
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
AGROPECUARIAS

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



EL PICUDO *Scyphophorus acupunctatus* Ghyll (Coleoptera:
Curculionadae) Y SU MICROBIOTA ASOCIADA AL TEJIDO
DAÑADO DE *Agave tequilana* Weber var. azul

por

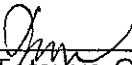
Maria Celia Beltrán García

Tesis presentada como requisito parcial para obtener el grado de

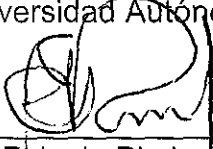
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(ORIENTACIÓN ECOLOGÍA)**

LAS AGUJAS , ZAPOPAN; JALISCO
NOVIEMBRE DE 2005.

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias
División de Ciencias Biológicas y Ambientales
Posgrado en Ciencias Biológicas
Orientación Ecología



Dr. Tetsuya Ogura Fujii.
Director de Tesis
Departamento de Química
Universidad Autónoma de Guadalajara



Dr. Eulogio Pimienta B.
Codirector de Tesis
Departamento de Ecología.
CUCBA



**EL PICUDO *Scyphophorus acupunctatus* Ghyll (Coleoptera:
Curculionidae) Y SU MICROBIOTA ASOCIADA AL TEJIDO DAÑADO DE
Agave tequilana Weber var. azul**

Por



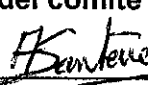
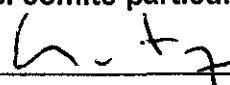
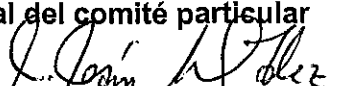
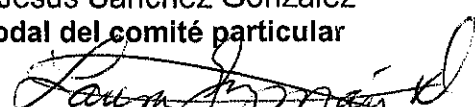
MARIA CELIA BELTRAN GARCIA

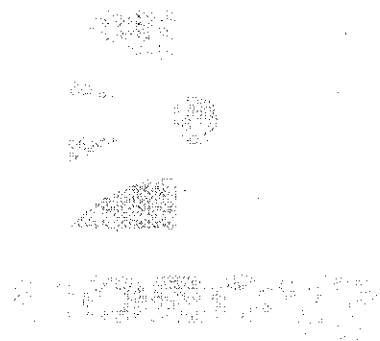
Tesis presentada como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS (AREA ECOLOGIA)

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
NOVIEMBRE DE 2005

Aprobada por:

 _____ Dr. Tetsuya Ogura Fujii Presidente del Comité particular	<u>13 de Oct de 05</u> Fecha
 _____ Dr. Eulogio Pimienta Barrios Asesor del comité particular	_____ Fecha
 _____ Dra. Anne Santerre Lucas Sinodal del comité particular	<u>13 octubre 2005.</u> Fecha
 _____ Dr. Gustavo Moya Raygoza Sinodal del comité particular	<u>13 oct 2005</u> Fecha
 _____ Dr. Jesús Sánchez González Sinodal del comité particular	<u>13 - Oct - 2005</u> Fecha
 _____ Dra. Laura Guzmán Dávalos Presidente del Posgrado	<u>Octubre 17, 2005</u> Fecha



ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA-ICET DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUADALAJARA Y AGRADEZCO AL CONSEJO ESTATAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DEL ESTADO DE JALISCO (COECYTJAL) POR LA AYUDA ECONOMICA PARA LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO.

EL TEMA FORMÓ PARTE DEL PROYECTO "ESTUDIO DEL PICUDO DE AGAVE, SCYPHOPHORUS ACUPUNCTATUS. CULTIVO ARTIFICIAL, DAÑO A AGAVE Y PREVENCIÓN Y ERRADICACIÓN DEL INSECTO" CON CLAVE 17-2001.

A DIOS.

Por su continua protección.

A mis Ángeles (Abuelita Celia y Adriana)

Las cuales no pudieron ver la culminación de esta nueva etapa en mi vida.

A mi madre

Gracias, por el apoyo, el ánimo y sobre todo el escucharme cuando ha sido necesario. Forjándome como una persona de lucha y visualización.

A mi padre

Gracias...

A Miguel Beltrán

Gracias... por la ayuda brindada en este trabajo durante la parte experimental y de revisión.

Dr. Tetsuya Ogura:

Le agradezco el apoyo brindado a lo largo de estos 9 años de trabajo, de compartir sus conocimientos no solo a mí si no a todas las generación de estudiantes que han pasado por su laboratorio, el enseñarme a tener ética en el trabajo, así como su apoyo económico que ha tenido hacia mí.

Universidad Autónoma de Guadalajara.

Por el espacio brindado para realizar este trabajo.

Azul Agricultura:

Agradezco por el apoyo económico y por la facilidades para la obtención del material necesario para la realización de este trabajo.

ÍNDICE GENERAL

iii

1	INTRODUCCION	1
2	ANTECEDENTES	3
2.1.	Interacción Planta Patógeno	
2.1.1	Resistencia de las plantas al ataque de un patógeno o parásito	3
2.1.2	Relación insecto-patógeno-planta	4
2.2	Antecedentes de Agave	
2.2.1	Generalidades del agave	5
2.2.2	Taxonomía	5
2.2.3	Distribución geográfica	6
2.2.4	El <i>Agave tequilana</i> Weber variedad azul	6
2.2.4.1	Características botánicas	6
2.2.4.2	Propagación vegetativa	7
2.2.4.3	Enfermedad del <i>Agave tequilana</i>	8
2.3	Antecedentes de <i>Scyphophorus acupunctatus</i>	
2.3.1	Clasificación de <i>Scyphophorus acupunctatus</i>	9
2.3.2	Sinónimos	9
2.3.3	Antecedentes taxonómicos	9
2.3.4	Distribución	10
2.3.5	Aspectos ecológicos	10
2.3.6	Características morfológicas de <i>Scyphophorus acupunctatus</i>	11
2.3.6.1	Características del huevo	11
2.3.6.2	Características de la larva	12
2.3.6.3	Características de la pupa	12
2.3.6.4	Características del adulto	12
2.3.7	Ciclo biológico en otros géneros de la familia Curculionidae	13
2.3.8	Daño a los cultivos de agave	14
2.3.9	Hábitos generales de alimentación de los insectos	14
3.	MATERIAL Y METODOS	16
4.	RESULTADOS	27
5	DISCUSION	41
6	CONCLUSIONES	47
7	LITERATURA CITADA	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Diferentes grado de pigmentación del tejido. a) Túnel formado por la larva e inicio del pigmento y daño al tejido, b) Tejido de hoja con gran avance de pigmentación y olor a ácido orgánicos. c) Túnel entre piña y hojas con pigmentación media. d) tejido totalmente pigmentado.	19
Figura 2	Obtención del intestino. a) Las larvas en disección (corte transversal) b) separación del intestino del cuerpo c) intestino en vial con agua peptonada.	20
Figura 3	Comparación entre el tejido y la pigmentación obtenida. a) tejido con un alto grado de pigmentación en todo el centro de la piña concede un color rojo oscuro al extracto. b) Tejido con grado de pigmentación bajo en el túnel formado por la larva. c) Inicio de pigmentación en el tejido y olor a ácido orgánico.	22
Figura 4	Estadíos morfológicos del <i>Scyphophorus acupunctatus</i> en jugo de agave: a) apareo b) huevo (4x) c) larva d) pupa e) adulto recién salido de capullo y f) adulto.	27
Figura 5	Estadíos morfológicos del <i>S. acupunctatus</i> en tejido de agave: a) huevo (4x) b) larvas distintos instares c) capullo y pupa d) adulto.	29
Figura 6	Observación microscópica (100X) de la tinción de gram A) cocos Gram (+) <i>L. mesenteriodes</i> B) levadura <i>R. mucilaginosa</i>	31
Figura 7	Desarrollo de microorganismos inoculados en medios de cultivos solidos.	32
Figura 8	Crecimiento de <i>Rhodo mucilaginosa</i> en el medio de inulina después de 72 h de incubación. A: Caja de medio control. B. Modificación del pH del medio durante la producción de ácido láctico y acético generado durante la hidrólisis de la inulina.	33
Figura 9	Aspecto físico del tejido inoculado con <i>L. mesenteroides</i> . Tejido control (A) Tejido dañado y pigmentado (B).	33
Figura 10	Aspecto físico del tejido inoculado con <i>R. mucilaginosa</i> (B) y tejido control (A). Generación de pigmentos a las 48 h de inoculación.	34
Figura 11	Identificación de Ac. Clorogenico.	35
Figura 12	Identificación de compuestos fenólicos.	36
Figura 13	Reacción oxidativa del ácido clorogénico expuesto a distintas concentraciones de peróxido de Hidrogeno (H_2O_2) y con 30 U de peroxidasa	37
Figura 14	Oxidación del ácido clorgénico por actividad de peroxidasa.	38
Figura 15	Migración larvario a zonas con cristales de oxalato de calcio, a diferentes intervalos de tiempo.	40
Figura 16	Propuesta del daño a la planta de <i>A. tequilana</i> por el <i>S. acupunctatus</i> (picudo de agave).	49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Cultivo del <i>S. acupunctatus</i> en medios preparados con jugo de agave.	28
Tabla 2	Cultivo de <i>S. acupunctatus</i> en trozos de tejido de <i>A. tequilana</i>	29
Tabla 3	Desarrollo del <i>S. acupunctatus</i> en cabezas o piñas de <i>A. tequilana</i>	30
Tabla 4	Condiciones de oxidación en la reacción del ac. clorgénico expuesto a 300 mM de peróxido de hidrógeno y 30 U de peroxidasa	39

SUMMARY

vi

Scyphophorus acupunctatus Ghyll regularly cause severe damages to the *Agave tequilana* Weber plants. The parasited plants show both tissue softening and pigmentation in stem (or head), the rot of shoot and consequently the total of the plant loss. The objective of this work is to understand the insect behavior and the consequences in the plant by the interaction with intestinal microbiot.

The biological cycle of the insect from egg to adult phase occurs in approximately 111 days in the artificial culture composed mainly by agave juice and of 105 days in the tissue. During this period, the larva has a great amount of microorganisms that are distributed in the plant. The isolated microorganisms of the intestine of the cultivated larvae aseptically were *Rhodotorula mucilaginosa* and a lactic acid bacterium (BAL) *Leuconostoc mesenteroides*, commonly found in all the morphologic stage of the insect. Bacteria gram (-) were found also *Erwinia* sp and *Pseudomonas paucimobilis* in culture with simple sugars (fructose and glucose) or in culture with inulin previously hidrolized by the leavening and the BAL. Under the growth of these microbes pH decreases from 4.8 to 3.6 and apparently this reductan is caused by hydrolysis of inulin to both fructose and glucose, this decrease was followed by fermentation of the hydrolysates to produce lactic acid (0,1 mM) and acetic acid (10 mM), which in turn causes the softening of the tissue. In these conditions *L. mesenteroides* and *R. mucilaginosa*, but not found negative bacteria gram. Finally, the plants when suffering these alterations generate substances that presumably play a part of a chemical defense mechanism, that accumulate clorogenic acid, as well as, phenolic compounds that cause the red coloration inside the ill plant.

I conclude that the permanence of *L. mesenteroides* and *R. mucilaginosa* in the larvae forms the asociation damaging the plant and that the *Erwinia* and *Pseudomonas* bacterias are microorganisms that do not participate to the main cause of the total damage of the plants.

RESUMEN

vii

El picudo *Scyphophorus acupunctatus* Ghyll causa severos daños al *Agave tequilana* Weber var. azul. Las plantas afectadas presentan ablandamiento y pigmentación rojiza del tejido en el tallo o piña, pudrición del cogollo y puede llegar a ocasionar la muerte de la planta. El objetivo del presente trabajo fue conocer el ciclo biológico del insecto y las consecuencias que ejerce en la planta por su asociación con su microbiota intestinal.

El ciclo biológico del insecto desde el estadio de huevo a la fase adulta ocurre en aproximadamente en 111 días en medio artificial preparado con jugo de agave y de 105 días cuando se alimenta directamente del tejido. Durante este tiempo se observó que la larva posee una gran cantidad de microorganismos que son distribuidos en la planta. Los microorganismos aislados del intestino de las larvas cultivadas asépticamente fueron la levadura *Rhodotorula mucilaginosa* y una bacteria ácida láctica (BAL) *Leuconostoc mesenteroides*; que se encuentran en todos los estadios morfológicos así como en el tejido dañado. Así mismo se hallaron bacterias gram (-) *Erwinia sp* y *Pseudomonas paucimobilis* en medios con azúcares simples (fructosa y glucosa) o en medios con inulina previamente hidrolizada por la levadura y la BAL. Bajo el crecimiento de estos microbios el pH disminuye de 4.8 a 3.6 por la hidrólisis de la inulina y la fermentación de los azúcares produce ácido láctico (0.1 mM) y ácido acético (10 mM) causando el ablandamiento del tejido. En estas condiciones solo se encontraron *L. mesenteroides* y *R. mucilaginosa*, pero no las bacterias gram negativas. Finalmente, las plantas al sufrir estas alteraciones generan sustancias como parte de los mecanismos químicos de defensa, que causa la acumulación de alta concentración del ácido clorogénico, así como la presencia de otros compuestos fenólicos que se manifiestan con la coloración rojizo en el interior de la planta enferma.

En conclusión la permanencia de *L. mesenteroides* y *R. mucilaginosa* en la larva, se debe a una existente asociación con el insecto dañando así a la planta y que las bacterias *Erwinia* y *Pseudomonas* son microorganismos que no participan directamente en el daño total de las planta.

JUSTIFICACIÓN

La gran demanda que tienen las plantas de *Agave tequilana* como materia prima para la industria tequilera, ha ocasionado una disminución de la superficie del cultivo. El aumento de los problemas fitosanitarios provocados por hongos, bacterias e insectos también ha influido considerablemente. Sin embargo el daño por el insecto considerado como una plaga importante, a tal grado que Solís en 2001 estimó que un 24.5 % del daño al tejido de las piñas es producido por el picudo.

Estudios realizados en otras especies de *Agave*, muestran que la pudrición se relaciona con la presencia de un insecto y de los fitopatógenos que ayudan a desdoblar los productos en el tejido de la planta mediante su actividad microbiana (Waring y Smith, 1986).

En el *Agave tequilana* se conoce poco del ciclo biológico de *Scyphophorus acupunctatus* Gyll y la relación simbiótica con su microbiota intestinal que es la causante del daño al tejido en las plantas de agave. Conocer el ciclo proveerá información importante para establecer los criterios para el manejo de la enfermedad, así como la prevención y la erradicación de esta plaga.

HIPOTESIS

La pigmentación rojiza, la producción de ácidos orgánicos y la disolución de los cristales de oxalato de calcio en el tejido dañado de las plantas de *Agave tequilana* Weber, var azul, se relacionan con la presencia del picudo *Scyphophorus acupunctatus* Ghyll y la asociación con su microbiota intestinal en su fase larvaria.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Determinar el ciclo biológico del *Scyphophorus acupunctatus* en condiciones de laboratorio y la interacción simbiótica con su microbiota intestinal como promotores del daño al tejido de plantas de *Agave tequilana* Weber var. azul.

Objetivos particulares:

1. Conocer el comportamiento y ciclo biológico del picudo en condiciones de laboratorio empleando medios artificiales y tejido de agave.
2. Identificar los microorganismos asociados al daño del tejido de agave.
3. Determinar e identificar la naturaleza química del pigmento rojizo y cuantificar los ácidos orgánicos generados durante la pigmentación del tejido de la planta.
4. Conocer el efecto de los rafidios sobre el estado larvario en medios de cultivos artificiales.

1 INTRODUCCION

El *Agave tequilana* Weber var. Azul es un cultivo importante en el estado de Jalisco, debido a su alto consumo como materia prima de la industria tequilera (Valenzuela, 1994). La planta en edades de 7-8 años tienen un alto contenido de carbohidratos, donde el 20% es la inulina (Cedeño, 1995). La inulina es un carbohidrato no digerible, que funciona en las plantas como un almacén natural de energía; y para tener acceso a él se necesita de bacterias, microorganismos o de enzimas específicas (Tomomatsu, 1994). El resultado es la hidrólisis, la fermentación, disminución del pH y un aumento en la producción de ácidos de cadenas cortas tal como acetato, L-lactato, propionato y butirato (Delzenne y Roberfroid, 1994).

Por otra parte, la superficie de cultivo del agave en el 2000 era de 63,000 y se redujo a 45,000 ha, la cual se mantenido hasta el 2003 (CRT, 2003). Esta reducción o poco incremento en el área de cultivo se debe a los problemas fitosanitarios originados por hongos, bacterias e insectos. Donde el picudo *Scyphophorus acupunctatus* Ghyll (Coleóptera:Curculionidae) es considerado la principal plaga que parasita a los generos *Agavacea* y *Yuccae*, que sirven de alimento y ambiente idóneo para su reproducción (Woodruff y Pierce,mírez, 1993). El daño que presentan las plantas de agave es ocasionado por la presencia del estado larvario y adulto del insecto. Donde la larva ocasiona un considerable daño al alimentarse de la fibra, formando túneles en la parte central y en estas zonas se presentan una pudrición o necrosamiento endurecido de color rojo o café.

Estudios realizados por Sánchez y Rodríguez en 1999 proponen al picudo adulto como vector de la bacteria *Erwinia carotovora* (Jones), y que esta provoca la pudrición en el cogollo (Vélez, 1997). Fucikovsky y Velázquez en 2002 mencionan que las larvas introducen bacterias como *Pseudomonas fluorescens* biotipo I y bacterias pectinolíticas Gram positivas, son las causantes de la infección

provocando una pudrición suave y una coloración en el tejido, y con el tiempo la muerte de la planta.

En este estudio se encontró que la larva es la portadora de una comunidad microbiana compuesta por la levadura *Rhodotorula mucilaginosa* y la bacteria ácido láctico *Leuconostoc mesenteroides*, que son necesarias para hidrolizar la inulina y así obtener los carbohidratos simples necesarios para la reproducción del *Scyphophorus acupunctatus* dentro de la planta de *Agave tequilana*. En este proceso, el tejido sufre un ablandamiento debido a la producción de los ácido láctico y ácido acético durante la fermentación de la fructosa; el pigmento rojizo del tejido de agave se debe a una gran variedad de sustancias fenólicas, donde el ácido clorogénico es la principal, el cual sufre un proceso oxidativo sirviendo como mecanismo de defensa de la planta, originado por la asociación de los microbios y el insecto.

2 ANTECEDENTES.

2.1 Interacción Planta Patógeno

2.1.1 Resistencia de las plantas al ataque de un patógeno o parásito

Las plantas contienen compuestos secundarios que juegan un papel importante en las estrategias defensivas y su principal función es mantener la integridad contra los depredadores y/o agentes patógenos (Swain, 1979; Vivanco *et al*, 2005). Pero las plantas por si solas utilizan diversos mecanismos de defensa como la producción de sustancias químicas tales fenoles, terpenos, alcaloides, glucosidos y algunas proteínas que funcionan como detergentes tales como los inhibidores de proteinasa y amilasas, que bloquean la actividad enzimática en el tracto digestivo de insectos. Sin embargo, el insecto algunas veces puede detoxificar, secuestrar o desviar estos mecanismos (Farmer, 1997; Ananthkrishnan, 2003).

Las plantas por su naturaleza poseen isoenzimas tal como peroxidasa, polifenol oxidasas, etc. Las peroxidadas son activas principalmente durante procesos infecciosos, y se les asocia a una reacción hipersensible (Mayer, 1987). Las reacciones químicas que se llevan a cabo cuando una enzima como la peroxidasa se pone en contacto con concentraciones el peroxido de hidrógeno tomando como agente reductor al ácido clorogenico y su producto de oxidación proporciona un color rojizo. En estudios realizados con la enzima polifenoloxidasasa (PPO), los polifenoles presentes en las plantas son oxidados a su correspondiente quinona por acción de esta enzima (Fawzi y Mark, 2002). Estas quinonas son consideradas como polimerizados de quinonas o aminas que forman un pigmento café (McEvily *et al.*, 1992). Este fenómeno se presenta con una coloración negra o café, debido a la modificación covalente y de enlaces cruzados de los aminoácidos y proteínas derivados de la PPO a quinonas, ejerciendo así una defensa antinutricional contra insectos y patógenos (Razem y Bernards, 2002; Steffens, 2002).

2.1.2 Relación insecto-patógeno-planta.

La resistencia o tolerancia de las plantas hacia los insectos y patógenos es mediada por vías o inducción de mecanismos de defensas (Buell, 1998). Esta inducción en las plantas juega un papel importante debido a la resistencia de la enfermedad derivada por la presencia de los patógenos (Maleck y Dietrich, 1999; Stotz *et al.*, 2000), y sus efectos sobre los insectos donde se incluyen la adición de la toxicidad, retraso en el desarrollo larvario, incremento del ataque por insectos parasitoídes (Johnson y Felton, 2001).

En general, las plantas contienen un grado de resistencia contra la depredación de insectos, siendo reflejado en una serie de mecanismo de defensa adquirida por la planta durante su evolución (Schuler *et al.*, 1998). La protección de la planta hacia la invasión de los organismos que la consumen, infectan y/o dañan a su tejido sigue varios caminos o fases conceptuales tal como el reconocimiento al ataque, señales de transducción y conducta de defensa (Meaux y Mitchell, 2003). El ataque por un organismo puede ser asociado con la agresión de otros organismos. Por ejemplo, muchos insectos son vectores de enfermedades para las plantas. Las heridas físicas producidas por el insecto durante su alimentación puede facilitar la entrada de patógenos oportunistas. Al contrario, algunos insectos prefieren a las plantas dañadas un ejemplo claro son los áfidos prefieren el color amarillo de las plantas enfermas (Dixon *et al.*, 1998).

Los insectos y las bacterias fitopatógenas que transmiten, tienen un tipo de relación simbiótica de diversos grados, tal como la ectosimbiosis y/o endosimbiosis; donde el patógeno puede sobrevivir sobre el lumen intestinal, hasta la simbiosis completa con la formación de estructuras especiales por parte del insecto para almacenar al microorganismo. Sin embargo, todavía no hay estudios que realmente confirmen esta relación y se desconoce lo relativo a la acción de las bacterias dentro del insecto, si son comensales patógenos o realmente es una asociación mutuamente simbiótica (Nurnberger *et al.*, 1997).

Ha sido demostrado que la mayoría de las bacterias presentes en el intestino de los insectos están relacionados con la fácil absorción de los nutrientes y la obtención de los carbohidratos necesarios para su desarrollo. Un ejemplo es el caso de la microflora intestinal de la termita *Reticulitermes speratus*, que contienen gran diversidad de especies bacterianas, donde la composición de las bacterias intestinales son exclusivas de colonias específicas, esto permite que la termita degrade más fácilmente los nutrientes de la madera y así reproducirse (Matsuura, 2001).

2.2 ANTECEDENTES DEL Agave.

2.2.1 Generalidades del agave

El agave o maguey (*Agave spp*) ha sido importante para el desarrollo de comunidades ubicadas en zonas áridas y semiáridas de México; Su aprovechamiento es integral debido a que se producen alimentos, bebidas, licores, almíbar, fibra, carbohidratos, papel, alimento para ganado, productos farmacéuticos y sapogeninas a partir de estas especies. Las partes más utilizadas como fuentes de alimento son los tallos y las bases de las hojas, que son ricas en carbohidratos, el líquido extraído de los tallos tienen un alto contenido de azúcares principalmente fructosa, produciendo a partir de él diferentes bebidas (Bye, 1994; Cedeño, 1995).

2.2.2 Taxonomía

Pertenece a la Clase Angiosperma, Subclase monocotiledoneae y el género *Agave* es el más importante de la familia Agavaceae y hasta la fecha se reportan 310 especies de agave, donde en México existen 272 considerándolo su país de origen (Granados, 1999).

2.2.3 Distribución Geográfica.

Son nativos de América del norte y su máxima diversidad se encuentra en México en la mayor parte en las regiones áridas y semiáridas en los estados de Oaxaca, el desierto de Chihuahua, de Sonora, Coahuila, Durango, Yucatán y Jalisco (Gentry, 1982). Muchas especies tienen importancia comercial (Ramírez, 1993). El uso económico más importantes son sus fibras y se han establecido en la agroindustria importantes en Tanzania, Kenia, Mozambique y otros países como la India, Australia, Brasil y en algunas partes del Caribe.

2.2.4 El *Agave tequilana* Weber variedad Azul

El *Agave tequilana* Weber o *agave azul* es una especie representante de las plantas metabolismo ácido de crasulacea (Nobel *et al*, 1988) y es un importante cultivo en México pero solo se cultiva en regiones limitadas debido a que ha sido reconocido y protegido como un producto con la denominación de origen (Nobel, 2002). La legislación mexicana señala que el tequila solo puede ser producido por esta especie, la cual es cultivada particularmente en las regiones del este y del oeste de Guadalajara, en las localidades de Amatitán, Arandas, Tequila y los altos, así como en algunos municipios de los estados colindantes de Michoacán y Nayarit (Granados, 1999) son los sitios para el cultivo de la planta.

2.4.4.1 Característica botánica

El agave azul (*Agave tequilana*) es una planta perenne, rizomatosa frecuentemente con hijuelos en la base, presenta raíces duras y fibrosas, el tallo es grueso muy corto y usualmente es más corto que la yema terminal. Las hojas son grandes dispuestas en roseta, suculentas y fibrosas que terminan en una espina y presenta pequeñas espinas en los bordes. Las hojas presentan un color azul-verdoso, esta característica los hace diferenciarse de las otras especies de agaves presentes en Jalisco (Granados, 1999).

2.4.4.2 Propagación vegetativa

Es una planta monocárpica anual esto es, sólo presenta una floración durante su ciclo biológico que va de 8 a 10 años y al cabo de ésta la planta muere (Granados, 1999; Orozno, *et al*, 1993). Su propagación puede seguir dos tipos biológicos de reproducción: sexual y asexual. La reproducción sexual es a partir de semillas pero se espera que haya cierta variación genética o segregación entre las plantas hijas (Binh, *et al*, 1990), que podrían ocasionar problemas si la variación afecta la producción de azúcares, esto representa la calidad de la planta para la industria tequilera. El segundo tipo de reproducción, se lleva a cabo por los bulbillos, que se desarrollan en el meristemo axilar de la inflorescencia, en la base de las flores (Oronoz *et al*, 1993; Binh *et al* 1990). Aunque no existe variación genética, es un tipo de reproducción poco aceptado ya que el tiempo y costo son mayores que la propagación por hijuelos rizomatosos (Cedeño, 1995; Valenzuela, 1994), y puede ocasionar que los bulbillos transmitan las enfermedades presentes en la planta madre (Oronoz *et al*, 1993; Binh *et al* 1990).

Los rizomas, es otra de las formas de reproducción asexual de los agaves. Estos generalmente crecen en un plano horizontal paralelo a la superficie del terreno, poseen yemas en la cara ventral de donde se originan ramas y hojas, mientras que en la cara inferior generan raíces (Oronoz *et al*, 1993; Binh *et al*, 1990). Los hijuelos se originan cada año, siendo esta su forma comercial más importante de propagación, esto por que conserva sus características genéticas presentando un desarrollo rápido y vigoroso. El *agave tequilana* en edades de 6 a 8 años tiene un alto contenido de azúcares cuyos contenidos llegan a ser de hasta el 80 % de carbohidratos no estructurales por peso seco; mientras que las hojas verdes contienen cerca de un 20%. Los carbohidratos no estructurales son azúcares, almidones y otros polisacáridos que pueden ser hidrolizados a azúcares simples como fructosa y glucosa (Cedeño, 1995; Valenzuela, 1994).

2.2.4.3 Enfermedades del *Agave tequilana*.

La resistencia del agave tequilero a las enfermedades radica principalmente en la cutícula cerosa y por el contenido de fibras presentes en las hojas que cubren la cabeza rica en azúcares, una atractiva fuente de carbohidratos para los microorganismos (citado por Valenzuela, 1994). Dentro de los reportes de enfermedades fungosas en *A. tequilana* se encuentra la pudrición seca del pie ocasionada por *Fusarium sp.* y/o *Phytophthora sp.*; mancha foliar por *Botryodiplodia sp.*; mancha anular por *Didymosphaeria sp.*; y mancha foliar negra por *Rhizoctonia solana* (Virgen et al 2004). Los principales síntomas que presentan las plantas afectados por estos hongos se caracterizan por el endurecimiento del tejido de la cabeza, y la marchites en las hojas basales. La pudrición blanda del pie que se inicia en el tronco o pie de la planta adulta (mayores de tres años), presenta como primeros síntomas marchites en las hojas más viejas, que asciende hasta dañar el cogollo a la vez que descompone los tejidos del pie y cabeza de la planta. Se cree que *Phytophthora spp.* y/o *Phytium spp.* pueden ser los responsables de esta pudrición.

Así mismo, se describe una secazón de origen bacteriano, caracterizado por la marchites en las hojas iniciando esta desde la punta; además se representan exudados rojizos en la basa de las hojas. Se reportan a la bacteria *Erwinia spp.* como la responsable de esta enfermedad (Valenzuela, 1994; Veléz, 1997). La presencia de insectos también produce una disminución en los cultivos de agave, esto se debe a una enfermedad producida por la infestación de la larva del *Scyphophorus acupunctatus*; donde el adulto barrena los tallos de la planta, causando un daño mecánico además de consumir la planta al utilizarlo como almacén y sitio de desarrollo. Se cree que hay una relación simbiótica con los microorganismos que rompen los tejidos de la planta (Woodruff y Pierce, 1973).

2.3 ANTECEDENTES DE *Scyphophorus acupunctatus*

2.3.1 Clasificación de *Scyphophorus acupunctatus*.

Filo Artropoda

Clase Insecta

Orden Coleóptera

Familia Curculionidae

Genero *Scyphophorus*

Especie *acupunctatus*

(Booth *et al.*, 1990)

2.3.2 Sinónimos

Scyphophorus interstitialis, *S. anthracinus*, *S. robustior*, *Rhynchophorus asperulus*. Este último fue debido a que lo ubicaban en la subfamilia Rhynchophorinae y dentro de la tribu Sphenophorini.

La gente que trabaja en los cultivos de agave le llama "picudo" de agave por su principal característica de contener un pico largo.

2.3.3 Antecedente taxonómico

Existen solo dos especies del género *Scyphophorus* en el continente americano; una especie es *S. yuccae* Horn., selectivo por su distribución y hospedero, donde se alimenta de la *Yucca gloriosa* y *Y. whipplei* Koobele (Huxman *et al.*, 1997); la otra es *acupunctatus* Gyllenhae, encontrado en los cultivos de agave de todo el continente americano así como en algunas partes del mundo (Vaurie, 1971; Woodruff y Pierce, 1973).

2.3.4 Distribución.

El picudo *S. acupunctatus* es originario de América, pero ha sido introducido a otras partes del mundo (principalmente en regiones áridas y tropicales) con la distribución del *A. sisalana* para la producción de sisal. Esta especie se ha encontrado en plantas de la familia Agavaceae y Dracaenaceae. En el agave (en diferentes especies, por ejemplo se utilizan en la producción de fibras: *A. sisalana* (sisal) *A. fourcroydes* (henequén); bebidas: *A. tequilana* (tequila), o de ornamental: *A. americana*), *Beaucarnea*, *Dasyilirion longissimum*, *Dracaena draco*, *Furcraea*, *Yucca* (*Y. aloifolia*, *Y. elephantipes*, *Y. glauca*) (Vaurie, 1971; Woodruff y Pierce, 1973)

Principalmente se extiende a lo largo del hemisferio occidental principiando en el sur de Estados Unidos, casi todo México, las Antillas (Cuba, Jamaica, Haití), América central y el norte de Sudamérica (Vaurie, 1971). El primer reporte de la presencia de esta especie fuera de centro América fue en Tanganyika en 1914. En 1916 se reportó en Java y para 1927 ya había aparecido en Hawii. Actualmente se encuentra distribuido en África oriental y el primer reporte data de 1914 en los distritos de Pangani y Tanda es posible que a la fecha se encuentre en todos los países donde se cultive alguna especie de Agave.

Los primeros reportes de esta especie fue en Florida en 1957; otras apariciones fue en América central y actualmente se acepta que es el lugar de origen de esta especie (Lock, 1969).

2.3.5 Aspecto Ecológico.

Duges describió y dibujo por primera vez a la larva y pupa de *acupunctatus*, ahora conocido como el gorgojo sisal, y además mencionó que las plantas utilizadas como alimento era el maguey o planta centenario, tales como *Agave mexicana* y *A. cubensis*. En la última encontró todos los estadios morfológicos tal como larvas, pupa y adultos. Posteriormente en 1910 adicionó a la lista el *Agave*

americana y *Furcroea tuberosa*. En 1948 realizó estudios de la larva del *S. acupunctatus* de Arizona y México, reportando como planta huésped al *Agave*, *Dasyllirion*. En 1959 el departamento de agricultura en California agregó más huéspedes como el *A. atrovirens*, *A. attenuata*, *A. ferdinandiregis*, *A. lechuguilla* y *A. shawii* a demás agregaron como nuevo huésped a *Dracaena draco* (Vaurie, 1971).

Pérez (1950) menciona que el insecto *S. acupunctatus* se encuentra con más frecuencia en la parte interior del tronco y la raíz y que en casos severos, también se localiza en el cogollo y en el escapo. Prefiere plantas adultas y se encuentra más frecuente en plantas viejas, en plantaciones abandonadas y el adulto puede hallarse en todos los meses del año siendo más abundante en la época de lluvias.

Se menciona que desde 1957, es frecuente encontrar adultos en las bases de las hojas o en la parte superior del tallo o piña, y que el insecto tiende a concentrarse sobre las plantas que ataca. Lock en 1969 menciona que el hábitat favorito del adulto es bajo, en lo profundo de las axilas de las hojas de arriba adyacentes al cogollo, y tiene una preferencia por las hojas más jóvenes antes o inmediatamente después de que se han desdoblado. Menciona que además oviposita en los tejidos húmedos de hojas podridas o en las bases de las hojas, y que los adultos tienen una mínima incidencia sobre las plantas nuevas y donde el clima es húmedo.

2.3.6 Características morfológicas del *Scyphophorus acupunctatus*.

2.3.6.1 Características del Huevo.

Los huevos son blancos, ovoides y alargados con una longitud que varía de 1.3 a 1.7 mm, y un diámetro que oscila entre 0.50 y 0.60 mm. El periodo de incubación fue de tres a siete días con un periodo promedio cinco días. A medida que se aproxima a la eclosión, el huevecillo toma un aspecto ligeramente

amarillento. El corión es suave y delgado (membranoso) (Lock,1969; Ramírez, 1993).

2.3.6.2 Características de la Larva.

Las larvas recién emergidas no son más grandes que el huevo estas son de color blanco lechoso, e incluso la cápsula cefálica no presenta coloración; pero en pocas horas se torna café. Se presentan 5 instares en esta fase, se puede diferenciar uno de otro por el tamaño de la cápsula cefálica. En el ultimo instar la larva, primero barrena en busca de tejido fibroso para formar su capullo, para lo cual la larva comienza a efectuar movimientos giratorios. Dentro del capullo y sin desprender la exuvia entra en estado de prepupa, el aspecto de las larvas entre cada muda (cuando la larva cambia de piel) presenta la cabeza de color blanco, pero en pocas horas la cápsula cefálica se torna consistente y de color café. Las larvas presentan el cuerpo arrugado, curvado y es ápoda. El último segmento abdominal presenta dos procesos carnosos. Cada uno con tres setas estando dos en posición lateral y una en posición central (Lock,1969; Ramírez, 1993).

2.3.6.3 Características de la pupa

La pupa es de color blanco adquiriendo un color amarillo y posteriormente se torna negro. Se pueden observar movimientos giratorios en el abdomen debido posiblemente a estímulos externos (Lock, 1969; Ramírez, 1993).

2.3.6.3 Características del adulto.

El insecto dentro del cocón se desprende de la exuvia pupal apareciendo el adulto cuyos élitros no alcanzan a cubrir bien el abdomen en su parte posterior dorsal (Hopkinson y Mature, 1970).

2.3.7 Ciclo biológico en otros géneros de la familia curculionidae.

Existen otros géneros que tienen la mismas características en tamaño, color, etc., tal es el caso de picudo negro (*Cosmopolitas sordidus* Germar) el cual es un insecto plaga que ataca a las plantas de plátano y del banano a nivel mundial.

Los huevos son blancos y miden 1.8 mm y tiene un periodo de incubación de 3-12 días. La larva es blanca con la parte abdominal ensanchada, cabeza amarillenta y mandíbulas fuertes. El ciclo de vida de la larva varía entre 10 y 165 días, con un promedio de 70 días para América central. La pupa joven es blanca y presenta las características externas del adulto; este estadio dura de 4 a 22 días. Al emerger el adulto presenta una coloración rojiza que se torna pardo oscuro o negro, su tamaño se estima de 11-14 mm de largo y 4 mm de ancho. El daño es ocasionado por la larva, que al alimentarse dentro del rizoma, produce perforaciones que destruyen el sistema radical de la planta, debilitando de tal manera que se pueden volcarse fácilmente. Los túneles o galerías producidas en el rizoma, permiten la entrada de microorganismos que causan pudriciones, acelerando la destrucción de la planta (Gold y Messiaen, 2000).

Otro genero es el picudo de la palma (*Rhynchophorus palmarum*) plaga de la palma aceitera y el coco. La larva provoca el daño directo, debido a que se alimenta de los tejidos del tronco y en la región del cogollo. El ciclo de vida ha sido estudiado por varios autores. La etapa de huevo toma entre 2 y 4 días, del desarrollo larval es de 40-60 días, la pupa 20-30 días y el adulto vive por 45-60 días. En total el ciclo se cumple en 70-120 días (Giblin *et al*, 1989). Mexzón *et al* en 1994, cultivó a este insecto en condiciones de laboratorio empleando como sustrato la caña de azúcar, encontró que el ciclo de vida tiene un promedio de 120 días, y comprendió un periodo de incubación del huevo es de 3.5 días, la etapa larval de 60.5 días, pupa de 16 días y adulto 42 días.

2.3.8 Daño a los cultivos de Agave.

La disminución de los agaves es causada por una enfermedad que se debe a la infestación de la larva del insecto. Estas barrenan los tallos o piñas, favoreciendo la entrada a plagas secundarias y patógenos que causan una pudrición, llevando a la muerte de la planta (Siller, 1985), principalmente cuando el agave alcanza edades entre 6 y 8 años, coincidiendo con niveles altos de azúcares.

Varios aspectos biológicos de *S. acupunctatus* son la razón de que el insecto provoque la disminución de los cultivos de agave. Es una especie cuyos adultos barrena los tallos de la planta, causando daño mecánico además de consumir la planta que toma como almacén y que por una posible relación simbiótica con microorganismos dañan a los tejidos de la planta. Otros miembros de la subfamilia (Rhynchophorinae) atacan casi exclusivamente a las plantas monocotiledoneas y su larva son siempre asociadas con la necrosis del tejido de la planta (Woodruff y Pierce, 1973). Se creía que la presencia del *Aspergillus niger* van Tiegh, inducía la pudrición en el agave que había sido atacado previamente por *S. acupunctatus* (Vaurie, 1971). De esta manera, el agave que exhibe una infección microbiana concuerda con la presencia del insecto herbívoro. El *Scyphophorus acupunctatus* es considerado una plaga porque causa la muerte a los agaves cultivados y ornamentales, antes de florecer o de ser cosechados.

2.3.9 Hábitos generales de alimentación de los insectos.

Los carbohidratos representan un importante origen de energía para los insectos herbívoros especialmente durante el estado larvario. Algunos carbohidratos son más importantes que otros. Por esta razón los compuestos como la hexosa la mayor fuente de energía que necesitan las larvas, pero los canales alimenticios dependen de las hexosas específicas por ejemplo la fructosa es la más utilizada en un 100%; y así mismo la sacarosa se relaciona con el peso

del cocón (Valentine, 1983). Otros estudios muestran que la sacarosa causa un incremento en los canales alimenticios en las larvas de *Choristoneura fumiferana* y en el escarabajo mexicano. Finalmente, no todos los insectos son capaces de digerir almidones, y por lo general los carbohidratos utilizados por el insecto son mono y disacaridos (Friend, 1958).

Freind (1958) demostró que el contenido de nitrógeno en la dieta diaria es proporcional al desarrollo del insecto, así mismo, los niveles de proteínas solubles y aminoácidos pueden ser importantes para proporcionar la cantidad de nitrógeno total. El contenido de agua en los alimentos es de gran importancia para algunas especies de insectos, y a que el bajo contenido de agua puede reducir la eficiencia del nitrógeno (Mattson y Haack, 1987).

El contenido de minerales en el tejido puede conducir los cambios en el ambiente y promover el éxito de los insectos herbívoros. Por lo general el insecto requiere de altos niveles de nitrógeno, potasio, fósforo y magnesio. Por el contrario el alto contenido de calcio, sodio y potasio reduce la actividad alimenticia de algunos insectos; comportamiento similar ha sido observado con los iones sulfatos, yoduro y carbonatos (Chapman, 1974).

Las vitaminas no son necesarias para el insecto, pero pueden utilizar el complejo B, aunque algunas especies pueden recibir los compuestos necesarios por simbiontes presentes en el intestino (Dadd, 1973). El metabolismo secundario a través de los fenoles que se producen en respuesta a la invasión por insectos, influyen en todos los niveles en la interacción planta-insecto, como los terpenoides que constituyen la mayor parte de las resinas de las coníferas las cuales son importantes en la defensa contra insectos y patógenos (Levin, 1976). También, dentro de la planta juegan un mayor papel en la selección de planta-huésped por muchos insectos (Heron, 1965).

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Comportamiento y Ciclo Biológico del Picudo en Medios Artificiales y Tejido de *Agave tequilana*.

3.1.1 Recolección del Picudo *Scyphophorus acupunctatus* Gyll en plantas dañadas.

Para conocer y observar el ciclo biológico del picudo *S. acupunctatus* Gyll a nivel de laboratorio se procedió a la recolección de insectos adultos y larvas en en la procesadora de tequila "Los Camichines"; para esto fueron elegidos al azar las plantas que mostraban síntomas de la enfermedad (pudrición del cogollo y/o pigmentación rojiza en las bases de las hojas).

3.1.2 Condiciones de cultivo en el laboratorio.

Las colonias de los insectos se mantuvieron a 28°C en una estufa marca Felisa y una humedad relativa que varió entre 60 y 70% (Hidrómetro Brannan Thermometers, Cleator Moor, Cumberland U.K.) y un fotoperiodo de 10:14 hr (L:O) (lámpara de luz blanca fluorescente de 9 W), simulando las condiciones ambientales en campo.

3.1.3 Aumento de población de insectos en el tejido de *Agave tequilana*.

En el laboratorio las larvas y los adultos colectados fueron colocados en recipientes rectangulares de polietileno (20 x 27 x 8 cm), sobre trozos de hojas (5 x 0.5 cm) y tejido de agave sano (5 x 0.5 cm) para su reproducción y obtener un mayor número de insectos.

3.1.4 Selección de sexos de insectos adultos.

Los insectos fueron seleccionados y separados en machos y hembras (Ramírez, 1993) con la ayuda de un microscopio estereoscopio (Iroscope modelo ES-24 SPLIT).

Las hembras después de 30 días, se juntaron en las cámaras de cultivos con los machos, con el propósito de tener una misma camada de huevos y no perder la relación en tiempo del desarrollo de cada estadio así como la atracción entre sexos (apareamiento) y la oviposición.

3.1.5 Cultivo del insecto en trozos de tejidos de agave.

Para el cultivo del insecto se utilizaron recipientes de plásticos previamente esterilizados a 15 lb por 15 min en una autoclave (marca Presto). En estos se colocaron trozos de tejidos de agave e insectos adultos previamente desinfectados con soluciones de hipoclorito (100 mg/L) y benzal (0.1 %) para la eliminación de microorganismos presentes sobre el cuerpo del *S. acupunctatus* y evitar la rápida contaminación de los medios. Se colocó una población de 5 machos y 5 hembras, utilizando las condiciones mencionadas en las condiciones de cultivo. El contenido de azúcares reductores en el tejido completo es de 22-25 %; 20 % de fibra; 80% de humedad (datos proporcionados por el Laboratorio Agrícola de Tequila Cuervo).

3.1.6 Cultivo del insecto en medio preparado artificialmente.

Para la reproducción del picudo de agave, se utilizó el método descrito por Rahalkar *et al*, (1978) con algunas modificaciones. Este mismo cultivo se ha empleado para el cultivo gorgojo de la palma roja (*Rhynchophorus ferrugineus* Oliver).

3.1.6.1 Elaboración de los medios de cultivos artificiales.

3.1.6.1.1 Medio con bagazo o fibra de agave.

Con el bagazo que se obtuvo de la fabrica tequilera "Los Camichines", localizada en La Laja, Jalisco. Se lavó previamente con agua caliente, hasta quitarle la mayor cantidad de residuos de azúcares. Se secó en una estufa a 60°C durante 24 h. De la fibra limpia y seca se pesaron 60 gr para la preparación del medio y se esterilizó a 15 lb por 15 min. En los recipientes estériles se colocaron 300 g de medio, preparados previamente con la mezcla de todos los componentes (Apéndice) y con las diferentes soluciones de inulina, fructosa, sacarosa y jugo de agave. Se utilizó una población de 5 machos y 5 hembras; y el ensayo se lleva a cabo por triplicado.

3.1.6.1.2 Medio sin bagazo

En los recipientes estériles se colocaron 300 g de medio, preparados previamente con la mezcla de todos los componentes (Apéndice) y con las diferentes soluciones de inulina, fructosa, sacarosa y jugo de agave. Se utilizó una población de 5 machos y 5 hembras; y el ensayo se lleva a cabo por triplicado.

3.2 Identificación los Microorganismos Causantes del Daño al Tejido de Agave.

3.2.1 Recolección y preparación del tejido dañado.

Para el aislamiento microbiológico se empleo tejido dañado con apariencia similar a los mostrados en la Fig. 1; Estos se removieron con un bisturí estéril. Cada tejido fue previamente desinfectado superficialmente por 30 segundos con una solución de hipoclorito a la concentración (0.01 %) se lavó con agua destilada estéril tres veces y se continuo con el trabajo bajo condiciones asépticas. Se

eliminó la parte exterior de los segmentos sanitizados para eliminar residuos del hipoclorito y se cortaron en porciones pequeñas 0.5 x 0.5 cm (Vélez, 1997). Cada tejido se colocó en soluciones de agua peptonada (1 %) (Merck) y homogenizados con una espátula metálica estéril durante aproximadamente 2 minutos. Después se incubó en una estufa a 27°C durante 15 min.

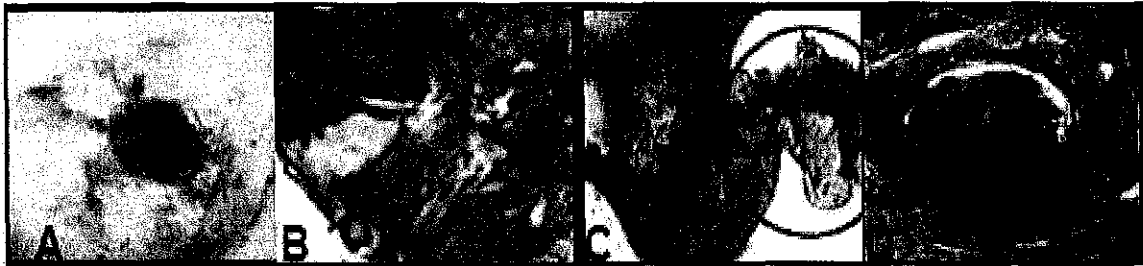


Figura 1: Diferentes grado de pigmentación del tejido. a) Túnel formado por la larva e inicio del pigmento y daño al tejido, b) Tejido de hoja con gran avance de pigmentación y olor a ácido orgánicos. c) Túnel entre piña y hojas con pigmentación media. d) tejido totalmente pigmentado.

3.2.2 Obtención del Intestino de las larvas sin desinfectar y de cultivos estériles.

Se seleccionaron 10 larvas al azar con el mismo tamaño 1.2 mm. La limpieza externa de las larvas se llevo acabo con la solución de hipoclorito (0.01 %), benzal (0.1%) y agua estéril. El abdomen del insecto se abrió y con pinzas estériles se removió el intestino (Fig. 2). Estos fueron colocados en soluciones de agua peptonada (1 %) y macerados con una espátula metálica estéril durante 2 minutos e incubado.

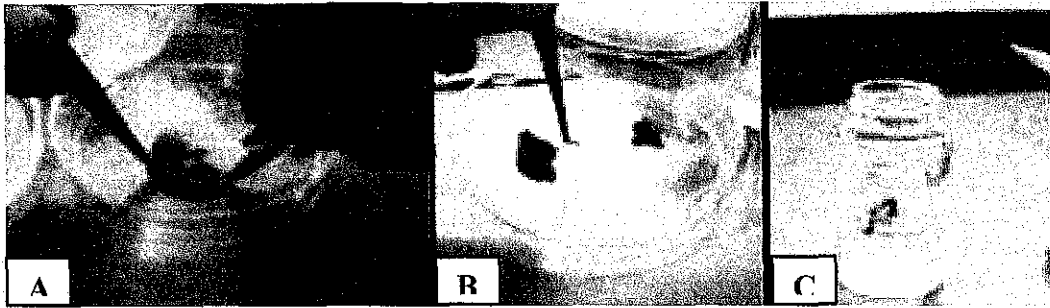


Figura 2: Obtención del intestino. a) Las larvas en disección (corte transversal) b) separación del intestino del cuerpo c) intestino en vial con agua peptonada.

3.2.3 Inoculación de las Muestras en Medios Cultivo Microbiológico.

3.2.3.1 Aislamiento microbiano a partir del tejido dañado e intestino larval

Para su aislamiento se utilizaron los siguientes medios selectivos: MRS-Bouillon para *Lactobacillus* (Merck), NSA (0.8% caldo nutritivo; 5% glucosa; y 1.8 % de agar) (Merck y Bioxon), Agar dextrosa papa PDA (Merck). Así como medios artificial preparados de la siguiente manera: fructosa (2%), Inulina (1.5 %) (Obtenida del jugo de agave); y jugo de agave (2%) cada uno, con la proporción de agar bacteriológico (2%) (Bioxon) e indicador de pH azul de bromofenol rango 3-4.5.

Para el aislamiento y purificación de las colonias se seleccionaron de acuerdo al tamaño, color y textura; y se realizaron diversas pruebas bioquímicas como tinción de gram, producción de gas a partir de glucosa, producción de ácido de sacarosa, glucosa y fructosa, hidrólisis de gelatina, oxidación-fermentación, decarboxilación de la lisina, licuefacción de gelatina. La temperatura de incubación fue de 27°C por 72 h.

3.2.4 Identificación de género y especie.

La identificación del género y la especie de los microorganismos purificados se llevo a cabo en el Departamento de Microbiología Sanitaria (CUCEI) de la

Universidad de Guadalajara. Empleando el sistema API 50 CHL Medium y API 50 CH Medium para bacterias ácida lácticas y Sistema API 20 C (43449, 43450) y API 20 E (43448) para levaduras y bacterias gram negativas respectivamente Marca bioMerieux.

3.2.5 Inoculación de los microorganismos en medios con Inulina, jugo de agave y tejido de agave.

3.2.5.1 Inoculación en medio de cultivo preparado con Inulina y jugo de agave.

Se prepararon cultivos de caldo soya-tripticosa con *R. mucilaginosa*, *L. mesenteroides*, *Erwinia* y *P. Paucimobilis* incubados a 27°C durante 24 h. Las cajas de cultivo se inocularon con cada microorganismos mediante estrías y se incubaron durante 24, 48 y 72 h a 27° C.

3.2.5.2 Inoculación de los trozos de agave.

Se prepararon nuevos cultivos con cada microorganismo, el cual serviría para la inoculación de los trozos de agave; sobre el tejido se colocó la cantidad de 10,000 unidades formadoras de colonias (UFC). Los trozos se colocaron en cajas petri estéril, y se incubaron desde 24 h hasta una semana a una temperatura de 27°C.

3.3 Determinación de los Pigmentos Rojizos y los Ácidos Orgánicos en el Tejido Dañado.

3.3.1. Análisis de los pigmento rojizo.

3.3.1.1 Selección de la muestra.

Para el análisis se usaron cuatro tonalidades de pigmentación presentes en el tejido, los cuales representan las diferentes tonalidades más comunes de los tejidos en estudio (Fig. 3).

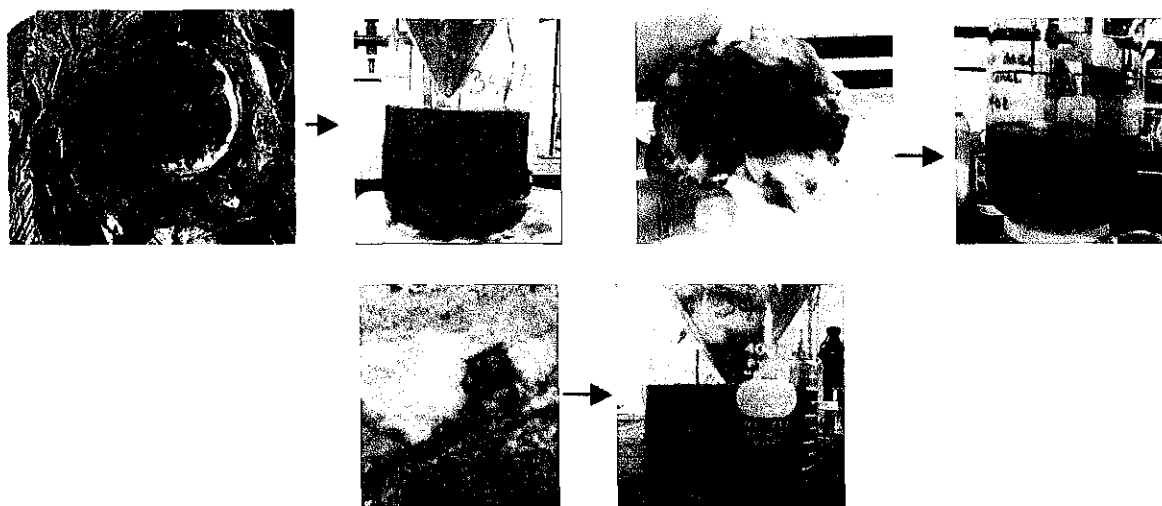


Figura 3: Comparación entre el tejido y la pigmentación obtenida. a) tejido con un alto grado de pigmentación en todo el centro de la piña concede un color rojo oscuro al extracto. b) Tejido con grado de pigmentación bajo en el túnel formado por la larva. c) Inicio de pigmentación en el tejido y olor a ácido orgánico.

3.3.1.2 Extracción de los pigmentos.

Se pesó 5.0 g de muestra fresca de cada uno de los tejidos coloreados. Estos fueron macerados en nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Después se llevo a cabo una extracción con 30 mL del solvente orgánico metanol:acetona (2:1) (extracto 1). La fibra obtenida fue secada y con acetona se extrajo todo el colorante (extracto 2); esta se decantó y por último la fibra se

extrajo con etanol (extracto 3). Cada uno de los extractos fueron evaporados mediante flujo de nitrógeno. A partir del extracto 1 se realizaron nuevas extracciones con solventes como éter etílico, acetato de etilo, agua y agua más cloruro de sodio al 10% (Sherman y Freid, 1991).

3.3.1.3 Purificación de los extractos mediante cromatografía de capa fina. (TLC)

Se emplearon cromatofolios de sílica gel 60 F254 (Merck) de tamaño 10 x 5 cm. Se aplicaron 3 mL del extracto concentrado en bandas de 2 mm. El sistema de eluentes denominados **sistema 1** se componen de hexano:acetato de etilo:ácido fórmico (20:19:1 v/v/v), y el **sistema 2** acetato de etilo:agua:ácido fórmico (85:15:10 v/v/v). El sistema 1 es para la identificación del ácido clorogénico y el sistema para los compuestos fenolicos.

3.3.2 Determinación los ácidos orgánicos.

3.3.2.1 Determinación de ácidos totales por el análisis volumétrico.

Se pesaron 5.6 g de muestra que presentaba una coloración rojiza a la que se le adiciono 150 mL de agua destilada, para ser homogenizados mediante la trituración con una licuadora. El extracto fue filtrado en papel whatman # 2, y la solución filtrada se aforó a 200 mL con agua destilada. En un matraz Erlenmeyer de 250 mL se colocaron 50 mL de la solución extraída. En una bureta de 50 mL se adicionó NaOH (0.05 N). Con la ayuda de un potenciometro (Conductronic pH10, digital pH meter) se registró gradualmente el pH, cada vez que se agregaba NaOH.

3.3.2.2 Determinación de ácido láctico mediante espectrofotometría de UV-Vis.

3.3.2.2.1 Preparación de la muestra:

La extracción de la muestra se llevó a cabo el mismo procedimiento descrito previamente. El sobrenadante obtenido se decantó tomando un volumen de 10 mL; agregando a este 0.1 mL de H_2SO_4 (1:1), y 0.4 mL de $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$ (20%). (AOAC 32.041).

Para la preparación de estándares de ácido Láctico, fueron tomados 55 μ L de ácido láctico puro (Merck). Este se aforó a 10 mL con agua destilada. La solución se transfirió a un extractor de líquido con 0.2 mL de H_2SO_4 (1:1).

3.3.2.2.2 Técnica de extracción.

En el matraz de extracción se colocaron 40 mL de éter etílico, en el cual se llevo a cabo una extracción mediante reflujo continuo por 4.5 h. Posteriormente se agregaron 20 mL de agua destilada y se evaporó el éter en un baño de María. El extracto fue titulado y neutralizado Hidróxido de bario ($Ba(OH)_2$) (0.1 N), utilizando indicador de pH fenolftaleina. El extracto neutralizado se transfirió a un matraz volumétrico de 200 mL y se filtro (AOAC 16.030).

De esta solución se colocaron 50 mL en una bureta y se tomó el volumen indicado en la tabla 4 apendice (AOAC16.029).

3.3.2.2.3 Determinación del ácido láctico

A matraz volumétricos de 50 mL de cada estándar y muestra, se adicionó 6.6 mL de HCl 0.1 N y 40 mL de agua destilada. A cada matraz se le agregaron 400 mg de carbón activado tratado, se calentaron en un baño de María durante 10 min. Se enfriaron a temperatura ambiente, se aforo a 50 mL y después se filtro. De cada solución se midieron 40 mL y se agregaron 5 mL de $FeCl_3$ (0.03 N). Y

finalmente se afora a 50 mL y se leyó en el espectrofotómetro de UV-VIS a 360 nm (AOAC 16.031).

3.3.3 Cuantificación de los ácidos orgánicos por cromatografía de gases.

Aproximadamente 15 g de tejido dañado fue exprimido con la ayuda de un exprimidor de limones para obtener el jugo en conjunto con los ácidos formados.

3.3.3.1 Destilación a presión reducida.

Se colocó 5 mL del jugo obtenido en un matraz bola de 20 mL, y éste se conectó al tubo refrigerante y en el extremo se encontraba el tubo recolector de 10 mL, con el fin de separar los residuos de azúcares. El destilado se usó para la determinación de ácidos orgánicos por cromatografía de gases.

3.3.3.2 Condiciones y equipo:

Se utilizó un cromatógrafo de gases (GC) marca Perkin Elmer modelo autosystem, detector de ionización en flama (FID), columna empacada (4%) carbowax 20 M on carbograph 1 DA, temperatura del horno 180°C, gas carrier helio, flujo 20 mL/min, volumen de muestra 1 µL. Se inyectó en las mismas condiciones el estándar de ácido fórmico, acético, butírico, propiónico y láctico.

3.4 Conocer el comportamiento de las larvas en presencia de cristales de oxalato de calcio medios de cultivos.

3.4.1 Obtención de los cristales de oxalato de calcio.

Las hojas de agave fueron cortadas en tiras finas y se colocaron en un vaso de precipitado de 500 mL con agua destilada hasta cubrir la fibra. Esta se dejó reposar por 20 min, y con ayuda de unas pinzas se tomarán las tiras para ser

agitadas en el agua destilada durante 3 min. Se dejó sedimentar y posteriormente se filtraron a través de un papel whatman # 1.

Se dejó secar al ambiente (27°C) y se removieron los cristales con ayuda de un pincel, y con poca agua. Finalmente se obtuvieron los cristales de oxalato de calcio en forma de rafidios (Salinas *et al*, 2001)

3.4.2 Efecto sobre las larvas del picudo.

Los cristales de oxalatos obtenidos se colocaran en placas de agar nutritivo. Esta placa se divide en dos zonas. Un zona con rafidio y la otra zona sin rafidio (control); se colocaron un numero total de 15 larvas recién emergidas y 10 larvas de tercer instar en cada repetición se colocaron 5 individuos. Se observó la migración de las larvas a la zona de rafidio y sin rafidio durante una semana.

4 RESULTADOS

4.1 Ciclo biológico del picudo en condiciones de laboratorio empleando medios artificiales y tejido de agave.

Durante el cultivo del *S. acupunctatus* en el medio con jugo de agave y en el tejido de agave sano, se encontraron los diferentes estadios morfológicos que indican el orden de los coleópteros: huevo, larva, pupa y adulto. La duración del ciclo biológico promedio en el medio de jugo de agave fue de 111 días, distribuidos en cuatro etapas de desarrollo, el huevo de 5 días, la larva de 85 días, la pupa de 11 y el adulto de 6 días para salir del capullo formado en el medio (Fig. 4 y tabla 1).

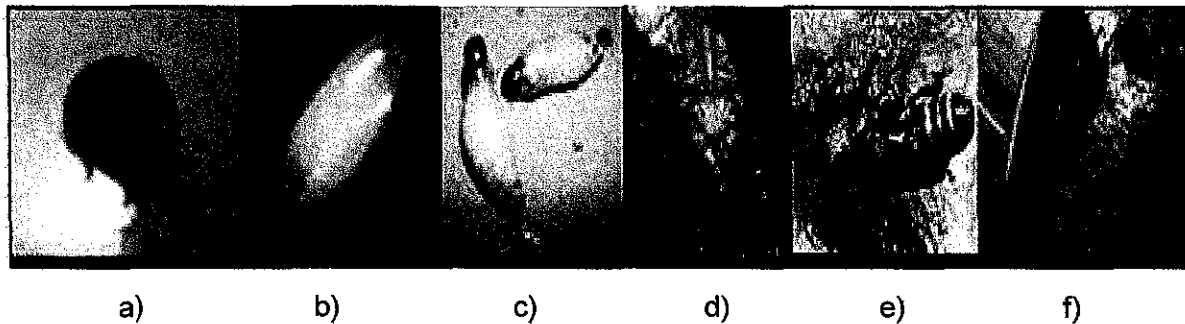


Figura 4. Estadios morfológicos del *Scyphophorus acupunctatus* en jugo de agave: a) apareo b) huevo (4x) c) larva d) pupa e) adulto recién salido de capullo y f) adulto.

Se observó que las hembras ovipositan en los agujeros que ellas y los machos hacen al alimentarse; las hembras para poner el huevo se echan hacia atrás hasta poner en contacto el ovipositor con el sustrato. Después de eclosionar los huevos, las larvas presentan una cavidad bucal masticatoria, donde sobresalen un par de mandíbulas cónicas. El color del tegumento varía de blanco en larvas recién emergidas a un amarillo tenue en larvas de mayor tamaño, el cual puede acentuarse antes de la pupación. Durante el inicio de la pupación, la larva remueve el sustrato para construir el capullo, dentro de este la larva genera movimientos giratorios en la parte inferior del cuerpo, y en un promedio de 4 días se genera la metamorfosis donde se forma el aparato bucal, las patas, las alas, y

el cambio de color a negro. Después de 6 días el adulto sale del capullo cumpliendo así su ciclo biológico y el comienzo del cortejo previo a la cópula entre los machos y hembras jóvenes. En la cópula el macho sube sobre la hembra, la aprieta y se sujeta con las patas; se inclina hacia atrás y curva el abdomen hacia abajo para buscar la copulación teniendo una duración de fecundación de 21 días.

Tabla 1: Cultivo del *S. acupunctatus* en medios preparados con jugo de agave.

Estadíos morfológicos	Días (media)
Cópula a oviposición	21 (\pm 0.98)
Huevecillo-larva	5 (\pm 0.69)
*Larva-prepupa	85 (\pm 1.62)
Prepupa-pupa	4 (\pm 0.78)
Pupa-adulto	11 (\pm 2.13)
Adulto dentro del capullo	6 (\pm 1.1)
Ciclo biológico	111

* Los datos son promedios \pm error estándar (n=20 individuos)

En el cultivo con tejido de *A. tequilana* el ciclo biológico tuvo una duración promedio de 105 días distribuidos en las cuatro etapas de desarrollo, cumpliendo 5 días de huevo a larva, de 78 días de larva a pupa, 11 días de pupa y 6 días para que el adulto salga del capullo formado con la propia fibra del agave (Fig. 5 y tabla 2).

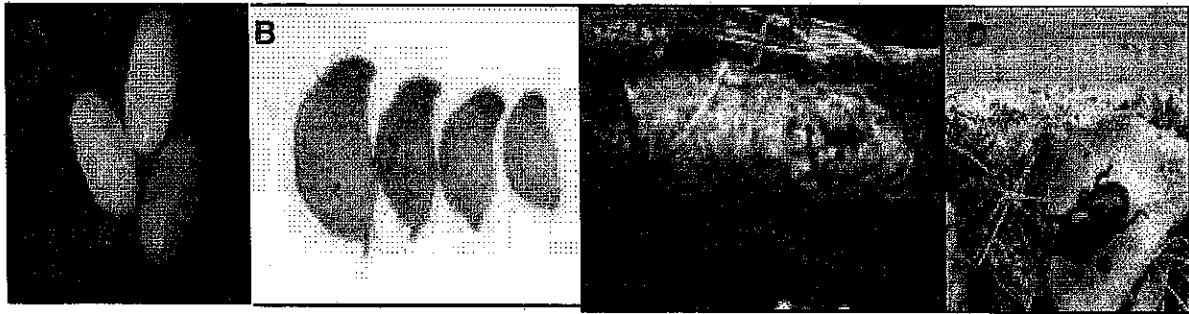


Figura 5: Estadios morfológicos del *S. acupunctatus* en tejido de agave: a) huevo (4x) b) larvas distintos instares c) capullo y pupa d) adulto.

Los hábitos del insecto en todo el ciclo estudiado dentro del tejido de agave son semejantes a los encontrados en el cultivo con jugo de agave. Solo existió una diferencia entre ambos cultivos, en el tiempo que transcurre el desarrollo larvario con una diferencia de 7 días, en la prepupa de 2 días y la permanencia del adulto activo dentro del capullo de 1 día. También en ambos cultivos se observó que el estadio de larva a prepupa registró un mayor número de días, y de huevecillo a larva y adulto a capullo es de menor número de días.

Tabla 2: Cultivo de *S. acupunctatus* en trozos de tejido de *A. tequilana*

Estadios morfológicos	Días (media)
Cópula a oviposición	21 (± 1.05)
Huevecillo-larva	5 (± 0.50)
*Larva-prepupa	78 (± 0.95)
Prepupa-pupa	6 (± 0.83)
Pupa-adulto	11 (± 1.36)
Adulto dentro del capullo	5 (± 0.91)
Ciclo biológico	105

* Los datos son promedios \pm error estándar (n=20 individuos)

Se realizó un experimento opcional empleando piñas de agave recién jímadas, con las mismas condiciones de laboratorio y un tiempo de estudio de 94 días dio como resultado el siguiente número de población (Tabla 3) en donde se encontraron todos los estados morfológicos del insecto. En el transcurso de este tiempo se generó una nueva generación de adultos jóvenes la mayoría machos (10 individuos), los cuales junto con los adultos longevos (10 ind.) fecundaron a las hembras longevas (10 ind.) y jóvenes (5 ind.), encontrando una gran población de huevos y larvas de diferentes tamaños, prepupas y pupas. Las larvas medianas y grandes se encontraron distribuidas en la mayor parte de la piña; los huevos y las larvas recién emergidas se localizaron cerca de las bases de las hojas, las pupas en las hojas por el alto contenido de fibra que le sirve para hacer su capullo.

Tabla 3: Desarrollo del *S. acupunctatus* en cabezas o piñas de *A. tequilana*

Estado morfológico	Número de individuos
Huevo	17
Larvas :	
recién emergidas (<3 mm)	22
Chicas (3-6 mm)	28
Medianas y grandes (7-15 mm)	26
Prepupas	3
Pupas	8
Adultos	35 (*)

Nota * en este número se contemplan los adultos iniciales

4.2 Identificación de los microorganismos asociados al daño del tejido de agave.

Después de 24 h de incubación en los diferentes medios de cultivos de jugo e inulina de agave con indicador de pH, MRS (*Lactobacillus*) y PDA (hongos y levaduras); se encontraron crecimientos de tres géneros bacterianos dos gramnegativas y una grampositiva; y cuatro especies de levaduras y ninguna especie de hongos. La identificación de cada microorganismos se llevo a cabo con el sistema API indicando a las bacterias gramnegativas como *Pseudomonas paucimobilis* y *Erwinia spp*; y la grampositiva como *Leuconostoc mesenteroides* (Fig. 6 A). Las levaduras identificadas fueron *Candida moris*, *C. famata*, *C. glabrata* y *Rhodotorula mucilaginosa* (Fig. 6 B).

Se observó que solo las especies de *Candida*, *Rhodotorula* y *Leuconostoc* se presentaron continuamente en los tejidos con mayor grado de enfermedad o daño y con alto contenido de acidez, mientras que *Pseudomonas* y *Erwinia* solo se encontraron en tejido poco dañado.

En el intestino de las larvas cultivadas en medios artificiales se encontraron *Rhodotorula*, *Leuconsotoc*, y poco frecuente *Pseudomonas* y *Erwinia*; mientras las procedentes de tejidos enfermo se encontraron todas las especies antes mencionadas.

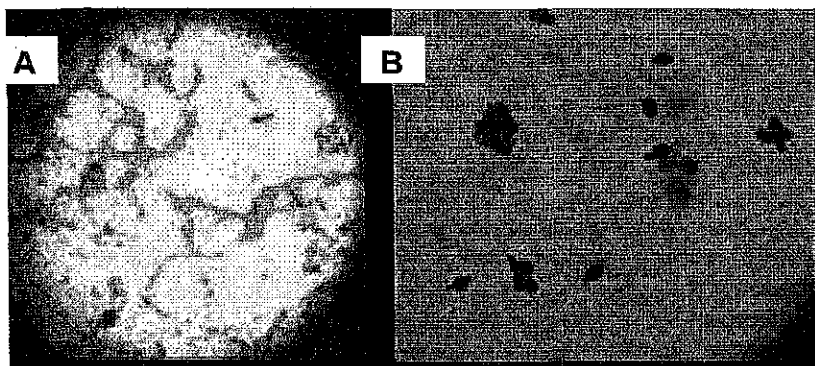


Figura 6. Observación microscópica (100X) de la tinción de gram A) cocos Gram (+) *L. mesenteroides* B) levadura *R. mucilaginosa*

En los ensayos realizados en medios de cultivos bacterianos se observó que la levadura *Rhodotorula mucilaginosa* presentó un cambio de color amarillo en la zona de descarga, debido al cambio realizado por el indicador que se lleva a cabo en un rango de pH 3 (ácido) esto por la la formación de acidez en el medio (Fig. 7 A), este efecto que se lleva a cabo a las 48 h de incubación a 27°C, en comparación con las bacterias gram (-) que no hubo crecimiento. En la Fig. 7B se observa un ligero cambio de color en la caja inoculada con *R. mucilaginosa* a las 24 h de incubación, por la producción de acidez a partir del contenido de azúcares presentes como fructosa y glucosa libre en el jugo. Mientras las bacterias empezaron a crecer después de 36 h para *L. mesenteroides*, y 96 h para *Pseudomonas* y *Erwinia* estas ultimas no generaron nunca cambio de color en el medio.

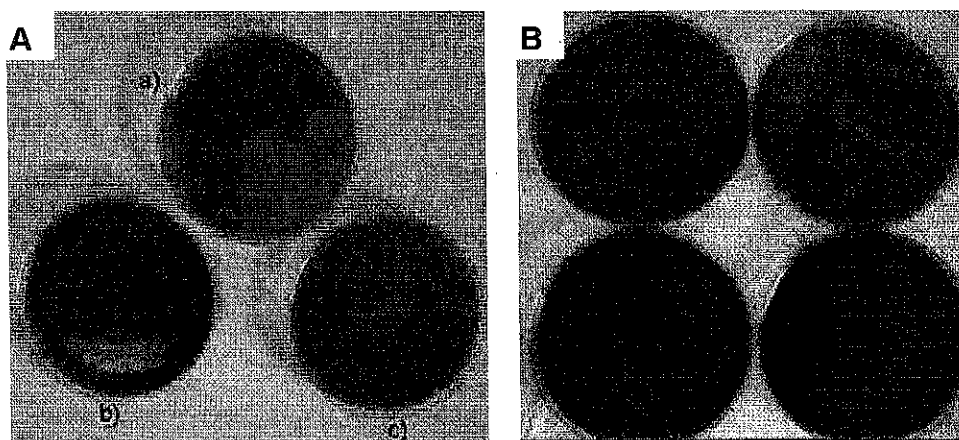


Figura 7: Desarrollo de microorganismos inoculados en medios de cultivos solidos A: Medio de jugo de inulina inoculado con: a) *Rhodo mucilaginosa*, b) *P. paucimobilis* y c) *Erwinia spp.* **B:** Medio jugo de agave inoculado con a) *L. mesenteroides* b) *Rhodo mucilaginosa*, c) *P. paucimobilis* y d) *Erwinia spp.*

En la Fig. 8 B se observa el cambio total del color en el medio por *R. mucilaginosa*, el cual se lleva a cabo por la hidrólisis de la inulina y la fermentación de azúcares ocasionando un fuerte olor a etanol desde las primeras 24 h de desarrollo, y por consecuencia la disminución de pH generado por el aumento en

la producción de ácidos orgánicos como ácido láctico y ácido acético.

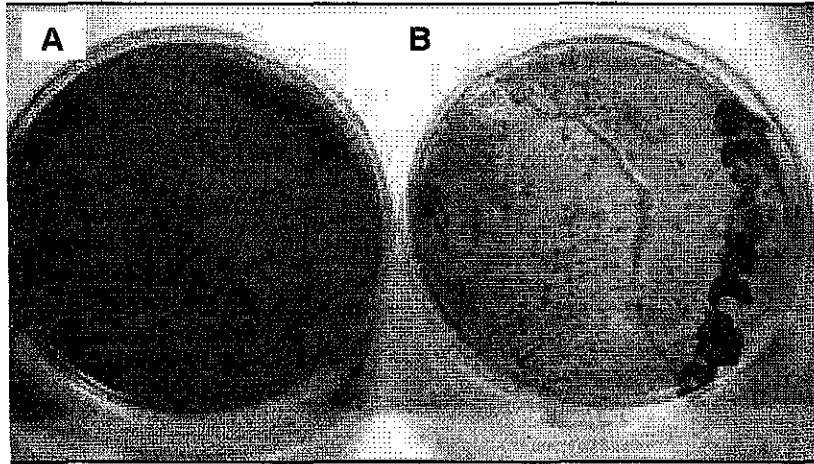


Figura 8. Crecimiento de *Rhodo mucilaginoso* en el medio de inulina después de 72 h de incubación. **A:** Caja de medio control. **B.** Modificación del pH del medio durante la producción de ácido láctico y acético generado durante la hidrólisis de la inulina.

En el tejido de agave sano de 4 x 6 cm inoculado con aproximadamente 10,000 unidades formadoras de colonia (UFC) de *L. mesenteroides* se observó un daño severo a las 24 h de incubación y el desarrollo de una pigmentación café-rojizo (Fig. 9), la consistencia del tejido fue blanda y con un aroma a ácido láctico. Así mismo, a un trozo tejido se le agregó ácido láctico al 0.1 mM, este presentó características físicas similares al tejido dañado por *L. mesenteroides*.

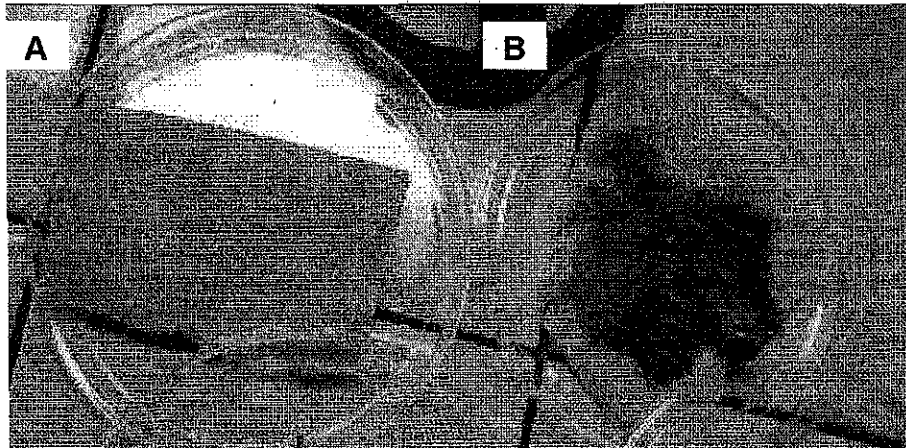


Figura 9. Aspecto físico del tejido inoculado con *L. mesenteroides*. Tejido control (A) Tejido dañado y pigmentado (B).

El tejido con *R. mucilaginoso* mostró una ligera tonalidad roja a las 48 h de

inoculación (Fig.10), lo que indica que el daño es más lento que el ocasionado por *L. mesenteroides*. Después de cinco días de incubación el tejido inoculado con *Pseudomonas* y *Erwinia* no presentó ningún cambio de coloración en el tejido; por lo que consideramos que los microorganismos que generan el mayor daño al tejido son *Rhodo mucilaginoso* y *L. mesenteroides*.

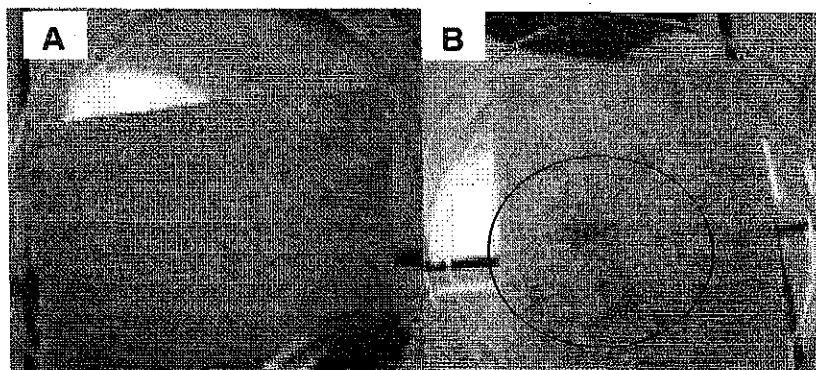


Figura 10. Aspecto físico del tejido inoculado con *R. mucilaginoso* (B) y tejido control (A). Generación de pigmentos a las 48 h de inoculación.

4.3 Determinar y caracterizar la naturaleza química del pigmento rojizo y cuantificar los ácidos orgánicos generados durante la pigmentación del tejido de la planta

4.3.1 Naturaleza química de los pigmentos.

La extracción es muy importante para la búsqueda natural de compuestos fenólicos, flavonoides, carotenos entre otras sustancias que generan pigmentación a cualquier tejido dañado.

La cromatografía de capa fina de las Fig. 11 y 12, sugieren una mezcla de sustancias fenolicas y del acido clorogénico, en el extracto crudo de cada tejido dañado y sano.

En la Fig. 11 A revelada con luz visible, se observó una fracción barrida en

la parte superior de la placa, correspondiente a una mezcla de sustancias fenólicas y en el centro una fracción con índice de referencia de Rf 0.28 correspondiente al estándar de ácido clorogénico. La Fig. 11 B revelada con luz ultravioleta, se observa con más claridad las fracciones barridas en todas las muestras analizadas, estas presentan seis bandas y una corresponde al ácido clorogénico (marca azul), en comparación al tejido sano que presenta solamente cuatro bandas claras y la del ácido clorogénico.

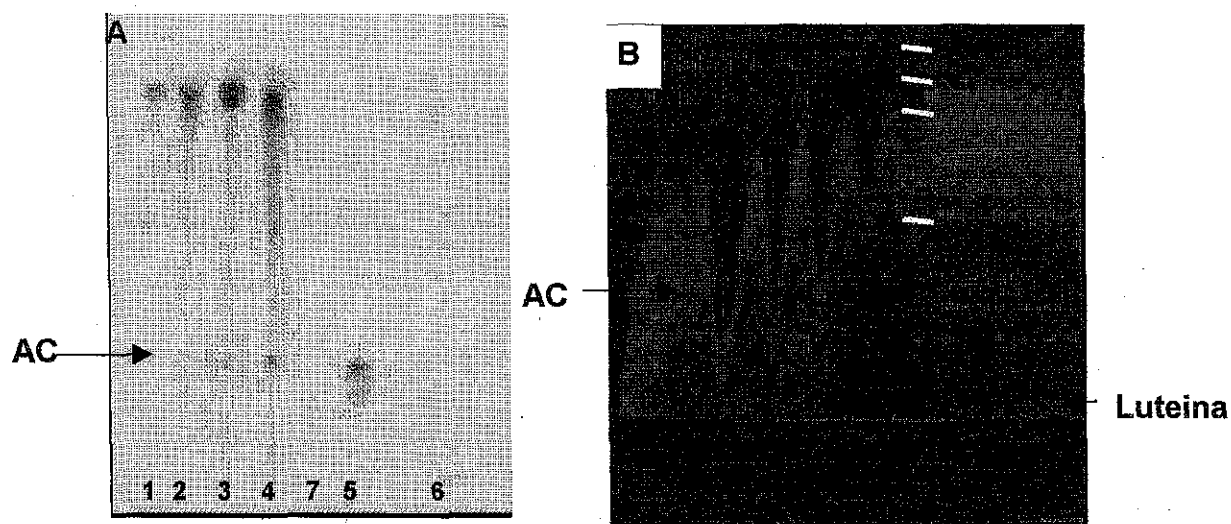


Figura 11. Identificación de Ac. Clorogénico: Cromatografía de Capa Fina en el sistema 1 acetato de etilo-agua-ácido fórmico (85:15:10 v/v/v). Aplicación 1: tejido rojo 2: tejido café-rojizo 3: tejido café claro 4: tejido negro 7: tejido sano 5: estándar ácido clorogénico (AC) 6: estándar luteína. **A:** revelado con luz visible **B:** revelado con luz UV.

La Fig. 12 A y B todos los extractos analizados son una mezcla de mas de seis sustancias fenólicas, las cuales corresponden a la fracción barrida presente en el sistema 1. El extracto del tejido sano mediante luz visible sugiere únicamente la presencia de ácido clorogénico en el origen de la CCF, mientras que los extractos de los tejidos dañados sugieren cuatro sustancias más el ác. clorogénico. En la Fig. B revelado con luz UV el extracto del tejido rojo y café-rojizo se observan seis fracciones con mayor intensidad que con respecto al tejido sano y los extractos del

tejido café claro y negro con cinco fracciones, esto se deberá a la activación de estas sustancias durante la presencia del insecto. Los compuestos fenólicos encontrados no fueron identificados.

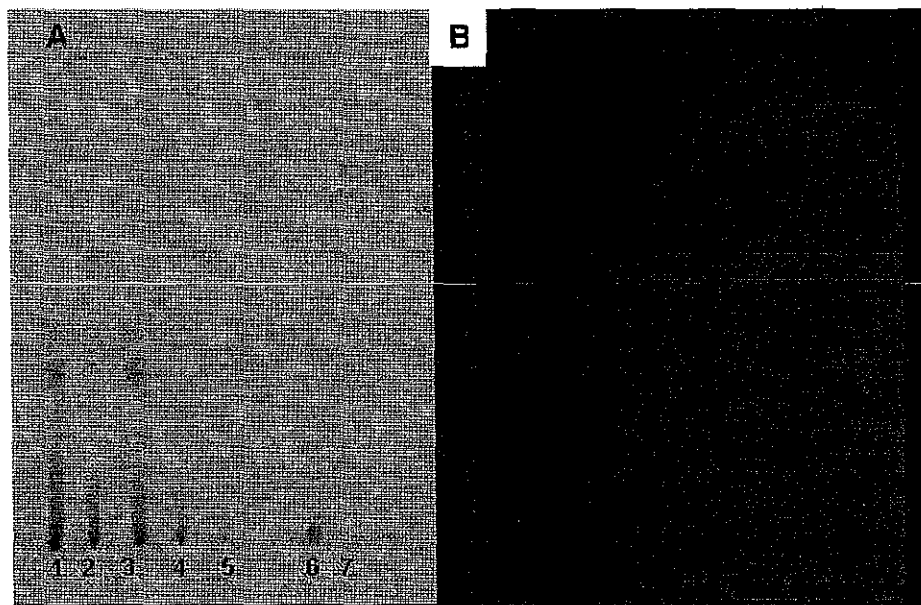


Figura 12. Identificación de compuestos fenólicos: Cromatografía de Capa Fina en el sistema 2 hexano-acetato de etilo-ácido fórmico (20:19:1 v/v/v). Aplicación 1: tejido rojo 2: tejido café-rojizo 3: tejido café claro 4: tejido negro 5: tejido sano 6: estándar ácido clorogénico 7: estándar luteína. **A:** revelado con luz visible **B:** revelado con luz UV.

Por otra parte, se realizó una reacción de oxidación del ácido clorogénico como precursor de la pigmentación mediante la actividad de peroxidasa en presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

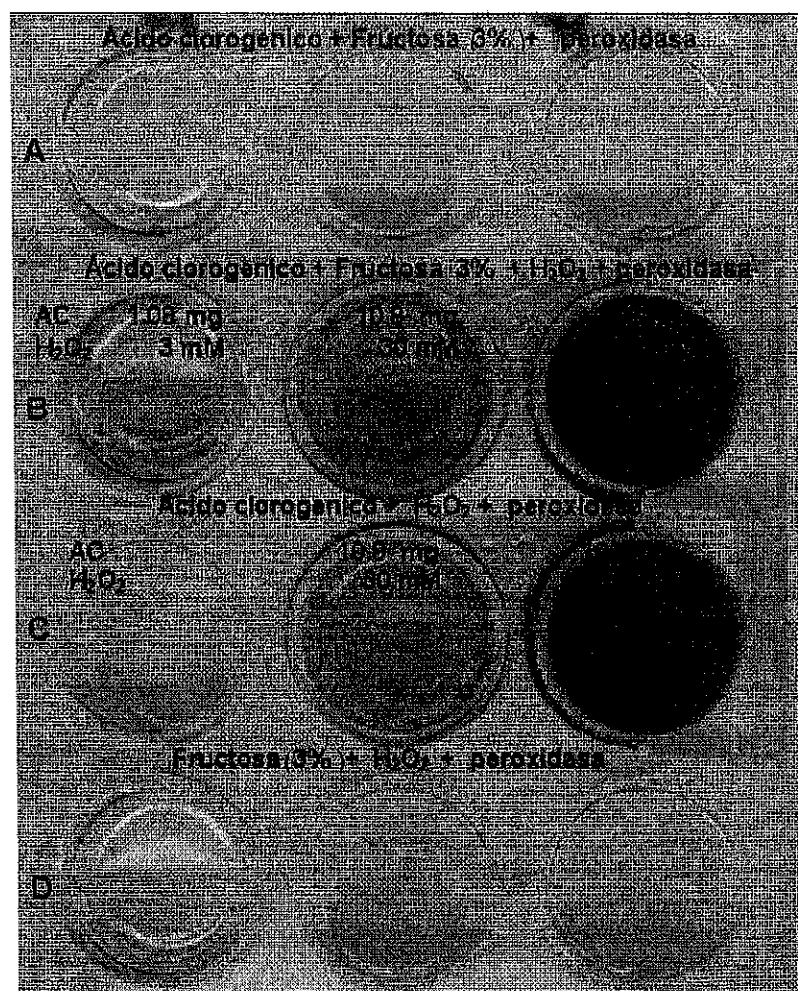


Figura 13: Reacción oxidativa del ácido clorogénico expuesto a distintas concentraciones de peróxido de Hidrogeno (H_2O_2) y con 30 U de peroxidasa.

La Fig. 13 ejemplifica el fenómeno que ocurre en las plantas. La reacción de oxidación del ácido clorogénico se lleva a cabo por el peróxido de hidrógeno, ya que sin estar presente alguno de estos compuestos no existe la producción del color (Fig. 13 A y D) aun cuando este presente la peroxidasa como agente oxidante.

Una reacción de pigmentación se forma durante la oxidación de ácido clorogénico por acción de la peroxidasa. Pero esta reacción se activa en mayor proporción durante el aumento en las concentraciones del ac. clorogénico y

peroxido de hidrogeno que activan a la enzima, provocando el aumento del color que va de amarillo, pasando por rojo intenso hasta café o negro (Fig. 13 B y C).

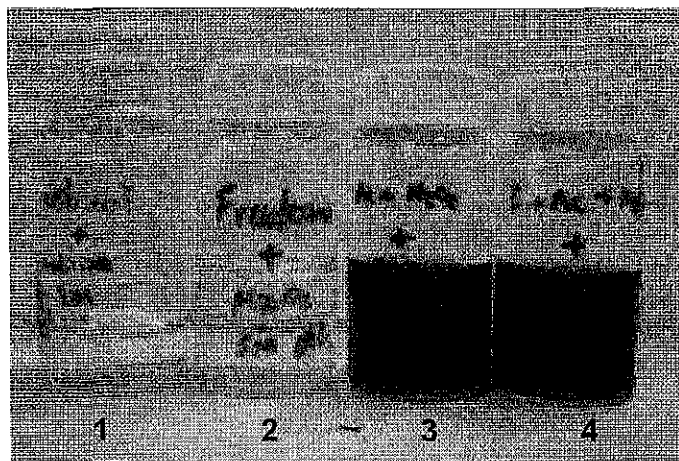


Figura 14: Oxidación del ácido clorgénico por actividad de peroxidasa.

La Fig. 14 representa a la figura anterior, se observó que ha mayor concentración de H_2O_2 existe una mayor pigmentación en la solución a rojo oscuro (Tabla 4). Y que el añadir fructosa y ácido láctico a las soluciones sustancias presentes en el tejido de agave dañado, estas no proporcionan actividad alguna en la producción de pigmento. Siendo así los agentes principales en la reacción son el ác. clorgénico y el peroxido de hidrogeno.

Tabla 4: Condiciones de oxidación en la reacción del ac. clorogénico expuesto a 300 mM de peróxido de hidrógeno y 30 U de peroxidasa.

1	H ₂ O ₂ (300 mM)		Ácido clorogénico (30 mM)		Fructosa (3 %)
2	H ₂ O ₂ (300 mM)			Ácido Láctico (5 mM)	Fructosa (3 %)
3	H ₂ O ₂ (300 mM)	Peroxidasa (30 U)	Ácido clorogénico (30 mM)		Fructosa (3 %)
4	H ₂ O ₂ (300 mM)	Peroxidasa (30 U)	Ácido clorogénico (30 mM)	Ácido Láctico (5 mM)	Fructosa (3 %)

4.3.2 Cuantificación de los ácidos orgánicos

En el proceso de fermentación se generan ácidos orgánicos de cadena corta por microorganismos específicos, tales como los ácidos fórmico, acético, propiónico y láctico. El análisis mediante volumetría ácido-base se encontró una acidez total de 30 mM Kg⁻¹ de tejido por peso fresco. La determinación del ácido láctico mediante espectrofotometría UV-Vis reveló una concentración de 0.1 mM Kg⁻¹ de tejido.

Al emplear la cromatografía de gases se confirmó la presencia de los ácidos acético y láctico, en una concentraciones de 0.1 mM y de 10 mM por Kg de tejido por peso fresco respectivamente.

4.4 Comportamiento de las larvas en presencia de los cristales de oxalato de calcio en medios de cultivos.

Es conocido que los cristales de oxalato de calcio son utilizados como mecanismo de defensa de la planta hacia la invasión de plagas; la distribución de cristales en la plantas de agave están presentes en mayor cantidad en hojas que

en las "piñas", de este resultado experimental no existe referencia que soporte estos datos.

No hubo un efecto que indique la repulsión de las larvas hacia los cristales de oxalato de calcio, debido que se estuvieron desplazando por todas las zonas de estudio. Además durante la migración se observó una fuerte producción de CO₂, etanol y ácidos orgánicos generados de la fermentación de los azúcares del medio, lo cual no permitió tener buenos resultados, ya que después de cinco h de exposición se observaron la muerte de algunas larvas, y conforme el tiempo paso se fueron muriendo en mayor numero, este efecto se llevo principalmente en las larvas recién emergidas (primer instar).

Migración larval a zonas con cristales de oxalato de calcio

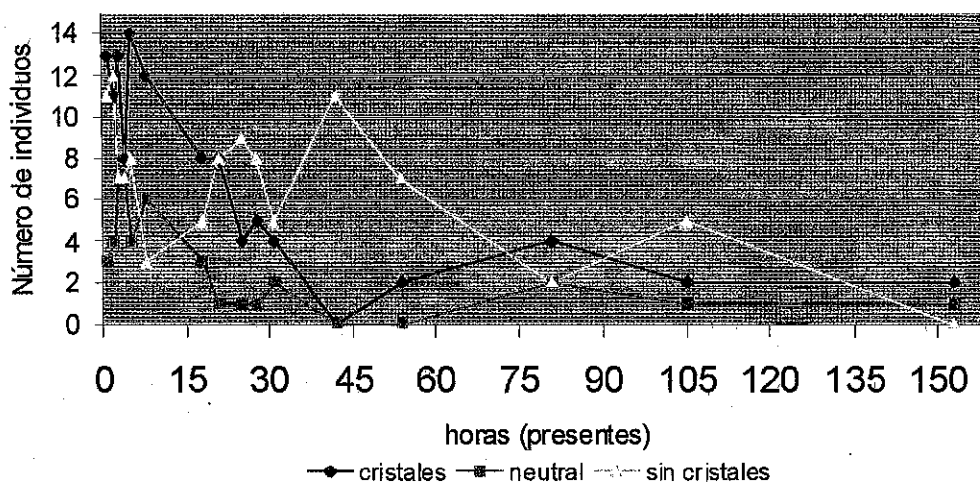


Figura 15: Migración larvario a zonas con cristales de oxalato de calcio, a diferentes intervalos de tiempo.

5 DISCUSION

El picudo es considerado la principal plaga que ataca al género de Agave, alimentandose y cumpliendo su ciclo de vida en el interior de ella (Woodruff y Pierce, 1973). Sin embargo, es escasa la información disponible sobre estudios relacionados con el ciclo biológico en especie de importancia económica, como es el caso del *Agave tequilana*.

Los primeros estudios completos sobre su ciclo biológico del picudo fueron realizado en el *A. fourcroydes* Lem (henequén). Ramírez 1993 encontró una duración del ciclo de 133 a 137 días, desde huevo hasta adulto. Las condiciones de estudio fueron a una temperatura de 27°C, humedad relativa de 62 a 93% y con tejido de agave dañado como alimento. En estas condiciones encontró una duración promedio de 5 días para la eclosión del huevo, 108 días de periodo larval, de prepula 8-10 días y pupa de 12-14 días.

En el *A. sisalana* Perenne, Hill en 1983 descubre que el ciclo biológico puede variar entre 50 y 90 días dependiendo las condiciones ambientales (cultivo *in vivo*) con 4 a 5 generaciones por año; cada estadio morfológico presento una duración de 5 días en huevo, 21-58 días el estado larvario, pupa de 12 a 16 días pudiendo variar de 7 a 23 días. Para el estudio con el agave pulquero (*A. atrovirens* kart.) y en condiciones del laboratorio el ciclo dura 81 días (Siller, 1985), con un periodo de incubación de los huevos de 8 días, el estado larvario de 58 días y pupa de 13 días.

En este trabajo el cultivo del picudo se llevo a cabo con el tejido *A. tequilana* como testigo en el cual se halló una duración de 105 días (Fig. 2 a-d), mientras que en el medio artificial elaborado con jugo de agave duró 111 días pasando por todos sus estados morfológico en ambos cultivos (Fig. 1 a-f). Las condiciones de cultivo en el laboratorio con una temperatura de 27°C±2, humedad relativa de 60-70% y un fotoperíodo de 14 h luz: 10 h oscuridad (L:O). La variación existentes entre cada especie estudiada, puede corresponder a la falta de condiciones

reguladas como la temperatura, humedad y luz, así como al efecto nutritivo que tuvo el medio de cultivo sobre el desarrollo del insecto.

Como resultado de las disecciones del intestino de las larvas en crecimiento aséptico, como de las obtenidas de las plantas dañadas, se encontraron los mismos microorganismos con excepción de algunas levaduras del género *Candida*, que sólo estaban presentes en las larvas y el tejido procedente de plantas dañadas.

En el tejido de agave dañado se encontraron *Rhodotorula mucilaginosa*, *Candida moris*, *C. glabrata*, *C. famata*. Estas observaciones coinciden parcialmente con lo reportado por Waring y Smith (1986, 1987) en el *A. palmeri* y *A. americana*; sin embargo no había sido reportada la levadura *Rhodo mucilaginosa*. En el intestino de la larva se aislaron las bacterias, *Leuconostoc mesenteroides*, *Erwinia sp* y *Pseudomonas paucimobilis*.

Existen estudios previos, que establecen que todavía no se encuentra a los posibles causante del daño al agave. Fucikovsky y Velásquez (2002) aislaron e identificaron la bacteria *Pseudomonas fluorescens* biotipo 1, procedentes de plantas enfermas y de picudos; él observo que esta bacteria se caracteriza por formar una pudrición blanda y un enrojecimiento de los tejidos. Castañeda (2002) hizo pruebas de patogenicidad en forma *In vitro* con *Erwinia* la cual no mostró un alto grado de virulencia, mientras que *Pseudomonas* produjo lesiones semejantes a aquellas observadas en agave de campo.

Al evaluar cada microorganismos aislado en medios con inulina, jugo de agave y tejido sano; se observó que los microorganismos que provocan las diversas consecuencias en las plantas de *A. tequilana* son la bacteria ácido láctico *L. mesenteroides* y la levadura *R. mucilaginosa*, esto se ve reflejado en el ablandamiento, la pigmentación, un fuerte olor a etanol producto de la fermentación de los azúcares y la disminución del pH a 3.6 en el tejido, debido a la formación de los ácidos láctico y acético; todo quizás provocado por la hidrólisis

de la inulina tal y como lo describe Delzenne *et al.*, 1994. Algo similar ocurre en las plantas de *A. tequilana* cuando es parasitada por el picudo, donde *R. mucilaginoso* y *L. mesenteroides* hacen el ambiente propicio para su desarrollo, ya que las bacterias que siempre asocian con el daño carecen de inulinasa.

En un estudio previo en *A. palmeri* enfermas, Waring y Smith (1986, 1987) observaron una población no menor de tres especies de levaduras en la zona cercano al tejido putrefacto. Esta zona presentaba un pH de 3 a 4. También encontraron bacterias y hongos en zonas con pH mayor a 5. En ese entonces estos autores mencionaron que una asociación entre la larva y microbios que inducían la pudrición en el tejido; en ese entonces sugirieron una relación simbiótica facultativa.

Debido a que *S. acupunctatus* depende de los productos de descomposición de la actividad microbiana que rompe el tejido y facilita el acceso a los nutrientes, entonces el insecto es favorecido por la presencia de *R. mucilaginoso* y *L. mesenteroides* para obtener mas fácilmente el alimento y reproducirse dentro de la planta de agave e hidrolizar la inulina.

En este estudio se observó que el picudo sirve de transporte y huésped de la levadura *R. mucilaginoso* y *L. mesenteroides*; cada microorganismo ejecuta una función indispensable es esta asociación. Donde la levadura es un productor natural de la enzima inulinasa provocando la hidrólisis de la inulina y proporcionando así los carbohidratos necesarios para el desarrollo del insecto; y la bacteria *L. mesenteroides* realiza el ambiente favorable disminuyendo el pH sin dañar a la planta, esto para evitar presencia de microbios secundarios u oportunista como *Pseudomonas* y *Erwinia*.

Basándose en nuestras observaciones y en la literatura relacionada se puede mencionar que existe una asociación entre *R. mucilaginoso* y *L. mesenteroides* con la larva, debido a que le ayudan a obtener los azúcares para su ciclo reproductivo; mientras que las bacterias *Erwinia* y *Pseudomonas* pueden

participar de forma secundaria al daño ocasionada a la planta de *A. tequilana*.

En el tejido de agave se encontró una sustancia que predominan en cada uno de los tejidos dañados y se presentaba en menor proporción en el tejido sano, es el ácido clorogénico, así también existen otros compuestos fenólicos que no fueron identificados en este trabajo. Pero estudios relacionados con el ácido clorogénico mencionan que forma parte de los mecanismos de defensa que ejercen las plantas en especial contra insectos y fitopatógenos (Dao y Friedman, 1992; Rank *et al.*, 1998). El ácido clorogénico es conocido como un inhibidor potencial del desarrollo larvario en insectos, y como un agente antinutricional en el estado larvario de *Bombix mori* (gusano de seda). En la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) infectada con *Colletotrichum falcatum* también se observa la generación de pigmentos rojizos, justamente en la zona donde el hongo está presente, Godshall (1987) analizó esta zona encontrando ácido clorogénico y luteína como principales componentes de este pigmento.

Durante el mecanismo de defensa de una planta, esta establece la formación de sustancias que generan el color al tejido. En el caso del *A. tequilana* y *S. acupunctatus*, este inocula a sus microorganismos asociados en el tejido sano, y este exhibe distintos grados de pigmentación, que se generan por la activación de sustancias químicas en especial el ácido clorogénico hasta formar subproductos de oxidación. Estudios realizados con plantas de tomate (*Lycopersicon esculatum*) indicaron una respuesta similar que sirve para limitar el desarrollo y extensión de *Pseudomonas syringae* dentro de la planta de tomate, donde se activaron sustancias como fitoalexinas y compuestos fenólicos, y así también la producción de especies reactivas de oxígeno, tal como el peróxido de hidrógeno. Esto da como resultado una respuesta hipersensible en el sitio de infección que se manifiesta como una lesión necrótica, causando la muerte celular del huésped (Li y Steffens, 2002);

Existen bacterias que pueden ser homofermentativas y heterofermentativas, ambas fermentan la glucosa hasta producir ácido láctico; las últimas además

producen etanol, ácido acético y CO₂. La bacteria *Leuconostoc* como el grupo de *Lactobacillus* son heterofermentativas (Veiga y Foster, 1992). Por tal motivo el *L. mesenteroides* dentro de la planta de *A. tequilana* utiliza la inulina, hidrolizando y generando una parte en etanol, ácido láctico y acético presente en el tejido dañado, evitando así la proliferación de las bacterias *Erwinia* y *Pseudomonas*.

Así mismo los azúcares son utilizados para el desarrollo larvario del picudo, debido que en el proceso de fermentación a partir de la inulina por *L. mesenteroides* es lento teniendo una producción de ácido láctico de 0.4 %, pero si utiliza la glucosa y/o la fructosa se obtiene 9.3 y 7 % de ácido láctico respectivamente (Merrill *et al.* 1946). En este estudio se encontró una producción de ácido láctico de 0.1 mM y 10 mM de ácido acético, por lo que *Leuconostoc* está utilizando los azúcares provocando las condiciones idóneas como la disminución de pH del tejido a 3.6 para el desarrollo del insecto dentro de la planta de *Agave tequilana*.

Los cristales de oxalato de calcio tienen un gran papel en las plantas como parte del mecanismo de defensa contra los herbívoros y/o en el acumulamiento excesivo de calcio (Ward *et al.*, 1997; Finley, 1999; Molano, 2001). Es conocido que al aumentar los niveles de calcio por la presencia de insectos en las plantas, estas pueden desarrollar niveles altos de cristales de oxalato de calcio. Un ejemplo es *Sida rhombifolia* donde demostraron el papel fisiológico de la planta y sugirieron que los cristales de oxalato de calcio pueden actuar como mecanismo de defensa contra la invasión de insecto.

Por otra parte, las plantas de *A. tequilana* contienen altas concentraciones de cristales de oxalato de calcio en hojas y tallo, lo que sugiere que podrían funcionar como mecanismo de defensa contra los microbios y los insectos que la pueden parasitar. Pero en los ensayos realizados en forma *in vitro* no encontramos este efecto pero tampoco lo podemos descartar; esto puede estar ocasionado por distintas razones, 1) el rápido consumo de los carbohidratos por la levadura; 2) la limitación de los azúcares necesarios para el desarrollo de la larva

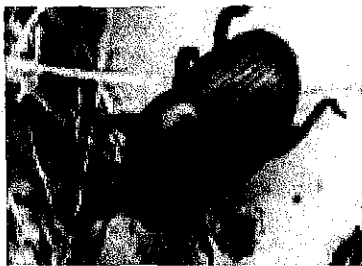
principalmente de las larvas recién emergidas; y 3) una adaptación del insecto a las concentraciones de los cristales de oxalato de calcio, debido a que generalmente las hembras ovipositan sobre las bases de las hojas los cuales eclosionan y se introducen hacia el centro de la piña, la cual contiene menor cantidad de cristales de oxalato que en las hojas.

6 CONCLUSIONES

1. El picudo *Scyphophorus acupunctatus* tiene un ciclo biológico de 105 días en el tejido de *Agave tequilana* y 111 días en el medio artificial con jugo de agave, en condiciones de laboratorio estrictamente controladas.
2. Se identificaron los microorganismos *Rhodotorula mucilaginosa*, *Leuconostos mesenteroides*, *Erwinia sp*, *Pseudomonas paucimobilis* y algunas especies de *Candida*.
3. La magnificación del daño en el tejido de las "piñas" de agave se debe a la asociación entre el *S. acupunctatus* con *R. mucilaginosa* y *L. mesenteroides*.
4. La hidrólisis de la inulina a fructuosa u otros azúcares se debe a *R. mucilaginosa* y *L. mesenteroides* que son útiles para el desarrollo del *S. acupunctatus* que este carece de la enzima inulinasa.
5. Las bacterias *Erwinia* y *Pseudomonas paucimobilis* se presentan en las larvas del insecto, pero no son las causantes del daño al tejido de agave, las cuales podrían ser bacterias oportunistas, ya que carecen de la enzima inulinasa y la otra no fermenta glucosa y fructosa.
6. Durante la hidrólisis de la inulina *R. mucilaginosa* produce alcohol y *L. mesenteroides* produce 0.1 mM de ácido láctico y 10 mM de ácido acético.
7. La producción de los ácidos orgánicos láctico y acético causan la acidificación del tejido de *A. tequilana* de pH 4.9 a 3.6 y esto evita el crecimiento de otros microorganismos.
8. El ácido clorogénico y otra serie de compuestos fenólicos son los responsables de la coloración del tejido como parte del mecanismo de defensa que utiliza la planta de *A. tequilana* por la asociación insecto microbiota.

9. Los cristales de oxalato de calcio no provocaron ningún efecto sobre las larvas de *S. acupunctatus*.

PROPUESTA DEL DAÑO A LA PLANTA DE *Agave tequilana* POR EL *Scyphophorus acupunctatus* (PICUDO DE AGAVE).



El insecto adulto oviposita y ocurre el estado larvario



El huevo y la larva poseen *L. mesenteroides* y *Rhodo. mucilaginoso*



Excreta la bacteria y la levadura al tejido



Durante la disminución del pH, se forman los pigmentos rojizos-café por la activación del Ac. clorogénico y otros fenólicos



Aparecen otros microorganismos como *Erwinia* y *Pseudomonas* a pH no menor de 4.



Daño total en la piña



7 LITERARURA CITADA

- Ananthakrishnan, T.N. 2003. Applied chemical ecology: Induced and transgenic defences in insect-plant interactions. *Current Science*. 84 (4):492-493.
- Binh, L.T., Moui, L.T., Oanh T.K. and Phong, T.D. 1990. Rapid propagation of agave by *in vitro* tissue culture. *Pl. Cell. Tissue Organ Cult.* 23: 67-70.
- Blumwald, E.; Aaron, G.S. and Lam, B.H. 1998. Early signal transduction pathways in plant-pathogen interactions. *Trends. Plant Sci.* 3:342-346.
- Booth, R.G., Cox, M.L. and Madge, R.B. 1990. Coleóptera. International Institute of Entomology (An institute of C.A.B International). Cambridge University Press. Cambridge, UK.
- Buell, C.R. 1998. *Arabidopsis*: a weed leading the field of plant-pathogen interactions. *Plant Physiol Biochem* 36:177-186.
- Bye, B.R. 1994. Usos tradicionales de los *Agaves* en México. Primer simposium Internacional sobre Agaváceas. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Mexico, D. F.
- Castañeda, H. 2002. Aislamiento e identificación de microorganismos responsables de la marchites del agave tequilero. Descrito avances de la investigación en el Agave tequilero. Elaborado por el Consejo Regulador del Tequila. Editorial Agata. p 31.
- Cedeño, M. 1995. Tequila production. *Crit. Rev. Biotechnology*. 15:1-11
- Consejo regulador del tequila (CRT). 2001. Estadística de producción exportación y consumos de materias primas para la elaboración del tequila. Guadalajara, Jalisco. México. Pagina de internet: <http://www.crt.org.mx>
- Chapman, R.F. 1974. The chemical inhibition of feeding by phytophagous insects. A Review. *Bull. Entomol. Res.* 64:39-47.
- Dadd, R.H. 1973. Insect nutrition: current developments and metabolic implications. *Annu. Rev. Entomol.* 18:281-297
- Dao, L. and Friedman, M. 1992. Clorogenic acid content of fresh and processed potatoes determined by ultraviolet spectrophotometry. *J. Agric. Food Chem.* 40: 2152-2156.
- Delzenne, N. and Roberfroid, M.B. 1994 Physiological effects of nondigestible oligosaccharides. *Lebensm. Wiss. Technol.* 27: 1-6.
- Dixon, R.A., Harrison, M.J. and Lamb C.J. 1998. Early events in the activation of plant defense responses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32:79-501.
- Farmer, E.E. 1997. New fatty acid-based signals: A lesson from the plant world.

Science. 276: 912-913.

- Fawzi, A.R and Mark A.B. 2002. Hidrogen peroxide is required for poly(phenolic) domain formation during wound-induced suberizaion. J. Agric. Food Chem. 50, 1009-1015.
- Finley, D.S. 1999. Patterns of calcium oxalate crystals in young tropical leaves: a possible role as an anti-herbivory defense. Rev. Biol. Tropical. 47: 27-31.
- French, A.D. and Waterhouse, A.L. 1993. Chemical structure and characteristics. Suzuki and N. J. Chatterton (eds.), Science and Technology of Fructans. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida. pp 41-82.
- Friend, W.G. 1958. Nutritional requirements of phytophagus insects. Annu. Rev. Entomol. 3:57-72.
- Fucikovsky, L. and Velázquez, J. 2002. Complex bacterial, fungal and insect invasion of *Agave tequilana* Weber var. Azul in México. Resumen de póster presentado en la 3rd international Bactrial Wilt Symposium. South Africa. Internet: http://www.eppo.org/QUTINE/Alñert_List/Insects/scypat.html. 07/01/03.
- Gentry, H.S. 1982 Agaves of continental north America. University of Arizona Press, Tucson pp 670 pp.
- Giblin. D.R., Garber, K. and Griffith, R. 1989. Laboratory rearing of *Rhynchophorus cruentatus* and *R. palmarum* (Coleoptera:Curculionidae) florida Entomologist 72 3: 480-488.
- Gibson, G.R. and Roberfroid, M.B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. J. Nutr. 125 : 1401-1412.
- Gibson, G.R., Beatty, E. R., Wang, X and Cummings, J. H. 1995. Selective stimulation of Bifidobacteria: implications for health. Int. Sugar J. 96:1150
- Godshall, M.A. 1987. The effect of sugarcane extracts on the growth of the pathogenic fungus, *Colletotrichum falcatum*. Physiological and molecular plant pathology. 30, 299-308.
- Gold, C.S. and Messiaen, S. 2000. El picudo Negro del Banano *Cosmopolites sordidus*. Plaga de Musa-Hoja divulgativa no 4. Inibap.
- Granados, S.D. 1999. Los Agaves en México. Primera reimpresión. Universidad Autónoma de Chapingo, México.
- Hatcher P.E. 1995. Three-way interactions between plant pathogenic fungi, herbivorous insect and their host plants. Biol. Rev. 70, 639-694.
- Heron, R.J., 1965. The role of chemotactic stimuli in the feeding behavior of

spruce budworm larvae on white spruce. Can.J. Zool. 43: 247-255.

- Hill, D.S. 1983. Agricultural insect pests of the tropics and their control. Second edition, Cambridge university press. New York, U.S.A.
- Hopkinson, D. and Materu, M.E. 1970. The control of the sisal weevil (*Scyphophorus interstitialis* Ghyll., Curculionidae: Coleoptera) in Tanzania III. Trials with insecticides in field sisal. E. Afri. Agric. For. J. 35:273-277.
- Huxman, T.E., Huxman, K.A. and Stamer, M.R. 1997. Dispersal characteristics of the yucca weevil (*Scyphophorus yuccae*) in a flowering field of *Yucca whipplei*. Grant Basin Naturalist 57. No 1: 38-43.
- Johnson, K.S. and Felton, G.W. 2001. Plant phenolics as dietary antioxidants for insects: a test with genetically modified tobacco. J. Chem.Ecol. 27: 2579-2597.
- Kessmann H, stab T, Hofmann C, Maetzke T, Herzog J, Ward E, Uknes S, Ryals J. 1994. Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. Annual Review of phytopathology 32:39-59.
- Levin, D.A. 1976. The chemical defenses of plants to pathogens and herbivores. Ann. Rev. Ecol. Syst. 7: 121-135.
- Li, L. and Steffens, J.C. 2002. Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. Planta. 215 no. 2:239-47.
- Lock, G. W. 1969. Sisal. Thirty year's sisal research in Tanzania. Second Edition, Tanganyika Sisal Growers' Association, Longmans, Green and Coltd. London, Great Britain. p 355
- Maleck K, Dietrich R.A. 1999. Defense on multiple fronts: how do plants cope with diverse enemies? Trends Plant Sci 4: 215-219.
- Matsuura, K. 2001. Nestmate recognition mediated by intestinal bacteria in a termite, *Reticulitermes speratus*. OIKOS 92: 20-26.
- Mattson, W.J. and Haack, R.A., 1987. The role of drought in outbreaks of plant-eating insect. Bioscience. 37(2), 110-118.
- McEvily, A.J., Iyengar, R. and Otwell, W.S. 1992. Inhibitions of enzymatic browning in food and beverages. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 32, 252-273.
- Meaux, J. and Mitchell-Olds, T. 2003. Evolution on plants resistance at the molecular level: ecological context of species interactions. Nature 91, 345-352.
- Mexzón, R., Chinchilla, C., Castrillo, G. and Salamanca, D. 1994. Biología y hábitos de *Rhychophorus palmarum* L. asociado a la palma aceitera en Costa Rica. ASD Oil Palm Papers 8, 14-21.

- Molano, B. 2001. Herbivory and calcium concentrations affect calcium oxalate crystal formation in leaves of *Sida* (Malvaceae). *Annals of Botany*. 88 (3): 387-391.
- Müller, M and Steller, J. 1995. Comparative studies of the degradation of grass fructan and inulin by strains of *Lactobacillus paracasea* subsp. *Paracasei* and *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Bacteriology*. 78. 229-236.
- Müller, M, and Lier, D. 1994. Fermentation of fructans by epiphytic lactic acid bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*. 76, 406-411.
- Nobel, P.S. 1988. Environmental biology of agave and cacti. New York; Cambridge University Press. pp 37-40, 42, 170,175.
- Nobel, P.S. 2002. Ecophysiology of roots of desert plants, with special reference to agaves and cacti. *Plant Roots: The Hidden Half, Marcel Dekker* 3rd Ed. 961-973 .
- Nurnberger, T., Wirtz, W., Nennstiel, D., Hahlbrock, K. and Jabs, T. 1997. Signal perception and intracellular signal transduction in plant pathogen defense. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 17:127-136.
- O'Brien, Ch.W and Wibmer, G.J. 1982. Annotated checklist of the weevils (Curculionidae sensu lato) of North America, Central America, and the West Indies (Coleoptera: Curculionidae). Mem. Amer. Ent. Inst. Number 34. The American Entomological Institute. Ann Arbor, Michigan, U.S.A.
- Orozno, M.R., Roaro, D.N. and Rodriguez, I.L. 1993. Tratado elemental de Botánica. Ed Científica Latinoamericana. Larios. México.
- Pérez, T.A. 1950. Enfermedades y plagas del henequén en Yucatán. Henequeneros de Yucatán. Merida, Yucatán, México.
- Pineda, M.G. 1983. Control químico de las plagas y enfermedades mas comunes del maguey pulquero *A. atrovirens* Kart. Tesis profesional. U. A. CH, Chapingo, México.
- Rahalkar, G.W., Tamhakar, A.J. and Shatharam, K. 1978. An artificial diet for rearing red palm weevil, *Rhychophorus furegineus* Oliv. *J. Plant. Crops* 6:61-64
- Ramírez, Ch. J. L. 1993. Max del henequén *Scyphophorus interstitialis* Ghlh. Bioecología y control. Serie: Libro técnico. Centro de Investigación Regional del Sureste. INIFAP-SARH. Mérida, Yucatán, México
- Rank, N.E., Köpf, A. Julkunen-Tiitto, R and Tahvanainen, J. 1998. Host preference and larval performance of the salicylate-using leaf beetle *Phratora vitellinae*. *Ecology* 79: 618-631. University Pre
- Razem, F.A, and Bernards, M.A. 2002. Hydrogen peroxide is required for poly(phenolic) domain formation during wound-induced suberization. *J. Agric.*

Food chem. 50, 1009-1015.

- Sánchez, M.J. and Rodríguez, G.B. 1999. Uso de *Scyphophorus acupunctatus* en pruebas de patogenicidad de *Erwinia caratovora* en *Agave tequilana* Weber var. azul. Resúmenes del XXVI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología y X Congreso Latinoamericano de Fitopatología. Guadalajara, Jalisco. México. Resumen 311.
- Schuler, H.T., Poppy, M.G., Kerry, B.R. and Denholm, L. 1998. Insect-resistant transgenic plants. Trends Biotechnol. 16. 168-174.
- Sherman, J. and Fried, B. 1990. Handbook of Thin-Layer Chromatography. Marcel Dekker, Inc. pp 637-643.
- Siller, J.M. 1985. Ciclo biológico del picudo del maguey *Scyphophorus acupunctatus* Gyll. (Coleoptera: Curculionidae) y algunas consideraciones sobre su impacto económico. Tesis profesional, UNAM. Mexico, D. F.
- Solís, J. F., González, H., Leyva, J. L., Equihua, A., Flores, F. J. and Martínez, Ángel. 2001. *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenb, PLAGA DEL AGAVE TEQUILERO EN JALISCO, MÉXICO. Agrociencia 35: 663-670.
- Steffens, J.C. 2002. Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. Planta. 215:239-247.
- Stotz, H. U., Pittendrigh, B. R., Kroymann, J., Weniger, K., Fritsche, J., Bauke, A. and Mitchell-Olds, T. 2000. Induced Plant Defense Responses against Chewing Insects. Ethylene signaling Reduces Resistance of Arabidopsis against Egyptian Cotton Worm But Not Diamondback Moth. Plant Physiology. 124: 1007-1017.
- Swain, T. 1979. Secondary compounds as protective agents. Ann. Rev. Plant. Physiol., 28: 479-501
- Tomomatsu, H. 1994. Health effects of oligosacharides. Food techcnol. 48(10).61-65.
- Valentine, H.T 1983. Nutritional changes in host foliage during and after defoliation and their relation to the weight of gypsy moth pupae. Oecologia. 57: 298-306.
- Valenzuela, A.G. 1994. El agave tequilero: su cultivo e industrialización. Monsanto. Guadalajara, Jalisco. México. 119
- Van Loon, L.C. 1997. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. European Journal of Plant Pathology 103: 753-765.
- Vaurie, P. 1971. Review of *Scyphophorus* (Curculionidae:Rhychophorinae). The Coleopterists Bulletin 25.1:1-8.

- Veiga da Cunha, M., and Foster, M. A. 1992. Sugar-glycerol cofermentations in lactobacilli: the fate of lactate. *J. Bacteriol.* 174:1013–1019.
- Vélez, G. C. 1997. Selección celular para resistencia a filtrados microbianos en *Agave tequilana* Weber. Tesis de Maestro en ciencias. Universidad de Guadalajara. p 10.
- Virgen, C.G., Martínez, R.L., Rodríguez, R.R., Bernal. F., Vázquez, G. M. and Pimienta, B. E., 2004. Epidemiología y manejo integrado de problemas fitosanitarios en *Agave tequilana* Weber var. azul. Avances de la investigación en el agave tequilero. Consejo Regulador del tequila. Ed. AGATA. Pag 129-145.
- Vivanco, J.M., Cosio, E., Layola, V.M and Flores H. 2005. Mecanismos químicos de defensa en las plantas. *Scientific American Latinoamericana.* 3 31:68-75.
- Ward, D., Spiegel, M., and Saltz, D., 1997. Gazelle herbivory and interpopulation differences in calcium oxalate content of leaves of a desert lily. *J. Chem. Ecol.* 23: 333-346.
- Waring, G.L. and Smith, R.L. 1986. Natural history and ecology of *Scyphophorus acupunctatus* (Coleoptera: Curculionidae) and its associated microbes in cultivated and native Agaves. *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 79: 334-340.
- Waring, G.L. and Smith, R. L. 1987. Patterns of faunal succession in *Agave palmeri*. *Southw. Naturalist.* 32 no. 4: 489-498.
- Woodruff, R.F. and Pierce, W.H. 1973. *Scyphophorus acupunctatus*, a weevil pest of yucca and agave in Florida (Coleoptera:Curculionidae) Fla. Dep. Agric. Consum. Serv. Entomol. Circ.135.

APENDICE

1. Preparación de los medios de cultivos artificiales con y sin bagazo de agave

1.1 Composición por kg de medio:

Bagazo de Agave	53 g
Agar bacteriológico	20 g
Mezcla de sales	2 g
Mezcla de Vitaminas	*
Ácido láctico 4 M	160 µL
Jugo de agave 10%	**100 mL
Inulina al 10%	** 100 g en 200 mL
sacarosa al 10%	** 100 g en 200 mL
Fructosa al 10 %	** 100 g en 200 mL
Agua destilada	Equiv. 1 Kg

** Elaboración de los diferentes medios artificiales.

1.2 Componentes de la mezcla de sales (g/100g):

Carbonato de calcio	21.0 g	Fosfato de potasio	31.0 g
Sulfato de cobre	0.039 g	Yoduro de potasio	0.005
Fosfato ferrico	1.47 g	Sulfato de Aluminio potasio	0.009 g
Sulfato manganoso	0.02 g	Cloruro de sodio	10.5 g
Sulfato de magnesio	9.0 g	Fluoruro de sodio	0.057 g
Cloruro de potasio	12 g	Difosfato de calcio	14.9 g

1.3 Componentes de la mezcla de Vitaminas:

Vitaminas	Cantidades
Vitamina A	62,000 UI
Vitamina D2	1000 UI
Vitamina E	50 mg
Vitamina B1	144 mg
Vitamina B2	20 mg
Nicotinamida	100 mg
Pantotenato de calcio	10 mg
Acido folico	2 mg
Vitamina B6	40 mg
Vitamina B6	72 µg
Vitamina C	400 mg

2. Preparación del estándar de ácido láctico para su determinación mediante espectrofotometría de luz UV-Vis.

No de estándar	mL de ácido láctico Estándares	Equivalente a mg de ácido láctico
1	0	Blanco
2	1.8	0.5
3	3.6	1
4	7.2	2
5	14.3	4
6	17.9	5
7	21.5	6
8	28.7	8
9	35.9	10

Preparación de reactivos para la determinación ácido láctico.

* Tratamiento del carbón: Se utilizaron 10 gr de carbón activado, 200 ml de agua y 30 mL de HCl 1N, sobre baño Maria se agito continuamente por 20 minutos y pasando corriente de aire. Se filtro y se lavo nuevamente con agua destilada; y nuevamente se filtro y se seco en una estufa a una temperatura de 100°C.

**Preparación de la solución de cloruro ferríco: Disolver 2 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en agua, y adicionar 5 mL de HCl 1 N y diluirlo a 200 mL. (AOAC 16.027).