

# **UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**

**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS  
DIVISIÓN DE CIENCIAS AGRONÓMICAS**



**“PRESENCIA DE *Thielaviopsis paradoxa* EN  
AGAVE (*Agave tequilana* Weber var. Azul)”**

## **TESIS PROFESIONAL**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
INGENIERO AGRÓNOMO**

**PRESENTA:**

**JUAN ANDRÉS ROBLES GÓMEZ**

**LAS AGUJAS, ZAPOPAN, JAL., JULIO 2006**



**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**  
**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS**  
**BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS**  
**CARRERA DE INGENIERO AGRÓNOMO**  
**COMITE DE TITULACIÓN**

**M.C. SALVADOR MENA MUNGUÍA**  
**DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS AGRONÓMICAS**  
**PRESENTE**

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

*“PRESENCIA DE Thielaviopsis paradoxa EN AGAVE ( Agave tequilana Weber var. Azul). “*

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

**JUAN ANDRÉS ROBLES GÓMEZ**

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

<b>DR. JOSÉ LUIS MARTÍNEZ RAMÍREZ</b>	<b>DIRECTOR</b>
<b>DR. PEDRO POSOS PONCE</b>	<b>ASESOR</b>
<b>M.C. CARLOS MANUEL DURÁN MARTÍNEZ</b>	<b>ASESOR</b>


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

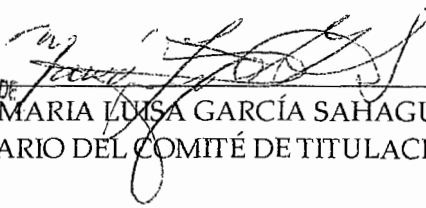
<b>M.C. SALVADOR HURTADO DE LA PEÑA</b>	<b>PRESIDENTE</b>
<b>M.C. BENITO MONROY REYES</b>	<b>SECRETARIO</b>
<b>DR. PEDRO POSOS PONCE</b>	<b>VOCAL</b>

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 RESPONDE"**  
 Las Agujas, Zapopan, Jalisco, el 26 de julio de 2006.



  
 M.C. SALVADOR GONZÁLEZ LUNA  
 PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

  
 COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE INGENIERO AGRÓNOMO  
 M.A. MARIA LUISA GARCÍA SAHAGÚN  
 SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN



*Mayahuel, Diosa del Agave (Códice Borbónico)*

"Los cuatrocientos pechos de esta diosa son las pencas del maguey que alimentan al hombre con su leche blanca, el pulque".

*"El que quisiera aplicarse a la agricultura, ha de saber que tiene que llamar en su auxilio, con preferencia a todo lo demás ha estas tres cosas: Inteligencia en ella, Facultad para gastar y la Voluntad de hacerlo".*

*(Columela: De rustica)*

## DEDICATORIA

A Dios creador del universo y dueño de mi vida que me permite construir todos mis sueños y metas fijadas.

A mi Alma Mater, la Universidad de Guadalajara. Por darme una segunda oportunidad para mi formación profesional.

A Karla Verónica Beas Ruvalcaba, por lo que ha representado en mi en esta fase de estudiante, por esos momentos de alegría y optimismo que vivimos, su apoyo incondicional, motor principal de mi superación y ahora Esposa mía.

A mis padres el Sr. Hermenegildo Robles Verdín y la Sra. Julia Gómez Aldrete, quienes me infundieron la ética y el rigor que guían mi transitar por la vida, por su amor, comprensión y apoyo.

A mi hermano Leandro por su apoyo moral y económico, por confiar en mí.

A mis hermanos: Ma. de Jesús, Ma. del Rosario, Efraín y Agueda.

A mis amigos biólogos: Miroslava, Ma Dolores, Karla H., Adriana, Diana y Agustín Camacho por la amistad desinteresada que siempre me han brindado.

GRACIAS.

## AGRADECIMIENTOS

A mi estimado Director de Tesis: Dr. José Luis Martínez Ramírez por su asesoramiento científico, disposición permanente e incondicional en aclarar mis dudas, por sus substanciales sugerencias durante la redacción de la tesis y estímulo para seguir creciendo intelectualmente. Por su amistad.

A mi asesor y sinodal: Dr. Pedro Posos Ponce por su asesoría y por permitirme llevar a cabo mi proyecto en su laboratorio, sus observaciones, críticas en la redacción del trabajo y su paciencia.

A mi asesor M.C. Carlos Manuel Durán Por las observaciones realizadas a mi trabajo.

A mis sinodales M.C. Salvador Hurtado de la Peña y M.C. Benito Monroy Reyes: por su gran disposición para revisar el trabajo, facilidades y apoyo brindados, por haberme dirigido con sus acertadas correcciones.

A todos los que de una manera u otra me ayudaron para la realización de este trabajo.

GRACIAS.

## CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS.	i
RESUMEN.	1
I. INTRODUCCIÓN.	3
1.1 Hipótesis.	5
1.2 Objetivo.	5
1.3 Objetivos particulares.	5
II. REVISIÓN DE LITERATURA.	6
2.1 Taxonomía y descripción botánica.	7
2.2 Requerimientos agroecológicos del agave.	8
2.3 Antecedentes patológicos del genero <i>agave</i> .	9
2.4 Los postulados de Koch en la fitopatología.	12
III. MATERIALES Y MÉTODOS.	14
3.1 Descripción del medio físico del área de estudio uno.	14
3.1.1 El Arenal.	14
3.1.2 Delimitación.	14
3.1.3 Localización.	14
3.1.4 Geología.	14
3.1.5 Topografía.	15
3.1.6 Clima.	15
3.1.7 Hidrografía.	15
3.1.8 Suelos.	15
3.1.9 Vegetación.	15
3.2 Fauna.	16
3.2.1 Recursos naturales.	16
3.2.2 Uso del suelo.	16
3.3 Descripción del medio físico del área de estudio dos.	16
3.3.1 Arandas.	16

3.3.2 Delimitación.	17
3.3.3 Localización de toma de muestra.	17
3.3.4 Geología.	17
3.3.5 Topografía.	17
3.3.6 Clima.	17
3.3.7 Hidrografía.	18
3.3.8 Suelo.	18
3.3.9 Vegetación.	18
3.3.10 Fauna.	19
3.3.11 Recursos naturales.	19
3.3.12 Uso del suelo.	19
3.4 Toma de muestra.	19
3.5 Esterilización del material de laboratorio.	19
3.6 Preparación de medio de cultivo PDA y B de King.	20
3.7 Llenado de cajas de petri con medio de cultivo.	20
3.8 Obtención y desinfección del material enfermo.	21
3.9 Aislamiento de bacterias y hongos.	21
3.10 Purificación.	22
3.11 Identificación del patógeno.	22
3.11.1 Preparación en fresco.	22
3.12 Incremento de la cepa.	23
3.13 Plantación de agave sano.	23
3.14 Pruebas de patogenicidad en invernadero.	23
3.14.1 Preparación de inóculo.	23
3.15 Reaislamiento del patógeno.	24
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.</b>	<b>25</b>
4.1 Toma de muestra, esterilización de material de laboratorio, preparación de medio de cultivo y llenado de cajas de petri con	25



medio de cultivo.	
4.2 Obtención y desinfección del material enfermo.	25
4.3 Aislamiento de bacterias y hongos.	25
4.4 Purificación.	25
4.5 Identificación del patógeno.	26
4.6 Incremento de la cepa.	27
4.7 Plantación de agave sano.	27
4.8 Pruebas de patogenicidad en invernadero.	27
4.8.1 Tratamiento No. 1	28
4.8.2 Tratamiento No. 2	30
4.8.3 Tratamiento No. 3	31
4.8.4 Tratamiento No. 4	32
4.9 Reaislamiento del patógeno.	33
<b>V. CONCLUSIONES.</b>	<b>35</b>
<b>VI. LITERATURA CITADA.</b>	<b>36</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> a) Cepa de <i>T. paradoxa</i> en medio de PDA, b) Cepa de <i>T. paradoxa</i> en medio de B de King.	26
<b>Figura 2.</b> a) Hoja que comienza a secarse por manchas negras, b) Comparación de una hoja sana con una inoculada.	28
<b>Figura 3.</b> a) Mancha rojiza, b y c ) Encarrujamiento de hoja, d) Manchas en la orilla de las hojas.	29
<b>Figura 4.</b> a y c) Puntos negros en hoja, b) Hoja que comienza a secarse, d) Avance de la enfermedad.	31
<b>Figura 5.</b> a) Quemadura de cogollo, b) Presencia de manchas en T3.	32
<b>Figura 6</b> a y b) Formación de clamidosporas; c) Clamidospora típica de <i>Thielaviopsis paradoxa</i> ; d) Clamidosporas en el tejido.	34

## RESUMEN

El agave (*Agave tequilana* Weber var. Azul), es la materia prima para la elaboración del tequila. A nivel mundial México es el único productor de tequila, a nivel nacional Jalisco ocupa el primer lugar como productor de agave que se distribuye principalmente en tres zonas: Altos, Sur y Centro. Por lo que cualquier problema relacionado con el agave y principalmente los de índole fitosanitarios afecta gravemente a la industria tequilera, lo que impacta directamente en la economía nacional. Actualmente en la zona de los Altos se ha detectado una nueva enfermedad la cual produce la pudrición negra del agave, investigaciones previas señalan como patógeno al hongo *Thielaviopsis paradoxa* (Fucikovsky, 1999). Este tipo de hongo vive, crece y se propaga como un parásito no obligado casi siempre en asociación con la materia orgánica muerta y es favorecido por la considerable humedad del suelo y la alta humedad relativa del aire (Agrios, 1991).

El objetivo de este trabajo fue confirmar si realmente *Thielaviopsis paradoxa* es el causante de la enfermedad mediante los postulados de Koch.

Se colectaron plantas enfermas obtenidas de dos predios, localizados uno en Arandas y otro en Arenal Jalisco. Las plantas mostraban la misma sintomatología; se llevaron al laboratorio de Plagas Urbanas del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Se tomaron muestras, después se desinfectaron para manipularlas *in Vitro* y a partir de ahí se obtuvo una cepa pura, enseguida se identificó el fitopatógeno con claves taxonómicas y se encontró que se trataba del hongo *Thielaviopsis paradoxa*.

Se realizaron las pruebas de patogenicidad en el vivero del Departamento de Producción Agrícola, donde se inocularon 30 plantas de agave sanas con las cepas obtenidas anteriormente. La inoculación se realizó de manera diferente para cada 10 plantas. Se realizaron dos soluciones, una fue con una cepa más 200 mL de agua destilada estéril (1) y otra fue con una cepa más 150 mL de agua destilada estéril (2) El primer tratamiento consto de realizarle heridas a la raíz y asperjarle solución (1). El segundo tratamiento consistió en asperjar solamente sobre la planta la solución (1) y el tercero en aplicar un agroquímico sobre la planta y asperjarla con la solución (2).

Se fueron presentando los síntomas paulatinamente en un periodo de tres meses. Se colecto al azar material enfermo de cada uno de los tratamientos y se hicieron aislamientos hasta obtener nuevamente una cepa pura y se identificó con claves taxonómicas de Barnett y Barry (1999).

Con la realización de cada uno de estos postulados se logró confirmar que el hongo *Thielaviopsis paradoxa* es el causante de la pudrición negra del agave.

## I. INTRODUCCIÓN

EL agave (*Agave tequilana* Weber var. Azul), es un cultivo de gran importancia sobre todo para la industria tequilera, ya que a partir de los azúcares fermentables extraídos del tallo se puede obtener la bebida conocida como tequila (Ruiz-Corral *et al.*, 2002).

Según la norma oficial mexicana NOM-006-SCFI-1994 esta especie es la única materia prima permitida para la producción del tequila 100% agave (Diario Oficial de la Federación, 1994, citado por, Secretaría de Economía, 2006), debido a su alta concentración de inulina, bajo contenido de fibras, además de otros compuestos químicos que determinan las características particulares de la bebida, siendo una de las más codiciadas no solo en México, sino en el mundo (Castro, 2003).

En los últimos años se ha incrementado la demanda por esta bebida, tanto nacional como internacionalmente (Ibarra, 2001), por lo que se ha creado una industria de grandes dimensiones y una extensa área de cultivo de mezcal en el Estado de Jalisco (Valenzuela, 1987).

A nivel mundial México es el único productor de tequila, a nivel nacional Jalisco ocupa el primer lugar como productor de agave con una superficie de 66,785.08 has, distribuidas principalmente en tres zonas: Altos, Sur y Centro, ubicadas en 54 municipios del Estado, diseminados en 14,928 predios con más de 250' 377,247 millones de plantas de diferentes edades (CRT, 2005). Se tiene una producción de 380'226,460 Kg. en un área de 50,000 has (Valenzuela, 1994), de donde se obtienen 83' 447,792 lt. de tequila, de los cuales se exportan 48'500,037 lt. a 50 países aproximadamente (Rodríguez, 2002).

Recientemente el agave se ha visto afectado por una serie de factores adversos para su producción, de los cuales destacan los fitosanitarios que son sin duda los más importantes. Dentro de los problemas fitosanitarios se encuentran por sus efectos devastadores los fitopatológicos, especialmente aquellos causados por hongos y bacterias (Martínez-Ramírez *et al.*, 1998).

Investigaciones previas señalan que la pudrición negra del agave es causada por el hongo *Rhizoctonia*, mientras que Fucikovsky-Zak (1999), menciona que es causada por *Thielaviopsis* y señala además que la planta va debilitándose lentamente hasta que causa su muerte y la denominó tristeza y muerte del agave. Dado que llega a afectar hasta el 23% o más de las plantas, se cree necesario realizar un estudio aplicando a fondo los postulados de Koch, para de esta manera, se realice un estudio sobre las condiciones que pueden ayudar al desarrollo y diseminación de dicho fitopatógeno. Estos aspectos deberán determinarse para establecer un manejo integrado de esta enfermedad.

### **1.1 Hipótesis.**

- ✧ El *Thielaviopsis paradoxa* es el agente causal de la pudrición negra del agave.

### **1.2 Objetivo.**

- ✧ Confirmar que el hongo *Thielaviopsis paradoxa* es causante de la pudrición negra del agave mediante los postulados de Koch.

### **1.3 Objetivos particulares.**

- ✧ Aislar el hongo fitopatógeno causante de la pudrición negra del agave.
- ✧ Identificar las estructuras características de *Thielaviopsis paradoxa* ya sean los conidióforos, conidios o clamidosporas mediante microscopía de luz.
- ✧ Comprobar mediante los postulados de Koch que *T. paradoxa* es el agente causal de la pudrición negra del agave.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

Dentro de las numerosas familias botánicas que constituyen la clase de las monocotiledóneas resaltan por su utilidad, sobre todas aquellas del género *Agave*, en efecto su nombre en Náhuatl Metl = Magnífico y en griego Maravilloso, así lo denotan todas las partes de la planta que fueron usados por nuestros antepasados aztecas, algunos de estos todavía persisten en la actualidad (Cházaro y Lomelí, 1995).

Fue descrito por Linneaus en 1753 ubicado al género *Agave americana* como la primera especie conocida por la ciencia (Granados, 1985).

Junto con el maíz y el frijol los agaves fueron quizás de las primeras plantas cultivadas en Mesoamérica (González y Galván, 1992).

Los géneros de agavaceas conocidas para Jalisco son: *Agave*, *Dasyilirion*, *Fureraea*, *Manfreda*, *Nolina*, *Polianthes*, *Prochnyanthes* y *Yuca* (Cházaro y Lomelí, 1995).

Dentro de esta familia se pueden encontrar especies cultivadas las cuales tienen un gran valor económico en el país, ya sea como fuentes de empleo o captación de divisas (García, 1995).

Así podemos encontrar al *Agave foucroydes* Lemaire (Henequén) para la industria cordelera en Yucatán, *A. salmiana* Otto ex Salm y *A. atrovirens* (Maguey manso o pulquero) para la industria del pulque en Hidalgo y Tlaxcala, *A. potatorum* Zucc. (Maguey mezcalero) para la industria del mezcal en Oaxaca y principalmente el *Agave tequilana* Weber (Maguey azul tequilero), para la industria del tequila en Jalisco (Sánchez, 1991).



En 1902 Weber describió el *Agave tequilana*, hasta la fecha las variedades de dicha planta carecen de estudios taxonómicos particulares ignorándose aun las características propias y completas de cada una (Vicente, 2002).

El Dr. Howard S. Gentry lo ha agrupado en 197 taxa: 136 especies, 26 subespecies, 29 variedades y 7 formas (Gentry, 1982 citado por Ibarra, 2005).

México es el centro de mayor diversificación del género *Agave* lo que representa un 75% del número total de especies conocidas de América (Álvarez, 2004).

Valenzuela (1994), realizó una revisión sobre la clasificación de *A. tequilana* y concluye que existen 7 variedades denominadas "azul", "pata de mula", "zopilote", "moraleño", "bermejo", "xigüín" y "chato o sahuayo".

## **2.1 Taxonomía y descripción botánica**

*Agave tequilana* Weber var. azul pertenece a la familia de las agavaceas que se agrupan en el orden Asparagales (Vicente, 2002). Perteneció al subgénero *Agave* y a la sección *Rigidae*, que se caracterizan por sus hojas angostas y rígidas radialmente extendidas desde la base (Gentry, 1982).

Planta suculenta que se extiende radicalmente de 1.2 a 1.8 m de altura. Su tallo es grueso, corto de 30 a 50 cm de altura al madurar. Las hojas de 90 a 120 cm. Lanceoladas, acuminadas de fibras firmes, casi siempre rígidamente estiradas, cóncavas de ascendentes a horizontales; lo más ancho se encuentra hacia a la mitad de la hoja, angosta y gruesa hacia la base, generalmente de color glauco azulado a verde grisáceo, el margen es recto a ondulado o retando; los dientes generalmente de tamaño regular y espaciados

irregularmente, en su mayoría de 3 a 6 mm de largo a la mitad de la hoja; los ápices delgados, curvos o flexos desde poca altura de la base piramidal de color café a oscuro, de uno a dos cm de largo raramente larga achatada o abiertamente surcada de arriba, la base ancha, café oscura decurrente o no recurrente. La inflorescencia es una panícula de 5 a 6 m de altura, densamente ramosa a lo largo, con 20 a 25 umbelas largas, difusas de flores verdes y estambres rosados; flores de 68 a 75 mm de largo con bractéolas sobre los pedicelos de 3 a 8 mm de longitud; ovario de 32 a 38 mm de largo, cilíndrico con cuello corto, inconstricto, casi terminado en punta sobre la base, tubo floral de 10 mm de ancho, funeliforme surcado, los pétalos desiguales de 25 a 28 mm de longitud por 4 mm de ancho, lineares erectos pero rápidamente flojos en anthesis, cambiando entonces a cafesosos y secos filamentos de 45 a 50 mm de largo dobladas hacia dentro junto al pistilo, insertos de 5 a 7 mm cerca de la base de tubo; anteras de 25 mm de largo. El fruto es una cápsula ovalada a brevemente cuspida (Gentry, 1982).

## **2.2 Requerimientos agroecológicos del agave**

La altitud que requiere la planta de agave para su desarrollo es de 1000-2400 m.s.n.m; con respecto a precipitación, las regiones productoras más importantes de agave, localizadas en el estado de Jalisco presentan una precipitación anual que va de 700 a 1000 mm (Ruiz,1997).

El agave prospera en regiones con atmósfera seca a moderadamente seca en la mayor parte del año. Presentan una pobre tolerancia a las bajas temperaturas (Castro, 2003), se puede observar que en las zonas térmicas óptimas tienen un rango de temperatura nocturna de 10 a 16°C mientras que la diurna es de 15 a 25°C (Pimienta-Barrios *et al.*, 2002).

Los agaves cuentan con adaptaciones únicas para su ambiente natural y que influyen en varias formas de reproducción, morfología, fisiología y anatomía, pero su éxito se relaciona principalmente en la abertura de noche de

los estomas y el cierre de estos durante el día por lo que la fijación de CO<sub>2</sub> ocurre de noche (Nobel, *et al.*, 1998). Esta adaptación se lleva a cabo mediante el Metabolismo Ácido de las Crasuláceas (CAM) el cual es una de las tres vías fotosintéticas para la asimilación del CO<sub>2</sub> atmosférico y consiste en la fijación y almacenamiento temporal del CO<sub>2</sub> ocurre durante la noche y este es almacenado en forma de ácidos grasos (Nobel, *et al.*, 1998).

La removilización del CO<sub>2</sub> a partir de los ácidos grasos ocurre durante el día y conlleva a una gran concentración de CO<sub>2</sub> en los órganos fotosintéticos de la planta (hojas y tallos). Puesto que los estomas están cerrados, el CO<sub>2</sub> no puede salir de la planta y por lo tanto es fijado y convertido en carbohidratos (Taiz y Zeiger, 1998).

Los agaves prefieren suelos de textura media, por ejemplo suelos francos, franco-arenosos o franco-arcillosos. Aunque en zonas de baja precipitación prefieren suelos con mayor retención de humedad, es decir, suelos de textura pesada, como arcillosos o limo-arcillosos, pero pueden desarrollarse adecuadamente en suelos delgados o profundos. Además el género *Agave* presenta una ligera a intermedia tolerancia a sales y prospera mejor en un rango de pH de 6.0 a 8.0; no son recomendables con problemas de acidez o alcalinidad (FAO, 1994).

### **2.3 Antecedentes patológicos del género *agave***

Agrios (2004), denomina el término enfermedad a cualquier alteración en una función o funciones que puedan interferir con la estructura normal, o valor económico de la planta causada por organismos patógenos o por determinadas condiciones del medio.

La prevalencia y severidad de las enfermedades depende de la cantidad de inóculo, condiciones existentes en el área geográfica determinada,

temperatura y humedad, pH y nutrientes de suelo, microflora y virulencia del patógeno (Castro, 2003).

A pesar de que el agave se cultiva desde el siglo XVIII no se habían presentado problemas fitosanitarios fuertes que atrajeran la atención de los investigadores (Luna, 1996).

Un factor que favorece la aparición de enfermedades en el agave, es la gran concentración de azúcares que almacena en el tallo, lo cual propicia la proliferación de microorganismos, incluidos los patógenos (CRT, 2004).

En el agave se han presentado enfermedades importantes, entre las que se destacan aquellas que ocasionan marchitez o algún tipo de pudrición.

Según Castro (2003), este síntoma se ha asociado a fitopatógenos identificados hasta ahora y que se encuentran en diferentes partes de la planta por lo que son considerados de mayor importancia por sus efectos sobre el desarrollo de la planta así como por su distribución, estos fueron *Erwinia sp.* (pudrición del cogollo) y *Fusarium oxysporum* (marchitez o encarrujamiento),

Y aunque se trabajaron principalmente con *Erwinia* y *Fusarium* se encontraron otros hongos y bacterias causantes de enfermedades como son: anillo rojo (*Erwinia sp.*), mancha foliar (*Botryodiplodia sp.*), mancha foliar negra (*Erwinia sp.*), mancha anular (*Didymosphaeria sp.*), y algunos nemátodos de los géneros *Helicotylenchus* y además se ha encontrado agaves con síntomas de enfermedades virales (Castro, 2003).

Fucikovsky (2000), reportó una enfermedad que denominó Tristeza y Muerte del Agave (TMA), causada principalmente por el *Thielaviopsis paradoxa* y que en la cual parecen estar involucrados otros hongos, bacterias e insectos.

Además del *T. paradoxa* también se aisló la bacteria que se identificó como *Pseudomonas fluorescens* biotipo 1.

Estos fitopatógenos han provocado un incremento considerable en el desarrollo de las enfermedades, lo cual puede ocurrir debido a que existe poca variabilidad genética en esta planta (Gil, 1996, citado por Castro, 2003).

Los hongos fitopatógenos es el grupo de organismos causantes de las mayores pérdidas económicas agrícolas por el gran número de enfermedades que ocasiona. Se considera que todas las plantas son susceptibles al ataque de por lo menos un hongo y muchas son afectadas por un gran número de estos organismos, que las invaden desde la semilla hasta la planta adulta (De la I. de Bauer, 1984).

Actualmente en la zona de los Altos se ha detectado una enfermedad la cual produce la pudrición negra del agave y se sospecha que el fitopatógeno asociado a dicha enfermedad puede ser el *Thielaviopsis paradoxa* descrito ya por Fucikovsky (2000), y que es anamorpho del *Chalara paradoxa* que también es un deuteromycete y del *Ceratocystis paradoxa* o *Ceratostomella* que estos son los teleomorphos por lo que son ascomycetes (Rohrbach y Schmitt, 1994), este es un problema ya que se ha pensado que se trata de hongos diferentes, pero se han realizado estudios filogenéticos y se encontró que en realidad se trata del mismo hongo (Paulin-Mahady *et al.*, 2002). En si el *T. paradoxa* es la fase conidial del *Ceratocystis* (Romero, 1988), este tipo de variaciones son las que han complicado la identificación de dicho hongo. Además el género *Thielaviopsis* algunos autores lo consideran como sinónimo del género *Chalara*.

El *T. paradoxa* se encuentra entre los hongos imperfectos que ocasionan las pudriciones negras de raíz y del tallo como de la caña, cocotero, piña, camote , plátano, palma datilera, mango entre otras y el ahogamiento de

muchas hortalizas y flores en particular del frijol, remolacha, zanahoria, apio, chícharo, tomate, pensamiento, flor de pascua, calabaza, arveja, sandia y así como de muchos cultivos mayores que incluyen al algodón, chícharo de vaca, lino, cacahuate, trébol, soya y el tabaco, etc. (García, 1987; Hanlin, 1990; Agrios, 2004).

Este tipo de hongo vive, crece y se propaga como un parásito no obligado casi siempre en asociación con la materia orgánica muerta y es favorecido por la considerable humedad del suelo y la alta humedad relativa del aire (Agrios, 2004), así como la temperatura; el micelio por lo tanto puede sobrevivir con estas condiciones ya sea dentro o fuera del hospedero y el agente de diseminación de las esporas es el viento por lo que el tipo de diseminación es pasiva (Mendoza y Cortés, 1983).

#### **2.4 Los postulados de Koch en la fitopatología**

El primer eslabón del ciclo de la enfermedad es el patógeno; una vez identificada la enfermedad en una población los especialistas deben correlacionar el brote de esta con un patógeno específico, por lo que es preciso descubrir la causa exacta de la enfermedad, aquí es donde se emplean los postulados de Koch y sus modificaciones, para determinar la etiología o causa de la enfermedad (Prescott *et al.*, 2004).

En esencia Koch postuló, que para comprobar que un patógeno causa enfermedad se debe demostrar que el parásito y la enfermedad no solo están correlacionados, sino relacionados en cuanto causa, la causa verídica y directa de la enfermedad; esto depende de la separación del patógeno y su reintroducción a un organismo, con la subsiguiente producción de síntomas, incluyendo la reaparición del agente causal en el organismo enfermo. Estos se formalizan a continuación:

- 1) El microorganismo siempre debe estar asociado con la enfermedad, y la enfermedad no debe presentarse sin que el organismo o agente causal se encuentre presente, o haya estado presente.
- 2) El microorganismo en cuestión debe ser aislado en cultivo puro y sus características determinadas.
- 3) La inoculación del microorganismo debe resultar en los mismos síntomas de la enfermedad.
- 4) El microorganismo debe ser reaislado y sus características deben coincidir con las determinadas en el segundo postulado (French y Hebert, 1980).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS.**

#### **3.1 Descripción del medio físico del área de estudio uno**

##### **3.1.1 El Arenal**

El municipio de Arenal se encuentra en el noroeste del estado, en las coordenadas 20°42'44" a 20°52'15" de latitud norte y de los 103°37'04" a los 103°42'45" de longitud oeste, a una altura de 1,450 metros sobre el nivel del mar (INAFED –SEGOB, 2004).

##### **3.1.2 Delimitación**

Limita con los municipios de Amatitán al norte y al oeste, al sur con Tala y al este colinda con Zapopan (INAFED –SEGOB, 2004).

##### **3.1.3 Localización de la toma de muestra**

La parcela de la que se obtuvo el material enfermo está ubicada en el predio del Sr. Donato Ibarra en Arenal, Jal., que se encuentra en las coordenadas 20° 45'38" Norte y 103° 39'57" Oeste, con una altitud de 1420 m.s.n.m. en la región de Arenal Jalisco (Gudiño, 2005).

##### **3.1.4 Geología**

Está considerado dentro del período Terciario; el subsuelo está constituido por caliza, rocas ígneas extrusivas, riolita, andesita, basalto, toba y brecha volcánica (INAFED –SEGOB, 2004).



### **3.1.5 Topografía**

La mayor parte del municipio presenta zonas semiplanas con elevaciones de 1,550 a 1,600 metros sobre el nivel del mar. Le siguen en proporción las zonas planas con elevaciones de 1,400 a 1,550 metros sobre el nivel del mar, y en proporción mínima se presentan zonas accidentadas con elevaciones de los 1,600 a los 1,840 metros sobre el nivel del mar (INAFED – SEGOB, 2004).

### **3.1.6 Clima**

El clima del municipio se ha clasificado como semiseco; con invierno y primavera secos y semicálido, sin estación invernal definida. La temperatura media anual es de 20°C., y una precipitación pluvial media de 1,103.6 milímetros, con régimen de lluvias en los meses de junio y julio.

Los vientos dominantes son en dirección noroeste. El promedio de días con heladas al año es de 13 (INAFED –SEGOB, 2004).

### **3.1.7 Hidrografía**

Pertenece a la cuenca Lerma-Chapala-Santiago y a la subcuenca de los ríos Santiago-Cuisillos-Juchipila; sus principales corrientes son los ríos Salado y Arenal y los arroyos Las Tortugas, Arenal, Agua Dulce y la Laguna Colorada (INAFED –SEGOB, 2004).

### **3.1.8 Suelos**

La composición del suelo corresponde a los del tipo Feozem háplico asociado con el Regosol eútrico y Vertisol pélico (INAFED –SEGOB, 2004).

### **3.1.9 Vegetación**

Los cerros están cubiertos de encino y vegetación baja espinosa. Las lomas y laderas se cubren con huizache (*Acacia farnesiana*), nopal (*Opuntia*

sp.), grangeno, uña de gato y algunos árboles frutales (INAFED –SEGOB, 2004).

### **3.2 Fauna**

La fauna está representada por especies como venado, tlacuache, zorra, coyote, tejón, zorrillo, ardilla, conejo, reptiles y otras especies menores. (SEIJAL, 2005).

#### **3.2.1 Recursos naturales**

La riqueza natural con que cuenta el municipio está representada por 900 hectáreas de bosque (INAFED –SEGOB, 2004).

Sus recursos minerales son yacimientos de elementos no metálicos: cal, cantera, arena, grava, arcilla, caolín, diatomita, cuarzo y feldespato (INAFED –SEGOB, 2004).

#### **3.2.2 Uso del suelo**

La mayor parte del suelo tiene un uso pecuario. El municipio tiene una superficie territorial de 20,744 ha. de las cuales 8,223 son utilizadas con fines agrícolas, 7,021 en la actividad pecuaria, 2,000 son de uso forestal, 120 son de suelo urbano y 3, 380 ha tienen otro uso (INAFED –SEGOB, 2004).

En lo que la propiedad se refiere, una extensión de 12,936 ha es privada y otra de 7,808 es de ejidal; no existiendo propiedad comunal (Gudiño, 2005).

### **3.3 Descripción del medio físico del área de estudio dos**

#### **3.3 .1 Arandas**

El municipio de Arandas se localiza en el centro oriente del estado, en las coordenadas 20°36'30" a 20°54'30" de latitud norte y 102°00'45" a 102°37'00" de longitud oeste a una altura de 2,000 metros sobre el nivel del mar (INAFED –SEGOB, 2004).

### **3.3.2 Delimitación**

Limita al norte con los municipios de San Miguel el Alto, San Julián y San Diego de Alejandría; al sur con Jesús María, Ayotlán y Atotonilco; al este con el municipio de Jesús María y el estado de Guanajuato; y al oeste con Tepatitlán de Morelos y Atotonilco (INAFED –SEGOB, 2004).

### **3.3.3 Localización de la toma de muestra**

La parcela de la que se obtuvo el material enfermo está ubicada en el predio del Sr. Ignacio López López en Arandas, Jal. (Comunicación Personal, 2005).

### **3.3.4 Geología**

Esta región está considerada como del período Cuaternario, está constituida por rocas ígneas extrusivas, basalto, toba y brecha volcánica (INAFED –SEGOB, 2004).

### **3.3.5 Topografía**

La mayor parte del municipio es semiplano, cuenta con elevaciones como son: el cerro de Ayo; Cerro Gordo y meseta de Los Altos; existen también extensos valles en los planos de Bombela, Sáuz de Cajigal y exhacienda de Guadalupe (INAFED –SEGOB, 2004).

### **3.3.6 Clima**

El municipio de Arandas cuenta con un clima que se clasifica como semiseco con invierno seco y semicálido, sin cambio térmico invernal bien definido. La temperatura media anual es de 19° C. y una precipitación media de 888.1 milímetros, con régimen de lluvias en los meses de julio, agosto y septiembre. Los vientos dominantes son en dirección sureste. El promedio de días con heladas es de 31.8 al año (INAFED –SEGOB, 2004).

### 3.3.7 Hidrografía

Sus recursos hidrológicos son proporcionados por los ríos y arroyos que conforman las subcuencas hidrológicas río Turbio, Atotonilco y Verde o Grande de Belem, pertenecientes a la región hidrológica Lerma- Chapala- Santiago. Varios son los arroyos que atraviesan en todas las direcciones al municipio, pero sus aguas no son caudal permanente y sólo en la época pluvial suelen ser de gran caudal. El principal es el de Sánchez que en su nacimiento se denomina del Lagunazo, formado por los arroyos de La Tinaja y Edificios continuando con el nombre de El Tule; El Aguilillas; El Guamuchil; El Caracol; Capulín; Grangena; Valonado; El Gachupín, que en el rancho El Caracol recibe el nombre de río de Los Sabinos; y Santa Margarita. Las presas son las de Santa Isabel, El Rodeo, Agua Negra, El Tule y Bombela (INAFED –SEGOB, 2004).

### 3.3.8 Suelo

El tipo de suelo predominante es planosol eútrico, asociado con vertisol pélico (INAFED –SEGOB, 2004).

### 3.3.9 Vegetación

La vegetación del municipio está formada por encino (*Quercus* sp.), roble, sauce (*Salix* sp.), cedro, sabino o ahuehuete, fresno, cerezo, uña de gato, tepehuaje, nogal, pochote, madroño y colorín (*Erythrina americana*). Existen también árboles frutales y plantas medicinales como durazno (*Prunus persica*), pera, perón, granado, guayabo (*Guajaba* sp.), higuera, naranjo (*Citrus*), lima, limón, nopal (*Opuntia* sp.), cardo santo, calabaza (*Cucurbita pepo*), chayote, doradilla, hiedra, sábila (*Aloe vera*), yerbabuena y yerba de golpe, entre otras (INAFED –SEGOB, 2004).

### **3.3.10 Fauna**

Las especies animales son variadas: murciélago, tejón, gato común y montés, mastín, lobo, coyote, zorrillo, tlacuache, ardilla, liebre, conejo, armadillo, jabalí, venado, águila y grulla, entre otros (INAFED –SEGOB,2004).

### **3.3.11 Recursos naturales**

La riqueza natural con que cuenta el municipio está representada por 1,400 hectáreas de bosque donde predominan especies de encino, roble, sauce, cedro, sabino, fresno y nogal (INAFED –SEGOB,2004).

### **3.3.12 Uso del suelo**

La mayor parte del suelo tiene un uso agrícola y la tenencia de la tierra, en su mayoría, corresponde a la propiedad privada (INAFED –SEGOB, 2004).

## **3.4 Toma de muestra**

Con el fin de aislar al patógeno responsable se eligieron plantas con daños severos, con síntomas de pudrición negra, de hojas y raíz se tomó el tejido que sirvió para aislar el patógeno.

## **3.5 Esterilización del material de laboratorio**

Se lavó primero que nada el material a esterilizar, esto es cajas de petri, se estilaron y se terminaron de secar con serví toallas y se acomodaron de cinco en cinco en papel periódico, se selló con cinta masking tape y se metieron en bolsas de plástico de alta densidad. Enseguida, antes de colocar los materiales a esterilizar se le agregó en el autoclave agua a una altura aproximada de 5 cm llegando casi al nivel de la parrilla, se cerró el autoclave. Se cercioró que se encontrara abierta la válvula de escape antes de colocar la tapa. Se mantuvo abierta la válvula de escape, dejando fluir el vapor por el orificio de la válvula con objeto de desplazar el aire que queda adentro del autoclave. Después se cerró la válvula, cuando comenzó a salir vapor de esta y se llegó a las 15 libras se tomó el tiempo por 20 min. Después se apagó y se

dejó que bajara poco a poco la presión hasta que llegó a cero la manecilla del manómetro. Después se abrió la válvula para que saliera el poco vapor que quedará. Se sacaron los paquetes de caja de petri. Se dejaron aproximadamente 15 min. fuera y se metieron después al refrigerador.

### **3.6 Preparación de medio de cultivo PDA y B de King**

Para la preparación de PDA (Papa Dextrosa Agar), se utilizaron 200 grs. de papa previamente lavadas y cortadas, se le adicionó agua destilada, en un matraz de 500 mL enseguida se le colocó un tapón de algodón en la boca del matraz y se esterilizó con calor húmedo (autoclave), a una presión de 15 lb. durante 20 min. Posteriormente se filtró el caldo con ayuda de un embudo y cedazos de calibre 150 y 120  $\mu$ , se vertió en un vaso de precipitado, de ahí se tomó el caldo de papa y se vació en un matraz de 1 lt. se le agregaron 10 grs. de dextrosa hasta que se disolvió, enseguida se añadió 15 grs. de agar bacteriológico y ya disuelto se aforó a un litro con agua destilada y se licuó sobre la flama de un mechero; realizado lo anterior se llevó al autoclave nuevamente y se esterilizó durante 20 min. a 1. 2 atmósferas.

Se preparó medio B de King que contiene Proteose peptone No.3 20 grs., Glycerol C. P. 10 grs.,  $K_2HPO_4$  ( anhydrous ), 1.5 grs.,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1.5 grs., Agar 15 grs., pH 7.2 (Tuite,1969), que es un medio que menciona Fucikovsky (1999), como bueno para que se desarrolle el hongo de interés.

### **3.7 Llenado de cajas de petri con medio de cultivo**

Se llevó el medio y las cajas en su estado estéril a la campana de extracción la cual previamente se limpió con hipoclorito al 1%, seguido de esto se encendió el mechero. Se destaparon los juegos de cajas y se tomó una por una y cerca del mechero se vertió el medio hasta cubrir el fondo de esta y así consecutivamente hasta tener todas las cajas con medio. Estas se dejaron sobre una superficie plana hasta que se solidificaran. El medio que sobró se tapó y conservó en refrigeración.

### **3.8 Obtención y desinfección del material enfermo**

Se utilizaron plantas de agave aproximadamente de tres años de edad con daños severos adquiridas de un predio de Arandas y Arenal, Jalisco.

De parte del cogollo se desprendieron las hojas enfermas y se tomó la parte lesionada de esta y la raíz. En el laboratorio de Plagas Urbanas del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, se lavaron las raíces, se tallaron con un cepillo de cerdas suaves para quitar la tierra y se enjuagaron con abundante agua corriente. Se tomaron pequeños fragmentos de tejido infectado en el margen de la lesión con tejido sano de aproximadamente 0.5 cm<sup>2</sup> los cuales antes de ser expuestos al medio se trataron con una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl), al 1% durante 2 minutos, enseguida se colocaron en una tapa de caja de petri para que se escurrieran y los cortes se enjuagaron en agua destilada estéril para eliminar el exceso de hipoclorito. Una vez secos los cortes se pasaron a las cajas de petri en medio de B de King (French y Hebert, 1980; Agrios, 2004). Se incubaron a temperatura ambiente (24-27°C), para obtener el desarrollo del micelio. Después de haberse realizado varios aislamientos para evitar la contaminación por otros organismos que no eran del interés de este trabajo, se tomó el hongo del que según trabajos anteriores se describían las características de dicho patógeno. A continuación se pasó a medio PDA que previamente ya se había preparado y hecho el vaciado, con el fin de que presentara la coloración negruzca característica del micelio de dicho hongo.

### **3.9 Aislamiento de bacterias y hongos**

El material que se sembró mostró que contaba con otras asociaciones de bacterias y hongos por lo que se procedió a aislarlos del hongo del que se sospechaba que estaba causando dicha enfermedad pero a la vez se cree que también estos organismos estaban participando de una forma ya sea en simbiosis con dicho hongo o como agente de control biológico con este. Para poder saber su función en esta asociación se tomó de una colonia de bacterias

que contaba una de las primeras siembras del tejido con una asa de nicromo y se hizo un estriado en una de las cajas de petri; para poder obtener una cepa pura, se realizó esto varias veces tomando como cepa a la que ya se había sembrando con anterioridad. Cuando este hongo ya estuvo puro se tomó una pequeña sección de micelio con agar y se le agregó una gota de lactofenol y con un cerillo encendido se flameó el portaobjetos donde se encontraba el micelio hasta que el agar se fundió; enseguida se llevó al microscopio compuesto y se observó en los diferentes objetivos (40x y 100x), con el fin de observar las características del hongo que tienen un valor taxonómico para su identificación.

### **3.10 Purificación**

Cuando se obtuvo el micelio se tomó un fragmento de este aproximadamente de 25 mm<sup>2</sup>, se sembró en otra caja de petri con el mismo tipo de medio y se realizaron más de estas resiembras, este proceso duró hasta que se consideró que el hongo ya estaba puro, es decir, sin ningún contaminante.

### **3.11 Identificación del patógeno**

#### **3.11.1 Preparación en fresco**

Cuando se tuvo suficiente micelio se tomó un fragmento aproximadamente de 0.5 cm<sup>2</sup> al cual se le agregó una gota de lactofenol y con la flama de un cerillo se derritió el agar que contenía la muestra de micelio y se le colocó un cubreobjetos.

Esta se llevó a un microscopio compuesto y se realizó la observación correspondiente en la cual se consiguió reconocer las hifas y clamidosporas. Con la ayuda de unas claves taxonómicas (Barnett y Barry, 1999), se compararon las estructuras y por último se identificó al patógeno mostrando que



el hongo de dicha cepa era del género *Thielaviopsis* en su forma asexual al mostrar solamente clamidosporas, conidios y conidióforos.

### **3.12 Incremento de la cepa**

Después de haber realizado la observación e identificación del hongo se propagó para obtener un mayor número de clamidosporas, conidios y conidióforos por lo que se dejó crecer hasta que las cajas estuvieran totalmente cubiertas.

### **3.13 Plantación de agave sano**

Se seleccionaron plantas sanas, de *Agave tequilana* Weber var. Azul, las cuales se colocaron en macetas de 6" (de fibra de coco), con un sustrato de peat-most y estopa de coco a una proporción de 1:2, las cuales fueron colocadas en un invernadero ventilado continuamente; para el acomodo de las plantas se ubicaron a nivel de piso para su adaptación (Ibarra, 2005).

### **3.14 Pruebas de patogenicidad en invernadero**

El trabajo de patogenicidad en plantas de agave se llevó a cabo en el Vivero del Departamento de Producción Agrícola del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, de la Universidad de Guadalajara en el período de Marzo a Mayo de 2005.

#### **3.14.1 Preparación de inóculo**

Se esterilizó todo el material a utilizar incluyendo agua destilada. Se tomó un poco de agua estéril y se vertió en la caja donde se tenía la cepa pura y con ayuda de un portaobjetos se removió el micelio evitando tomar parte del medio de cultivo, después se pasó a un vaso de precipitado y se aforó a 200 mL y se homogenizó, para facilitar su manejo se regresó todo el volumen al matraz de 250 mL y se usaron aspersores para inocular. Los experimentos comenzaron el día 21 de Marzo de 2005.

Los tratamientos quedaron de la siguiente manera:

- Tratamiento 1 (T1): Micelio + 200 mL de agua destilada estéril + heridas en raíz.
- Tratamiento 2 (T2): Micelio + 150 mL de agua destilada estéril.
- Tratamiento 3 (T3): Micelio + 150 mL de agua destilada estéril + una aplicación de un agroquímico (H24 a base de Propoxur, Praletrina y Deltametrina).
- Tratamiento 4 : Testigos tratados con agua estéril

Después de hacerse las inoculaciones, las plantas se cubrieron con bolsas de polipropileno de 50 x 70 cm., para simular una cámara húmeda se asperjaron con agua destilada estéril.

### **3.15 Reaislamiento del patógeno**

Cuando se obtuvieron los resultados se tomó tejido enfermo (hoja y raíz), de cada uno de los tratamientos y se realizó la misma metodología que la de un inicio, después se pusieron cuatro explantes por cada caja de petri con medio B de King ya que encontró puro el micelio se cambio a medio PDA y ya que esporuló se tomó una muestra en fresco y se observaron en el microscopio compuesto los conidióforos y conidios característicos de dicho hongo.

## **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**

### **4.1 Toma de muestra, esterilización de material de laboratorio, preparación de medio de cultivo y llenado de de cajas de petri con medio de cultivo**

Desde la toma de muestra hasta el llenado de cajas de petri con medio fue satisfactorio por lo que se realizó los pasos subsecuentes sin problemas mayores.

### **4.2 Obtención y desinfección del material enfermo**

Cuando se obtuvo el material enfermo que se trajo de campo y se desinfectó inicialmente presentaron algunas contaminaciones pero se logró rescatar siempre el patógeno que surgía del material por lo que finalmente se realizó el aislamiento tanto de las hojas dañadas como de la raíz obteniéndose la cepa del hongo responsable de la sintomatología mostrada por la planta enferma.

### **4.3 Aislamiento de bacterias y hongos**

Se separó la bacteria del hongo, pero no se identificó la bacteria ya que se centró más en el hongo por ser un poco más difícil de aislar, además de su fácil contaminación y sobre todo para no desviarse del objetivo central del trabajo.

### **4.4 Purificación**

Se presentaron una serie de contaminaciones principalmente por microorganismos oportunistas, al adquirir la experiencia del manejo de la técnica en el laboratorio se fueron obteniendo los cultivos puros del hongo aislado.

Se utilizaron dos tipos de caja de petri, unas de cristal y cajas de plástico desechables, mostrando que en los casos de las cajas de plástico se presentaron más las contaminaciones que en el caso de las de vidrio, esto puede atribuirse a las propiedades de ambos materiales, ya que en el plástico las partículas están mas separadas que el vidrio.

Se pudo observar en un inicio el micelio con un crecimiento radial uniforme con una coloración blanquecina que se fue tornando con el paso de los días a gris oscuro, cuando se hizo el cambio de medio de B de King a PDA se tornó en pocos días a un color negruzco (Fig. 1a y 1b).

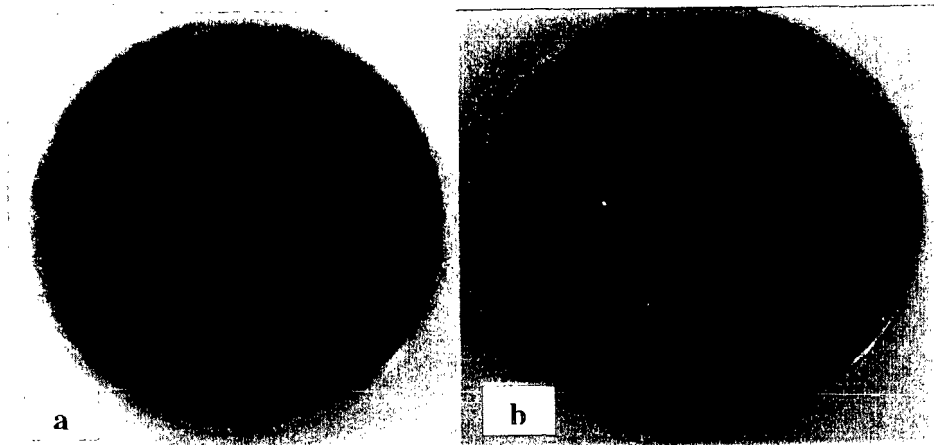


Figura 1. a) Cepa de *T. paradoxa* en medio de PDA, b) Cepa de *T. paradoxa* en medio de B de King.

#### 4.5 Identificación del patógeno

Cuando el micelio tomó la coloración gris oscuro casi negro se realizó una preparación en fresco con el fin de identificar al hongo utilizando sus estructuras reproductoras, el microscopio de luz y claves taxonómicas especializadas (Barnett y Barry, 1999), se pudo observar que este presentaba conidióforos hialinos a marrón pálido, alongados, en forma de botella, ahusados hacia el ápice, de pared delgada y septados. Conidios hialinos a marrón claro, producidos endógenamente en cadenas, en forma cilíndrica a elipsoidal. Clamidosporas lisas con doble pared formadas en cadenas fuertemente

coloreadas de marrón. Estas características permitieron la identificación del hongo obteniéndose que *Thielaviopsis paradoxa* es el microorganismo aislado, así se cumplió el segundo postulado de Koch.

#### **4.6 Incremento de la cepa**

Se realizó el incremento de la cepa obteniendo varias cajas de la cepa pura las cuales servirían más adelante para efectuar las pruebas de patogenicidad.

#### **4.7 Plantación de agave sano**

Se prepararon las macetas con las plantas de agave las cuales rápidamente se adaptaron a las condiciones de invernadero y quedaron listas para las pruebas de patogenicidad.

#### **4.8 Pruebas de patogenicidad en invernadero**

De acuerdo a las inoculaciones realizadas en los tratamientos se obtuvo que los síntomas comenzaron a mostrarse casi inmediatamente en las plantas infectadas (Fig. 2a).

Con el paso del tiempo empezaron a mostrar síntomas similares los tratamientos, los que no presentaron dicha sintomatología fueron los testigos (Fig. 2b), algunos de los síntomas que se observaron inicialmente fue:

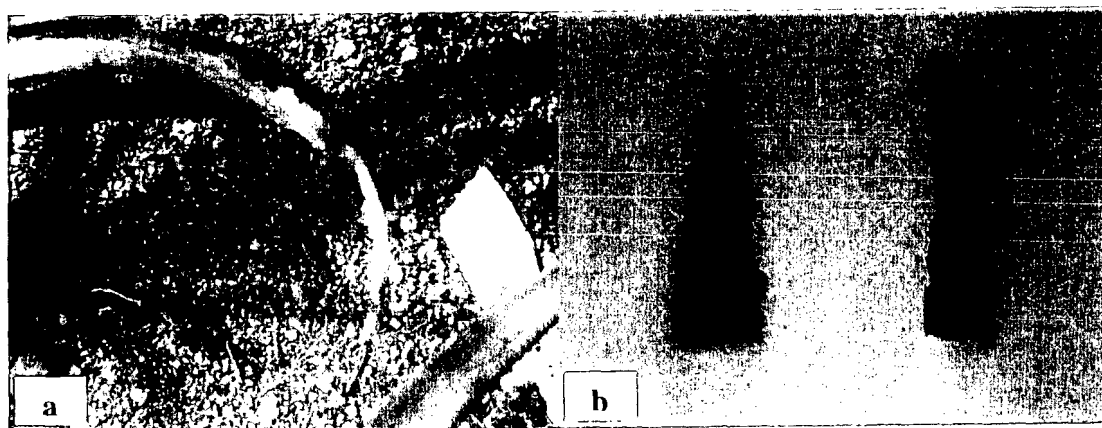


Figura 2. a) Hoja que comienza a secarse por manchas negras, b) Comparación de una hoja sana con una inoculada.

Con esta prueba se comprobaba el tercer postulado de Koch, ya que se inoculó con el hongo *Thielaviopsis paradoxa* en las plantas de agave sano y estas empezaron a desarrollar la enfermedad que presentaban las plantas colectadas.

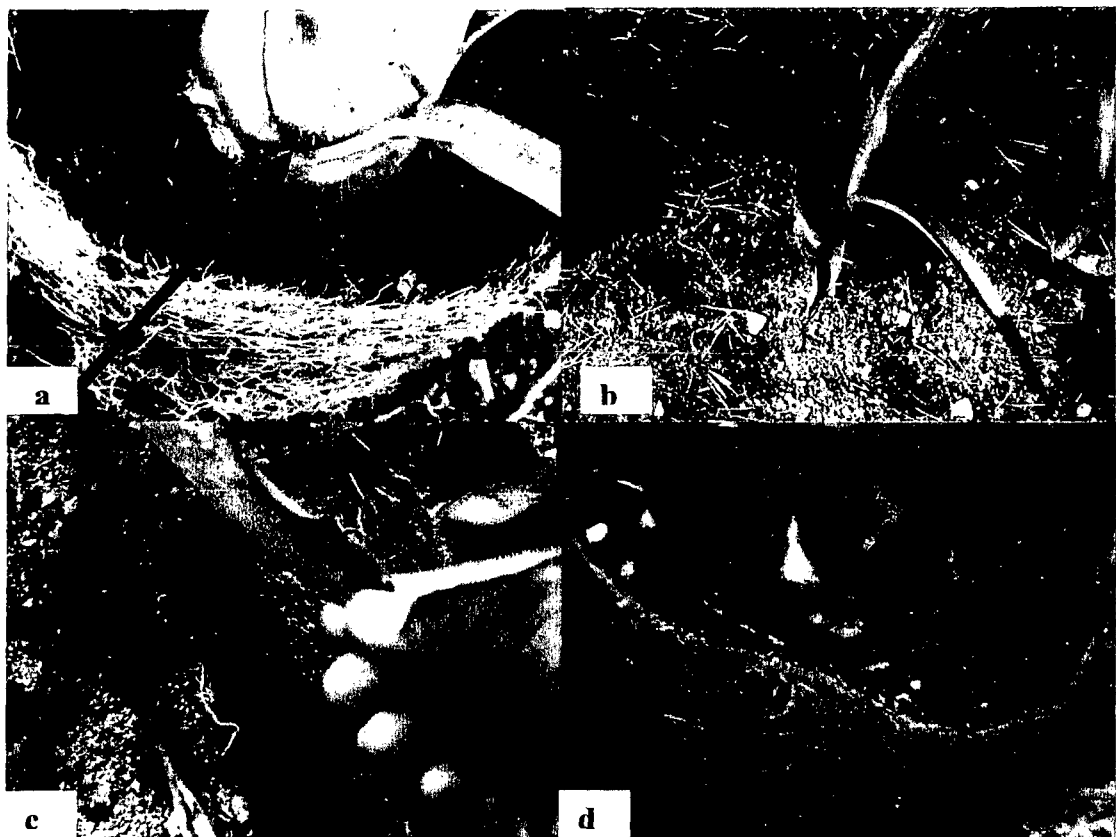
#### 4.8.1 Tratamiento No. 1

En este tratamiento se observaron de forma más rápida los síntomas que en los otros tratamientos. Después de una semana de haber inoculado 10 plantas sanas se comenzaron a notar ciertas características que no tenían antes de la inoculación, como un secamiento de menos de un centímetro en el ápice de la hoja y un ligero encarrujamiento, apareció en las orillas de las hojas basales un ligero color rojizo.

Con el paso del tiempo, aproximadamente más de dos meses también se fueron acentuando los síntomas y aparecieron otros.

Los síntomas que se manifestaron con el tiempo y que se fueron intensificando son: Encarrujamiento de la hoja y coloración morada en el borde

de esta, en algunas ocasiones mostró la tendencia de que esta coloración fuera rojiza (Fig. 3a y 3b). Aparecieron unos puntos negros en los bordes de las hojas que después de un tiempo se convirtieron en manchas moradas y en casos más avanzados estas se tornaban de color negro de aproximadamente medio centímetro cada una; avanzó el secamiento de la hoja casi hasta la mitad de la misma y las hojas que no sufrieron este fenómeno mostraron en sus puntas un color negro, en otras hojas se observó la aparición de manchas amarillas y oscuras ambas originaban que la parte afectada comenzara a secarse. Se observó que las hojas que no mostraban manchas ni secamiento dejaban de crecer y daban la impresión de que estaban sufriendo un achicamiento (Fig. 3c y 3d).



**Figura 3. a) Mancha rojiza, b y c ) Encarrujamiento de hoja, d) Manchas en la orilla de las hojas.**

Hubo ocasiones donde aparentemente la enfermedad se detenía, por lo que esto se le atribuyo a la variación de temperatura que fue de los 28°C hasta los 34°C, observándose que cuando incrementaba la temperatura a más de 31°C era cuando aparentemente se detenía y si bajaba a menos de 31°C esta continuaba su avance.

#### **4.8.2 Tratamiento No. 2**

Al igual que el tratamiento No.1, se tomó lectura de las inoculaciones en el agave pero las plantas no mostraron ninguna muestra de enfermedad. Los síntomas empezaron aparecer hasta cumplido el mes. Los daños fueron menores pero mostraron lo mismo que en el primer tratamiento. Hubo presencia de puntas secas de las hojas y algunos puntos negros de aproximadamente 0.5 cm., también se pudo observar un ligero encarrujamiento de algunas hojas. A los dos meses algunas de las hojas ya se encontraban secas y otras llevaban invadida casi la mitad de cada hoja (Fig. 4a - 4c).

Se considera que los síntomas tardaron en aparecer en este tratamiento por que el hongo no entro por ninguna herida como sucedió en el primer tratamiento.





Figura 4. a y c) Puntos negros en hoja, b) Hoja que comienza a secarse, d) Avance de la enfermedad.

#### 4.8.3 Tratamiento No. 3

En este tratamiento se desarrolló más rápido la enfermedad que en el segundo tratamiento, ya que se aplicó en el cogollo un agroquímico (H24), con la finalidad de causar quemaduras (Fig. 5a). La penetración del patógeno es más lenta a pesar de que se hicieron quemaduras, esto señala que el patógeno entra al tejido más rápido por heridas hechas mecánicamente como se observó en el tratamiento No.1.

La sintomatología que comenzó a mostrar fue puntas de las hojas color negro, borde de hojas morados y manchas rojizas, encarrujamiento de la hoja y finalmente secamiento de estas.

Las manchas de color morado y los puntos aparentemente son los mismos; comienza como una pequeña mancha morada y después crece como se mencionó a 0.5 cm y cambia su coloración a casi negro y donde aparecen estas manchas se empieza a secar esta hoja hasta que la seca totalmente (Fig. 5b). Este tejido se aisló y se desarrolló exclusivamente una bacteria la cual no se identificó.

Las manchas según los aislamientos mostraron que las ocasionaban principalmente la bacteria no identificada, por lo que se cree que se trata de alguna de las bacterias asociadas a esta enfermedad reportadas ya por Fucikovsky-Zak (2000), ya que el hongo es uno de los principales patógenos pero Fucikovsky-Zak menciona que bacterias del género *Pseudomonas* pueden estar involucradas en esta enfermedad. Además se concuerda en la sintomatología presentada por este pues los agaves presentan el enrollamiento, amarillamiento y secado de hoja que son los síntomas ya descritos por él.

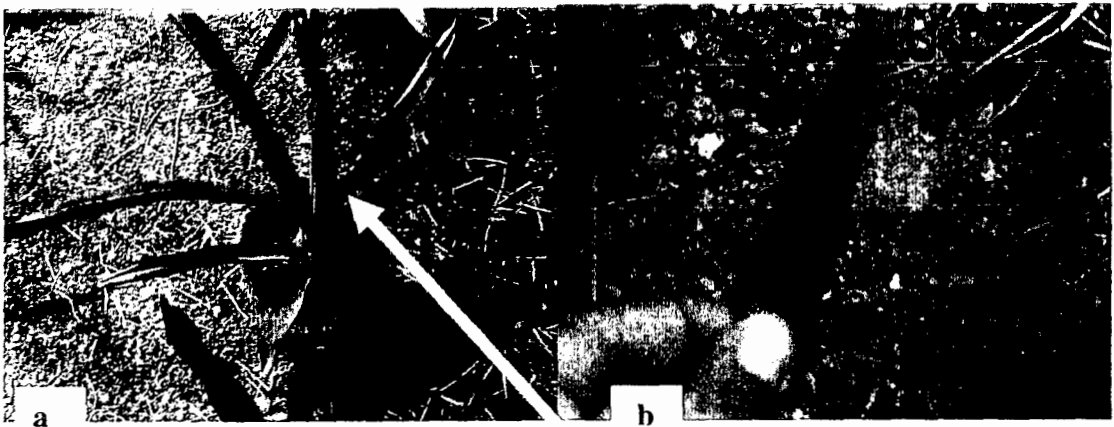


Figura 5. a) Quemadura de cogollo, b) Presencia de manchas en T3

#### 4.8.4 Tratamiento No. 4

Este tratamiento no presentó alteración alguna, se mostró siempre con las características del cultivo en campo, como color característico verde azulado y continuó su crecimiento, en los otros tratamientos se detuvo el crecimiento de las plantas.

#### 4.9 Reaislamiento del patógeno

De las hojas que mostraban alguna de las sintomatologías descritas, se cortaron una parte enferma con una sana, después se desinfectó y se sembró en los medios antes descritos para obtener una cepa pura y de este modo identificar al patógeno; también se tomaron muestras de la raíz y se trataron de la misma forma que las hojas; esto fue en cada uno de los tratamientos. Cuando se obtuvo la cepa pura se realizó una preparación en fresco y se encontró la presencia de conidios hialinos, algunos apenas en formación y otros que mostraban la forma típica de cuatro clamidosporas en forma elipsoidal. Se observaron a la vez clamidosporas lisas con doble pared formadas en cadenas fuertemente coloreadas de marrón (Fig. 6a - 6d), estas se encontraron principalmente en el tejido obtenido de las muestras de las hojas, y con la ayuda de las claves taxonómicas para identificación de hongos imperfectos de Barnett y Barry (1999), se encontró nuevamente al hongo *Thielaviopsis paradoxa* estos resultados fueron comparados con los obtenidos previamente por Parra *et al.* (2003), y Polizzi *et al.* (2006), con esto se concluye el último postulado de Koch, ya que se aisló el hongo y al inocular, nuevamente fue encontrado este agente causando de esta manera la misma enfermedad.

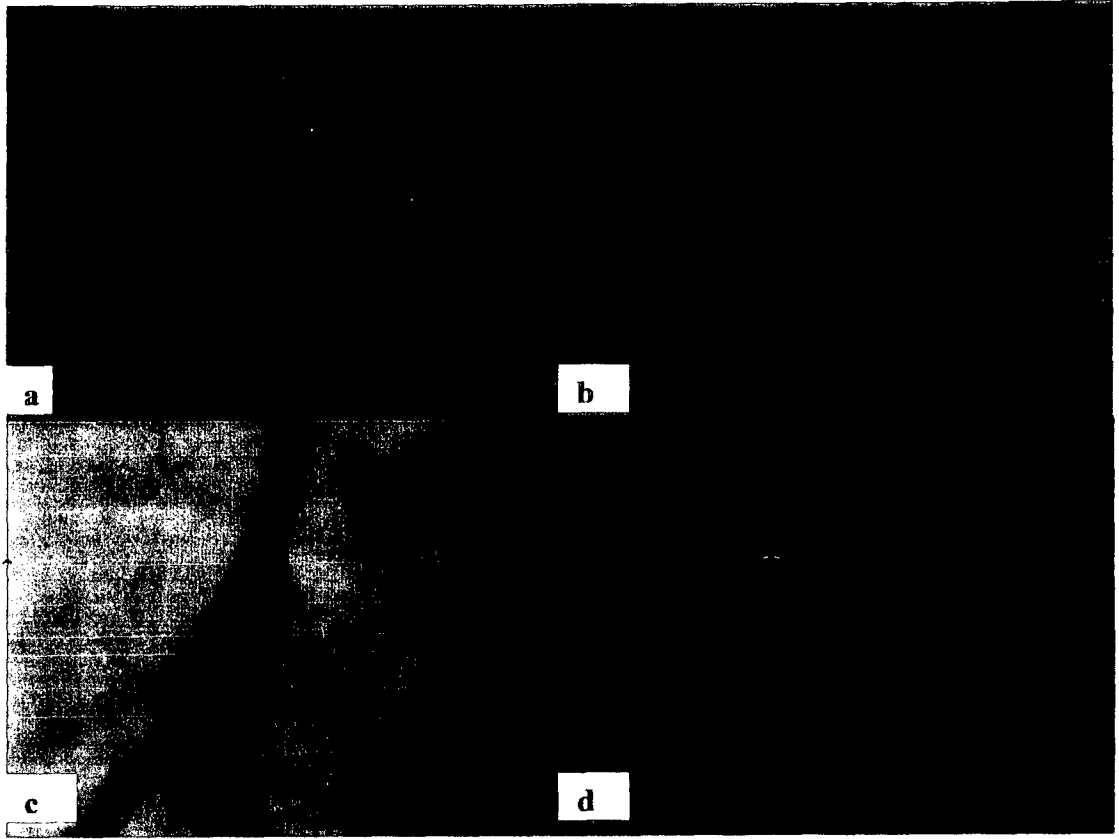


Figura 6. a y b) Formación de clamidosporas; c) Clamidospora típica de *Thielaviopsis paradoxa*; d) Clamidosporas en el tejido.

## CONCLUSIONES

De acuerdo con los objetivos establecidos y el planteamiento de la hipótesis se llegó a las siguientes conclusiones.

- ❖ Se pudo aislar al hongo causante de la pudrición negra del agave.
- ❖ Se identificaron las clamidosporas, conidios y conidióforos característicos del hongo, lo que permitió su identificación.
- ❖ Se cumplieron cada uno de los postulados de Koch demostrando de esta manera que *Thielaviopsis paradoxa* es el agente causal de la pudrición negra del agave.

## VI. LITERATURA CITADA.

1. Agrios G. 1991. Manual de enfermedades de las Plantas. Vol.2. Limusa. México. pp.380-381.
2. Agrios G.N. 2004. Fitopatología. Limusa. México. 838p.
3. Álvarez, S. 2004. Estudio genético de especies silvestres del género agave, distribuidas en el volcán de Tequila. Tesis de Lic. Universidad de Guadalajara. 42p.
4. Barnett, H.L. y Barry, B.H. 1999. Illustrated Genera Of Imperfect Fungi. Minnesota. APS Press.
5. Castro.V.R. 2003.Incidencia y marchitez y pudrición del cogollo del Agave (*Agave tequilana* Weber var. azul) en la zona sur de Jalisco. Tesis de Maestría. Universidad de Guadalajara. 59 p.
6. Cházaro B.M., M.E. Lomelí.1995. Las Agavaceas del Estado de Jalisco. Antología Botánica del Estado de Jalisco. P.87-90.
7. Consejo Regulador del Tequila (C.T.R.). 2004. Avances de la Investigación en el Agave tequilero. Guadalajara, Jalisco.
8. Consejo Regulador del Tequila (C.R.T.). 2005. Inventario de *Agave tequilana* Weber var. azul dentro de la Denominación de Origen del Tequila; Mayo de 2005. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación (SAGARPA) Delegación Jalisco. Departamento de Geomática e Inventarios del Consejo Regulador del Tequila, A.C.

9. De la I. Bauer. 1984. Fitopatología. Colegio de Postgraduados. México. 378 p.
10. FAO. 1994. Ecoocrup 1. The adaptability level of the FAO crup environmental requirements database. Version 1.0 AGLS. FAO, Rome, Italy.
11. French, R.E. y Hebert, T.T. 1980. Métodos de investigación fitopatologica. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. Costa Rica. 289 p.
12. Fucikovsky-Zak. 1999. La tristeza y muerte del agave (TMA), importante enfermedad del Agave tequilana Weber var. Azul. Avances en la investigación. Instituto de Fitosanidad. Colegio de Postgraduados.
13. Fucikovsky-Zak. 2000. Estudio de la Fitosanidad del *Agave tequilana* Weber var. Azul. Informe Técnico para el Programa General de Apoyo y Desarrollo Tecnológico a la Cadena Productiva Agave-Tequila. Instituto de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados.
14. García-Álvarez. 1987. Patología vegetal practica. Editorial Limusa. México. 156 p.
15. Garcia, G.R. y G.F.J. Gonzalez. 1995. Agave, alternativa económica para la zona de Arandas, Jal. Tesis de Licenciatura. Universidad de Guadalajara. 53 p.
16. Gentry H.S. 1982. Agaves of Continental North America. University of Arizona Press. Tucson. Arizona.

17. Gonzalez. E.M. R. Galvan. 1992. El maguey (*Agave* spp.) y los tepehuanes de Durango. *Cact. Suc. Mex.* 73:3-11.
18. Granados S.D. 1985. Etnobotánica De Los Agaves De Las Zonas Áridas Y Semiáridas, Biología Y Aprovechamiento Integral Del Henequén Y Otros Agaves. Centro de Investigación Científica de Yucatán. P. 127-135.
19. Granados S.D. 1993. Los agaves de México. Universidad Autónoma de Chapingo. México. Editorial Multiprensa. P. 9, 20-21,30.
20. Gudiño O. J. M. 2005. Influencia Climática Sobre El Desarrollo De La Enfermedad Pudrición Del Cogollo Del Agave. (*Agave tequilana* Weber variedad azul). Tesis de Licenciatura. Universidad de Guadalajara. 38p.
21. Hanlín R., 1990. Illustrated Genera of Ascomycetes. APS PRESS. USA. P.18-20.
22. Ibarra M. V. A., 2005. Agente Causal De Anillo Rojo En Agave (*Agave tequilana* Weber var. azul). Tesis de Licenciatura. Universidad de Guadalajara. 38p.
23. Ibarra N. 2001. Distribución e incidencia de marchitez (*Erwinia* sp. y *Fusarium* sp.) del Agave (*Agave tequilana* Weber) en los Altos de Jalisco. Tesis de Licenciatura. Universidad de Guadalajara. Jalisco. México. 39 p.
24. Instituto Nacional Para El Federalismo y El Desarrollo Municipal (INAFED-SEGOB). 2004. <http://www.e-local.gob.mx/wb2/> (Revisada 15/04/2005).



25. Luna H.G. 1996. Pudrición del tallo *Agave tequilana* L. Weber en el estado de Jalisco. México. Tesis de Lic. Universidad Autónoma de Chapingo. 59p.
26. Martínez-Ramírez, J.L., Vázquez, G.M., Pimienta, B.E., Bernal, M.F., Flores, M.F., Ibarra, D.R., Torres, M.P., Cuevas, C.H., Martín del Campo, M.N., Rodríguez, R.R., Virgen, C. G. 1998. Proyecto: Epidemiología y manejo integrado de problemas fitosanitarios de en *Agave tequilana* Weber var. Azul. Rev. Mex. Fitopatol. Vol 16(1): 116.
27. Mendoza Z. C., B. P. Cortes. 1983. Principios de Fitopatología y enfermedades causadas por hongos. Universidad Autónoma de Chapingo. P. 84-87.
28. Nobel P. S., M. Castañeda, G. North, E. Pimienta-Barrios y A. Ruiz. 1998. Temperature Influences on leaf CO<sub>2</sub> exchange, cell viability and cultivation range for *Agave tequilana*. Journal of Arid Environments, 29:1-9.
29. Parra D., Morillo F., Sánchez P., Pineda J., Guerra J. 2003. Presencia de *Thielaviopsis paradoxa* De Seynes Höhn en el tubo digestivo de *Rhynchophorus palmarum* Linneo (Coleoptero: Curculionidae). Entomotropica 18 (1): 49-55.
30. Paulin-Mahady, et al. 2002. Phylogenetic and taxonomic evaluation of *Chalara*, *Chalaropsis*, and *Thielaviopsis* anamorphs associated with *Ceratocystis*. Mycologia. 94:62-72.
31. Pimienta-Barrios E. M. C. Robles, J. A. Ruiz, P. S. Nobel, M. Castañeda, G. North, G. J. García. 2002. Regiones térmicas óptimas y marginales

para el cultivo de *Agave tequilana* en el Estado de Jalisco. Consejo Regulador del Tequila.

32. Prescott, L., J. Harley, B., Klein. 2004. Microbiología. Mc Graw Hill. España. 1240 p.
33. Rodríguez, R.R. 2002. Extractos de origen vegetal para el control de *Fusarium oxysporum* y *Erwinia* sp., aislados de Agave (*Agave tequilana* Weber variedad azul).
34. Rohrbach K.G., D.P. Schmitt. 1994. Bult Rot, Black Rot and White leaf spot. In Compendium of Tropical Fruit Diseases. APS PRESS. USA. p. 47.
35. Romero C. S. 1988. Hongos Fitopatógenos. Universidad Autónoma de Chapingo. P. 129-132.
36. Ruiz C., J. A., H. E. Flores Ruiz C., H. E. Flores L., R. A. Martínez, P., D. R. González E. y L. Nava V. 1997. Determinación del potencial productivo de especies vegetales para el Distrito de Desarrollo Rural de Zapopan, Jalisco. Folleto Técnico Núm. 5. INIFAPCIRPAC- C.E. Centro de Jalisco. Tlajomulco de Zúñiga, Jal. México. 60 p.
37. Ruiz-Corral. J. A., E. Pimenta-Barrios y J. Zañudo. 2002. Regiones térmicas óptimas y marginales para el cultivo de *Agave tequilana* en el estado de Jalisco. Agrociencia. Vol.36 num. 1 México.
38. Sánchez, A. F. 1991. Comparación de Metodologías de Micropropagación de *Agave tequilana* Weber. Tesis de Lic. Universidad de Guadalajara. 97 p.

39. SEI –JAL. 2005. Sistema Estatal de Información Jalisco, en base de datos tomados de la Enciclopedia Temático de Jalisco (INEGI).
40. Secretaria de Economía, México. 2006. Norma Oficial Mexicana, 1993. NOM-006- SCFI-Bebidas Alcoholicas- Tequila. Especificaciones Gobierno de la Republica Mexicana.
41. Simone G.W. 1994. Stem Bleeding Disease. In Compendium of Tropical Fruit Diseases. APS PRESS. USA. P.27-28.
42. Taiz L., E. Zeiger. 1998. Plant Physiology. Second Edition. Sinaver Associates, Inc. Sunderland.
43. Tuite, J., 1969. Plant Pathological Methods Fungi and bacteria. Minneapolis, Burgess Publishing. USA. 240 p.
44. Ulloa M.,T. Herrera. 1994. Etimología e Iconografía de Géneros de Hongos. Universidad Nacional Autónoma de México.
45. Valenzuela, Z. A. G. 1987. La poda en el agave tequilero (*Agave tequilana* Weber) y su influencia en la productividad. Tesis de Licenciatura. Universidad de Guadalajara. 126 p.
46. Valenzuela. Z. A. G. 1994. El agave tequilero, su cultivo e industria. Monsanto, Litteris Editores; México, p. 133-134.
47. Vicente R. I. 2002. Diagnóstico del estado de sanidad del agave (*Agave tequilana* Weber variedad azul) en la zona protegida por la denominación de origen del tequila. Tesis de Maestría. Universidad de Guadalajara. 70 p.