeno y acentúa sus síntomas de marchitamiento, (Martín, 1981).

2.5 Sobrevivencia de *Fusarium*.

El hongo *Fusarium* tiene la capacidad de invernar sobre material muerto de las plantas en el campo o como organismo de materia orgánica hasta por 20 años, aún en ausencia de plantas susceptibles. Algunos factores pueden afectar su sobrevivencia como, humedad en el suelo, comportamiento saprofítico sobre residuos de raíces de hijuelos, plantas asintomáticas en el campo y rotación de cultivos. Se favorece la sobrevivencia en suelo limoso, pero no en arena fina o limo arcilloso. Además este patógeno puede sobrevivir en malezas como *Cyperus rotundus*, *Leptochloa chinensis*, (Virgen, 1998).

2.6 Métodos de control de la enfermedad.

Existen ciertos factores que favorecen el desarrollo y diseminación del hongo cuando no existe un manejo adecuado en el cultivo del agave, cabe mencionar que existen cuatro tipos de métodos de control: genético, cultural, químico y biológico, (García y Vazquez, 2002).

2.6.1 Control genético.

Es el que se basa en la tolerancia o resistencia genética de las plantas aplicados a la agricultura, (García y Vazquez, 2002).

2.6.2 Control cultural.

Es aquel en que las prácticas normales de un cultivo pueden ser utilizadas para reducir la incidencia de una enfermedad, y estas pueden ser muy variadas; las más usadas por su eficacia son las aplicaciones de residuos de cosechas y modificadores orgánicos, (García y Vazquez, 2002).

2.6.3 Control químico.

Está basado en la aplicación de agroquímicos para el control de enfermedades, es un método con gran limitante debido al impacto que ocasiona: toxicidad al hombre y otros organismos, contaminación de mantos freáticos, resistencia mutagénica de ciertos patógenos, además de incrementar los costos de cultivo, (Virgen, 2000).

El control químico se dirigió durante muchas décadas al control de los hongos, por lo que comúnmente se realiza el término fungicida para referirse a los productos químicos que controlan las enfermedades en las plantas, (García y Vazquez, 2002).

El control químico no ha resultado muy efectivo porque el hongo habita en el suelo, el cuál constituye una barrera física entre el hongo y los fungicidas. No obstante se han realizado algunos intentos por reducir el efecto del patógeno. Por ejemplo el fungicida Thiabendazole da resultados viables en el control, (Virgen, 2000).

2.6.4 Control biológico.

De los patógenos de las plantas es un área de investigación relativamente nueva y promete ser una de las formas aceptables en el control de las enfermedades de las plantas, debido al poco desequilibrio ecológico que ocasiona y su amplia posibilidad de usarse en programas de manejo integrado, está basado en el uso de microorganismos y consiste en la reducción de inóculo ó actividad productora de enfermedad (Cook, 1995).

El control biológico se basa en el uso de microorganismos que pueden ser antagonicos, parásitos o que producen antibiosis sobre el patógeno y es una de las formas mas aceptables en el control de enfermedades de las plantas. Frecuentemente se asocia la promoción del crecimiento de la planta a que las rizobacterias promotoras de crecimiento (PGPR), son también capaces de proteger a las plantas contra el ataque de fitopatógenos, a este proceso se le denomina control biológico, (Jiménez et al., 2001).

En varias partes del mundo se realizan esfuerzos en investigación y desarrollo para encontrar nuevas alternativas que complementen el uso de plaguicidas y fertilizantes químicos en la producción de cultivos. Entre las principales causas de la búsqueda de nuevas alternativas para el control de plagas así como nuevos esquemas de fertilización, destacan la preocupación de los riesgos al medio ambiente y al hombre por exposición a plaguicidas, contaminación de los mantos freáticos por lixiviaciones de fertilizantes y agroquímicos aplicados al suelo, pérdida de control químico sobre ciertos patógenos (generación de resistencia) y las limitaciones económicas sobre la aplicación de químicos costosos en áreas agrícolas con cosechas de poco valor remunerativo. (Kloepper, 1989).

El control biológico de las enfermedades en las plantas en un amplio sentido comprende el uso de cualquier organismo para controlar un patógeno, incluyendo el uso de plantas superiores y la resistencia genética de las plantas hospederas, es una alternativa de control que se ha incrementado notablemente en los últimos 65 años, principalmente con el uso de microorganismos de la rizósfera, dado que ellos constituyen la línea frontal de defensa entre fitopatógenos nativos del suelo y las raíces de las plantas, siendo candidatos ideales de usarse en la reducción de enfermedades, (Schmidt, 1990).

Un manejo integrado de la enfermedad puede disminuir el daño causado por este patógeno. En este manejo integrado destaca la posibilidad del control biológico, considerando a *Bacillus subtilis* como un organismo que tiene significancia en la reducción de la enfermedad, (Virgen, 2000).

Garcés (2000) recomienda buscar el biocontrolador específico en el medio natural de los cultivos o agrosistemas y las condiciones que propicien su eficacia; ya que se corre un gran riesgo al importar microorganismos que pueden resultar adversos para otras especies nativas ya sea como patógenos vasculares o como vectores de micovirus, no presentes en nuestros ecosistemas, que pueden afectar tanto plantas como microorganismos autóctonos.

2.6.5 Mecanismos de control biológico.

Varios mecanismos de control biológico se han descrito para la reducción o supresión de fitopatógenos; los cuales involucran antibiosis, competencia y exclusión de nicho, parasitismo y lisis, resistencia sistémica inducida, hipovirulencia y biosurfactantes. Aunque posiblemente los mecanismos más importantes en bacterias de biocontrol sean la antibiosis y la competencia básicamente por nutrientes, (Arias *et al.*, 2001).

Indudablemente los antibióticos son los mecanismos más importantes de control ya que existen evidencias que apoyan el papel de los antibióticos en el control biológico, son básicamente 5 tipos; 1) muchos agentes de control biológico producen antibióticos *in vitro*; 2) para algunos agentes de control biológico la producción de antibióticos se correlaciona con la actividad de biocontrol; 3) los antibióticos purificados, filtrados de cultivos o extractos de los filtrados de algunos agentes de biocontrol duplican el efecto de esos agentes; 4) mutantes deficientes en la producción de antibióticos de algunos agentes de biocontrol son menos supresivos que las cepas parentales y la complementación genética restaura la de control; 5) algunos antibióticos producidos por agentes de biocontrol pueden aislarse en habitats naturales, (Arias *et al.*, 2001).

2.6.5.1 Antibiosis.

Se refiere a la producción por parte de un microorganismo de sustancias tóxicas para otros microorganismos. Los antibióticos en el control biológico tienen un papel importante en la supresión de enfermedades, siendo producidos principalmente por bacterias. Existe un gran número de bacterias capaces de producir antibióticos como mecanismo de supresión de enfermedades causadas por hongos, entre las principales bacterias como agentes de control biológico se encuentran: *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Pasteuria*, *Streptomyces* entre otras. Los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* son los más estudiados por sus propiedades de control biológico, (García y Vazquez, 2002).

Por su capacidad antagónica, *Bacillus subtilis* es un importante antagonista, que se encuentra comúnmente en el suelo, distribuida con una alta densidad de población, sobrevive largos periodos y tolera temperaturas altas mejor que otros microorganismos, (Virgen, 2000).

2.6.5.2 Competencia.

Se puede definir como el desigual comportamiento de dos o más organismos ante un mismo requerimiento, siempre y cuando la utilización del mismo por uno de los organismos reduzca la cantidad disponible para los demás. Consiste en la lucha de los organismos por recursos esenciales tales como; espacio, hospederos, nutrientes, este concepto en el control biológico involucra 2 pasos en la interacción agente de biocontrol – patógeno, el primero es la competencia entre el agente de biocontrol y el patógeno, permitiendo el control biológico, y el segundo es la competencia entre el agente de biocontrol y la microflora nativa de la rizósfera (Raaijmakers y Weller, 2000).

Uno de los mecanismos de competencia más ampliamente estudiado en el control biológico es la producción de sideróforos como mecanismo de control biológico. Estos se han asociado también con la capacidad de incrementar el desarrollo y el rendimiento de las plantas (Kleopfer *et al.*, 1989).

2.6.5.3 Parasitismo.

Este mecanismo de control biológico, es un fenómeno que ocurre frecuentemente en algunos hongos. Se considera que este mecanismo junto con la antibiosis y sideróforos son los principales mecanismos de antagonismo, el parasitismo consiste en que un organismo (normalmente hongo) ataca a otro organismo (hongo) y consiste en la utilización del patógeno como alimento por su antagonista. Hasta la década de los setentas no se consideraba a este mecanismo como una herramienta efectiva en el control biológico. Los micoparásitos más ampliamente utilizados por su potencial en el control biológico son:

Trichoderma y *Gliocadium*. *Gliocadium virens* por ejemplo es un micoparásito eficiente sobre *Rhizoctonia solani* AG-3 y AG-4 y *Sclerotium spp.*, (Estrada *et al.*, 2001).

2.6.5.4 Resistencia sistémica inducida.

La resistencia se refiere a la capacidad de una planta de resistir o suprimir el desarrollo del patógeno mediante mecanismos bioquímicos y físicos o estructurales de resistencia, cuando esta ha sido estimulada previamente. Investigaciones recientes demostraron que algunas rizobacterias promotoras del crecimiento, protegen a las plantas de varios patógenos por inducción de resistencia sistémica (Bernard, 1995).

2.6.5.5 Hipovirulencia.

Este fenómeno puede definirse como, la reducción de la virulencia de una cepa de un patógeno, como resultado de la presencia de ácido ribonucleico de doble cadena (ds RNA) (Agrios, 1998). Las moléculas de ds RNA en las cepas hipovirulentas se encuentran en el citoplasma y son transmisibles entre las cepas solamente por anastomosis, las cepas virulentas que reciben esas moléculas se vuelven hipovirulentas; el mecanismo por el cual el ds RNA causa hipovirulencia, aún es desconocido (Schmidt, 1990).

2.6.5.6 Biosurfactantes.

Los biosurfactantes son referidos a aquellos compuestos que poseen una parte polar y una no polar, los más comunes son del grupo de los ramnolípidos, que son producidos por diversas especies de bacterias, entre ellas *P. aureofascines* la cual produce un biosurfactante sumamente activo sobre *Phytophthora capsici*, el mecanismo de control está dado en la intercalación de la parte polar del biosurfactante en la membrana de las zoosporas del patógeno (Schmidt, 1990).

2.6.6 Rizobacterias promotoras de crecimiento en las plantas (PGPR).

Las bacterias son los habitantes del suelo más comunes, posiblemente por su rápido crecimiento y reproducción así como por su capacidad para utilizar un amplio rango de sustancias como fuente de carbono o nitrógeno y aquellas que promueven el desarrollo de las plantas son llamadas "*Rizobacterias Promotoras del Crecimiento de las Plantas*" (Plant Growth- Promoting Rhizobacterial, PGPR). Frecuentemente una cepa PGPR puede inducir tanto promoción de crecimiento de la planta como control biológico de enfermedades (Virgen, 2000).

El concepto PGPR fue definido por Kloepper (1980), estimulan significativamente el crecimiento de las plantas, por lo que se ha establecido cuatro características que definen este grupo:

1. Que no requieran de la invasión interna de los tejidos en plantas, como ocurre en los hongos micorrícicos con la formación de arbusculos o nódulos en el caso de *Rhizobium*.
2. Que tengan una elevada densidad poblacional en la rizósfera después de su inoculación, ya que una población que declina rápidamente tiene una baja capacidad competitiva con la microflora nativa del suelo.
3. Que presenten capacidad de colonización efectiva en la superficie de la raíz y, como consecuencia, puedan influir positivamente en el crecimiento de la planta.
4. Que no produzcan daños en el hombre ni a otros organismos incluyendo la planta.

En cuanto al efecto positivo sobre el crecimiento de las plantas, las PGPR pueden actuar de manera directa o indirecta:

Mecanismos directos: ocurre cuando los metabolitos producidos por algunas cepas de rizobacterias son utilizados como reguladores de crecimiento o precursores de éstos por parte de la planta.

Mecanismos indirectos: los metabolitos producidos por las PGPR pueden funcionar como determinantes antagónicos, involucran aspectos de control biológico, suprimen o inhiben el crecimiento de microorganismos perjudiciales para el desarrollo de la planta, vía

producción de sideróforos, antibióticos, acción de enzimas líticas o inducción de mecanismos de resistencia.

La conjunción de ambos mecanismos de acción ha dado como resultado la promoción evidente del crecimiento en plantas; se ha observado un incremento en la emergencia, el vigor y el peso de plántulas, un mayor desarrollo en sistemas radicales y un incremento hasta de un 30% en la producción de cultivos de interés comercial. (Jiménez *et al.*, 2001).

2.6.7 Mecanismos de promoción de crecimiento.

En diferentes PGPR se han reportado que facilitan la promoción del crecimiento de las plantas. Las PGPR pueden fijar el nitrógeno atmosférico y suplementarlo a las plantas. Las PGPR tienen un papel importante en el control de varios patógenos propios del suelo, siendo también benéficas para varias plantas directamente por la producción de metabolitos que estimulan crecimiento de la raíz y el crecimiento de la planta o activan la inducción de adquirir un sistema de resistencia, (Carletti, 2000).

2.6.7.1 Producción de sideróforos.

Los sideróforos son compuestos biosintéticos, producidos por muchos microorganismos aerobios y anaerobios facultativos, sirven como vehículo para el transporte de Fe^{3+} al interior de las células microbiales. Los sideróforos son compuestos de bajo peso molecular (400-1000 D) que tienen alta afinidad por el ión Fe^{3+} que queda así poco disponible para hongos fitopatógenos como *Fusarium sp.* y otros patógenos de plantas. Estos sideróforos secuestran el Fe^{3+} , y lo regresan al interior de la célula bacteriana, también pueden solubilizarlo en el suelo y hacerlo disponible para la planta (Virgen, 2000).

2.6.7.2 Producción de fitohormonas.

Algunas PGPR interactúan con sus hospederos mejorando su crecimiento, debido a la producción de fitohormonas (auxinas, giberelinas y citoquininas). Por otra parte también se ha demostrado que algunas cepas de *B. subtilis* son capaces de producir ciertas cantidades de compuestos parecidos a las giberelinas y la producción de estas se ha correlacionado con un mayor crecimiento de las plantas, así como de uniformidad en el desarrollo, (Carletti, 2000).

2.6.7.3 Solubilización de minerales.

Muchos de los minerales o elementos necesarios para el desarrollo de las plantas en ocasiones se encuentran poco disponibles, las razones pueden ser diversas, pero frecuentemente incluyen; retención por partículas o agregados del suelo, pH del suelo, o formas no asimilables para las plantas. Algunos de los métodos para aislar PGPR puede hacerse mediante el uso de 1-aminocyclopropane-1- carboxylate (ACC), como la única fuente de nitrógeno, estas bacterias con esta actividad promueven el desarrollo y la elongación de las raíces por la inhibición del etileno, lo cual favorece la toma de nutrientes, entre ellos el fósforo debido a la solubilización del mismo (Pal *et al.*, 2000).

3. MATERIALES Y METODOS

3. MATERIALES Y METODOS

Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Fitopatología del Departamento de Producción Agrícola, en el Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara.

3.1 Aislamiento de *Fusarium oxysporum*.

El aislamiento de *Fusarium oxysporum* se realizó a partir de plantas enfermas de *Agave tequilana*, que se colectaron en diferentes localidades del estado de Jalisco. Se cortaron discos de 5 mm aproximadamente del tejido dañado previamente lavado con agua corriente para eliminar el exceso de materia orgánica o suelo adherido al tejido, considerando tanto área dañada como área sana, se desinfectó en una solución de cloro al 1% sumergiéndolo por 30 segundos, después de este tiempo se enjuagó tres veces con agua destilada estéril con la finalidad de quitar el exceso de cloro, colocándolo en un papel secante. Posteriormente se sembró cinco trozos de tejido en medio de cultivo Agar Dextrosa Papa Acidificado con ácido láctico al 80% (PDAA) y se incubó a una temperatura de 25°C. Finalmente el hongo se aisló en el medio PDAA para obtener una cepa pura.

3.2 Aislamiento de bacterias antagónicas.

Se seleccionaron 5 predios que presentaban problemas con el hongo (Cuadro 4), de las plantas de agave, de esos predios que mostraron sanidad se colectó una muestra de suelo de la rizosfera. Se tomó aproximadamente 1 kg de suelo por cada muestra.

Las muestras de suelo se tamizaron por separado con la finalidad de obtener muestras homogéneas, de éstas se tomó 10 gr de cada una y se depositó en bolsas de plástico, se les agregó agua destilada hasta un punto de saturación, con una esponja estéril se impregnó con el suelo y se inoculó presionando en la superficie del medio Agar Nutritivo (AN), se realizaron 3 diluciones en diferentes cajas petri. Se incubó por 24 horas a 25°C. Se clasificaron las colonias bacterianas, procurando tomar las que estuvieron más separadas

del resto, con palillos estériles (un palillo por colonia) se purificaron en AN y se incubaron por 24 horas a 25°C.

Se obtuvo una muestra de suelo adherida a la raíz de una planta sana, se lavo la raíz y se tomó 0.1ml de muestra, se realizó una dilución de 10^{-4} , se tomó 0.1ml de la última dilución y se colocó en una medio AN, se incubó por 24 horas a 25°C.

En cajas petri con medio Agar-papa-dextrosa (PDA) se inoculó el hongo y cuando tuvo 2 cm de diámetro se inoculó alrededor las colonias bacterianas aisladas anteriormente, incubándose por 3 o 4 días a 25°C, posteriormente se observó el halo de inhibición.

Cuadro 4. Origen y número de las cepas de bacterias aisladas de plantas sanas de *Agave tequilana*

PREDIO	MUNICIPIO	No. DE MUESTRA	COLONIAS AISLADAS
Zamorano	Arenal	2	210
El Mezquite	Tequila	2	250
Amatitan	Amatitan	1	150
Cuervo	Tequila	2	280
Antonio Escobedo	Tequila	3	360
TOTAL		10	1250

Cada una de las colonias de bacterias que presentaron halo de inhibición se aislaron y se hizo una purificación con cada una en medio de cultivo Agar Nutritivo (AN) por 24 horas a 25°C, de la cepa pura se tomó una muestra y se inoculó con el hongo para confrontarlas en medio Agar-papa-dextrosa (PDA) por 3 o 4 días a 25°C y se comprobó que estas bacterias presentaban un halo de inhibición considerable y por lo tanto antagonismo.

3.3 Aislamiento de rizobacterias promotoras de crecimiento en *Agave tequilana* (PGPR).

Para el aislamiento de las PGPR se preparó medio Peptona Proteasa, Caseína Hidrolizada, Anhidro y Gliserol (PAF) con 10g de peptona proteasa, 10g de caseína hidrolizada, 1.5g de $MgSO_4$ anhidro, 1.5 g de K_2HPO_4 dibásico, 10ml de glicerol, aforando a 1lt de agua, se esterilizó a $121^\circ C$ por 15 min.

Se preparó medio Dworkin and Foster (DF) con 4g de K_2HPO_4 , 6g de Na_2HPO_4 , 0.2g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1mg de $(Mg)FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 10mg de H_3BO_4 , 10mg de $MgSO_4 \cdot H_2O$, 70mg de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 50mg de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 10mg de MO_3 , en 1lt de agua destilada, se esterilizó a $121^\circ C$ por 15 min., para la primera incubación con este medio se agregó 2g/lt de $(NH_4)_2SO_4$ y en la segunda incubación se agregó 0.3033g/lt de enzima ACC.

Se preparó medio Tryptone Soy Broth (TSB) con 30g del medio y se disolvió en 1lt de agua destilada, se esterilizó a $121^\circ C$ por 15 min., para la primera incubación con este medio se agregó 2g/lt de $(NH_4)_2SO_4$ y en la segunda incubación se agregó 0.3033g/lt de 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC).

Se prepararon diluciones para la obtención de rizobacterias promotoras del crecimiento (PGPR), para lo cual, se tomó 1gr de suelo de cada muestra siendo un total de 5 muestras, se tamizó y se adicionó a 50ml de medio PAF estéril. Incubando a $25^\circ C$ por 24 horas en agitación.

Se tomó 1ml del medio incubado por 24 hrs y se inoculó a otro matraz con 50ml del medio PAF estéril incubando a $25^\circ C$ por 24 horas en agitación. Estas dos inoculaciones son enriquecimiento para las *Pseudomonas* y reducen el número de microorganismos en el medio.

Se tomó 1ml del medio incubado anteriormente por 24 hrs y se inoculó a otro matraz con 50ml del DF conteniendo 2g/lit de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, se incubó a 25°C por 24 horas en agitación.

Se tomó 1ml del medio incubado anteriormente por 24 hrs y se inoculó en un matraz con 50ml de medio TSB que contienen 0.3033g/lit de la enzima ACC equivalente a 3m μ de la enzima, se incubó a 25°C por 24 horas en agitación. Para la esterilización de la enzima se utilizó una membrana estéril ya que esta es termolábil y es necesario agregarla en el medio ya estéril.

Se preparó medio sólido DF con la enzima, se sembró 0.1ml de la última dilución en cajas petri y se incubaron por 48hrs a 25°C. Cada una de las muestras se pasaron a un medio sólido PAF, posteriormente se purificaron en medio Agar Nutritivo (AN).

3.4 Bioensayo de PGPR sobre agave en condiciones de invernadero.

Para el ensayo de promoción de crecimiento en plantas de agave en condiciones de invernadero se utilizaron un total de cinco diferentes cepas bacterianas y con su respectivo testigo. Cada bacteria se colocó en un medio papa-dextrosa y se crecieron por 24 horas a 25°C en agitación, se tomó 200 ml del medio y se colocó en 1 lt de agua estéril. Las plantas se sumergieron en la suspensión bacteriana (Cuadro 5) por espacio de una hora. Posteriormente se sembraron en macetas esterilizadas y con sustrato SunShine estéril.

Se tomo 0.1 ml de la suspensión bacteriana y se realizaron diluciones para obtener la UFC/ ml en la inoculación de plantas de agave.

Cuadro 5. Resultado de Unidades Formadoras de Colonias (UFC/ml) en la inoculación de plantas de *Agave tequilana* con rizobacterias promotoras de crecimiento (PGPR). Fecha de inoculación: Octubre 11, 2001.

BACTERIA	UFC/ml
B1	46 X 10 ⁶
B2	72 X 10 ⁵
B3	60 X 10 ⁴
B4	60 X 10 ⁴
B5	18 X 10 ⁶

3.4.1 Fertilización en invernadero

Se regaron con agua corriente y se realizo una fertilización cada 10 días a todas las plantas con las siguientes cantidades de N P K:

- N 100 ppm. Sulfato de Amonio
- P 50 ppm. Fosfato de Sodio Monobásico
- K 60 ppm. Fosfato de Potasio

Cuatro semanas después de la siembra se tomaron 2 plantas de cada tratamiento incluido el testigo, se quitó el sustrato y quedó al descubierto la raíz, se pesó la masa radicular (peso fresco), se colocó en la estufa a una temperatura de 70°C por 48hrs y se pesaron nuevamente para observar la pérdida de humedad y determinar así el peso seco.

3.4.2 Diseño del Experimento.

Este experimento fue realizado bajo un diseño completamente al azar, siendo la unidad experimental un hijuelo sin raíz por maceta tipo vivero de plástico negro con medidas de 40 cm x 20 cm y sustrato estéril SunShine y con 5 repeticiones por tratamiento, tomando como variables masa radicular (pf) y pérdida de humedad (ps), los datos fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de separación de medias Tukey=0.05.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de bacterias antagonicas.

Pruebas de inhibición *in vitro* mostraron que de 1250 cepas de bacterias aisladas solo cinco mostraron actividad antagonica hacia *Fusarium oxysporum*, (Figura 1) lo cual se reflejo mediante la formación de un halo de inhibición y se pudo observar que fueron constantes en el tamaño del halo (Cuadro 6).

Cuadro 6. Pruebas de inhibición *in vitro* por bacterias antagonicas a *Fusarium oxysporum* de *Agave tequilana*.

CEPA	ORIGEN	HALO DE INHIBICION (cm)*
3	Tequila	1.8
103	Tequila	1.5
45	Tequila	1.2
13	Tequila	1.0
34	Antonio Escobedo	1.2

*Media de tres repeticiones para cada cepa de bacteria.

Se realizó una Tinción Gram y un montaje en microscopio a las cepas de bacterias, dando como resultado positivo para *Bacillus*. Las cepas 3, 103, 45, 13 y 34 se aislaron esencialmente de 2 predios (Cuervo y Antonio Escobedo, estos se enviaron para su identificación a CINVESTAV, Irapuato, Gto.), y aún cuando se encuentran en diferentes predios, coinciden en edad (3 años), misma que puede ser un factor que involucra asociación específica entre bacterias antagonicas y los exudados de la planta. Otros factores importantes pueden ser las características del suelo, así como el manejo, esto es importante para poder encontrar mayor cantidad de microorganismos. *Bacillus* por su actividad antagonica a *Fusarium oxysporum* y por su alta densidad de población en el suelo, sobrevive largos periodos y tolera temperaturas altas mejor que otros microorganismos.

Se ha señalado por diversos autores (Arias *et al.*, 2001) que los métodos que se involucran en el control biológico son: antibiosis, competencia, hipovirulencia y surfactantes. Siendo los más importantes como método de control: por antibiosis y competencia básicamente por nutrientes. En base a estos datos se puede suponer los mecanismos de control biológico que estuvieron involucrados en la formación del halo de inhibición *in vitro* en este trabajo.

Evidencias reportadas por varios autores (Filippi *et al.*, 1986) concluyen que *Fusarium oxysporum* es muy sensible a *Bacillus subtilis* por inhibición o antagonismo. Otros mecanismos mencionados por (Chet, 1987) reporta que las enzimas citinolíticas han sido consideradas importantes en el control biológico por tener la capacidad de degradar la pared celular del hongo. Esto se pudo comprobar en los resultados a la tinción gram realizada a las cepas de bacterias, las cuales dieron como resultado positivo para *Bacillus*.

Muchos mecanismos se han propuesto estar involucrados en la supresión de *Fusarium oxysporum* por estos microorganismos antagónicos. (Alabouvette *et al.*, 1996) concluye que la supresión del patógeno fue debido a la competencia por los nutrientes entre el patógeno y el microorganismo. (Schneider *et al.*, 1980) propusieron la supresión debido a la competencia por espacio en la colonización de la superficie de la raíz.

Uno de los aspectos más importantes en este trabajo fue el efecto antagónico de la bacteria contra *Fusarium oxysporum*. Con los datos anteriores se pone de manifiesto los mecanismos que pudieran estar involucrados en los resultados de bacterias antagónicas a *Furarium oxysporum in vitro*.

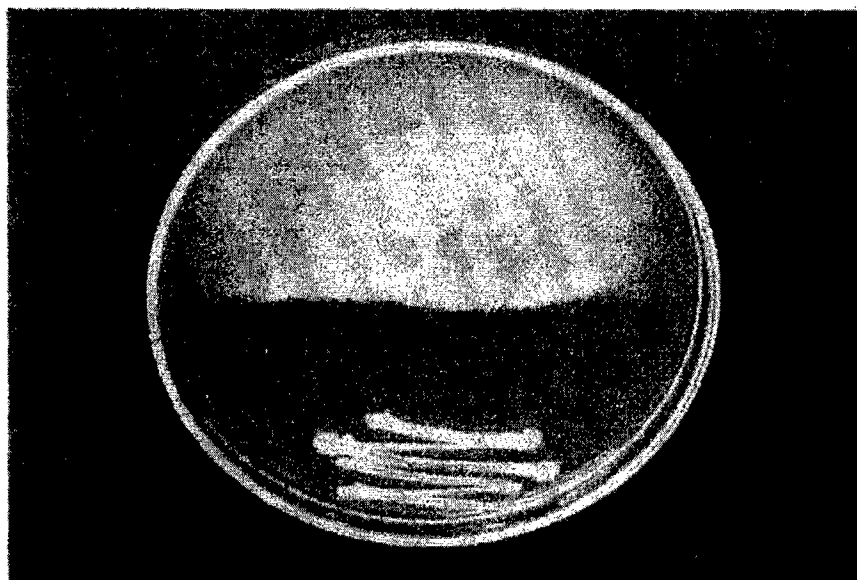


Figura 1. Inhibición *in vitro* de *Fusarium oxysporum* por bacterias antagónicas

Rizobacterias Promotoras de Crecimiento (PGPR) en Agave.

Por otra parte, también se realizó una prueba de antagonismo con las rizobacterias promotoras de crecimiento (PGPR), (Cuadro 7). Se puede observar que el halo de inhibición es mucho menor que en el caso de las bacterias antagónicas, esto puede ser debido a que la metodología utilizada para la obtención de bacterias promotoras de crecimiento (PGPR) fue selectiva para *Pseudomonas*.

Cuadro 7. Pruebas de inhibición *in vitro* por rizobacterias promotoras de crecimiento (PGPR) en *Agave tequilana*.

MUESTRA	ORIGEN	HALO DE INHIBICION (cm)*
B1	Antonio Escobedo	--
B2	Antonio Escobedo	0.5
B3	Cuervo	0.3
B4	Cuervo	0.6
B5	Cuervo	0.9

*Media de tres repeticiones para cada bacteria

Weller *et al.* (1988) reportan que existen un gran número de bacterias capaces de producir antibióticos como mecanismos de supresión de enfermedades causadas por hongos. Quizá los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* son los más estudiados por sus propiedades de control biológico. Por eso, se realizó las pruebas de inhibición *in vitro* de las *Pseudomonas* como rizobacterias promotoras de crecimiento y se pudo observar que también, aunque no en todas las cepas, presentó inhibición a *Fusarium oxysporum*, por lo tanto este tipo de bacterias también pueden ejercer un biocontrol a enfermedades.

La competencia entre el patógeno y *Pseudomonas fluorescent* fue propuesta por Kloepper, (1980) como la contribución a la supresión de la marchitez ocasionada por *Fusarium oxysporum* y se piensa que estas bacterias producen antibiosis.

Con estos reportes se puede indicar que la actividad antagónica también pudo verse involucrada en los resultados obtenidos en este trabajo, ya que las cepas promotoras de crecimiento también pueden presentar actividad antagónica a *Fusarium oxysporum*.

ANALISIS PRIMERA EVALUACION.

A un mes de la inoculación con las rizobacterias, se observaron importantes diferencias entre un tratamiento y otro, en base a un análisis de varianza (ver Anexo 1 y Anexo 2), las plantas tratadas con las rizobacterias señaladas como bacteria 5, (Figura 3) fue la que mayor masa (peso fresco y seco) radicular produjo, (Cuadro 8) seguida de la que fue tratada con la bacteria 1, las plantas tratadas con las bacterias 2 y 4 presentaron similitudes en el peso en masa radicular, finalmente la bacteria 3 y el testigo (sin tratamiento) respectivamente hacia una menor masa radicular, (Figura 2).

Cuadro 8. Crecimiento radicular en *Agave tequilana* a un mes de inoculación con bacterias promotoras de crecimiento (PGPR). Fecha de evaluación: Noviembre 11, 2001.

TRATAMIENTO	PESO FRESCO RAIZ		PESO SECO RAIZ	
		(gr)		(gr)
TESTIGO	2.25	B	0.15	BC
B1	5.70	AB	0.40	AB
B2	4.70	AB	0.35	ABC
B3	2.20	B	0.10	C
B4	6.40	AB	0.35	ABC
B5	7.70	A	0.50	A

Tukey, $p= 0.05$

DMS (pf) = 4.2398

DMS (ps) = .2681



Figura 2. Resultado de los tratamientos a un mes de inoculación. T) Testigo absoluto (sin tratamiento). B1) Tratamiento B1 inoculado con 46×10^6 UFC/ml. B2) Tratamiento B2 inoculado con 72×10^5 UFC/ml. B3) Tratamiento B3 inoculado con 6×10^5 UFC/ml. B4) Tratamiento B4 inoculado con 6×10^5 UFC/ml. B5) Tratamiento B5 inoculado con 18×10^6 UFC/ml. Fecha de evaluación: Noviembre 11, 2001.

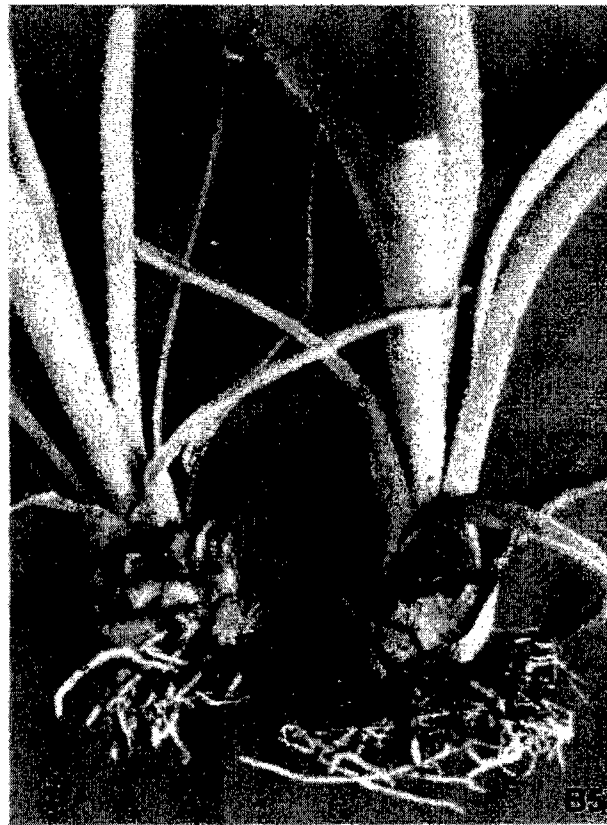


Figura 3. Comparación entre el Testigo y el tratamiento con la bacteria 5. (T) testigo absoluto (sin tratamiento), (B5) tratamiento con la bacteria 5 a un mes de inoculación inoculado con 18×10^6 UFC/ml.

ANALISIS SEGUNDA EVALUACION.

Dos meses después de inoculadas las cinco rizobacterias que se aplicaron a las plantas de agave se comportaron de forma diferente (Figura 4), dando un resultado con una diferencia significativa entre éstas (ver Anexo 3 y Anexo 4). Aquellas plantas de agave tratadas con las bacterias 5, 3, 4 presentaron mayor peso fresco en masa radicular, seguidas de las plantas de agave tratadas con las bacterias marcadas como bacteria 1, el testigo (sin tratamiento) y la bacteria 2 respectivamente, mientras que en el peso seco las plantas de agave tratadas con las bacterias 5 y 4 presentaron un mejor peso radicular que las tratadas con la bacteria 3, 2, 1 y el testigo (sin tratamiento).

Se determinó que la cepa identificada como muestra 5 (Figura 5) continuo siendo la que mayor masa (peso fresco y seco) radicular produjo (Cuadro 9).

Cuadro 9. Crecimiento radicular en *Agave tequilana* a dos meses de inoculación con bacterias promotoras de crecimiento (PGPR). Fecha de evaluación: Diciembre 11, 2001.

TRATAMIENTO	PESO FRESCO RAIZ		PESO SECO RAIZ	
	(gr)		(gr)	
TESTIGO	3.8166	BC	0.9466	C
B1	5.08	ABC	1.1833	BC
B2	3.0566	C	1.51	ABC
B3	6.94	A	1.3566	ABC
B4	6.39	AB	2.10	AB
B5	7.51	A	2.1766	A

Tukey $p = 0.05$

DMS (pf) = 2.9074

DMS (ps) = 0.9278



Figura 4. Resultado de los tratamientos a dos meses de inoculación. T) Testigo absoluto (sin tratamiento). B1) Tratamiento B1 inoculado con 46×10^6 UFC/ml. B2) Tratamiento B2 inoculado con 72×10^5 UFC/ml. B3) Tratamiento B3 inoculado con 6×10^5 UFC/ml. B4) Tratamiento B4 inoculado con 6×10^5 UFC/ml. B5) Tratamiento B5 inoculado con 18×10^6 UFC/ml. Fecha de evaluación: Diciembre 11, 2001.



Figura 5. Comparación entre el Testigo y el tratamiento con la bacteria 5. (T) testigo absoluto (sin tratamiento), (B5) tratamiento con la bacteria 5 a dos meses de inoculación inoculado con 18×10^6 UFC/ml.

A pesar de que las plantas no fueron inoculadas con la misma cantidad de UFC (Cuadro 10) se puede observar que las plantas con el tratamiento 1 tienen la mayor cantidad de UFC sin embargo no tuvo un aumento significativo entre la evaluación al mes y a los dos meses, en comparación por ejemplo con las plantas tratadas con la bacteria 3 que a pesar de tener la menor cantidad de UFC se vio en aumento entre una evaluación y otra.

Cuadro 10. Unidades Formadoras de Colonias (UFC/ml) de Rizobacterias promotoras de crecimiento (PGPR) en la inoculación de los tratamientos.

MUESTRA	ORIGEN	UFC/ml
B1	Antonio Escobedo	46×10^6
B2	Antonio Escobedo	72×10^5
B3	Tequila	60×10^4
B4	Tequila	60×10^4
B5	Tequila	18×10^6

Estudios reportados por varios investigadores han incrementado el interés por el estudio de bacterias rizosféricas que son capaces de estimular el desarrollo de las plantas por microorganismos que proporcionan nutrientes directamente o bien, los que producen sustancias promotoras del crecimiento (fitohormonas). Y que se pueden observar en los resultados de promoción de crecimiento de raíz en este trabajo.

Chester, (1933) menciona que dentro de los microorganismos PGPR se incluyen los fijadores de nitrógeno y los movilizadores de fosfato, pero además a otros microorganismos que producen sideroforos o antibioticos que controla el crecimiento de las plantas. Trabajos realizados anteriormente mencionan que las PGPR inducen mecanismos diferentes de promoción de crecimiento, lo cual puede reflejarse en que actúan aumentando la producción de nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio (K) (García y Vazquez 2002). Lo que también puede presentarse en este cultivo.

Kloepper (1997) menciona que las bacterias que colonizan la rizosfera de las plantas son capaces de producir hormonas vegetales como auxinas y giberelinas, citoquininas, etileno, etc. Los principales productores de estos compuestos son del grupo de las *Pseudomonas*. Esto se ha señalado por diversos autores (Arias *et al.*, 2001), quienes reportan que dentro del grupo de las rizobacterias se encuentran las *Pseudomonas* fluorescentes que son capaces de promover el crecimiento de las plantas debido a su capacidad de inhibir el crecimiento de hongos patógenos.

Con los datos anteriores se puede observar en los resultados obtenidos de este trabajo, donde parece que cada una de las bacterias utilizadas inducen mecanismos diferentes, mismos que pueden ser directamente relacionados con la nutrición, la fijación de nitrógeno, la solubilización de fosfato y otros nutrientes, así como la movilización de los mismos, por lo tanto los mecanismos por los que las PGPR actúan son varios y no del todo completamente conocidos y en donde pueden incidir factores tales como la edad de la planta, tipo de suelo, humedad del suelo, temperatura, atmósfera del suelo, fertilidad, luz, efectos foliares y la actividad microbiana.

5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

- De 1250 aislados bacterianos sólo cinco inhibieron a *Fusarium oxysporum*.
- En pruebas para bacterias antagónicas a *Fusarium oxysporum*, la cepa bacteriana identificada con el número 3, obtenida del predio nombrado como Cuervo, del Municipio de Tequila, Jal., fue la de mayor halo de inhibición.
- En pruebas para rizobacterias promotoras de crecimiento, la bacteria identificada con el número 5, obtenida del predio nombrado como Cuervo, del Municipio de Tequila, Jal., produjo el mayor efecto estimulador de crecimiento en *Agave tequilana*.
- Para el primer mes de inoculación, la estimulación de crecimiento se benefició tres veces más en comparación al testigo. Para el segundo mes de inoculación, la estimulación de crecimiento mostró un aumento del doble en comparación al testigo
- La rizobacteria promotora de crecimiento identificada con el número 5, obtenida del predio nombrado como Cuervo, del Municipio de Tequila, Jal., en pruebas para inhibición a *Fusarium oxysporum* fue la que mayor halo de inhibición.

6. BIBLIOGRAFIA

6. BIBLIOGRAFIA

1. **Alabouvette**, C., Lemanceau, P., and Steinberg, C. 1996. Use for nonpathogenic *Fusarium oxysporum* and fluorescent pseudomonas to control *Fusarium* wilts. 155-164p. in: Proc. Int. Workshop Biol. Control Plant Dis.
2. **Alexander**, M., 1981. Introducción a la Microbiología del Suelo, AGT EDITOR S.A. segunda edición, www.ffyb.uba.ar/
3. **Agrios**, G. N. 1998. Plant pathology. Academic Press, San Diego. California. 813p.
4. **Arias**, A. 2001. Una alternativa al uso de Pesticidas Químicos: Bacterias del Suelo. <http://iibce.edu.uy/2001-07/>
5. **Bernal** A, A. y López R, A. J. 2001. Germinación *in vitro* de conidios y clamidosporas de *Fusarium oxysporum* aislado de *Agave tequilana* Weber var. Azul a diferentes niveles de pH y temperatura. Tesis Licenciatura. Universidad de Guadalajara. 15-18p.
6. **Bernard** R. G, 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. Can. J. Microbiol. 45:536-599p.
7. **Burton**, W., Wigginton, M. J. 1970. The effect of a film of water upon the oxygen status of a potato tuber. Potato Res. 13:180-186
8. **Carletti**, S. 2000. Use of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria in Plant Micropropagation. Plant Tissue Culture Lab., Dept. Basic Sci., Universidad Nacional de Luján, Buenos Aires, Argentina. 67:221p.

9. **Chester**, K., 1933. The problem of acquired physiological immunity in plantas. *Quart. Rev. Biol.* 8, 12-151p.
10. **Chet**, I. 1987. Trichoderma- Application, mode of action, and potencial as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. 137-160p. in: *Innovative Approaches to Plant Disease Control*.
11. **Consejo** Regulador del Tequila, 2000. *Gaceta Informativa*. Año 1 No. 1 Junio 2000.
12. **Consejo** Regulador del Tequila, 2001. Estrategias para el manejo y protección vegetal en *Agave tequilana* Weber variedad azul. Colegio de Ingenieros Agrónomos.
13. **Consejo** Regulador del Tequila. Enfermedades del cultivo del agave. Programa general de apoyo y desarrollo tecnológico de la cadena productiva agave-tequila. 6-12p.
14. **Consejo** Regulador del Tequila, 2002. *Gaceta Informativa*. Año 3 No. 1 Junio 2002.
<http://www.crt.org.mx>
15. **Cook** R. James, (1995). *Biological Control of Plant Pathogens: Teory to Aplication*. 76th Annual Meeting. Guelph Ontario, Canada.
16. **Estrada** A, C., Ramon P, I., Virgen C, G., 2002. Efectividad Biológica de *Gliocadium virens* GL21, (CX2505) en condiciones *in vitro* e *in vivo*. Congreso Internacional de Fitopatología 2002. F-24.
17. **Fijación** Biológica de Nitrógeno: PGPR
<http://www.eez.csic.es/>

18. **Filippi**, C. Bagnoli, G. Volterrani, M. Picci, G. 1986. Antagonistic effects of soil bacteria on *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *dianthi* (Prill and Del.) Snyd. and Hans. Plant and Soil 98, 196-167p.
19. **Fuskey**, *Fusarium* Interactive Key, 2000. <http://sis.agr.gc.ca/brd/fusarium/home1.html>
20. **García** L, L y Vazquez S, R. A., 2002. Caracterización Morfológica y Biocontrol de *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* y *F. oxysporum* f. sp. *niveum* y Promoción del crecimiento por rizobacterias en melón y sandía. Tesis Licenciatura. Universidad de Guadalajara. 26-43p.
21. **Garcés**, E. Orozco M., Bautista G.R. y Valencia H. 2000. *Fusarium oxysporum* el hongo que nos hace falta conocer. Biólogos investigadores, científicos y profesores de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá.
22. **Gil** V, K 1997. Caracterización genética del *Agave* sp., utilizando marcadores moleculares. Tesis de Maestría en Ciencias. CINVESTAV.
23. **Guerrero**, G. y Baca, M, R., 2002. Del maguey azul al líquido de oro. El agave y su tierra. Revista Medica de Arte y Cultura, 22-33p.
24. **Ibarra** N, M. A., 2001. Distribución e incidencia de marchitez (*Erwinia* sp y *Fusarium* sp.) del agave (*Agave tequilana* Weber), en los Altos de Jalisco. Tesis Licenciatura. Universidad de Guadalajara. 4-8p.
25. **Jiménez-Delgadillo**, R., Virgen-Calleros, G., Tabares-Franco, J., Olalde-Portugal, V., 2001. Bacterias promotoras del crecimiento de plantas: agro-biotecnología. Avance y perspectiva. Noviembre-Diciembre de 2001. 20:395-400p.

26. **Kloepper**, J. W., Schroth, M. N., Miller, T. D., 1980. Effects of rhizosphere colonization by plant growth promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. *Phytopathology* 70, 1078-1082p.
27. **Kloepper**, J. W. 1989, Aqueous formulations of plant growth-promoting rhizobacteria for control of foliar pathogens. *Phytopathology*, 89:540
28. **Kloepper**, J. W., Tuzun, S., Zehnder, G. W., Wei, G., 1997. Multiple disease protection by rhizobacteria that induce systemic resistance historical precedence. *Phytopathology* 87, 136-137p.
29. **Luna**, H. G. 1996. Pudrición de tallo de *Agave tequilana* L. Weber en el estado de Jalisco, México. Tesis Profesional. Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma de Chapingo, México.
30. **Luna**, H. G. 1998. Hacia un manejo integrado de plagas, fundamentos y recomendaciones practicas. Cheminova.
31. **Lund**, B. M. and Wyatt, G. M. 1972. The effect of oxygen an carbon dioxide concentrations on bacterial soft rot. I. King Edward potatoes inoculated with *Erwinia carotovora* var. *atroseptica*. *Potato Res.* 15: 174-179.
32. **Maher**, E. A. and Kelman, A. 1983. Oxigen status of potato tuber tissue in relation to maceration by pectic enzymes of *Erwinia carotovora*. *Phytopathology* 73:536-539.
33. **Martínez**, 1998. Proyecto: Epidemiología y manejo integrado de problemas fitosanitarios en *Agave tequilana* Weber. *Rev. Mex. Fitopatología*. Vol. 16.
34. **Martínez**, S, J. P., 2000. El Sida del Agave, realidades y mentiras. Suplemento Investigación y desarrollo. 23-27p. <http://www.invdes.com.mx/>

35. **Microorganismos** Promotores del crecimiento vegetal (PGPR=Plant Growth Promoting Rhizobacteria) 2002. www.alltheweb.com
36. **Muriá**, J. M., 2002. Una bebida llamada Tequila. Colegio de Jalisco. 3-21p.
37. **Pal**, K. K. et, al. 2000. Plant Growth Promoting Fluorescent Pseudomonads Enhanced Peanut Growth, Yield and Nutrient Uptake
38. **Plant** Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) 2002
<http://www.agr.kuleuven.ac.be/>
39. **Raaijmakers**, J. M. y Weller, D. M. 2000. Role of Antibiotic-Producing *Pseudomonas* spp. in disease suppressive soils. Laboratory of Phytopathology, Wageningen University and Research Centre, The Netherlands; USDA-ARS, Pullman, WA, USA.
40. **Rodríguez** R, R., 2002. Extractos de origen vegetal para el control de *Fusarium oxysporum* sp. y *Erwinia* sp., aislados de agave (*Agave tequilana* Weber, var., azul). Tesis de maestría. Universidad de Guadalajara. 11-17p
41. **Schmidt**, R.R.1990. Investigation on mechanisms: the key to successful use of biotechnology. In: new directions in biological control: alternatives for suppressing agricultural pest and diseases. Baker, R and P.E. Dunn (eds). Alan R. Liss. New York.
42. **Schneider**, R. W., 1980. Effects of nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum* on celery root infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. apii and a novel use of the Lineweaver-Burk double reciprocal plot technique. *Phytopathology* 74:646-653.
43. **Valenzuela**, 1994. El Agave Tequilero: su cultivo e industrialización. Ed. Monsanto. 28-35p
44. **Valenzuela**, 2002. Manual para Agaveros. Tequila Cazadores. 68p.

45. **Velez**, G.C., A. P. Alvarez del la C. y B. Rodríguez G. 1996. Aislamiento de *Erwinia* del grupo *carotovora* como patógeno del *Agave tequilana*. Resumen XXIII Congreso Nacional de Fitopatología, Gdl, Jal. Mex.
46. **Virgen**, C. G. 1998. Avances del proyecto: Epidemiología y manejo integrado de problemas fitosanitarios en agave (*Agave tequilana* Weber). Programa general de apoyo y desarrollo tecnológico a la cadena productiva Agave-Tequila.
47. **Virgen** C. G. 2000. Rizobacterias Promotoras del Crecimiento de las Plantas (PGPR): Importancia en el Crecimiento y Fitosanidad. En: Castellanos Z. J. y Guerra O. F. (Ed). Memoria del simposio Internacional de la Fresa. Zamora, México. Pag 51-63.
48. **Virgen** C, G., 2000. Biología y control de las principales enfermedades del agave tequilero. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT.
49. **Virgen** C, G., J. L. Vazquez Vazquez., G. L. Aguiano Ruvalcaba., V. Olalde Portugal., 2001. Aislamiento de bacterias de la rizosfera de *Capsicum annuum* L. Antagónicas al desarrollo de *Phytophthora capsici* Leo. Revista Mexicana de Fitopatología, 395-400p.
50. **Virgen**, C, G., 2002. Enfermedades en el cultivo del Agave. Sociedad Mexicana de Fitopatología, A. C. Memoria del curso de acreditación en fitosanidad del Agave *tequilana* Weber, var. azul. 17-20p.
51. **Weller**, D. M. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rizosphere with bacteria. Annu. Rev. Phytopathol. 26:379-407.

7. ANEXOS

Anexo 1. Analisis de Varianza. Primera evaluación a un mes de inoculación para peso fresco (pf)

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	50.0975	5	10.0195	4.39934138	0.04971045	4.38737402
Dentro de los grupos	13.665	6	2.2775			
Total	63.7625	11				

Anexo 2. Analisis de Varianza. Primera evaluación a un mes de inoculación para peso seco (ps)

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0.235169067	5	0.047033813	5.13069279	0.03553544	4.38737402
Dentro de los grupos	0.05500288	6	0.009167147			
Total	0.290171947	11				

Anexo 3. Análisis de Varianza. Segunda evaluación a dos meses de inoculación para peso fresco (pf)

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	49.53972983	5	9.907945966	3.302661454	0.041745727	3.105874669
Dentro de los grupos	35.99986049	12	2.999988374			
Total	85.53959032	17				

Anexo 4. Analisis de Varianza. Segunda evaluación a dos meses de inoculación para peso seco (ps)

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	3.723423903	5	0.744684781	3.29947763	0.041866215	3.105874669
Dentro de los grupos	2.708373376	12	0.225697781			
Total	6.431797278	17				