

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
DIVISIÓN DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA
Centro de Investigación en Parasitología Vegetal
Laboratorio de Entomología

**INFLUENCIA DEL DAÑO DE GALLINA CIEGA
SOBRE LA INCIDENCIA DE LA MARCHITES POR
Fusarium oxysporum (Nelson, 1970),
EN EL CULTIVO DEL AGAVE
(Azul tequilana Weber)**

Effect of white Grub *Phyllophaga spp.*, Damage on Manifestation of Agave Wilt Caused by
Fusarium Oxysporum.

Laboratorio de Entomología, Departamento de Producción Agrícola, Centro
Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Las Agujas, Zapopan,
Jalisco. C.P. 45110.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS AGRÍCOLAS Y FORESTALES

PRESENTA

José Manuel Becerra Lizardi

Zapopan. Jalisco, Enero del 2006

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y
Agropecuarias
Programa de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Forestales



Esta tesis titulada **“Influencia del daño de gallina ciega en agave, sobre la incidencia de la marchitez por *Fusarium oxysporum*”** fue realizada bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para la obtención del grado de:

MAESTRIA EN CIENCIAS AGRÍCOLAS Y FORESTALES

Consejo Particular

Tutor: _____
Dr. Marcelino Vázquez García

Asesor: _____
Dr. Gil Virgen Calleros

Asesor: _____
Dr. Diego Raymundo González Eguiarte

Asesor: _____
Dr. José Luis Martínez Ramírez

Asesor: _____
M.C. Ricardo Nuño Romero

DEDICATORIA

A mis padres, José⁺ y Xochitl
Por su amor y apoyo en el transcurso de su vida

A mi esposa, Elizabeth
Por su gran amor, apoyo y comprensión

A mis hijos,
José Manuel, Diana Elizabeth,
Oscar Enrique y Héctor Iván
Que significan la ilusión para vivir y crecer

A mis nietos
Regina Mariana, Manuel Alejandro,
Abraham Maximiliano y Jimena
Ilusiones venideras

A mis profesores
Dr. Marcelino Vázquez, Dr. Gil Virgen, Dr. Diego R. González, Dr.
José Luis Martínez y MC. Ricardo Nuño
Por sus conocimientos y sabiduría, por su confianza, por la entrega
para enseñar y por significar un reto a seguir

Dr. Enrique Pimienta Barrios
MC. Salvador Hurtado de la Peña
MC. Santiago Sánchez Preciado
Por todo el apoyo y las facilidades recibidas

A la Universidad de Guadalajara
Por darme la oportunidad de superación

A todos mis compañeros y amigos
Por que de alguna forma contribuyeron en el propósito

José Manuel Becerra Lizardi

INFLUENCIA DEL DAÑO
DE GALLINA CIEGA EN AGAVE
(azul tequilana Weber)
SOBRE LA INCIDENCIA DE LA
MARCHITEZ POR
FUSARIUM OXYSPORUM
(Nelson, 1970)

INDICE

	Página
INDICE DE CUADROS.....	3
INDICE DE FIGURAS.....	4
RESUMEN	5
SUMMARY	6
1 INTRODUCCIÓN	7
2 REVISION DE LITERATURA	10
2.1 Generalidades de <i>Agave Tequilana</i> Weber variedad azul.....	10
2.2 Complicaciones Fitosanitarias.....	10
2.2.1 Plagas.....	10
2.3 Complejo "gallina ciega".....	11
2.3.1 Ubicación taxonómica.....	11
2.3.2 Ciclo biológico de "gallina ciega".....	11
2.3.3 Plantas hospederas.....	12
2.3.4 Hábitos.....	13
2.4 Métodos de control de "gallina ciega".....	14
2.4.1 Control Químico.....	14
2.4.2 Control Biológico.....	15
2.4.2.1 Principales patógenos de <i>Phyllophaga</i>	16
2.4.2.2 Bacterias.....	16
2.4.2.3 Hongos entomopatógenos.....	17
2.4.2.4 Otros microorganismos de control de <i>Phyllophaga</i>	18
2.4.3 Manejo Integrado de Plagas (MIP).....	19
2.5 Enfermedades.....	19
2.5.1 Factores Medioambientales en el desarrollo de la enfermedad.....	20
2.5.1.1 pH.....	21
2.5.1.2 Humedad.....	21
2.5.1.3 Temperatura.....	21
2.6 Marchitez del agave causado por <i>Fusarium oxysporum</i>	21
2.6.1 Biología de <i>Fusarium oxysporum</i>	22
2.6.2 Ciclo Biológico de <i>Fusarium oxysporum</i>	22
2.6.3 Sintomatología de <i>Fusarium oxysporum</i>	23
2.6.4 Sobrevivencia de <i>Fusarium oxysporum</i>	25
2.7 Métodos de control de la enfermedad.....	25
2.7.1 Control genético.....	25
2.7.2 Control Cultural.....	26
2.7.3 Control químico.....	26
2.7.4 Control Biológico.....	26
3 MATERIALES Y MÉTODOS	28
3.1 Ubicación de la parcela experimental.....	28
3.1.1 Estudio de campo.....	28
3.1.2 Construcción del gradiente de infestación bajo condición de campo.....	28
3.2 Variables en estudio.....	30
3.2.1 Daño a la raíz.....	30
3.2.2 Daño por <i>Fusarium oxysporum</i>	30
3.2.3 Peso de plantas.....	31
3.3 Análisis Estadístico.....	31

3.4	Estudio de vivero.....	32
3.4.1	Sitio de estudio.....	32
3.4.1.1	Colecta de <i>Phyllophaga spp.</i>	32
3.4.1.2	Preparación del experimento.....	32
3.4.1.3	Inoculación.....	32
3.4.2	Variables en estudio... ..	33
3.4.2.1	Daño a la raíz.....	33
3.4.2.2	Presencia de <i>Fusarium oxysporum</i>	33
3.4.2.3	Determinación de azúcares.....	33
3.4.3	Análisis estadístico.....	34
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
4.1	Especies evaluadas.....	35
4.2	Muestreo previo a la aplicación.....	35
4.3	Gradiente de infestación.....	35
4.4	Daño a la raíz por "gallina ciega".....	37
4.5	Determinación del peso de plantas.....	39
4.5.1	Peso de plantas.....	39
4.6	Determinación visual de <i>Fusarium oxysporum</i> en la planta de agave.....	39
4.6.1	Síntomas visibles de <i>Fusarium oxysporum</i>	39
4.6.2	Determinación de la presencia de <i>Fusarium oxysporum</i> en la raíz en un medio de cultivo.....	40
4.7	Resultados en vivero.....	42
4.7.1	Daño a la raíz.....	42
4.7.2	Concentración de azúcares en tejido fresco.....	43
4.7.3	Determinación de propágulos de <i>Fusarium oxysporum</i>	46
5	CONCLUSIONES	48
6	BIBLIOGRAFÍA	49

INDICE DE CUADROS

		Página
Cuadro	1	Distribución de tratamientos en campo..... 29
Cuadro	2	Dosis utilizadas para establecer un gradiente de infestación de "gallina ciega" <i>Phyllophaga spp.</i> en el cultivo del agave, Ameca, Jalisco, México. CUCBA. Universidad de Guadalajara... 29
Cuadro	3	Escala arbitrara para evaluar el daño en la raíz por "gallina ciega"..... 30
Cuadro	4	Escala utilizada para evaluar visualmente el daño en la planta..... 30
Cuadro	5	Promedio de larvas vivas en el muestreo previo de <i>Phyllophaga spp.</i> en 5 plantas en el cultivo del agave, Ameca, Jalisco, México. CUCBA. Universidad de Guadalajara..... 35
Cuadro	6	Promedio de larvas vivas (suma total) de <i>Phyllophaga spp.</i> en 15 plantas en el cultivo del agave, Ameca, Jalisco, México. CUCBA. Universidad de Guadalajara..... 36
Cuadro	7	Promedio de larvas vivas 30 (DDA) de <i>Phyllophaga spp.</i> en 5 plantas que establecieron el gradiente de infestación natural en la evaluación en el cultivo del agave, Ameca, Jalisco, México. CUCBA. Universidad de Guadalajara..... 36
Cuadro	8	Promedio de valores puntuales y porcentuales del daño de "gallina ciega", <i>Phyllophaga spp.</i> en la raíz de 20 plantas en la evaluación en el cultivo del agave, Ameca, Jalisco, México. CUCBA. Universidad de Guadalajara..... 38
Cuadro	9	Promedio de peso de plantas en la evaluación en el cultivo del agave, Ameca, Jalisco, México. CUCBA. Universidad de Guadalajara..... 39
Cuadro	10	Valores puntuales de la evaluación visual del daño por <i>Fusarium oxysporum</i> en 5 plantas, en la evaluación en el cultivo del agave, Ameca, Jalisco, México. CUCBA. Universidad de Guadalajara..... 41
Cuadro	11	Promedio de segmentos de raíces con germinación de al menos un propágulo de <i>Fusarium oxysporum</i> en la evaluación en el cultivo del agave, Ameca, Jalisco, México. CUCBA. Universidad de Guadalajara..... 41
Cuadro	12	Valores puntuales y porcentaje de daño a la raíz, en el estudio de vivero. CUCBA. Universidad de Guadalajara 42
Cuadro	13	Concentración de azúcares alcanzados en los tratamientos 0, 2 y 7 larvas de en el estudio en campo, como respuesta al daño a la raíz por <i>Phyllophaga</i> 44

INDICE DE FIGURAS

			Página
Figura	1	Ubicación del lote experimental.....	28
Figura	2	Fluctuación de larvas de <i>Phyllophaga</i> en los 90 días.....	36
Figura	3	Relación entre las dosis de insecticida y la presencia de <i>Phyllophaga</i> (5 cepellones) de la suma de 3 muestreos.....	37
Figura	4	Relación entre las variables dosis crecientes del insecticida (x) y el daño a la raíz por <i>Phyllophaga</i> (y).....	38
Figura	5	Relación entre las variables número de larvas (x) y presencia de propágulos de <i>Fusarium oxysporum</i> (y).....	41
Figura	6	Relación entre las variables infestación gradual de larvas de <i>Phyllophaga</i> (x) y el daño a la raíz por <i>Phyllophaga</i>	42
Figura	7	Relación entre las variables infestación gradual de larvas de <i>Phyllophaga</i> (x) y la concentración de azúcares Sin <i>Fusarium</i>	44
Figura	8	Relación entre las variables daño a la raíz por <i>Phyllophaga</i> (x) y la concentración de azúcares (y) sin <i>Fusarium oxysporum</i>	45
Figura	9	Relación entre las variables daño a la raíz por <i>Phyllophaga</i> (x) y la concentración de azúcares con <i>Fusarium oxysporum</i>	45
Figura	10	Relación entre las variables daño a la raíz por <i>Phyllophaga</i> (x) y la presencia de propágulos, con <i>Fusarium oxysporum</i>	45
Figura	11	Relación entre las variables propágulos de <i>Fusarium oxysporum</i> (x) y la presencia de propágulos de <i>F.oxysporum</i> (y).....	47

RESUMEN

En un campo comercial de agave del Municipio de Ameca, Jalisco, a los 30 días después del inicio del temporal se construyó un gradiente de infestación de "gallina ciega" mediante el uso de cuatro dosis, 750, 1125, 1500 y 2250 gramos de ingrediente activo de clorpirifos 75 WG y un testigo sin insecticida. Sobre del gradiente establecido, se midió a los 60 días después, el daño de gallina ciega y su relación con la presencia de *F. oxysporum* en la raíz, utilizando un diseño de bloques completos al azar con cuatro repeticiones y cinco tratamientos (0, 750, 1125, 1500 y 2250 gr de ia de clorpirifos). Se midió adicionalmente el efecto de los daños sobre el peso promedio de las plantas de agave.

Se hizo además un estudio en condiciones de vivero utilizando plantas de agave sanas de seis meses en macetas en un arreglo factorial de 3 x 2 al considerar 3 niveles de infestación artificial con 0, 2 y 7 larvas por planta, en tratamientos con y sin presencia de inóculo de *Fusarium oxysporum*, evaluando las variables de daño de gallina ciega a la raíz y correlacionándolo con la presencia de *F. oxysporum* en la raíz y la concentración de azúcares en tejido fresco medida en un espectrofotómetro.

En el estudio de campo, el daño por "gallina ciega" fue directamente proporcional a la infestación creciente del gradiente, es decir, conforme incrementó la presencia de *Phyllophaga* spp, mayor fue el daño a la raíz. Así mismo, se encontró una relación directa del daño a la raíz con la presencia de *F. oxysporum* en las raíces y su manifestación externa a los 60 días. Aunque se observó lo anterior, no se pudo reflejar significativamente en el peso de las plantas, quizás porque el tiempo de estudio fue tan solo de dos meses.

En el estudio de vivero, no se pudieron repetir los resultados de campo, pero si se observó una reducción de la concentración de azúcares (38.6%) en el tratamiento con mayor población de larvas (larvas por planta) mayormente afectados también por *F. oxysporum*.

SUMMARY

In a commercial *Agave* field, in Ameca, Jalisco, 30 days after of the beginning of annual rains, a gradient of infestation of "gallina ciega" was constructed by means of the application of four dosages, 750, 1125, 1500, and 2250 grams of active ingredient of clorpirifos 75 WG and a check plot without insecticide treatment. On the gradient established, damage of "white grub" 60 days after insecticide treatment was measured along with the presence of *Fusarium oxysporum* in the root, using a randomized block design with four replicates and five treatments (0, 750, 1125, 1500, and 2250 grams of active ingredient of clorpirifos). The impact of the damage on the weight of agave plants was also determined.

Simultaneously, a study on greenhouse conditions was established using six month old *Agave* plants free of disease placed in pots. The experiment was established using a factorial 3 x 2 design considering three levels of artificial "white grub" infestation, 0, 2 y 7 white grub second instar larvae per plant, in two levels of pathogen *F. oxysporum* presence, with y without presence of inoculate, evaluating the effect of both damages in the root and also the sugar concentration in fresh tissue, quantified in a common spectrophotometer.

Results under field conditions showed that damage of "white grub" resulted directly proportional to the infestation of the gradient, which in turn caused a direct same effect on the presence of pathogen in roots. This effect was also observed when external appearance of pathogen symptoms in plants was measured. However, the observed damages of both, insect and pathogen, did not reflect on the average weight of agave plants probably due to the short period of time of the study (only two months).

Under greenhouse conditions, results in field were not replicated, but a reduction of the sugars concentration of fresh plant tissue was observed as the damage of white grub and the presence of pathogen increased in roots.

1. INTRODUCCIÓN

Agave tequilana Weber es preferido en México para la elaboración de la bebida denominada "tequila" y en particular la variedad azul por la tonalidad de sus hojas, con plantas de 7 a 8 años de edad que produce "cabezas" o "piñas" que pesan entre 25 y 45 kg (Novel, 1998). Este cultivo, permite generar buenos ingresos a los productores y a los industriales tequileros (García, 1997) a la vez de ser una importante fuente de captación de divisas para el país con la venta de la bebida en el extranjero, principalmente a los Estados Unidos y países de Europa (CRT, 1997).

Agave tequilana Weber es cultivado en tres regiones del Estado de Jalisco: Altos, Sur y Centro y a lo largo de su zona de denominación de origen que comprende 188 municipios distribuidos en los Estados de Jalisco, Nayarit, Guanajuato, Michoacán y Tamaulipas (Valenzuela, 1994).

De las especies de agave, *A. tequilana* es la que se cultiva en mayor escala en la región de Jalisco (Bustamante, 1983), debido a ciertas características importantes, como la de poseer mayor resistencia y adaptación a las condiciones climáticas y edáficas de la región, además de ser el agave que produce una mayor cantidad de azúcares que son esenciales para la elaboración del tequila. El tiempo a la cosecha es menor en comparación con las demás y es la especie aceptada en la Norma Oficial Mexicana para la elaboración de tequila (Luna, 1998).

Aspecto primordial del tequila, es estar reconocido y protegido por México como un producto con "Denominación de Origen". Esta Norma, reconocida mundialmente, fue emitida por la Secretaría de Industria y Comercio el 22 de noviembre de 1974 y publicada en el Diario Oficial de la Federación del mismo año (Luna, 1991). La legislación mexicana señala que el tequila solo puede ser producido a partir de la especie *A. tequilana* Weber var. azul.

Jalisco como principal productor de agave con 60,923 has. (Flores *et al.*, 2002), en los últimos diez años ha experimentado un aumento notable en su cultivo, y con ello los valores económicos y sociales reflejados por un consumo de 530 mil toneladas, con exportaciones de tequila del orden de los 109 millones de litros (CRT, 2004).

Paralelamente, al crecimiento económico y social también han crecido sus problemas fitosanitarios (Luna, 1998). Villalvazo desde 1986 reportó que una de las principales plagas en agave era la "gallina ciega" (*Phyllophaga* spp.). El daño muy severo, llega a destruir completamente a la raíz, el cual incide en el crecimiento y tamaño de la piña (Valenzuela, 1991)

Las "gallinas ciegas" del género *Phyllophaga* constituyen el complejo de insectos rizófagos más diverso en nuestro país; Morón en 1988 cita catorce especies con mayor importancia agrícola en México y constituyen una de las principales plagas rizófagas que causan pérdidas económicas en los cultivos básicos (Morón, 1988, Borrór *et al.*, 1992).

Los daños de los insectos en el agave son por alimentación directa y como vectores potenciales de enfermedades al ocasionar puertas de entrada de patógenos o al introducirlos directamente; *Phyllophaga* spp., causa el daño en estado de larva cuando se alimenta de las raíces de la planta (Luna, 1998).

Dentro de los problemas de sanidad del *Agave Tequilana* Weber var. azul, también son importantes por sus efectos devastadores los agentes fitopatógenos, especialmente aquellos causados por hongos y bacterias (Martínez *et al.*, 1998). Entre los fitopatógenos más importantes de este cultivo sin duda alguna destacan aquellos asociados a la marchitez del agave, cuyo síntoma se ha asociado a fitopatógenos tales como *Fusarium oxysporum* y *Erwinia* spp, o bien por la acción de ambos (Martínez, 1994).

F. oxysporum es un hongo que afecta diferentes procesos metabólicos y fisiológicos en las plantas. En su período de incubación no produce síntomas iniciales, el patógeno infecta las raíces y avanza lentamente destruyendo el tejido vegetal (CRT, 2001). Los síntomas no son notorios sino hasta que el hongo ha invadido grandes áreas de tejido y es típico el enrollamiento y decoloración de las hojas, que contrasta con el azul característico de las plantas sanas (CRT, 2001). La infección completa se presenta cuando el hongo penetra a la planta por la base y gradualmente va infectando todo el tejido hasta provocar la muerte (Soltero, 2002).

El desarrollo de cualquier enfermedad está fuertemente influenciado por factores medioambientales, además de la condición del hospedero. El pH del suelo es un factor de suma importancia en el desarrollo de este patógeno, se ve favorecido en un rango de 4.5 a 6.5 teniendo un óptimo de 5.5. Cualquier práctica que favorezca este pH resultará en daños considerables (Virgen, 1998 y Bernal y López, 2001).

En el caso específico de la marchitez del agave, se desconoce cuales son los factores que predisponen o disparan el desarrollo de la misma, así como el avance o dispersión que muestra entre plantas a nivel de parcela (Ireta *et al.*, 2002). Factores como: temperatura, huésped, pH, virulencia del patógeno, nutrimentos del suelo y estado nutricional de la planta, microflora, humedad, oxígeno, influyen en la infección del patógeno (Virgen, 1998).

El presente trabajo se realizó con el objetivo de determinar si el daño de "gallina ciega (*Phyllophaga* spp.) en la raíz del agave trasciende en un incremento de la infección de la raíz con *F. oxysporum* y determinar el efecto conjunto de ambos daños en la concentración de azúcares en tejido fresco del agave.

Hipótesis

- A) El daño por gallina ciega influye en el inicio y desarrollo posterior de la marchitez del agave causada por *F. oxysporum*

- B) El daño por gallina ciega en combinación con la infección por *F. oxysporum* impacta en el crecimiento de la planta y la producción de azúcares

2. REVISION DE LITERATURA

2.1 Generalidades de *Agave tequilana* Weber

2.2 Complicaciones Fitosanitarias

Aunque el cultivo del agave es de gran tradición en Jalisco, el conocimiento actual del sistema de producción es aún insuficiente para explicar la respuesta que se tiene entre sus componentes. Los problemas evidentes más graves que ocasionan fuertes pérdidas en el sistema de producción son: 1) inadecuada fertilización 2) ausencia de labores culturales oportunas y 3) falla en el control de plagas y enfermedades (Flores *et al.*, 2002).

Paralelamente, la competencia por nutrimentos favorece la incidencia de plagas, que provoca grandes pérdidas, además de propiciar diseminación de enfermedades al actuar como vectores (Flores *et al.*, 2002).

2.2.1 Plagas

La importancia real o potencial de una especie plaga se determina por sus efectos sobre los valores relacionados con el recurso. Las plagas pueden afectar a una planta hospedante de maneras diferentes: **Matándola** directamente, impidiendo o haciendo más lento el crecimiento, destruyendo **ciertas** partes, como raíz, piña o cogollo y/o debilitándola fisiológicamente (Luna, 1998).

La condición del sitio, en combinación **con** el clima, determina la tasa de crecimiento y el vigor general de la planta hospedante. **Muchos** patógenos atacan a plantas que se encuentran debilitadas como consecuencia de la alteración del equilibrio fisiológico creado por deficiencia de nutrimentos, sequía, inundaciones, sobrepoblación, los insectos mismos y otras variantes (Luna, 1998). Los agentes destructivos son componentes integrales de los **ecosistemas** agrícolas que normalmente intervienen en los procesos ecológicos básicos como **la** recirculación de nutrientes; determinadas actividades, como forma de propagación **y** barbeos o podas, forma y tipo de fertilización relacionadas con el cultivo del agave **crean** condiciones que aumentan la probabilidad de que los agentes fitófagos y fitopatógenos se conviertan en plagas (Luna, 1998).

2.3 Complejo “gallina ciega”

El complejo “gallina ciega” está formado por larvas de coleópteros que cumplen funciones ecológicas importantes; las larvas del género *Phyllophaga* constituyen una de las principales plagas de este complejo de insectos edafícolas-rizófagas que causan pérdidas económicas en los cultivos básicos (Morón, 1988; Borror *et al.*, 1992).

Los adultos de las especies de estos géneros son conocidos popularmente como “mayates de mayo”, “mayates de junio”, “escarabajos sanjuaneros” o “escarabajos de junio”, “frailecillos”, “chimayates”, “pipioles”, “temoles”, “chochos”, “chonchudos”, “ronrones” y sus larvas como “gallinas ciegas”, “gusanos blancos” o “nixticuiles” (Morón, 1986; Borror *et al.*, 1992; Morón *et al.*, 1997).

Dentro de este complejo también se incluyen los géneros *Cyclocephala*, *Diplotaxis*, *Macroductylus*, *Anomala*, *Isonychus*, *Ligyris*, *Oxygrilius*, *Dyscinetus* y *Golofa* (Morón, 1997b; Morón, 2001a; Morón 2001b; Morón *et al.*, 1996)

La composición específica de los géneros varía de una localidad a otra, de un período anual a otro y de un cultivo a otro, por lo que se han designado a estas comunidades como “Complejo Gallina Ciega” (Morón, 1988; Nájera, 1996; Morón, 1997a; Morón 1997b; Morón *et al.*, 1997, Morón, 2001a; Morón 2001b)

2.3.1 Ubicación Taxonomica

Los géneros que forman este complejo pertenecen al orden Coleóptera, familia *Scarabaeidae* y a las subfamilias *Melolonthinae*, *Rutelinae*, *Dynastinae* y *Cetoniinae* (Borror *et al.*, 1992).

2.3.2 Ciclo Biológico de “gallina ciega”

El ciclo biológico de *Phyllophaga* spp varía en cierta forma, porque algunas especies completan su desarrollo en un año, pero otros requieren hasta cuatro años. El ciclo de vida común del más destructivo y abundante de estos escarabajos se extiende hasta tres años. Los adultos macho se aparean generalmente por la tarde y al amanecer, las hembras regresan al suelo a depositar de 15 a 20 huevos, de 1 a 8 pulgadas de profundidad en el suelo. Desde adultos son atraídos a los árboles para alimentarse,

ellos tienden a depositar más huevecillos en las partes altas de la hierba silvestre cerca de áreas arboladas o boscosas. Los huevos se convierten alrededor de tres semanas más tarde en jóvenes larvas que se alimentan de raíces y materia orgánica durante el verano y en el otoño, ellos emigran hacia abajo en el suelo a una profundidad de 1.5 metros y renuevan su actividad hasta la siguiente primavera. Esa parte del ciclo de vida del insecto es cuando más cantidad de daño provoca ya que la larva regresa cerca de la superficie del suelo a alimentarse de las raíces de la planta.

El siguiente otoño la larva de nuevo emigra dentro del suelo hasta después del invierno, regresando cerca de la superficie del suelo hasta la siguiente primavera para alimentarse de las raíces de la planta hasta que están completamente desarrollados al finalizar la primavera. Estos gusanos forman celdas de tierra para pupar.

Adulto: Desde abril hasta junio los adultos permanecen dentro de sus celdas pupales en espera del incremento de humedad que les indicará el momento de emerger (Morón *et al.*, 1996; CESAVEG, 1998) para reiniciar el ciclo (Morón *et al.*, 1996). Los adultos se encuentran en el campo desde principios de mayo a mediados de julio (Rodríguez, 1990; Flores, 1994), las fechas de emergencia de los adultos dependen de la humedad acumulada en el suelo (Morón *et al.*, 1998), aumentan su presencia entre mayo y junio (Morón, *et al.*, 1996).

2.3.3 Plantas hospederas

Los adultos se alimentan con las hojas, tallos, raíces, exudados, flores, frutos y tubérculos de angiospermas, así como del follaje y las raíces de gimnospermas y en algunos casos depredan a otros insectos (Morón, 1997a; Morón *et al.*, 1997).

Las especies de *Phyllophaga* spp., se asocian con más de 80 especies vegetales cultivadas y silvestres como agave, maíz, pastos, zacates, cultivos de grano, caña de azúcar, arroz, cafeto, pinos, sorgo, fresa, papa, frijol, rosal, chile, jicama, cacahuete, material de viveros, hortalizas, flores ornamentales, calabaza, algodón, cultivos frutícolas, florícolas y casi todas las plantas cultivadas (Metcalf y Flint, 1962; Morón, 1988; Borrer *et al.*, 1992; Coto, 1993; Flores, 1994; Morón, 1997b; Morón *et al.*, 1998; CESAVEG, 2001a).

También se han encontrado especies rizófagas asociadas con más de 50 familias de angiospermas y gimnospermas (Morón, 1986; Morón *et al.*, 1996; Morón, 2001a). Se les puede encontrar en las raíces del zacate guinea y otras malezas diversas comunes en los lotes baldíos y los bordes de los callejones, caminos y carreteras locales (Morón *et al.*, 1998). La abundancia de las especies de *Phyllophaga* con larvas de hábitos rizófagos sugiere que se pueden desarrollar a expensas de las gramíneas silvestres establecidas en las grietas del suelo rocoso y de una gran diversidad de arvenses presentes en los sistemas de cultivo (Morón *et al.*, 2000; Ramírez y Castro, 2000).

2.3.4 Hábitos

El comportamiento de los adultos al salir de la tierra dependerá de la cobertura vegetal existente (Ramírez y Castro, 2000); la mayoría de los adultos al salir de la tierra se dirigen a los hospederos para alimentarse o copular, para después regresar al suelo y depositar sus huevos (Ramírez y Castro, 2000). Luego que las hembras son fecundadas ponen sus huevos en la parte superficial del suelo (Flores, 1994); ponen mas huevos en suelos cubiertos por gramíneas que en suelos limpios (Ramírez y Castro, 2000). Las hembras tienen la capacidad de detectar el suelo más adecuado para el desarrollo de sus crías, asegurando su sobrevivencia (Ramírez *et al.*, 2001). Después de los meses de emergencia no se encuentran adultos vivos, sólo algunos vestigios, después de ovipositar los adultos mueren y son atacados por organismos desintegradores (Ramírez y Castro, 2000). Oviposita en suelo, individual o en masa, las larvas pupan en celdas de tierra donde se forman los adultos que salen en la época de lluvias una vez que se ablanda el cocón de tierra. El daño lo causa en estado de larva cuando se alimenta de las raíces de la planta. Por su biología y hábitos en el cultivo, pueden estar influyendo significativamente en la transmisión de enfermedades (Luna, 1998).

A pesar de sus movimientos torpes, tienen gran capacidad para excavar y desplazarse en sentido horizontal y vertical; con sucesiones de contracciones corporales y el apoyo de sus patas, ráster y piezas bucales desplazan el suelo y abren galerías que favorecen la circulación del aire y del agua (Morón, 2001a; Morón 2001b). Se desarrollan en el suelo consumiendo raíces, estiércol seco o humus, así como dentro o debajo de troncos podridos ingiriendo la madera descompuesta para procesarla en su

cámara de fermentación proctodeal (Morón, 1997a). Las larvas presentan migración vertical en el suelo hacia arriba cuando comienza la primavera, y descienden cuando las temperaturas comienzan a bajar, principalmente cuando comienza el otoño. Los adultos machos manifiestan un período de actividad mayor que las hembras porque éstas son más sedentarias debido a que su función vital es la oviposición después de emerger del suelo y a su menor habilidad de vuelo (Rodríguez, 1988).

La “gallina ciega” daña generalmente por “manchones” debido a que no presentan un padrón de oviposición definido, pues las hembras buscan condiciones propicias para el desarrollo de su progenie (Coto, 1993; Cracker *et al.*, 1995; Glocoza *et al.*, 1998; Ramírez y Castro, 2000), este hábito de las hembras de ovipositar grupos de huevos es el factor responsable de la distribución agregada en los primeros estadios (Rodríguez, 1998).

2.4 Métodos de control de “gallina ciega”

En 1998 Luna sugiere que dentro del contexto agrícola, para aquellas poblaciones de insectos que tengan un impacto como plagas, es necesario establecer programas de control que precisen:

- a) Identificación precisa del insecto
- b) conocer su ciclo biológico y hábitos
- c) determinar si el insecto-plaga es nativo o exótico
- d) determinar la densidad relativa de insectos en el cultivo
- e) tener en cuenta el valor del cultivo
- f) conocer o determinar las posibles causas
- g) contar con información relacionada

2.4.1 Control químico

Después de la Segunda Guerra Mundial los productores aceptaron el químico como único control de plagas por su fácil aplicación, costos económicos y sus efectos rápidos sobre las plagas. De manera tradicional el control de “gallina ciega” se ha llevado a cabo con el uso de agroquímicos sintéticos tales como: carbofuran, diazinon, terbufos, clorpirifos, foxim, etc., tan solo por mencionar algunos de los más importantes.

Sin embargo, en el corto plazo se han observado los problemas asociados a las excesivas e indiscriminadas aplicaciones de agrotóxicos. Las plagas se han vuelto resistentes contra la mayoría de éstos; los enemigos naturales están siendo eliminados, mientras que los residuos tóxicos de los insumos agrícolas han envenenado el suelo, el agua, el aire y hasta los mismos productos agropecuarios.

Los efectos colaterales de los agrotóxicos causan en el mundo más de un millón de intoxicaciones y 20.000 muertes por año. Esto no incluye a las personas que están sufriendo de intoxicaciones crónicas como son la esterilidad, la deficiencia en el sistema inmunológico, el cáncer, los efectos teratogénicos y otros.

2.4.2 Control Biológico

El control de esta plaga se dificulta debido a su hábito subterráneo, estacionalidad y patrón de ataque en parches y a que, en la mayoría de los casos, su detección se da cuando el daño al cultivo ya ha ocurrido.

El uso de microorganismos que han coevolucionado con la plaga se perfila como una práctica promisoriosa para su control, especialmente aquellos reconocidos por su capacidad para causar enfermedades crónicas y muerte, tanto a los estadios larvales como a los adultos de *Phyllophaga* spp. Muchos de estos microorganismos han mostrado ser capaces de causar epizootias que mantienen naturalmente controladas las poblaciones de larvas de escarabeidos en el campo. Una de las ventajas del uso de agentes de control biológico radica en que generalmente, son organismos que están adaptados a los mismos hábitats en que se desarrolla la plaga; además tienen la capacidad de autoreproducirse sobre las larvas y los adultos, aumentando la concentración de propágulos, lo cual ayuda a su establecimiento en el campo. Eventualmente, un microorganismo que se ha establecido en un sitio con problemas de infestación de *Phyllophaga*, entrará a formar parte de los factores de mortalidad de la plaga que ayudan a mantener las poblaciones en niveles bajos.

Pese a los esfuerzos en la investigación en control biológico de *Phyllophaga*, aún se está en una fase incipiente en lo referente al desarrollo de productos formulados de eficacia aceptable. Sin embargo, se ha demostrado el potencial de algunos

microorganismos y la necesidad de usarlos en combinación con otras prácticas que permiten mejorar el control de esta plaga. Una alternativa a esta estrategia es la aplicación masiva de inóculo para tener un efecto insecticida.

Productos utilizados con este fin se han denominado micoinsecticidas cuando el ingrediente activo es un hongo, o bioplaguicida como un término más general que incluye a todos los grupos de microorganismos utilizados con este propósito.

Para el control de *Phyllophaga* se han puesto al mercado preparaciones en forma de polvo humectable, gránulos o suspensiones de esporas, aunque mucho del trabajo en el control se ha realizado con formulaciones simples y económicas como mezclas con talco simple o suspensiones acuosas de esporas o conidios.

2.4.2.1 Principales patógenos de *Phyllophaga* spp.

Las bacterias formadoras de esporas y no formadoras de esporas, *Bacillus popilliae*, *Bacillus thuringiensis*, *Serratia* spp., así como los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* y nemátodos de las familias *Steirnermatidae* y *Heterorhabditidae*, son los microorganismos que se han estudiado más a fondo por tener mayor potencial para su uso en el control de larvas de escarabeidos. Sin embargo, otros grupos como los virus, rickettsias y protozoarios también llegan a jugar un papel importante en el arsenal biológico que naturalmente moderan las explosiones poblacionales de este tipo de plaga.

2.4.2.2 Bacterias

Muchas bacterias han sido asociadas a *Phyllophaga* spp., entre ellas *Bacillus cereus*, *Clostridium* sp., *B. laterosporus* (Poprawski y Yule, 1990); sin embargo Klein y Jackson (1992) consideran que en la mayoría de los casos éstos podrían ser patógenos facultativos que infectan solamente cuando las larvas están bajo condiciones de estrés. Otros grupos de bacterias considerados como invasores rápidos, incluyen *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Actinobacter*, *Erwinia* y *Serratia*.

La bacteria más exitosa y estudiada contra larvas de escarabajos, incluyendo *Phyllophaga* ha sido *B. popilliae*, para la cual se ha confirmado su condición de parásito

obligado. Esta bacteria forma esporas muy resistentes a las condiciones adversas del ambiente, que le confieren una ventaja como agente de control biológico. Las larvas se infectan cuando ingieren alimento contaminado con esporas de la bacteria. Las esporas pueden sobrevivir muchos años en el suelo y al entrar al tracto digestivo germinan e infectan a la larva (Coto, 1993)

2.4.2.3 Hongos entomopatógenos

Varios hongos del grupo de los Deuteromicetos tales como: *Paecilomyces*, *Hirsutela*, *Verticillium*, *Akanthomyces*, *Beauveria* y *Metarhizium*, han sido observados infectando larvas de *Phyllophaga*, sin embargo solamente los dos últimos han sido considerados como agentes con potencial para el desarrollo de micoinsecticidas. Ambos hongos son habitantes normales del suelo y están distribuidos globalmente, causando epizootias esporádicas bajo condiciones naturales. Al igual que para muchas otras plagas, las diferentes cepas de *Beauveria* y *Metarhizium*, no tienen la misma virulencia contra *Phyllophaga spp* por lo que es necesario llevar a cabo procesos de selección de aislamientos (Coto, 1993).

Las larvas de *Phyllophaga spp.* han evolucionado en un ambiente en que constantemente están en contacto con una gran variedad de microorganismos. Incluyendo hongos entomopatógenos, por lo que han desarrollado resistencia contra la mayoría de ellos, haciendo que las cepas patogénicas de alta virulencia sean poco comunes. Algunos mecanismos de defensa contra la infección por hongos son fácilmente identificables en el campo. El caso más claro es la acumulación de quitina, formando manchas café oscuro alrededor de los puntos de la cutícula por donde se ha iniciado la penetración del patógeno o la encapsulación del microorganismo cuando ya ha penetrado, formando gránulos pardos o negruzcos en el cuerpo graso de la larva.

Todas las especies de *Beauveria spp.* producen abundante micelio blanco sobre el cadáver, en algunos casos extendiéndose a varios centímetros de la larva, produciendo masas de conidios blancos o blanco cremoso. *Metarhizium spp.* produce micelio blanco o amarillo y columnas de conidias verdes que se unen formando típicos bloques muy compactos. Pese a ser un hongo muy abundante en el suelo, las cepas con buena actividad contra *Phyllophaga spp.* son escasas.

2.4.2.4 Otros microorganismos de control de *Phyllophaga* spp.

Nemátodos de las familias *Heterorabditidae* y *Steinernematidae* portan bacterias que son liberadas dentro del hospedante. La multiplicación de estas bacterias, causa la muerte del insecto y a la vez le permite al nematodo completar su ciclo de vida generando nuevos estadios juveniles que saldrán en busca de nuevas presas. Una ventaja de los nematodos es su movilidad, que se traduce en capacidad para buscar las larvas de *Phyllophaga* en el suelo. Existen métodos de producción masiva y formulación de estos organismos que ha permitido la generación de productos comerciales para otras plagas. Pese a que hay resultados promisorios contra *Phyllophaga* a nivel de laboratorio, su uso en campo tiene limitaciones biológicas y técnicas que deben superarse.

Algunos protozoarios, específicamente de los grupos Microsporidia, Eucoccidiida, Neogregarinida y algunos Eugregarinida, son comúnmente encontrados parasitando larvas de *Phyllophaga* spp. Sin embargo, se conoce poco sobre su ciclo de vida y su verdadero rol en el control de poblaciones de esta plaga.

Se han encontrado algunas Rickettsias, principalmente de la especie *Rickettsiella popilliae*, causando enfermedades letales en varias especies de escarabeidos. La infección es por ingestión y la muerte puede tardar hasta seis meses en alcanzarse. Pese a que se cree que tienen un papel importante en la dinámica de poblaciones de este grupo de insectos, su uso comercial es incierto debido a que su producción debe hacerse en células vivas y por el peligro que representan por su condición de patógenos potenciales de vertebrados (Shannon, 1996)

El control biológico es posiblemente la herramienta de más perspectiva dentro del manejo integrado de plagas, dadas las ventajas comparativas que ofrece sobre otros métodos como el control químico, al minimizar los riesgos ambientales asociados a los plaguicidas. Aunque se cuenta con algunos ejemplos exitosos, en el Estado de Jalisco se presentan fallas en la implementación de programas de control biológico, principalmente debido a las carencias de conocimientos teóricos y prácticos de las técnicas y los organismos comúnmente utilizados.

2.4.3 Manejo Integrado de Plagas (MIP)

El manejo integrado de plagas consiste en mantener a niveles tolerables los agentes destructores (patógenos, insectos y malezas), mediante el uso planificado de tácticas y estrategias preventivas, supresoras o reguladoras que sean ecológica y económicamente eficientes (Luna, 1998).

Está implícito el hecho de que las acciones que se tomen estén completamente integradas en el proceso total del manejo del cultivo (tanto en la planeación como en la plantación). Por lo tanto el manejo de plagas debe ajustarse como mínimo a un ciclo del cultivo y a un lapso mayor cuando así lo requiera la perspectiva de planificación del cultivo. Los conceptos del MIP están estrechamente ligados a una gran cantidad de relaciones fundamentales entre fitopatógenos, insectos fitófagos, los hospedantes vegetales de éstos, las características del sitio en el cual se cultiva la planta y las prácticas de manejo del cultivo (Luna, 1998).

El Manejo Integrado de Plagas es, simplemente definido como “el uso inteligente de todos los recursos disponibles para bajar las poblaciones de plagas debajo del umbral económico”.

2.5 Enfermedades

Se considera de manera general, que las enfermedades pueden ser causadas por dos tipos de factores: Bióticos y Abióticos, los cuales a su vez incluyen numerosas causas que producen alteraciones en los procesos fisiológicos de utilización de energía, que da por resultado un desequilibrio en todas las demás funciones vitales de las plantas. Estas alteraciones se manifiestan externamente en forma de cambios morfológicos llamados síntomas (Mendoza y Pinto, 1985).

Las enfermedades más importantes en las plantas cultivadas, son precisamente las causadas por los agentes bióticos, y resultan de la interacción de tres factores: un organismo vivo (el patógeno), la planta huésped y el ambiente, si uno de estos factores no se presenta o está presente, pero en condiciones inadecuadas, la enfermedad no se desarrollará (Mendoza y Pinto, 1985).

2.5.1 Factores medioambientales en el desarrollo de la enfermedad

El desarrollo de cualquier enfermedad está fuertemente influenciado por factores medioambientales, además de la condición del hospedero. En el caso específico de la Marchitez del agave, se desconoce cuales son los factores que predisponen ó disparan el desarrollo de la misma, así como el avance o dispersión que muestra entre plantas a nivel parcela. Cuando una planta se infecta o enferma solo se puede identificar por los síntomas que presenta:

- a) Cambio de coloración de un verde azul a uno más pálido hasta llegar gradualmente a un verde amarillo.
- b) Enrollamiento gradual de las hojas o pencas; este síntoma se inicia apicalmente y baja gradualmente hasta que toda la hoja se enrolla: a esto se le llama "acigarramiento" de las hojas.
- c) En forma simultánea al enrollamiento se presenta una marchitez de la hoja, la cual se muestra como un arrugamiento del tejido en forma paralela a la nervadura central; de aquí el nombre de la enfermedad. Esta marchitez permanece hasta la muerte de la planta.
- d) En algunos casos ocurre una descomposición acuosa del tejido del cogollo de la planta desintegrándolo totalmente, proviniendo de aquí el otro nombre de "Putridión del cogollo" con el cual muchos productores reconocen a la enfermedad (Ireta *et al.*, 2002).

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 (Virgen, 1998).

Las especies del género *Fusarium oxysporum* son altamente variables por su composición genética y por los cambios en el ambiente en el que crece y son causa de cambios morfológicos (Virgen, 1998).

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 organismos que dañan las raíces (CRT, 2001).

2.5.1.1 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 oxysporum* (Virgen, 1998,).

Bernal y López (2001), reportan 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.

2.5.1.2 Humedad

Fusarium oxysporum 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, citado por Guillen, 2003).

2.5.1.3 Temperatura

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

2.6 Marchitez del agave causado por *Fusarium oxysporum*

A principios de los años noventa varias plantaciones de agave tequilero en Jalisco fueron sumamente afectadas por a la enfermedad "Marchitez del agave", que ataca sin importar la etapa de desarrollo; iniciándose con la palidez y oscurecimiento de las hojas donde emerge el cogollo; después afecta la cabeza o parte reproductora que adquiere un color rojizo, las raíces se vuelven frágiles y en consecuencia no soportan el crecimiento y peso de la cabeza (Castañeda, 2002).

Las características del hongo causante de la pudrición del tallo de *agave tequilana* Weber, corresponden a *Fusarium oxysporum* según Boot, 1977, Ahmed, 1993, Smith *et al.*, 1992, Aredn, 1986 y Romero, 1988, citados por Luna, 1998. Causa una pudrición de raíz, rizomas y tallo debido a que el hongo taponea el xilema con el ácido fusárico y la toxina lycomarasmina, producto de su metabolismo. Estas pudriciones causan retraso en el crecimiento de la planta por la pérdida de área foliar, pero cuando la severidad de la enfermedad es muy alta, ocasiona la muerte de las plantas (Luna, 1998).

2.6.1 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 por tres a cinco células, gradualmente puntiagudas y curvadas hacia el final; estas esporas son comúnmente encontradas sobre la superficie de plantas muertas a causa de este patógeno. Las clamidosporas son redondas, esporas gruesas, de pared celular gruesa, producidas en cualquier forma, ya sea terminal o intercaladamente sobre micelio viejo o en macroconidias. Estas esporas pueden ser de una o dos células (Agrios, 1998 citado por Luna, 1998).

En el medio de cultivo papa-dextrosa-agar (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 forma especial del hongo. Si los esporodocios son abundantes, el cultivo puede aparecer en color crema o naranja (Fuskey, 2000).

2.6.2 Ciclo Biológico de *Fusarium oxysporum*

Hongo abundante y saprofítico activo en suelos y materia orgánica con capacidad para sobrevivir en el suelo entre ciclos de siembra infectando los restos de las plantas. Está caracterizado en su ciclo de vida por diferentes fases:

Fase I (determinativa primaria), expresada por el éxito o fracaso del patógeno en penetrar el tejido externo del hospedero.

Fase II (determinativa secundaria), expresada por el éxito o falla de la colonización del sistema vascular del hospedero.

Fase expresiva, durante la cual ocurre el desarrollo de síntomas del hospedero por el patógeno.

Senescencia o muerte del tejido hospedero por el patógeno. El crecimiento del hongo dentro del tejido vascular de la planta produce 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 disseminación.

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 estructuras de resistencia por crecimiento saprofitico, sobre restos orgánicos y exudados de raíces.

Renovación de estructuras de resistencia por infecciones ocasionadas en raíces de hospederos y no hospederos (Virgen, 1998).

2.6.3 Sintomatología de *Fusarium oxysporum*

Comienza cuando las raíces de la planta sensible se ponen en contacto con hifas desarrolladas a partir de clamidosporas y demás propágulos infectivos. Ahí el hongo penetra por aberturas naturales, heridas causadas mecánicamente, o por vía directa en tejidos tiernos, una vez dentro invade las células y empieza a causar marchitez; posteriormente crece hacia la región del xilema desarrollándose en las traqueidas y los vasos, para invadir el parenquima, donde segrega enzimas pectolíticas que destruyen parcialmente al xilema, vasos leñosos y traqueadas; a la vez de segregar también ácido fusárico que lo taponean. Por último produce esporas para nuevamente continuar el ciclo (Roberts y Boothroyd, 1972, citados por Luna, 1998).

El inicio de la enfermedad se favorece con elevada humedad y alta temperatura del suelo, mismas que son necesarias para la germinación de las esporas y el subsiguiente crecimiento del micelio (Roberts y Boothroyd, 1972, citados por Luna, 1998).

El potencial de daño que tiene esta enfermedad se puede notar en la sintomatología y daños determinados en campo. En la parte aérea y por ende visibles directamente, se observa una decoloración progresiva de las hojas, alcanzando una clorosis y amarillamiento, que se combina con una marchites y enroscamiento de las hojas. Después aparecen manchas negras que al pasar el tiempo se convierten en lesiones necróticas que aumentan en la superficie de la hoja coalesciendo en áreas de pudrición mayores; sin embargo éstos síntomas dentro del período de incubación de la enfermedad corresponden a la etapa final de la enfermedad seguida por la muerte del hospedante y la renovación de estructuras del patógeno; varios autores coinciden en que *Fusarium* puede germinar a concentraciones de glucosa de tan solo 0.04 mg de carbono por espora y por la presencia de raíces a través de quimiotaxis. En etapas iniciales al realizar un corte transversal del tejido vascular se observa una coloración café. Todo lo anterior como consecuencia del ataque del hongo en la raíz y tallo de *agave tequilana* Weber (Luna, 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).

Causante de esta enfermedad lo es *Fusarium oxysporum*, y determinados factores que auspician el desarrollo de este patógeno en un gran número de cultivos son: pH, temperatura, nivel de humedad en el suelo y la presencia de otros organismos que dañan las raíces (nematodos, insectos, otros), la fertilización (especialmente la nitrogenada), entre otros (C.R.T., 2001).

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. En el agave, la fuente de inóculo se encuentra en el suelo penetrando las raíces jóvenes o por las heridas producidas en las raíces ocultas; crece en los tejidos 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 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, ésta avanza hacia la piña (muerte ascendente) provocando un desprendimiento fácil de la planta.

2.6.4 Sobrevivencia de *Fusarium oxysporum*

Este patógeno 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; entre ellas, humedad en el suelo, comportamiento saprofitico 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 chinesis* (Virgen, 1998).

2.7 Métodos de control de la enfermedad

Una gama de factores favorecen el desarrollo y diseminación de este patógeno cuando no existe un manejo adecuado en el cultivo de *agave tequilana*, de tal forma que se deben implementar métodos de control.

2.7.1 Control genético

Es el método que debe estar sustentado en la tolerancia o resistencia genética de las plantas (García y Vázquez, 2002, citados por Guillén, 2003).

2.7.2 Control cultural

Es aquel cuyas prácticas normales y adecuadas del cultivo permiten ser utilizadas para reducir la incidencia de la enfermedad y éstas pueden ser muy variadas; las más usadas por su eficacia son las aplicaciones de residuos de cosecha y modificadores orgánicos (García y Vázquez, 2002, citados por Guillén, 2003).

2.7.3 Control químico

Soportado en la aplicación de agroquímicos para controlar enfermedades, con una gran limitante debido al impacto que origina: toxicidad al hombre y demás organismos, contaminación de mantos freáticos, resistencia mutagénica de ciertos patógenos, además de incrementar los costos del cultivo (Virgen, 2000).

El control químico se dirigió durante muchas décadas al control de los hongos, por lo que comúnmente se maneja el término fungicida para referirse a los productos químicos que controlan enfermedades en las plantas (García y Vázquez, 2002, citados por Guillén, 2003).

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

2.7.4 Control Biológico

Es un área de investigación relativamente nueva y promete ser una de las formas más aceptables en el control de las enfermedades de las plantas, debido al poco desequilibrio ecológico que ocasiona y representa una amplia posibilidad para adoptarse en programas de manejo integrado, ya que busca la reducción de inóculo o actividad productora de enfermedad (Cook, 1995).

En parte está sustentado en el uso de microorganismos que pueden ser antagónicos, parásitos o que producen antibiosis sobre el patógeno. Frecuentemente se asocia la promoción del crecimiento de la planta a Rizobacterias Promotoras de Crecimiento

(PGPR) por sus siglas en inglés, que son también capaces de proteger a las plantas contra el ataque de fitopatógenos (Jiménez *et al.*, 2001).

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. La resistencia genética de las plantas hospederas es una alternativa que se ha incrementado en los últimos 65 años, principalmente con el uso de microorganismos de la rizósfera, dado que ellos constituyen la línea frontal de defensa entre los fitopatógenos nativos del suelo y las raíces de las plantas, siendo candidatos ideales de usarse en la reducción de enfermedades (Schmidt, 1990, citado por Guillén, 2003). Un manejo integrado de la enfermedad puede disminuir el daño causado por el patógeno; considerando a *Bacillus subtilis* como un organismo que tiene significancia en la reducción de la enfermedad (Virgen, 2000)

Es importante buscar el biocontrolador específico en el medio natural de los cultivos o agrosistemas así como 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 los ecosistemas y que puede afectar tanto plantas como microorganismos autóctonos (Garcés, 2000).

Distintos 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 (Arias *et al.*, 2001)

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. 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 la promoción de crecimiento de la planta, como el control biológico de enfermedades (Virgen, 2000).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación de la parcela experimental

3.1.1 Estudio de campo

El lote experimental se ubicó en el predio “El salitre” del poblado El Salitre municipio de Ameca, Jal. El lote se encuentra aproximadamente sobre el Km 63 de la carretera Guadalajara–Ameca (Figura 1). El lote presentaba una plantación de agave de seis meses y se encontraba en etapa de crecimiento con un número promedio de 10 hojas. Las condiciones del cultivo (aparición, vigor, uniformidad) fueron en términos generales buenos y normales para la zona.

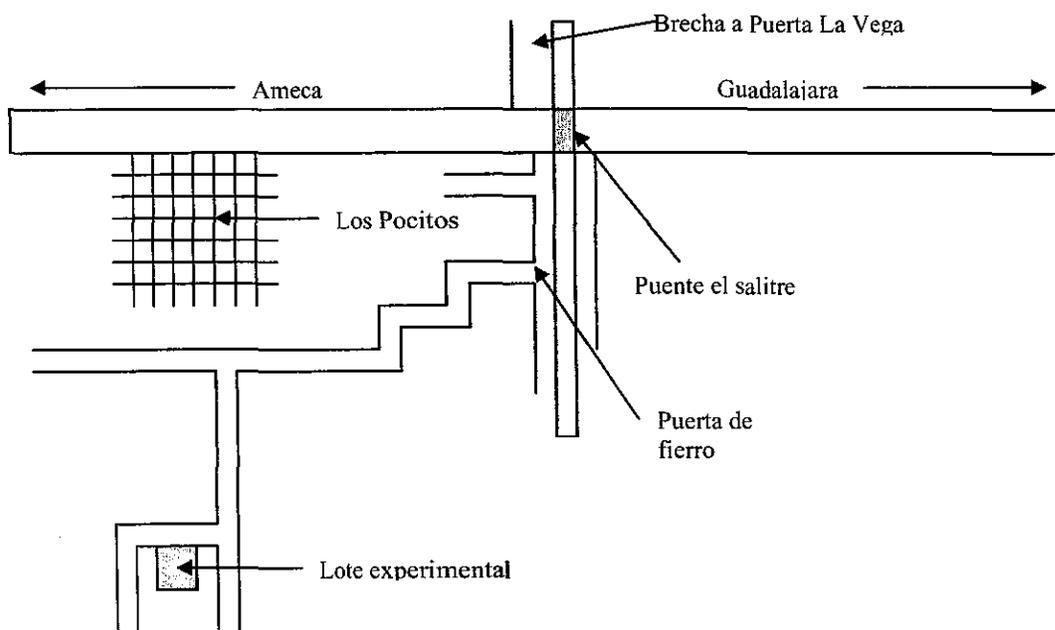


Figura 1. Ubicación del lote experimental para el estudio en el cultivo del Agave. Ameca, Jalisco, México. CUCBA, Universidad de Guadalajara.

3.1.2 Construcción del Gradiente de infestación bajo condición de campo

Se realizó una aplicación de dosis diferenciales de insecticidas (Cuadro 2) el 28 de Julio en plantas con seis meses desde el transplante, cuando se inició el periodo de lluvias y se había detectado una población promedio de siete larvas de primer instar por cepellón de 30 x 30 x 30 centímetros con una planta.

La aplicación se realizó por la tarde, sin viento, con una bomba motorizada marca Swissmex y utilizando una boquilla cónica TX8 floja para facilitar la aplicación a chorro. La aplicación se realizó sobre el suelo en círculo aproximadamente a 5 cm de la base de la planta. El gasto de agua fue en la proporción de 450 litros/hectárea.

Estas aplicaciones se hicieron sobre un diseño de bloques completos al azar, con cinco tratamientos y cuatro bloques (Cuadro 1). El tamaño de la parcela experimental fue de 4 surcos de 10 metros de largo que correspondieron a 120 m², tomándose como parcela útil los 8 metros centrales de los cuatro surcos (96 m²). Un día antes y a los 30, 60 y 90 días después de la aplicación, se determinaron el número de larvas vivas existentes por cepellón de 30 x 30 x 30 cm en 5 plantas dentro de cada parcela. Se recolectaron todas las larvas vivas del muestreo previo y se llevaron al laboratorio para la identificación del género. El efecto diferencial de las dosis crecientes de insecticida permitió construir un gradiente de infestación natural de larvas de gallina ciega.

B I	4	2	1	3	5
B II	2	4	5	1	3
B III	3	5	2	4	1
B IV	1	3	5	2	4

Cuadro 1. Distribución de tratamientos en campo

Tratamientos	Dosis gr ia*/ha	Dosis kg pf*/ha
1.- Insecticida** dosis 1	750	1.0
2.- Insecticida dosis 2	1125	1.5
3.- Insecticida dosis 3	1500	2.0
4.- Insecticida dosis 4	2250	3.0
5.- Testigo Sin insecticida	----	----

Cuadro 2. Dosis utilizadas para establecer el gradiente de infestación de gallina ciega *Phyllophaga* spp. en el cultivo del Agave. Ameca, Jalisco, México. CUCBA, Universidad de Guadalajara. ia = Ingrediente activo; ** = clorpirifos 75 WG; pf = Producto formulado

3.2 Variables en estudio

3.2.1 Daño en raíz. Se evaluó tomando 5 plantas por parcela y se determinó el daño en la raíz utilizando la escala de daño (Cuadro 3). Solamente se realizó por única ocasión durante el estudio, a los 90 días después de la aplicación.

VALOR PUNTUAL	VALOR PORCENTUAL	EFEECTO EN LA RAIZ
1	0.0	Raíz sana
2	0.1 - 20.0	1 al 20% de raíces con signos de daño
3	20.1 - 40.0	20 al 40% de raíces con daño
4	40.1 - 60.0	40 al 60% de raíces dañadas o destruidos
5	60.1 - 80.0	60 al 80% con raíces dañadas o destruidos
6	80.0 - 100.0	80 al 100% de la masa radicular destruida

Cuadro 3. Escala arbitraria para calificar daño en la raíz por gallina ciega en el cultivo del Agave. Ameca, Jalisco, México. CUCBA, Universidad de Guadalajara.

3.2.2. Daño por *Fusarium oysporum*. El daño de *Fusarium* al agave se pudo determinar mediante dos procedimientos distintos: Determinación visual de síntomas y detección de propágulos en laboratorio, también por una sola ocasión, a los 90 días después de la aplicación:

Determinación visual de síntomas. La presencia de síntomas externos incipientes se estudió sobre 5 plantas tomadas al azar dentro de la parcela experimental, para lo cual se utilizó la escala propuesta por Martínez* (1999) que se presenta en el Cuadro 4.

VALOR	EFEECTO EN LA PLANTA
1	Planta sana
2	De una a cinco hojas externas con encarrujamiento ligero
3	De seis a diez hojas externas con encarrujamiento
4	Plantas con más de diez hojas con encarrujamiento acentuado
5	Planta muerta, fácil de desprender del suelo

Cuadro 4. Escala utilizada para evaluar visualmente el daño en la planta en el cultivo del Agave. Ameca, Jalisco, México. CUCBA, Universidad de Guadalajara.

b. Detección de propágulos en laboratorio. Se determinó la presencia de *Fusarium oxysporum* colocando 5 segmentos de raíces en cajas *petri* con medio de cultivo L-sorbosa, para esperar la germinación de propágulos. Una vez incubadas a 25 °C por 3 días y usando un microscopio compuesto, se identificó y contabilizó cada segmento con germinación de *Fusarium*, utilizando la tinción con azul de metileno..

3.2.3 Peso de la planta.

Se tomaron cinco plantas por parcela, las cuales fueron cortadas y pesadas para determinar el peso promedio por planta como un indicativo del efecto combinado del daño de "gallina ciega" y la incidencia de *Fusarium oxysporum*.

3.3 Análisis estadístico

Antes de realizar el análisis de varianza se aplicó la prueba de Bartlett para corroborar la homogeneidad de las varianzas. En aquellas variables en las que se detectó la no homogeneidad de varianzas ($P < 0.05$), se aplicó la transformación de raíz cuadrada, sugerida por Snedecor y Cochran (1984).

La variable denominada larvas vivas en las mediciones previa y posteriores a la aplicación, requirió la transformación de raíz cuadrada. La comparación entre las medias se realizó mediante la prueba de Tukey, utilizando el nivel de $\alpha = 0.05$.

Los datos originales del daño de gallina ciega en raíz, de la determinación visual de síntomas de *Fusarium* y de la germinación de propágulos de *Fusarium* no requirieron transformación por lo que fueron directamente utilizados en el análisis de varianza y la separación de medias con la prueba de Tukey con un nivel de error de 5%.

Los datos originales y transformados del peso de plantas también fueron sometidos al análisis de varianza y la separación de medias con la prueba de Tukey.

Para la construcción de modelos cuantitativos se realizó un análisis de regresión para las variables daño a la raíz y la manifestación de propágulos de *Fusarium oxysporum*; así como, la regresión para el número de larvas y la aparición de propágulos de *Fusarium*.

3.4 Estudio de Vivero

3.4.1 Sitio de estudio

El estudio se desarrolló en el Vivero del Departamento de Producción Agrícola del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA), de la Universidad de Guadalajara, durante el período de agosto del año 2001 a marzo del año 2003.

3.4.1.1 Colecta de *Phyllophaga* spp.

Una gran cantidad de larvas de *Phyllophaga* spp fueron colectadas durante el ciclo agrícola primavera-verano 2001 de la propia parcela experimental en campo. Larvas de 2° instar de tamaño homogéneo fueron seleccionadas para la ingestación artificial a las macetas correspondientes.

3.4.1.2 Preparación del experimento

Se seleccionaron 48 plantas de agave sanas de una propagación *in vitro* de 6 meses de edad que se transplantaron en suelo de la misma parcela de campo. El suelo fue previamente esterilizado en una autoclave a 120° C, durante 35 minutos. Las raíces de las plantas fueron lavadas con agua destilada, sumergidas durante 15 segundos en solución de hipoclorito de sodio al 2% y se lavaron nuevamente con agua destilada para retirar residuos. Cada planta fue transplantada en bolsa negra tipo vivero con 3 kilos de suelo esterilizado. Ya preparadas las macetas se procedió a distribuir las larvas de *Phyllophaga* spp., en los respectivos tratamientos.

3.4.1.3 Inoculación

Se aplicó el inóculo de *Fusarium oxysporum* en las macetas correspondientes con 10 ml por planta, a una concentración de 341.75 millones de propágulos del patógeno por ml. La inoculación se hizo al suelo usando una jeringa para hacer llegar lo más cerca posible el inóculo a la base y a la raíz de las plantas.

3.4. Variables en estudio

3.4.2.1 Daño a la raíz

Se determinó el daño a la raíz utilizando la escala que se presenta en el Cuadro 3. En una sola ocasión (abril 4 - 2002) a los 240 días después de la infestación (Agosto 2 - 2001). Asimismo, de la zona radicular se tomaron muestras de raíces, las cuales fueron procesadas en el laboratorio.

3.4.2.2 Presencia de *Fusarium oxysporum*

Se determinó la presencia de propágulos en la raíz colocando 5 segmentos (de raíces aún adheridas a la planta) en cajas petri con medio de cultivo L-sorbosa. Una vez incubados a 25 °C por 5 días y usando la tinción de metileno se identificó y contabilizó cada segmento con germinación de *Fusarium oxysporum*.

3.4.2.3 Determinación de azúcares

Para tal efecto se cortaron trozos de tejido fresco de la incipiente "piña", se congelaron en forma inmediata a -10 °C, para luego determinar la cantidad de azúcares totales con la ayuda de un espectrofotometro marca Spectronic modelo 4001/4 a 620 nm.

La determinación de azúcares en tejido fresco se llevó a cabo con el método descrito por Carnal y Black (1989). A un gramo de tejido homogenizado, con la ayuda de un politrón Glas-Col, se le añadieron 5 ml de etanol (80%) y se colocó en baño maría a 75 °C por cinco minutos. Posteriormente se centrifugó a 12,000 g durante cinco minutos. Se colectó el sobrenadante. El paso anterior se repitió y se colectó un segundo sobrenadante que se combinó con el primero y se centrifugó a 27,000 g por 20 minutos. Se colectó el sobrenadante y se llevó a un volumen de 25 ml con etanol (80%). El contenido de azúcares totales se determinó mediante el método de Dubois *et al.*, (1956). Se tomó una alícuota de 0.1 ml del sobrenadante aforado, se añadieron 2 ml de antrona (disuelta en H₂SO₄ concentrado). Se agitó en vortex (Maxi-Mix II, Thermolyne) hasta mezclar la muestra con la antrona. Los tubos fueron colocados en un termo-baño (Felisa, modelo 370) a 80 °C, durante 10 minutos y dejándolos enfriar durante 2 minutos. Se preparó un blanco de calibración, utilizando agua bidestilada, en

sustitución de la muestra, añadiéndole la misma cantidad de antrona y aplicando la subsiguiente metodología empleada para la muestra en proceso; inmediatamente después se registró la absorbancia.

El cálculo de la concentración de azúcares totales en tejido se obtuvo mediante la siguiente ecuación: $\text{Absorbancia} + 0.00547 / 107.628) \times 25 / \text{alícuota} = \text{mg/g de glucosa}$.

3.4.3 Análisis estadístico

El estudio se estableció sobre un diseño factorial 3 x 2 con cuatro repeticiones según el esquema siguiente:

Factor A (No de larvas/maceta) Nivel 1= cero larvas, Nivel 2= 2 larvas y Nivel 3= 7 larvas

Factor B (Inoculo con *Fusarium oxysporum*) Nivel 1= Sin inoculo y Nivel 2= Con inoculo

Los datos fueron sometidos al análisis de varianza correspondiente y la comparación de medias con la prueba múltiple de Tukey, $P < 0.05$. Se elaboraron gráficos para seleccionar modelos entre las variables que presentaron correlación significativa.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Especies evaluadas

Se encontró un promedio general de 7.05 larvas por planta antes de realizar la aplicación de las dosis de insecticidas. En la población se encontró una predominancia del 98% del género *Phyllophaga* y un 2% del género *Anomala*

4.2 Muestreo previo a la aplicación. No se encontró diferencia significativa entre tratamientos en el análisis de los valores originales de larvas de primer instar del género *Phyllophaga*. El promedio general de larvas por planta fue de 7.05, el cual fue considerado como una población alta, uniformemente distribuída y adecuada para iniciar el estudio (Cuadro 5).

Tratamientos	Dosis gr. i.a./ha	Medias originales ± Desv. Est.	Tukey 0.05
Testigo absoluto 1	0	35.50 ± 5.32	a
Insecticida dosis 2	750	34.25 ± 6.13	a
Insecticida dosis 3	1125	34.25 ± 4.78	a
Insecticida dosis 4	1500	36.00 ± 4.24	a
Insecticida dosis 5	2250	36.75 ± 3.59	a
		C.V. = 15.34	Media General = 7.05

Cuadro 5. Promedio de larvas vivas en el muestreo previo de *Phyllophaga* spp. en cinco plantas en el cultivo del Agave. Ameca, Jalisco, México. CUCBA, Universidad de Guadalajara

4.3 Gradiente de infestación.

El análisis estadístico de los datos obtenidos en los conteos de larvas de *Phyllophaga* spp., después de la aplicación muestra que todos los tratamientos con insecticida fueron estadísticamente diferentes al testigo absoluto en el cual se encontraron en promedio 39.5 larvas por cada 15 plantas. El análisis de los resultados indica que las dosis de 2250 y 1500 gr ia/ha, produjeron una sobrevivencia de solamente 4.0 y 5.75 larvas en 15 plantas, respectivamente. Los tratamientos con 750 y 1125 gr ia/ha resultaron con un número de larvas mayor (14.25 y 8.5 larvas por 15 plantas, respectivamente) (Cuadro 6).

Tratamientos	Dosis gr. i.a./ha	Gradiente Resultante Medias originales \pm Desv. Stand.	Medias Transf. * \pm Desv. Stand.
Testigo absoluto 1	0	39.50 \pm 5.5 ** a	7,27 \pm 0,44 ** a
Insecticida dosis 2	750	14.25 \pm 2.8 ** b	4,76 \pm 0,37 ** b
Insecticida dosis 3	1125	8.50 \pm 1.7 ** bc	3,90 \pm 0,31 ** c
Insecticida dosis 4	1500	5.75 \pm 1.2 ** c	3,38 \pm 0,27 ** cd
Insecticida dosis 5	2250	4.00 \pm 2.8 ** c	2,91 \pm 0,66 ** d
		C.V. = 18.5 %	C. V.= 8.02 %

Cuadro 6. Promedio de larvas vivas (Suma total 30 60 90 DDA) de *Phyllophaga* spp. en 15 plantas en el cultivo del Agave, Ameca, Jalisco, México. CUCBA, Universidad de Guadalajara.

*Transformación de datos = raíz (x + 1); ** Tukey 0.05

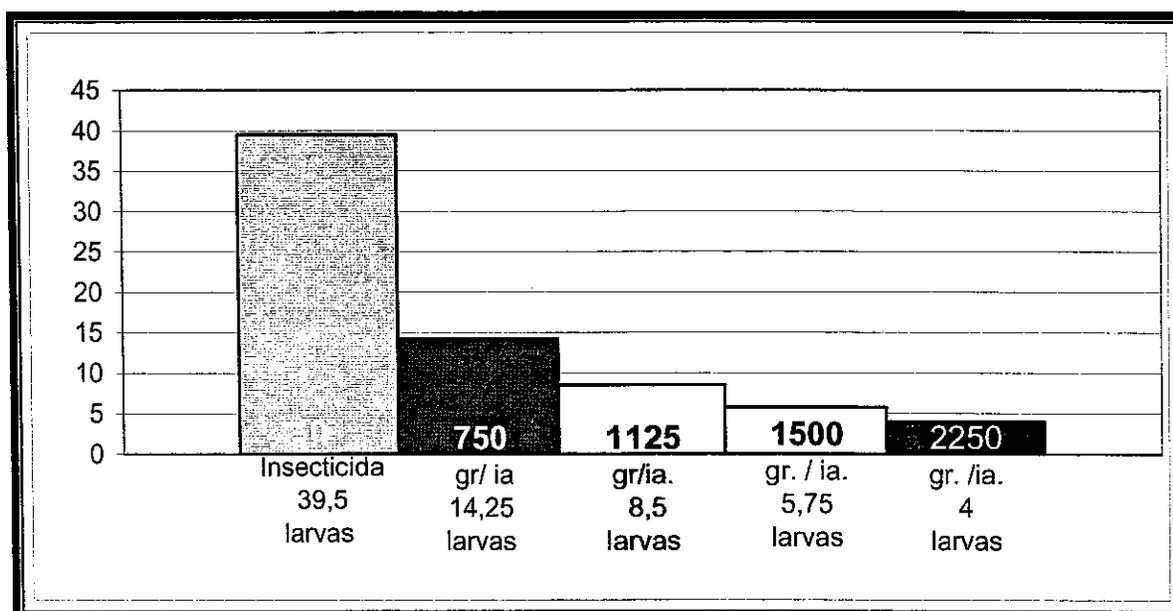


Figura 2. Fluctuación de *Phyllophaga* spp. en los 90 días que duró el estudio

Tratamientos	Dosis gr. i.a./ha	Medias originales \pm Desv. Stand.	Medias Transf. \pm Desv. Stand. *
Testigo absoluto 1	0	27,50 \pm 5,80 **c	6.22 \pm 0,56** d
Insecticida dosis 2	750	10,25 \pm 2,21** a	4.18 \pm 0,34** a
Insecticida dosis 3	1125	6,25 \pm 1,89 ** b	3.48 \pm 0,36** b
Insecticida dosis 4	1500	4,5 \pm 1,73 ** bc	3.08 \pm 0,45** bc
Insecticida dosis 5	2250	3 \pm 2,16 ** bc	2.64 \pm 0,61** cd
		C. V. = 24.77 %	C. V. = 9.29 %

Cuadro 7. Promedio de larvas vivas (30 DDA) de *Phyllophaga* spp en 5 plantas que establecieron el gradiente de infestación natural en la evaluación, en el cultivo del Agave, Ameca, Jalisco, México. CUCBA, Universidad de Guadalajara.

*Transformación de datos = raíz (x + 1). ** Tukey 0.05

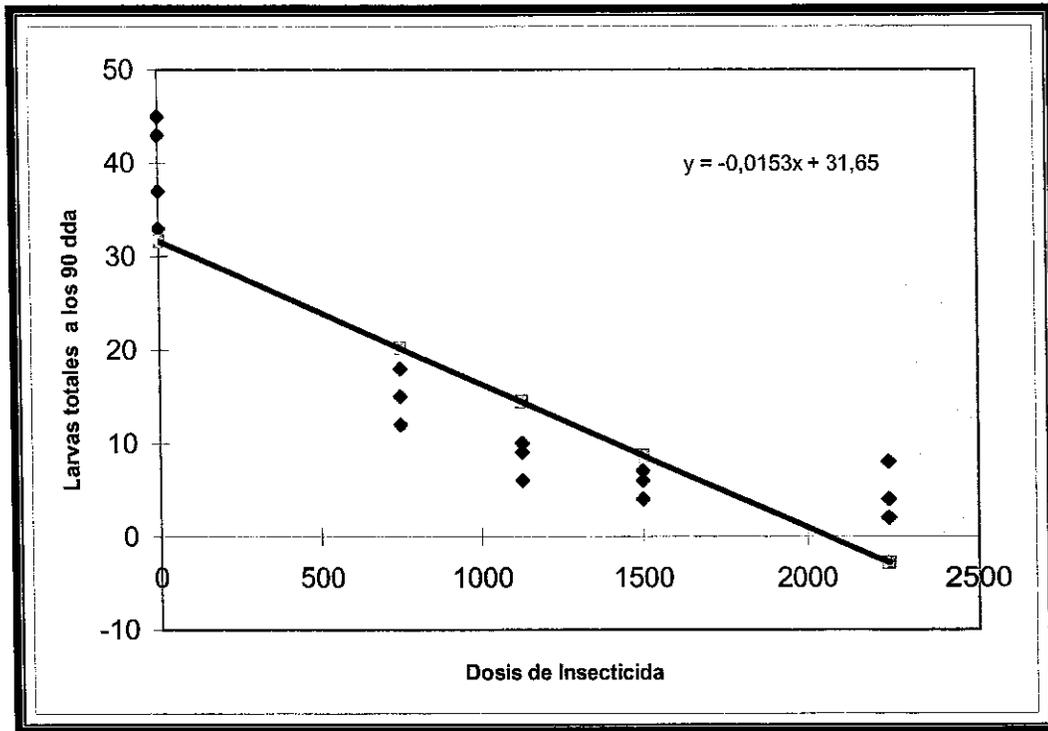


Figura 3. Relación entre las variables dosis de insecticida (x) y la suma de los 3 muestreos de larvas de *Phyllophaga* spp.(y).

El número de larvas y las dosis de insecticida muestran una relación inversamente proporcional, dada la disminución de larvas, conforme aumentan las dosis de insecticida (Figura 3). Esta prueba muestra el gradiente de disminución de larvas en función de la dosis de insecticida, que permitió evaluar los daños diferenciales en raíz por las larvas y su efecto en la presencia de propágulos de *F. oxysporum*

4.4 Daño a la raíz por “gallina ciega”.

Con el análisis estadístico de los valores puntuales del daño a la raíz, calificados mediante la aplicación de la escala que se presenta en el Cuadro 3, se detectó que todos los tratamientos con insecticida fueron diferentes al testigo absoluto, también se detectaron diferencias estadísticas significativas entre ellos, que en lo general refleja muy bien los efectos del número de larvas presente, de tal forma que se observó una correspondencia adecuada entre el número de larvas y los daños a la raíz observados.

Los tratamientos 1125 y 1500 g ia/ha alcanzaron valores promedio mas altos (1.70 y 1.75, respectivamente) que corresponden al 14 y 15% de daño en la raíz, valor que solamente fue superado por la dosis 750 g ia/ha, que correspondió un daño del 19%,

en tanto que el testigo absoluto alcanzó un valor promedio de 2.8, que correspondió a un 36% del daño a la raíz. (Cuadro 8).

Tratamientos	Dosis gr. i.a./ha	Valor puntual* ± Desv. Est.	Tukey 0.05	Porcentaje de raíz Dañada
Testigo absoluto 1	0	2,8 ± 0,76	c	36 % de la masa radicular
Insecticida dosis 2	750	1,95 ± 0,75	a	19 % de daño en raíz
Insecticida dosis 3	1125	1,70 ± 0,73	b	14 % de daño en raíz
Insecticida dosis 4	1500	1,75 ± 0,71	b	15 % de daño en raíz
Insecticida dosis 5	2250	1,45 ± 0,68	bc	0% planta sana
		C.V. = 6.49 %		

Cuadro 8. Promedio de los valores puntuales y porcentuales del daño de gallina ciega en la raíz de 20 plantas en la evaluación en el cultivo del Agave, Ameca, Jalisco, México. CUCBA, Universidad de Guadalajara. * Promedio de 20 plantas

La Regresión entre el daño a la raíz y las dosis crecientes del insecticida presenta una relación inversamente proporcional, ya que el daño a la raíz por *Phyllophaga* spp., se ve reducido por el efecto de la aplicación de la dosis creciente de insecticida, a mayor concentración de ingrediente activo, mayor control, menor presencia de larvas y en consecuencia menor daño a la raíz. (Figura 4)

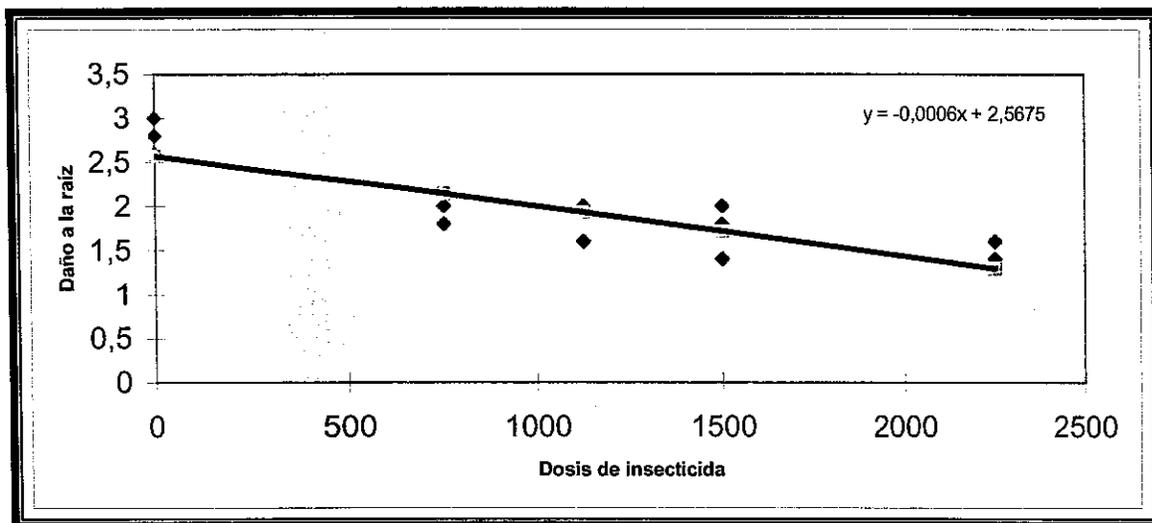


Figura 4. Relación entre las variables dosis crecientes del insecticida (x) y el daño a la raíz por *Phyllophaga* spp. (y)

4.5 Determinación de peso de plantas.

4.5.1 Peso de plantas.

No se observaron diferencias significativas entre tratamientos peso de plantas, sin embargo, con los valores absolutos obtenidos se puede apreciar una tendencia del peso a ser más alto conforme la dosis se incrementa. El peso es mayor invariablemente en los tratamientos con menor número de larvas a lo largo del experimento, a la vez de presentar un menor nivel de daño a la raíz al final del mismo. Sin embargo con este resultado, aún no se puede afirmar que el peso promedio de las plantas de agave tiene una relación inversamente proporcional a la población de larvas presentes ya que el tiempo de estudio fue muy corto y no se alcanzaron a reflejar los efectos plenamente (Cuadro 9).

Tratamientos	Dosis gr. i.a./ha	Peso en gr Datos originales ± D.E.	Datos transformados ± D.E.	Tukey 0.05
Testigo absoluto 1	0	1115 ± 207	34,27 ± 3,1	a
Insecticida dosis 2	750	1040 ± 184	33,15 ± 2,8	a
Insecticida dosis 3	1125	1182 ± 222	35,27 ± 3,2	a
Insecticida dosis 4	1500	1175 ± 151	35,22 ± 2,2	a
Insecticida dosis 5	2250	1300 ± 220	36,95 ± 3,0	a
		CV = 18.6 %	CV = 9.1	

Cuadro 9. Promedio de peso de 20 plantas en la evaluación en el cultivo del Agave. Ameca, Jalisco, México. CUCBA, Universidad de Guadalajara

4.6 Determinación visual de *Fusarium oxysporum* en la planta de agave

4.6.1 Síntomas visibles de *Fusarium oxysporum*. La incidencia natural de *Fusarium oxysporum*, en el experimento fue baja, sin embargo, se aprecia que todos los tratamientos, a excepción del tratamiento 1 (con mayor número de larvas) fueron diferentes al testigo absoluto. (Cuadro 10).

Los tratamientos de 1125, y 2250 gr de i.a./ha, fueron estadísticamente iguales entre sí con un valor promedio de 1.20 que corresponde a cuando mucho una sola hoja presentando el síntoma de encarrujamiento. En contraste un valor de 1.65 de los tratamientos de 750 g ia/ha y el testigo absoluto corresponde por lo menos a 4 hojas con el síntoma, según la escala (Cuadro 10).

Aparentemente, la presencia del síntoma en las hojas fue más visible en aquellos tratamientos con mayor número de larvas y donde se observaron mayores daños a la raíz. En los tratamientos en los que estas variables no se diferenciaron mucho, los síntomas de *Fusarium* en las hojas no fueron tan perceptibles. Los resultados sugieren que la presencia de larvas y daños en la raíz, si influye en la presencia natural de síntomas de *Fusarium* ("encarrujamiento" de hojas) ya que se magnificó en los tratamientos con pobre o ningún control de larvas. Los tratamientos que si produjeron mejores resultados para evitar una mayor presencia de síntomas visibles de *Fusarium* fueron 1125, 1500, 2250 gr de ia/ha.

Tratamientos	Dosis Gr. i.a./ha	Valor puntual ± Desv. Stand	Tukey 0.05	Porcentaje de raíz Dañada
Testigo absoluto 1	0	1.65 ± 0.74	a	36 % de la masa radicular
Insecticida dosis 2	750	1.65 ± 0.48	a	19 % de raíz dañada
Insecticida dosis 3	1125	1.20 ± 0.41	b	14 % de daños en raíz
Insecticida dosis 4	1500	1.25 ± 0.44	ab	15 % de daño a la raíz
Insecticida dosis 5	2250	1.20 ± 0.41	b	0
		CV = 13.71 %		

Cuadro 10. Valores puntuales de la evaluación visual de daño por *Fusarium* en 5 plantas en el cultivo de *Agave*. Ameca, Jalisco, México. CUCBA, Universidad de Guadalajara.

4.6.2 Determinación de la presencia de *Fusarium oxysporum* en raíz en medio de cultivo.

En la prueba de incubación de raíces en el medio de cultivo L-sorbosa, todos los tratamientos fueron estadísticamente diferentes al testigo absoluto en los conteos de germinación de propágulos de *F. oxysporum* en raíces, pero también se observan diferencias entre éstos. El tratamiento 2250 gr de ia/ha, mantuvo mas baja la presencia de *Fusarium* spp en raíces ya que solamente se encontraron 0.25 segmentos conteniendo al menos un propágulo germinado por cada 20 segmentos sembrados.

Con un mayor número de raíces con propágulos germinados (1.00, 1.25, 1.75 y 3.50) lo presentaron los tratamientos de: 0 (testigo absoluto), 1125, 1500 y 750 gr de i.a./ha.

Con estos resultados se ratifica lo que se había observado en la evaluación visual de daño por *Fusarium o.* advirtiéndose que hay asociación entre el número de larvas

encontradas en cada tratamiento y la incidencia de *F. oxysporum* (Cuadro 11). Se aprecia también una clara relación entre el número de larvas encontradas en cada tratamiento y la incidencia de propágulos de *Fusarium spp.* (Figura 5).

Tratamientos	Medias originales* ± D.E.	Medias transformadas** ± Desv. Estand.	Tukey 0.05
Testigo absoluto 1	3,50 ± 0,57	2,86 ± 0,15	c
Insecticida dosis 2	1,75 ± 0,50	2,31 ± 0,20	a
Insecticida dosis 3	1,00 ± 0,81	1,85 ± 0,60	b
Insecticida dosis 4	1,25 ± 0,50	2,10 ± 0,20	bc
Insecticida dosis 5	0,25 ± 0,50	1,25 ± 0,50	bc
	CV = 40.38 %	CV = 0.9439 %	

Cuadro 11. Promedio de segmentos de raíces con germinación de al menos un propágulo de *Fusarium oxysporum* en la evaluación en el cultivo del Agave. Ameca, Jalisco, México. CUCBA, Universidad de Guadalajara. * Promedio de 20 segmentos **Transformación de datos = raíz (x + 1)

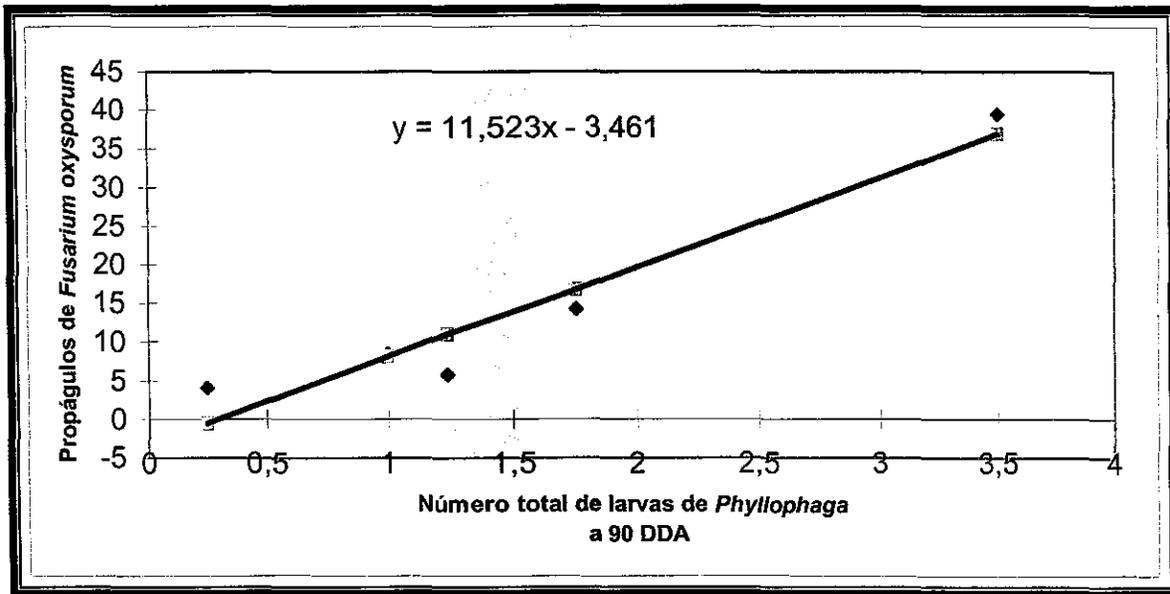


Figura 5. Relación entre las variables número de larvas (x) y propágulos de *Fusarium* (y)

La Regresión entre el número de larvas y la presencia de propágulos de *Fusarium* muestran una relación positiva, ya que a medida que *Phyllophaga* aumenta su número de larvas, estas impactan en una mayor cantidad de propágulos de *Fusarium oxysporum* en las raíces, (Figura 5)

4.7 Resultados en vivero

4.7.1 Daño a la raíz

El análisis estadístico de la variable daño a la raíz y aplicando la escala (Cuadro 3) mostró que los tratamientos con 0, 2 y 7 larvas presentaron diferencias estadísticas significativas, observándose mayor daño en el tratamiento con mayor presencia de larvas de *Phyllophaga* (7 larvas) y encontrando un daño menor a la raíz en el tratamiento con 0 larvas. (Cuadro 12)

Tratamientos	Valor puntual* ± Desv. Est.	Tukey 0.05	Porcentaje de raíz Dañada	Efecto en la raíz
7 larvas	2,75 ± 0.22	a	35 %	Raíces con mordeduras de hasta 2.5 cm
2 larvas	2.49 ± 0,26	b	20 %	Cicatrices alimentarias visibles
0 larvas	2.24 ± 0.27	c	15 %	Cicatrices alimentarias visibles
	C.V. = 9.23 %			

Cuadro 12. Valores puntuales y porcentaje de daño a la raíz en el estudio de vivero, CUCBA, Universidad de Guadalajara.

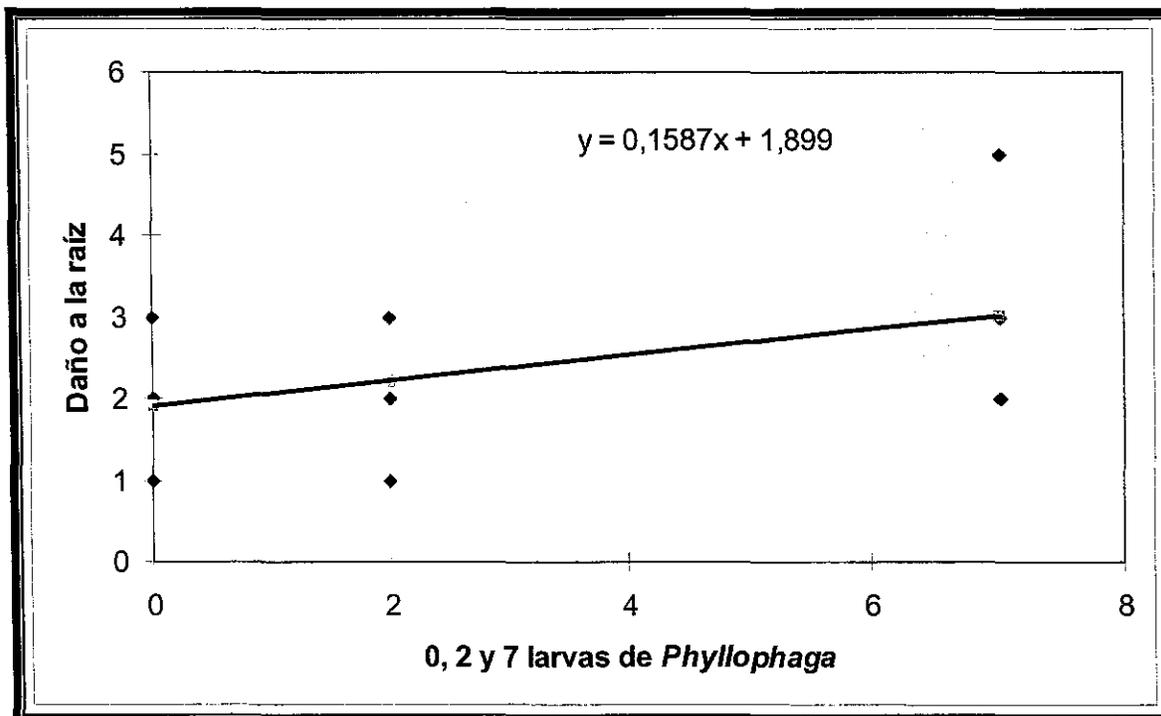


Figura 6. Relación entre las variables infestación gradual de larvas de *Phyllophaga* (x) y daño a la raíz (y).

Las variables infestación progresiva de larvas (0, 2 y 7) y el daño a la raíz, tienen una relación positiva, proporcionada por el aumento de la presencia de larvas de *Phyllophaga*, provocando con esto un mayor daño a la raíz. (Figura 6).

4.7.2 Concentración de azúcares

El análisis estadístico para la variable concentración de azúcares en tejido fresco, con valores originales y transformados, muestra que la infestación con 7 larvas propicia la más baja concentración de azúcares (1.83) en comparación con 0 y 2 larvas que alcanzan concentraciones de 2.68 y 2.71, respectivamente. Este resultado es un indicativo de que un pequeño daño ocasionado por pocas larvas de *Phyllophaga* spp no se refleja en una disminución significativa en el contenido de azúcares en el tejido, sino que se necesitan daños mayores como los ocasionados por infestaciones de un mayor número de larvas (Cuadro 13)

Tratamientos	Medias originales* ± Desv. Est.	Tukey 0.05	Medias transfor* ± Desv. Est.	Tukey 0.05
7 larvas	0.74 ± 0.34	b	1.83 ± 0.24	b
2 larvas	3.02 ± 1.02	a	2.71 ± 0.31	a
0 larvas	2.88 ± 0.83	a	2.68 ± 0.25	a
	C.V. = 35.30 %			

Cuadro 13. Concentración de azúcares alcanzados en los tratamientos 0, 2 y 7 larvas en el estudio en campo, como respuesta al daño a la raíz por *Phyllophaga*.

Sin embargo, la regresión de las variables concentración de azúcares y la infestación gradual con 0, 2 y 7 larvas muestran una relación negativa e inversamente proporcional con tendencia a la disminución de los azúcares inducida por el incremento en la presencia de *Phyllophaga* en los tratamientos con 0, 2 y 7 larvas (Figura 7).

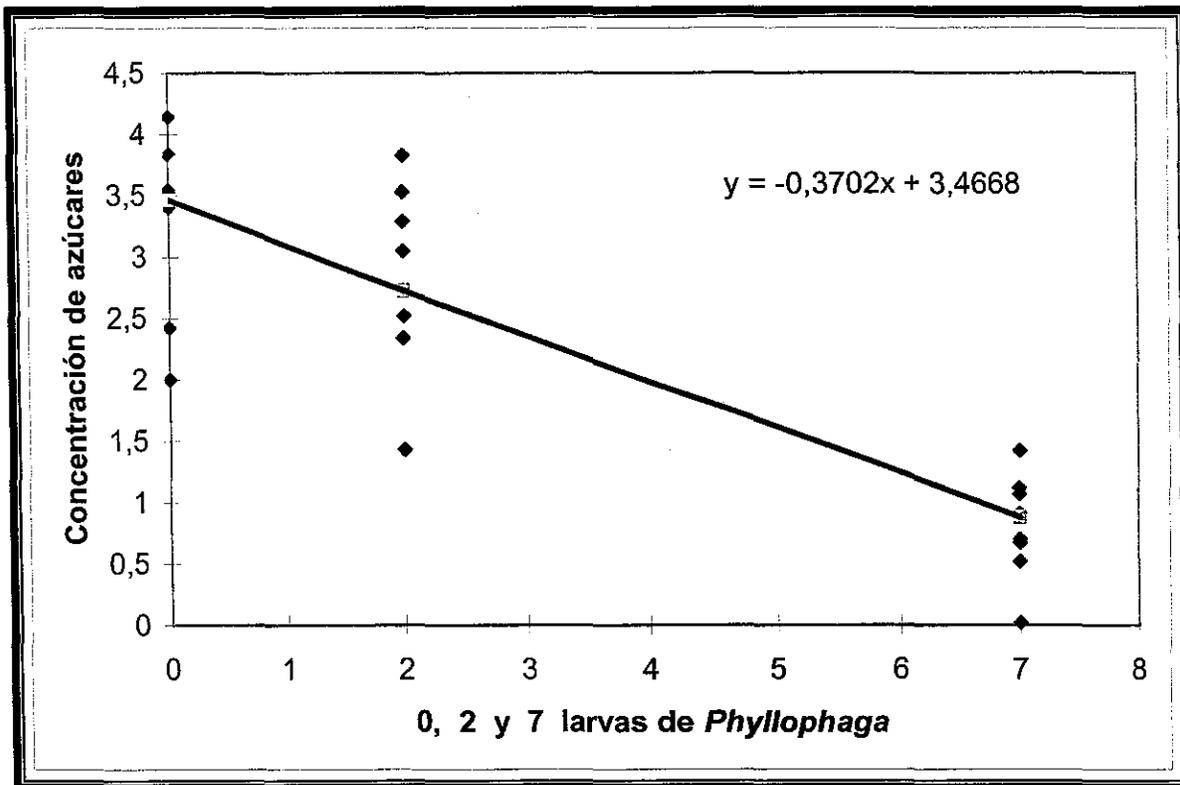


Figura 7. Relación entre las variables infestación gradual de larvas de *Phyllophaga* (x) y la concentración de azúcares (y) sin *Fusarium oxysporum*

Por otro lado, la regresión entre las variables daño a la raíz y la concentración de azúcares resultó negativa e inversamente proporcional, ya que en la medida que se incrementó el daño a la raíz por *Phyllophaga*, se provocó una tendencia en la disminución de los azúcares (Figura 8 y 9). Así mismo se observó, que la relación entre las dos variables fue muy similar en presencia o ausencia del patógeno *F. oxysporum*, resultado que indica que el impacto negativo en la concentración de azúcares depende más directamente del daño a la raíz por las larvas que por la presencia del patógeno.

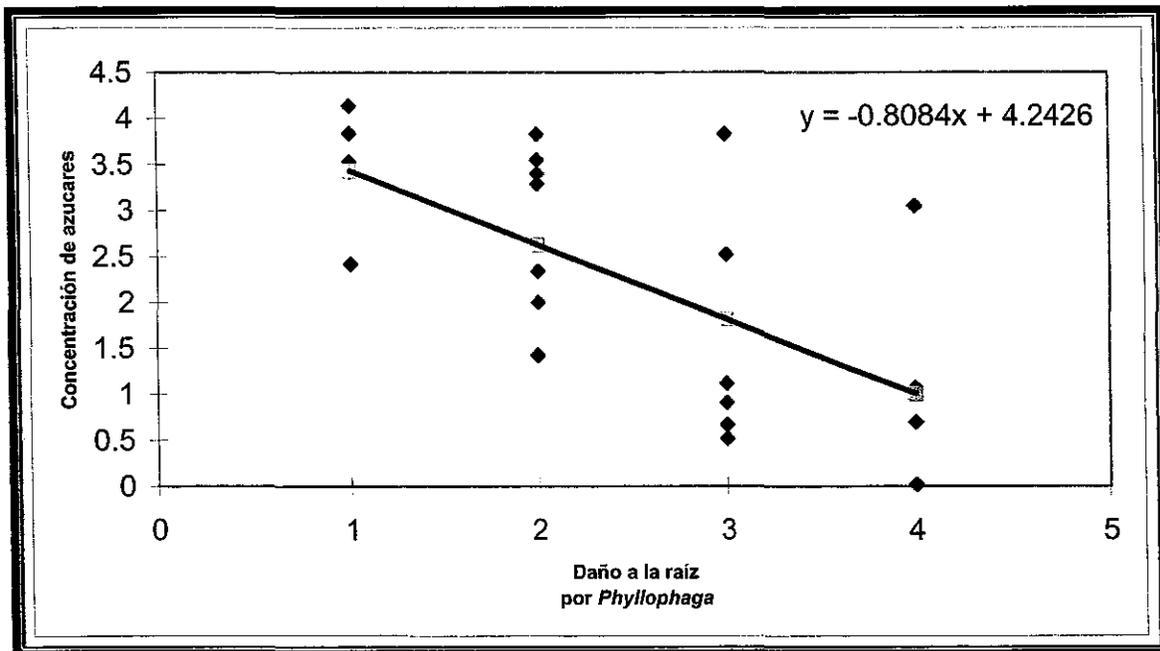


Figura 8. Relación entre las variables daño a la raíz por *Phyllophaga* (x) y concentración de azúcares (y) sin *Fusarium*

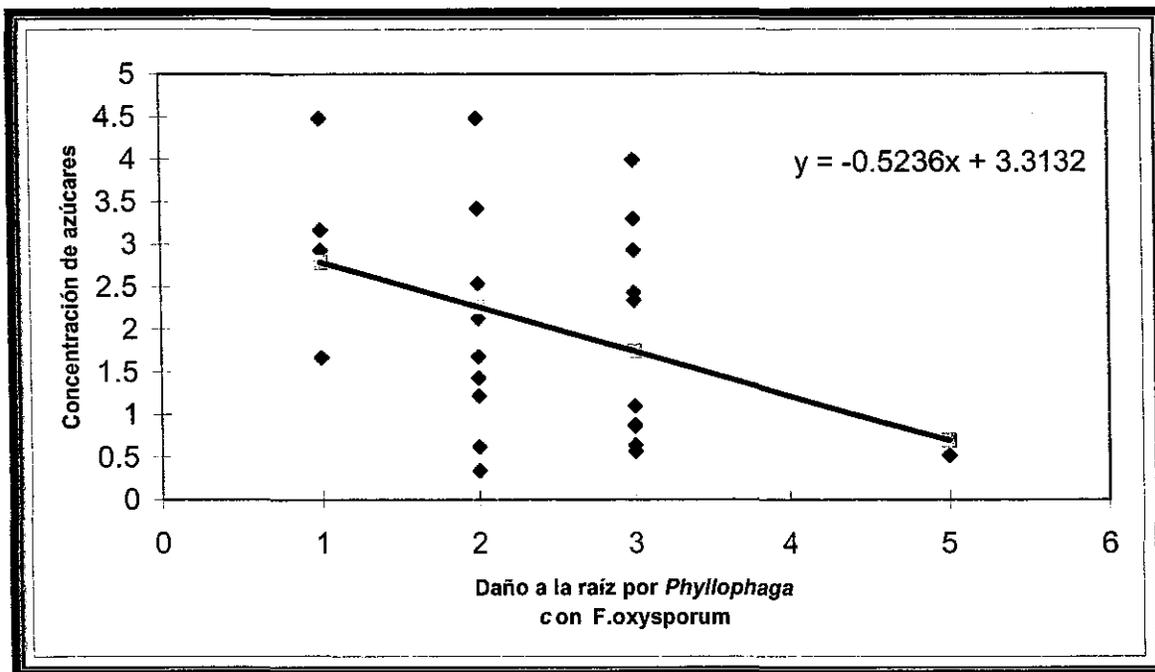


Figura (9) Relación entre el daño a la raíz por *Phyllophaga* y la concentración de azúcares con *F. oxysporum*

4.7.3 Determinación de propágulos de *Fusarium oxysporum*

La presencia de propágulos de *F. oxysporum* en la raíz sólo se encontró en los tratamientos en los que el patógeno fue inoculado, fueron observados microconidios en mayor proporción que macroconidios y un número reducido de clamidosporas

Por último, la regresión entre las variables daño a la raíz y la presencia de propágulos, muestra una tendencia positiva y directamente proporcional. Este resultado significa que a mayor presencia de larvas y mayor el daño a la raíz, la incidencia de *F. oxysporum* es mayor (Figura 10). Asimismo, se encontró que la regresión entre las variables presencia de propágulos del patógeno y la concentración de azúcares confirma que la presencia del patógeno poco influyó en el contenido de azúcares (Figura 11).

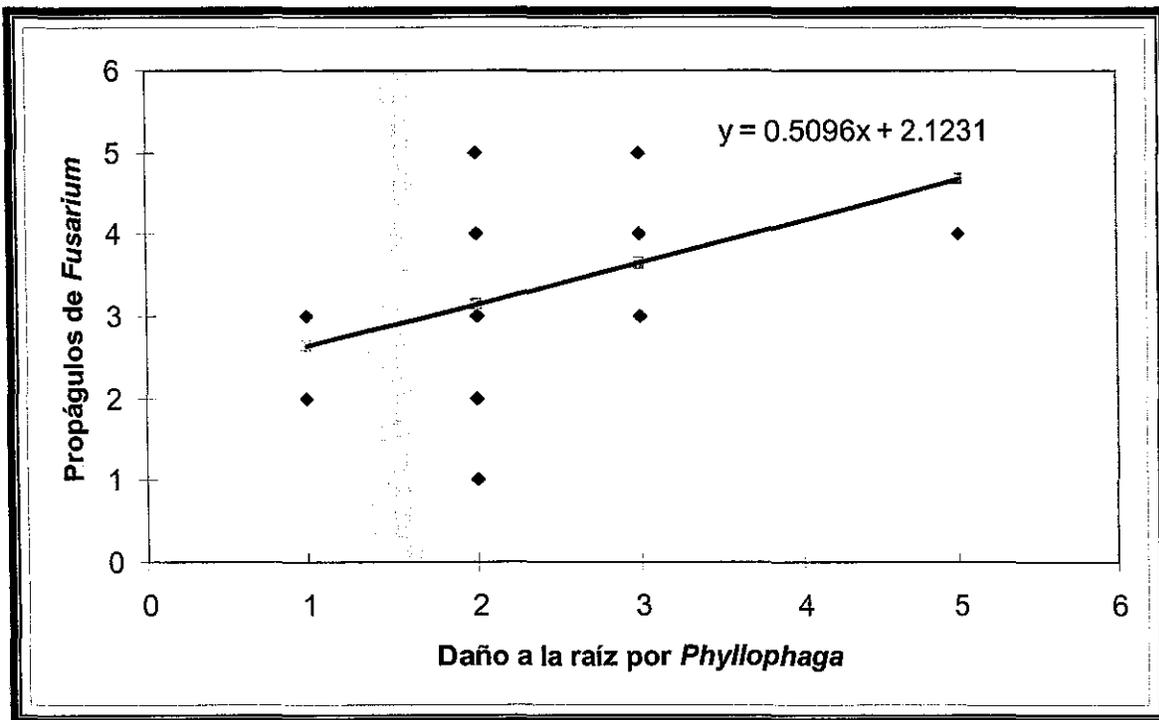


Figura 10. Relación entre las variables daño a la raíz por *Phyllophaga* (x) y la presencia de propágulos de *Fusarium oxysporum* (y)

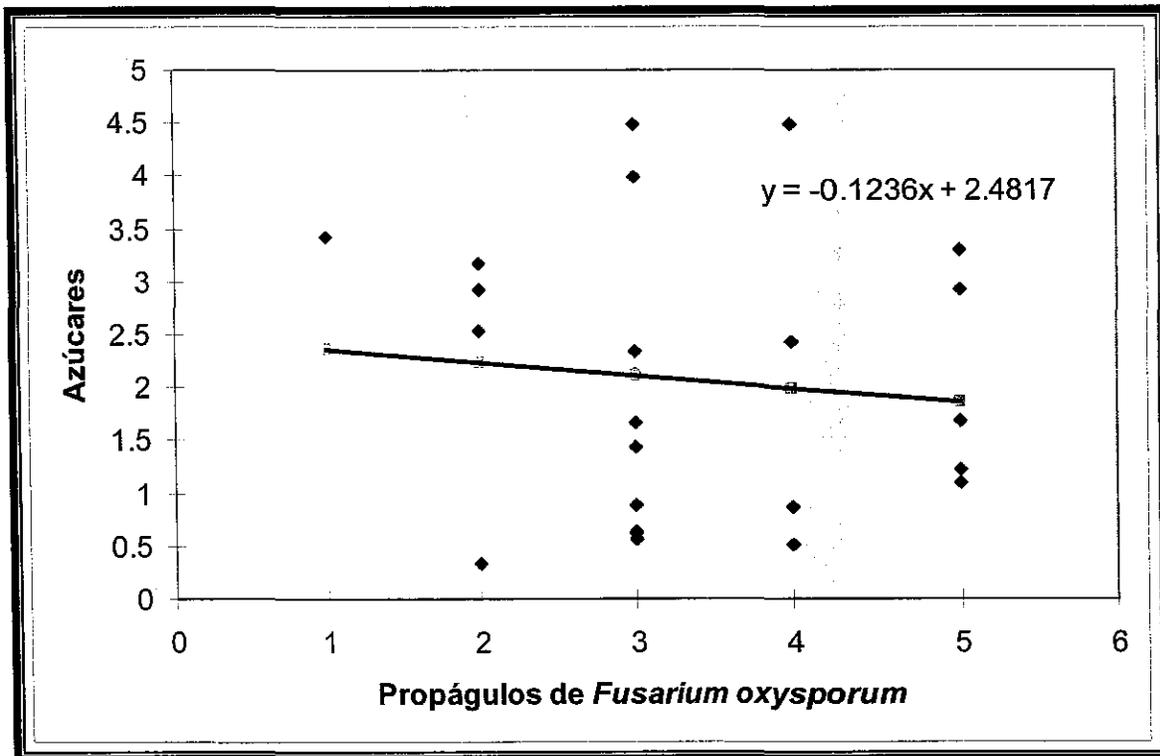


Figura 11. Relación entre las variables presencia de propágulos de *F. oxysporum* (x) y la concentración de azúcares (y)

6. CONCLUSIONES

En el estudio en campo, el daño provocado por "gallina ciega", fue directamente proporcional a la infestación creciente del gradiente natural establecido, lo cual indica que en los tratamientos conforme se incrementó la presencia de *Phyllophaga spp.*, mayor fue el daño a la raíz.

Con los resultados se encontró una relación directa, del daño a la raíz, con la presencia del patógeno *Fusarium oxysporum*, en las raíces y su manifestación externa a los 60 días.

Aunque se observó lo anterior, no logró reflejarse significativamente en el peso de las plantas, tal vez esto sucedió porque el tiempo de estudio fue tan sólo de 2 meses.

En el estudio de vivero, no se pudieron repetir los resultados de campo, aún así, se observó un mayor daño en el tratamiento con mayor presencia de larvas de *Phyllophaga* (7 larvas) y encontrando un daño menor a la raíz en el tratamiento con 0 larvas.

Se advirtió una reducción en la concentración de los azúcares del 38.6% en la incipiente piña, en el tratamiento con mayor población de larvas (7 larvas por planta), indicio de que un pequeño daño ocasionado por pocas larvas de *Phyllophaga spp* no se refleja en una disminución significativa en el contenido de azúcares en el tejido, sino que se necesitan daños mayores como los ocasionados por infestaciones de un mayor número de larvas.

En cuanto a la presencia o ausencia de *Fusarium oxysporum*, el resultado sugiere que la baja concentración de azúcares se relacionó más directamente con el daño a la raíz por las larvas, que por la presencia del patógeno. Aún así, a medida que *Phyllophaga* aumenta su número de larvas, estas impactan en una mayor cantidad de propágulos de *Fusarium oxysporum* en las raíces.

6. Bibliografía

Arias, A. 2001. Una alternativa al uso de Pesticidas químicos: Bacterias del suelo. Página de internet: <http://iibce.edu.uy/2001-07>

Bernal Alcocer, A. y López Rocha 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. p. 43.

Borror, D. J: CA. Triplehorn and N.F. Jhonson. 1992. An Introduction to the study of insects. Sixth Edition.. Saunders College Publishing. pp 875.

Bustamante, M. E. I., 1983 Estudio agroecológico de los agaves. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.

Castañeda Vázquez Hugo, 2002, Aislamiento e identificación de microorganismos responsables de la marchitez del Agave Tequilero, Análisis agroecológico del *Agave Tequilana* Weber var. *Azul* con énfasis en problemas fitosanitarios en Jalisco (publicación Especial No. 1 Tepatitlan, Jalisco, México). INIFAP, Centro de Investigación Regional del Pacífico Centro, Campo Experimental Altos de Jalisco. SAGARPA. 2002. p 21-24.

Cook R. James, 1995. Biological Control of Plant Pathogens: Teory to application. 76th Annual Meeting. Guelph Ontario, Canada.

CESAVEG, 1998. Campaña fitosanitario contra plagas del suelo. Manual Técnico, Comité Estatal de Sanidad Vegetal Guanajuato. Directiva 1998-2000.

CESAVEG, 2001a. Contingencia de Manejo Fitosanitario de la Fresa 2001. Comité Estatal de Sanidad Vegetal Guanajuato. Directiva 2000-2002.

Consejo Regulador del Tequila (CRT). 1997. Estadísticas de producción, exportación y consumos de materias primas para la elaboración del tequila. Guadalajara, Jalisco, México. Página de internet: <http://www.crt.org.mx>.

Consejo Regulador del Tequila 1997. Inventario general del cultivo de *Agave tequilana* Weber en la zona protegida con la denominación de origen del tequila. Guadalajara, Jalisco, México pp. 35-49.

Coto, D. 1993. Gallinas ciegas como plagas de cultivos anuales y perennes. CATIE, Turrialba, Costa Rica. En: <http://www.catie.ac.cr/información>

Flores M. F. J. 1994. El cultivo de agave azul *tequilana* (Weber), Foro de análisis de la problemática de la cadena productiva agave-tequila, p. 57-66.

Flores López Hugo Ernesto, Byerly Murphy Kier Francisco, Aceves Rodríguez José de Jesús, Ruiz Corral, J. Ariel., 2002., Diagnóstico del sistema de producción de agave con énfasis en problemas fitosanitarios., Análisis agroecológico del *Agave Tequilana* Weber var. Azul con énfasis en problemas fitosanitarios en Jalisco (publicación Especial No. 1 Tepatitlan, Jalisco, México). INIFAP, Centro de Investigación Regional del Pacífico Centro, Campo Experimental Altos de Jalisco. SAGARPA. 2002. p 63-64.

Fuskey, *Fusarium Interactive* key, 2000. <http://sis.agr.gc.ca/brd/fusarium/home1.html>

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.

García M., C. 1997. Lista de insectos y ácaros perjudiciales a los cultivos en México. Fitófilo No. 73. Dirección General de Sanidad Vegetal. SARH p 49.

Guillén, Cruz Raquel, 2003, Biocontrol de *Fusarium oxysporum* y promoción de crecimiento por Rizobacterias en *Agave tequilana* Weber Var. Azul. Tesis de Licenciatura CUCBA., Universidad de Guadalajara.

Ireta, Moreno Javier, Rodríguez González Pilar, Flores López Hugo Ernesto, Flores Mendoza Javier, 2002, Epidemiología de la "Marchitez" del Agave Azul. *Agave tequilana* Weber Variedad Azul, Análisis agroecológico del *Agave Tequilana* Weber var. Azul con énfasis en problemas fitosanitarios en Jalisco (publicación Especial No. 1 Tepatitlan, Jalisco, México). INIFAP, Centro de Investigación Regional del Pacífico Centro, Campo Experimental Altos de Jalisco. SAGARPA. 2002. p 51-52.

Jiménez-Delgadillo, R., Virgen-Calleros, G., Tabares-Franco, J., Olalde-Portugal, V., 2001. Bacterias Promotoras del Crecimiento de Plantas: Agrobiotecnología. Avance y perspectiva. Noviembre-Diciembre 2001. 20:395-400 p.

Luna Hernández Gregorio 1996 Pudrición del tallo de *Agave Tequilana* Weber en el Estado de Jalisco, México, Chapingo México. p 25-31.

Luna Hernández Gregorio 1998. Hacia un manejo integrado de plagas. Fundamentos y recomendaciones prácticas. p 26-27-30, 51-53, 121-122.

Martínez, R. J. L. 1994. Informe sobre el diagnóstico de la marchitez en Agave. Tequila Cuervo. Inédito.

Martínez, R. J. L., Vázquez, G. M., Pimienta, B. E., Torres, M. P., Bernal, M. F., Rodríguez, R. R., Flores, M. F. y Virgen, C. G. Centro de Investigación en Parasitología Vegetal, Departamento de Producción Agrícola, CUCBA U de G. 1998. Avances del proyecto: Epidemiología y manejo integrado de problemas fitosanitarios en agave. Foro de análisis de la problemática de la cadena productiva Agave-tequila p. 20-25. 165

Martínez, S, J. P., 2000. El Sida del Agave, realidades y mentiras. Suplemento Investigación y desarrollo. P. 23-27. página Internet: <http://www.invdes.com.mx>

- Mendoza-Zamora C, Pinto Cortes B. (1985) Principios de Fitopatología y enfermedades causadas por hongos. Imprenta Universitaria de la UACH. México.
- Metcalf, C. L. y W. P. Flint. 1962. Insectos destructivos e Insectos útiles. 4ª. Edición. Mc-Graw-Hill, N. Y. 1087 pp.
- Morón, M. A. 1988. Las especies de *Phyllophaga* (Coleóptera: Melolonthidae) con mayor importancia agrícola en México. En: III Mesa redonda sobre plagas del suelo. Sociedad Mexicana de Entomología. Morelia, Michoacán, México. p 81-102.
- Morón, M. A. 1996. El género *Phyllophaga* en México: Morfología, distribución y sistemática supraspecífica (Insecta: Coleóptera). Instituto de Ecología, A. C. México. 441 pp.
- Morón, M. A. 1997a. Inventarios faunísticos de los Coleoptera Melolonthidae Neotropicales con potencial como bioindicadores. *Giornale Italiano di Entomologia* n8: p 265-274.
- Morón, M. A. 1997b. White Grubs (coleoptera: Melolonthidae: *Phyllophaga* Harris) in México and Central America. A brief review. *Tend in Entomology* Vol. 1: 117-128.
- Morón, M. A., S. Hernández-Rodríguez y A. Ramírez-Campos. 1998. Las especies de *Phyllophaga* (Coleóptera: Melolonthidae) con importancia agrícola en Nayarit, México. En: Avances en el estudio de la diversidad, importancia y manejo de los Coleópteros Edafícolas Americanos. M. A. Morón y A. Aragón (Eds.) Publicación Especial de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y la Sociedad Mexicana de Entomología, A. C. Puebla, México. pp. 79-98.
- Morón, M. A. 2001a. Larvas de escarabajos del suelo en México (Coleóptera: Melolonthidae). *Acta Zoológica Mexicana* (n.s.) Número especial 1:111-130.
- Morón, M. A. 2001b. Los Coleópteros *Melolonthidae* que habitan el suelo en México. En: Tópicos sobre Coleóptera de México. Navarrete-Heredia, J.L., H.E. Fierros-López y A. Burgos-Solorio (Eds.) 2001. Universidad de Guadalajara-Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Guadalajara, México. p 23-34.
- Novel, P. S. 1998. Los incomparables agaves y cactus. Traducción Edmundo García Moya. Ed. Trillas. México, DF. p 211.
- Rodríguez, L. R. 1990. Plagas forestales y su control en México. 2ª. Edición. Universidad autónoma Chapingo. pp. 153-154.
- Shannon, P.J. 1996 Control microbiano de *Phyllophaga* spp. (Col: Melolonthidae). In Shannon, Pj; Carballo, M. Eds. *Biología y Control de Phyllophaga* spp. CATIE, Priag. P 80-93.
- Shannon, P. J. Smith, S. M. Hidalgo, E. 1993. Evaluación en el laboratorio de aislamientos costarricenses y exóticos de *Metarhizium* spp., y *Beauveria* spp., contra larvas de *Phyllophaga* spp. (Coleoptera: Scarabeidae). In *Diversidad y Manejo de*

Plagas Subterráneas. Veracruz, México, Sociedad Mexicana de Entomología/Instituto de Ecología. P. 203-215.

Soltero Quintana Rafael, pruebas de patogenicidad de *Fusarium oxysporum* y *erwinia* Sobre plantas de *Agave Tequilana* Weber variedad *Azul in vitro*, Análisis agroecológico del *Agave Tequilana* Weber var. *Azul* con énfasis en problemas fitosanitarios en Jalisco (publicación Especial No. 1 Tepatitlan, Jalisco, México). INIFAP, Centro de Investigación Regional del Pacífico Centro, Campo Experimental Altos de Jalisco. SAGARPA. p 2002. 27-31.

Snedecor, G.W. y W.G. Cochran. 1984. Métodos Estadísticos. Décima impresión. Tr. del Inglés por J. A. Reinoso. México. CECSA. 366-368 pp.

Valenzuela, Z. A. G. 1994. El agave tequilero su cultivo e industrialización. Editorial Ágata p 119.

Valenzuela Zapata A. G. 1997 El Agave tequilero, su cultivo e industria. Editorial Litteris. México p 204.

Virgen, C. G. 1997. Biología y manejo de *Fusarium* spp. Departamento de Biotecnología y Bioquímica, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN. Unidad Irapuato, Irapuato, Gto.

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.

Virgen, C. G., Martínez, R. J. L., Rodríguez, R. R., Pimienta, B. E., Vázquez, G. M., Bernal, A. A., López, R. A. J., Aguirre, V. T. Monserrat. 2000. Avances del proyecto: Epidemiología y manejo de problemas fitosanitarios en agave (*Agave tequilana* Weber) Programa general de apoyo y desarrollo tecnológico a la cadena productiva agave-tequila CUCBA U de G.

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. P. 51-63

Virgen C. G., 2000. Biología y Control de las principales enfermedades del agave tequilero, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT.

Virgen, C. G. 2002 Enfermedades en el cultivo de agave (*Agave tequilana* Weber var. azul). Curso de acreditación en fitosanidad del (*Agave tequilana* Weber variedad azul). Tlajomulco de Zúñiga, México. P. 17-20.