

2005B-2010A

301283308

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
AGROPECUARIAS**



1801019131

Evaluación de los hongos filamentosos asociados a la rizósfera de *Agave tequilana* Weber var. azul con potencial como biofertilizantes y/o agentes de biocontrol contra cepas patogénicas de *Fusarium oxysporum*

Trabajo de titulación en la modalidad de

TESIS

Para obtener el grado de Licenciado en Biología

Presenta

ALMA GUADALUPE GARCÍA VERA

Las Agujas, Nextipac, Zapopan Jal. Octubre 2011



Universidad de Guadalajara
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias
Coordinación de Carrera de la Licenciatura en Biología

COORD-BIO-136/2010.

**C. ALMA GUADALUPE GARCÍA VERA
PRESENTE**

Manifiestamos a usted, que con esta fecha, ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de **TESIS E INFORMES** opción **TESIS** con el título: "Evaluación de los hongos filamentosos asociados a la rizósfera de *Agave tequilana* Weber var. *Azu!* con potencial como agentes de biocontrol y/o biofertilizantes contra cepas patogénicas de *Fusarium oxysporum*", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos, que ha sido aceptado como director de dicho trabajo a la **Dr. Joaquín Alejandro Qui Zapata** y como asesor a **Liberato Portillo Martínez**.

Sin más por el momento, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"

"2010 Bicentenario de la Independencia y Centenario de la Revolución Mexicana"
Las Aguas, Nextipac, Zapopan, Jalisco, 21 de octubre del 2010.


DRA. TERESA DE JESUS ACEVES ESQUIMAS
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN


M.C. GLORIA PARADA BARRERA
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

Dra. Teresa de Jesús Aceves Esquivias.
 Presidente del Comité de Titulación.
 Licenciatura en Biología.
 CUCBA.
 Presente

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad de tesis e informes, opción Tesis con el título: "**Evaluación de los hongos filamentosos asociados a la rizósfera de *Agave tequilana* Weber var. azul con potencial como biofertilizantes y/o agentes de biocontrol contra cepas patogénicas de *Fusarium oxysporum***" que realizó la pasante Alma Guadalupe García Vera con número de código 301283308 consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

Atentamente





Las Agujas, Zapopan, Jal. 05 de Septiembre del 2011



Firma
 Dr. Joaquín Qui Zapata



Firma
 Dr. Liberato Portillo Martínez

Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Dra. Cecilia Neri Luna		05 SEP 2011
Dr. Conrado Soto Velazco		05 SEP 2011
Hon.C. Isela L. Alvarez B.		05 SEP 2011
Supl. Dr. Liberato Portillo Martínez		05. sep. 2011

10/10/11


AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento A mi Director de tesis, Dr. Joaquín Qui Zapata por su generosidad al brindarme la oportunidad de participar en este proyecto y por la experiencia durante la realización de este trabajo de investigación. También por su constante apoyo y valiosas aportaciones, su paciencia, confianza y sus consejos que han sido fundamentales para la concreción de este trabajo.

Al Dr. Liberato Portillo Martínez, por el apoyo que siempre me brindo, sus consejos, confianza, su amistad y sobre todo por ser uno de mis inspiradores para seguir con mi formación profesional.

A la Dra. Cecilia Neri Luna por su revisión y las valiosas aportaciones a este trabajo de tesis que lo enriquecieron.

Al Dr. Conrado Soto Velazco por su apoyo, por los conocimientos adquiridos durante mi formación académica y sus aportaciones para mejorar el escrito de esta tesis.

A la M.C Isela Álvarez Barajas por sus aportaciones para este trabajo y por formar parte de esta revisión.

A la Universidad de Guadalajara y a todos mis profesores que me ayudaron en mi formación como biólogo. También a todos mis compañeros y amigos que me acompañaron durante toda la carrera.

Al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A. C. (CIATEJ), en especial a la Unidad de Biotecnología Vegetal por su apoyo para llevar a cabo el trabajo de investigación.

D E D I C A T O R I A S

Son muchas las personas especiales a las que me gustaría agradecer su amistad, apoyo, ánimo y compañía en las diferentes etapas de mi vida. Algunos están conmigo, en mis recuerdos y en mi corazón. Sin importar en donde están o si alguna vez llegan a leer esta dedicatoria quiero darles las gracias por formar parte de mi vida, por todo lo que me han brindado y por todas sus bendiciones y buenos deseos.

En especial a Concepción Vera Ríos y Francisco Javier García Montes por ser los mejores padres del mundo, por estar a mi lado incondicionalmente brindándome su apoyo para siempre alcanzar mis metas, por sus sabios consejos y también por su cariño, comprensión y paciencia, siempre les agradeceré. Los "AMC" y muchas gracias por permitirme ser parte su vida.

A mis hermanos, Luz García, Liliana García y Javier García, por su apoyo, paciencia, sus consejos y por siempre estar conmigo en las buenas y en las malas. Los quiero mucho.

A toda la Familia García, por sus buenos deseos y apoyo.

A mis amigos y amigas, que me han acompañado en este trayecto de mi vida y que lo han hecho más divertido. Gracias.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de la Unidad de Biotecnología Vegetal, en el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A. C. El cual se ubica en la ciudad de Guadalajara, Jalisco. Bajo la asesoría del Dr. Joaquín Alejandro Qui Zapata.

Este trabajo formó parte del proyecto 2008-05-99148 apoyado con recursos del Fondo Mixto CONACYT – Gobierno del Estado de Jalisco.

	ÍNDICE	PÁGINA
	RESUMEN	1
1	INTRODUCCIÓN	2
2	MARCO TEÓRICO	4
2.1	AGAVE	4
2.1.1	Famillia Agavaceae	4
2.1.2	<i>Agave tequilana</i> Weber Var. azul	5
2.1.3	Clasificación taxonómica	7
2.2	EL TEQUILA	8
2.3	ENFERMEDADES DEL AGAVE	9
2.3.2	Marchitez del agave	11
2.3.3	Características del género <i>Fusarium</i>	13
2.3.4	Clasificación taxonómica	14
2.3.5	Características de las enfermedades causadas por <i>Fusarium oxysporum</i> .	15
2.3.6	Control biológico	17
2.3.7	Interacciones planta-microorganismos	18
3	ANTECEDENTES	21
3.1	EL ESTUDIO DE LA MARCHITEZ DEL AGAVE TEQUILERO Y LA BÚSQUEDA DE SU AGENTE CAUSAL	21
3.2	LA BÚSQUEDA DEL CONTROL DE LA MARCHITEZ DEL AGAVE TEQUILERO	22
3.3	EL CONTROL BIOLÓGICO DEL GÉNERO <i>Fusarium</i>	25
3.4	EL CONTROL BIOLÓGICO UTILIZANDO <i>Trichoderma</i> sp.	26

3.5	EL APROVECHAMIENTO DE LAS INTERACCIONES ENTRE PLANTAS Y MICROORGANISMOS COMO FUENTE DE BIOFERTILIZANTES Y AGENTES DE CONTROL BIOLÓGICO	28
3.6	EL APROVECHAMIENTO DE LA INTERACCIÓN PLANTA-HONGO CONTRA LAS ENFERMEDADES DE RAÍZ EN EL AGAVE TEQUILERO	30
4	JUSTIFICACIÓN	33
5	HIPÓTESIS	34
6	Objetivo general	35
6.1	Objetivos particulares	35
7	METODOLOGÍA	37
7.1	MATERIAL VEGETAL	37
7.2	AISLAMIENTO Y CULTIVO DE HONGOS	38
7.2.1	Aislamiento e identificación	38
7.2.2	Cultivo y mantenimiento	39
7.3	MATERIAL BIOLÓGICO	39
7.4	CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS PATOGÉNICAS DE <i>Fusarium oxysporum</i> ASOCIADAS A LA MARCHITEZ DEL AGAVE TEQUILERO	40
7.4.1	Prueba de patogenicidad <i>in vitro</i> de las cepas de <i>Fusarium</i>	40
7.4.1.1	Preparación del inóculo <i>in vitro</i>	40
7.4.1.2	Preparación del material vegetal para las evaluaciones <i>in vitro</i>	41
7.4.1.3	Prueba de patogenicidad <i>in vitro</i>	41
7.4.2	Prueba de patogenicidad <i>in planta</i> de las cepas de <i>Fusarium</i>	42
7.4.2.1	Preparación del inóculo	42
7.4.2.2	Preparación del material vegetal para las evaluaciones	43

7.4.2.3	Prueba de patogenicidad <i>in planta</i>	43
7.4.3	Evaluación histopatológica de la interacción <i>Fusarium oxysporum-Agave tequilana</i>	44
7.4.3.1	Cortes histológicos	44
7.4.3.2	Tinción Uvitex 2B	44
7.4.3.3	Tinción con azul de tripano	45
7.5	EVALUACIONES DE LAS CEPAS FÚNGICAS ASOCIADAS A LA RIZÓSFERA DE <i>Agave tequilana</i>	45
7.5.1	Pruebas de antagonismo <i>in vitro</i>	47
7.5.1.1	Prueba de antagonismo <i>in vitro</i> cualitativa	47
7.5.1.2	Prueba de antagonismo <i>in vitro</i> cuantitativa	48
7.5.2	Pruebas de patogenicidad en <i>Agave tequilana</i> de los aislamientos fúngicos con actividad antagónica <i>in vitro</i> sobresaliente	49
7.5.2.1	Prueba de patogenicidad <i>in vitro</i>	49
7.5.2.1.1	Preparación del inóculo	49
7.5.2.1.2	Preparación del material vegetal para las evaluaciones <i>in vitro</i>	50
7.5.2.1.3	Prueba de patogenicidad <i>in vitro</i>	51
7.5.2.2	Prueba de patogenicidad <i>in planta</i>	51
7.5.2.2.1	Preparación del inóculo	51
7.5.2.2.2	Preparación del material vegetal para las evaluaciones	52
7.5.2.2.3	Prueba de patogenicidad <i>in planta</i>	52
7.6	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS AISLAMIENTOS FÚNGICOS <i>in planta</i>	52
7.6.1	Preparación del inóculo	52
7.6.2	Preparación del material vegetal para las evaluaciones	53

7.6.3	Prueba de antagonismo en planta	53
7.6.4	Prueba de actividad benéfica en planta	54
7.6.4	Variables anatómicas	54
7.6.4.1	Crecimiento de la raíz	54
7.6.4.2	Ramificaciones de la raíz y crecimiento vegetativo	54
7.6.4.3	Densidad estomática	55
7.6.5	Variables fisiológicas	55
7.6.5.1	Determinación del pH, porcentaje de ácido málico y acidez nocturna	55
7.6.5.2	Determinación de clorofila	56
7.6.5.3	Determinación de azúcares directos	57
7.7	EVALUACIÓN HISTOLÓGICA DE LA ACTIVIDAD ANTAGÓNICA DEL AISLAMIENTO FÚNGICO	58
7.7.1	Cortes histológicos	58
7.7.2	Tinción Uvitex 2B	58
7.7.3	Tinción con azul de tripano	58
7.8	ANÁLISIS DE DATOS PARAMÉTRICOS	59
7.8.1	Análisis de datos paramétricos	59
7.8.2	Análisis de datos no paramétricos	59
8	RESULTADOS	60
8.1	CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS PATOGENICAS DE <i>Fusarium</i>	60
8.1.2	Prueba de patogenicidad <i>in vitro</i>	60
8.1.3	Prueba de patogenicidad <i>in planta</i>	62
8.1.4	Caracterización histológica de la infección	64

8.2	AISLAMIENTOS FÚNGICOS	75
8.3	ANTAGONISMO <i>IN VITRO</i>	75
8.3.1	Antagonismo <i>in vitro</i> cualitativa	75
8.3.2	Antagonismo <i>in vitro</i> cuantitativa	81
8.4	PATOGENICIDAD DE LOS AISLAMIENTOS FÚNGICOS EN <i>Agave tequilana</i>	82
8.4.1	Patogenicidad <i>in vitro</i>	82
8.4.2	Patogenicidad <i>in planta</i>	92
8.5	EVALUACIÓN DEL POTENCIAL COMO AGENTES DE CONTROL BIOLÓGICO Y BIOFERTILIZANTES DE LOS AISLAMIENTOS FÚNGICOS	96
8.5.1	Evaluación de actividad antagónica <i>in planta</i>	96
8.5.2	Actividad benéfica en planta	102
8.5.2.1	Variables anatómicas evaluadas	102
8.5.2.1.1	Crecimiento de la raíz	102
8.5.2.1.2	Ramificaciones de la raíz	103
8.5.2.1.3	Crecimiento vegetativo	104
8.5.2.1.4	Densidad estomática	104
8.5.2.2	Variables fisiológicas evaluadas	104
8.5.2.2.1	Evaluación de la actividad fotosintética	104
8.5.2.2.2	Evaluación de la eficiencia fotosintética	105
8.5.2.2.3	Evaluación de la acumulación de azúcares	105
8.6	CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA DE LA COLONIZACIÓN DE FUHER424A1	106
9	DISCUSIÓN	110

9.1	Caracterización de las cepas patogénicas de Fusarium	110
9.2	Evaluación preliminar del potencial los aislamientos fúngicos para el control biológico	114
9.3	Potencial de los aislamientos fúngicos como agente de control biológico	117
9.4	Potencial de los aislamientos como biofertilizantes	120
9.5	Consideraciones finales	124
10	CONCLUSIONES	126
11	LITERATURA CITADA	127

ÍNDICE DE FIGURAS

PÁGINA

Figura 2.1	Anatomía del agave.	6
Figura 2.2	<i>Agave tequilana</i> WEBER variedad Azul.	7
Figura 2.3	Desarrollo de la marchitez del agave.	13
Figura 2.4.	Esporas de las cepas patogénicas de <i>Fusarium oxysporum</i> (FPA y FPC).	15
Figura 2.5	Control biológico.	20
Figura 7.1	Diagrama de flujo de la metodología realizada	36
Figura 8.1	Evolución del grado de patogenicidad <i>in vitro</i> de las cepas patogénicas de <i>Fusarium oxysporum</i> asociadas a la marchitez del agave.	65
Figura 8.2.	Prueba de patogenicidad <i>in vitro</i> de las cepas patogénicas de <i>F. oxysporum</i> asociadas a la marchitez del agave.	66
Figura 8.3.	Evolución del grado de patogenicidad <i>in vitro</i> de las cepas patogénicas de <i>F. oxysporum</i> asociadas a la marchitez del agave, utilizando GelRite como agente gelificante.	67
Figura 8.4.	Prueba de patogenicidad <i>in vitro</i> de las cepas patogénicas de <i>F. oxysporum</i> asociadas a la marchitez del agave, utilizando GelRite como agente gelificante.	68
Figura 8.5.	Evolución del grado de patogenicidad <i>in planta</i> de las cepas patogénicas de <i>F. oxysporum</i> asociadas a la marchitez del agave.	69
Figura 8.6.	Parámetros anatomicos evaluados en la prueba de patogenicidad <i>in planta</i> de las cepa patogénica FPC de <i>F. oxysporum</i> asociadas a la marchitez del agave	72
Figura 8.7.	Parámetros anatomicos evaluados en la prueba de patogenicidad <i>in planta</i> de las cepa patogénica FPA de <i>F. oxysporum</i> asociadas a la marchitez del agave	73
Figura 8.8.	Prueba de patogenicidad <i>in planta</i> de las cepas patogénicas de <i>F. oxysporum</i> asociadas a la marchitez del agave.	70
Figura 8.9	Caracterización histológica de la infección de raíces de <i>A.</i>	74

tequilana por las cepas patogénicas de *F. oxysporum*.

Figura 8.10	Actividad antagónica <i>in vitro</i> contra <i>Fusarium oxysporum</i> asociado a la marchitez del agave, de los aislamientos obtenidos de la rizósfera de <i>A. tequilana</i> .	77
Figura 8.11	Tipo de actividad antagónica <i>in vitro</i> contra <i>F. oxysporum</i> asociado a la marchitez del agave, de los aislamientos obtenidos de la rizósfera de <i>A. tequilana</i>	77
Figura 8.12	Características de la actividad antagónica <i>in vitro</i> , producción de metabolitos.	80
Figura 8.13	Características de la actividad antagónica <i>in vitro</i> , micoparasitismo e inhibición del crecimiento.	80
Figura 8.14	Características de la evaluación cuantitativa de la actividad antagónica <i>in vitro</i> .	85
Figura 8.15	Evolución del grado de patogenicidad <i>in vitro</i> de los aislamientos seleccionados.	88
Figura 8.16	Prueba de patogenicidad <i>in vitro</i> de los aislamientos seleccionados.	89
Figura 8.17	Evolución del grado de patogenicidad <i>in planta</i> de los aislamientos seleccionados	93
Figura 8.18	Prueba de patogenicidad <i>in planta</i> de los aislamientos seleccionados.	94
Figura 8.19	Evolución de la actividad antagónica <i>in planta</i> de los aislamientos seleccionados.	99
Figura 8.20	Prueba de actividad antagónica <i>in planta</i> de los aislamientos seleccionados.	99
Figura 8.21	Caracterización histológica de la colonización de raíces de <i>A. tequilana</i> por FUHER424A1.	109

ÍNDICE DE CUADROS

PÁGINA

Cuadro 7.1	Cepas de hongos utilizados en este estudio con actividad antagonica <i>in vitro</i> sobresaliente.	40
Cuadro 7.2	Lista de aislamientos seleccionados de la rizósfera de <i>A. tequilana</i> .	46
Cuadro 7.3	Descripción de la escala de actividad antagonica utilizada en la prueba de antagonismo <i>in vitro</i> cualitativa.	48
Cuadro 7.4	Características establecidas para la descripción de la actividad antagonica <i>in vitro</i> cuantitativa.	50
Cuadro 8.1	Características de la actividad antagonica <i>in vitro</i> contra <i>F. oxysporum</i> asociado a la marchitez del agave, de los aislamientos obtenidos de la rizósfera de <i>A. tequilana</i> .	78
Cuadro 8.2	Evaluación cuantitativa de la actividad antagonica <i>in vitro</i> .	84
Cuadro 8.3	Parámetros anatomicos evaluados en la prueba de antagonismo <i>in planta</i> de los aislamientos fungicos seleccionados.	101
Cuadro 8.4	Evaluación de la actividad benéfica de los aislamientos fungicos seleccionados. Parámetros anatomicos.	106
Cuadro 8.5	Porcentaje diferencial de los parámetros anatómicos inducidos por los aislamientos fungicos seleccionados con respecto al testigo.	107
Cuadro 8.6	Evaluación de la actividad benéfica de los aislamientos fungicos seleccionados. Parámetros fisiológicos.	107
Cuadro 8.7	Porcentaje diferencial de los parámetros fisiologicos inducidos por los aislamientos fungicos seleccionados con respecto al testigo.	108

RESUMEN

El *Agave tequilana* Weber var. azul es la única materia prima autorizada por la Norma Oficial Mexicana y con determinación de zona de Denominación de Origen del Tequila (DOT) y del cual se produce una de las bebidas mas importantes “el tequila”, considerado como un símbolo de México. Sin embargo, el cultivo del agave tequilero está siendo afectada por diferentes problemas fitosanitarios que provocan grandes pérdidas económicas y ponen en peligro el abasto futuro de la materia prima para el tequila. La consecuencia principal de este daño es la “marchitez del agave tequilero”, cuyo agente causal se considera a *Fusarium oxysporum*, el cual se debe a la presencia y actividad del patógeno en el xilema de las plantas. Teniendo en cuenta estos antecedentes, la hipótesis de esta investigación fue que debido a la gran diversidad de interacciones que se encuentra en la rizósfera del agave tequilero, es posible encontrar hongos filamentosos con potencial como agentes de control biológico y/o biofertilizantes contra *F. oxysporum*. A partir de muestras de la rizósfera de plantas de *A. tequilana* que presentaban condiciones óptimas se aislaron hongos filamentosos en medio selectivos para los géneros *Fusarium* y *Trichoderma*, aquellas que fueron sobresalientes, se les evaluó su actividad como agentes potenciales como control biológico y biofertilizante. Los ensayos de patogenicidad, antagonismo y actividad benéfica en las plantas de *A. tequilana* utilizados en este estudio, permitieron observar que una cepa (FUHER424A1) presento ambos efectos, y un potencial como agente de control biológico y biofertilizante.

1. INTRODUCCIÓN

En México, el género *Agave* reviste de una gran importancia dado que muchas especies tienen diferentes usos, como alimento, obtención de fibras, cordelería y textiles, también como plantas ornamentales, en medicina, el uso de sus extractos como antimicrobiano y en biorremediación de suelos. Así mismo como materia prima para producir bioetanol y principalmente en la producción de diferentes tipos de bebidas alcohólicas como el mezcal y una de las bebidas más importantes a nivel mundial “el tequila”, considerado como un símbolo de México en el extranjero y el cual se elabora únicamente a partir de *Agave tequilana* Weber var. azul (Loera-Quezada, 2000). Siendo la única materia prima autorizada por la Norma Oficial Mexicana (NOM-006-SCFI-2005), que aparte debe de cultivarse en una región determinada como zona de Denominación de Origen del Tequila (DOT). Con esta denominación se ha buscado y logrado garantizar la procedencia geográfica, autenticidad y calidad del producto mexicano más importante en su tipo, convirtiéndose en una amplia perspectiva para el desarrollo a nivel internacional (CRT, 2004). Desde entonces, el crecimiento del cultivo del agave tequilero se ha incrementado, reportándose actualmente tan solo dentro del estado de Jalisco más de 120 mil ha cultivadas (Flores-López *et al.*, 2010), debido a la ventaja de su característica agronómica de reproducción mediante “hijuelos” (CRT, 2004), incrementando considerablemente la demanda en los cultivos de *A. tequilana*. Sin embargo, esta característica es a su vez es una desventaja desde el punto de vista fitosanitario al representar uno de los mayores riesgos que enfrenta el cultivo del agave tequilero al disminuir drásticamente su variabilidad genética aumentando el riesgo de una susceptibilidad a las enfermedades. La solución constituye un reto para asegurar el abasto futuro de la cadena productiva agave-tequila (Rendón-Salcido *et al.*, 2011). Actualmente se considera que entre un 20 y 30% del inventario del agave tequilero padece problemas fitosanitarios provocando grandes pérdidas en los cultivos y por lo tanto económicas (Aviña-Padilla *et al.*, 2008). Una de las principales enfermedades que afectan a este

cultivo y que presentan serios problemas para su control es la “marchitez del agave tequilero”, asociada principalmente con el hongo *Fusarium oxysporum* que produce marchitamiento y pudrición de la raíz del agave. Para la protección de los cultivos contra este patógeno, se ha usado de manera intensiva y a veces desmedida plaguicidas y agroquímicos con resultados poco efectivos, a la vez que ocasionan efectos negativos sobre el ambiente y la salud humana.

Debido a esta problemática, una opción que se ha estado explorando es el control biológico de enfermedades. Esta búsqueda de microorganismos con potencial como control biológico para *F. oxysporum*, un hongo ampliamente distribuido en el suelo y patógeno de diferentes especies vegetales, ha sido realizada en otros cultivos con resultados muy alentadores. El control biológico se ha definido como el dominio por uno o más organismos que de forma natural o a través de la manipulación del ambiente, hospedero, antagonista, o por la producción masiva de uno o más antagonistas (McSpaden-Gardener y Fravel, 2002). Debido a la gran diversidad de microorganismos que se pueden encontrar en la rizósfera de las plantas, y la variedad de interacciones entre microorganismos y las plantas (inocuas, patógenas o benéficas), que incluye a diferentes especies de *Agave*, donde se observa que pueden llegar a generar una ventaja al ser inoculadas a las plantas (Obledo *et al.*, 2003), estas interacciones pueden tener lugar en el suelo o incluso dentro de la propia planta. Por lo tanto, se han desarrollado agentes de control biológico contra *F. oxysporum*, siendo uno de los más importantes y con resultados sobresalientes, *Trichoderma* sp. (Bolwerk, 2005; Infante *et al.*, 2009), aunque también se ha incluido otras especies o cepas no patógenas de *Fusarium*. A partir de este conocimiento, en este estudio se buscó generar nuevas alternativas de control biológico contra *F. oxysporum*, específicamente para aquellos asociados con la marchitez del agave. Por lo tanto, se realizó una búsqueda de microorganismos con potencial como agentes de control biológico y/o biofertilizantes en la rizósfera del agave, que no presenten los efectos adversos de los agroquímicos hacia la salud humana y el ambiente, que repercuta de manera positiva dentro de la industria agave-tequila y las otras industrias asociadas

2. MARCO TEORICO

2.1 AGAVE

2.1.1 Familia Agavaceae

La familia de las Agavaceas incluye 20 géneros y más de 200 especies, de las cuales aproximadamente el 75% se encuentra en México, considerado como su centro de origen (Vázquez-García y Cházaro, 2007). Se reconocen dos subfamilias Agavoideae y Yuccoideae, esta familia es endémica de América, que se distribuye desde el sur de Canadá hasta Bolivia, incluyendo las islas del Caribe, desde las Bahamas hasta Aruba y Trinidad y Tobago (García-Mendoza, 2002).

Los agaves o “magueyes”, junto con el maíz y el frijol, fueron quizás de las primeras plantas cultivadas en Mesoamérica y gracias a la gran cantidad de formas de uso se ganaron el apelativo de “árbol de la vida” (Rodríguez-Garay *et al.*, 2004). En México, el género *Agave* reviste una gran importancia dado que muchas especies tienen diferentes usos, por ejemplo los indígenas los han utilizado como alimento, apoyo en la vivienda, medicina, en ceremonias, hilos, agujas para coser, calzado, ropa, clavos, punzones, armas de guerra, papel, etc. (Barragán-Barragán, 2001). También se han usado como plantas ornamentales y principalmente en la producción de diferentes tipos de bebidas alcohólicas como el mezcal y el tequila (Vázquez-García y Cházaro, 2007). Entre las propiedades no explotadas del agave se encuentran la actividad antimicrobiana de sus extractos y su potencial uso en la fabricación de papel (Barragán-Barragán, 2001), además, que en la actualidad sus nuevos usos son en la producción de inulina, una fibra soluble extraída del agave con beneficios como probiótico y suplemento alimenticio, la denominada “miel de agave” que es un edulcorante de origen natural utilizado como remedio energético. El uso más reciente es como biocombustible que se obtiene como un subproducto de la producción de tequila y de plantas abandonadas, las cuales son convertidas en la materia prima para la producción de bioetanol, una estrategia para ayudar a mitigar los efectos negativos del cambio climático (Valenzuela, 2011). Por estos motivos, este género es sin duda uno de los grupos de plantas más reconocidos por los mexicanos y

uno de los que identifican a México en todo el mundo (Rodríguez-Garay *et al.*, 2004).

El género *Agave* se divide en dos subgéneros *Littaea* y *Agave*, según el tipo de inflorescencia; que puede llegar a medir varios metros de altura y emerge del centro de la roseta ya sea con forma de espiga o racimo y a aquellas con inflorescencia ramificada o paniculada (Rodríguez-Garay *et al.*, 2004). La mayoría de las plantas son monocárpicas, es decir que tienen un solo evento reproductivo y después mueren, por lo que la planta depende de la eficiencia de los polinizadores para su éxito reproductivo, pero también pueden ser perennes. Su reproducción se puede dar por semillas, bulbillos o más eficientemente mediante rizomas, es decir trasplantando los hijuelos de la planta (Rodríguez-Garay *et al.*, 2004). Son plantas herbáceas suculentas, en algunos casos arborescentes forman una gran roseta de hojas gruesas y carnosas, generalmente terminadas en una afilada espina en el ápice y con espinas marginales o "dientes"; el tallo es robusto y leñoso (Rodríguez-Garay *et al.*, 2004; CRT, 2004), con algunas excepciones son acaulescentes o de tallo muy corto y grueso.

Entre las especies de agave utilizadas para obtener diferentes bebidas son *A. atrovirens* Karw, *A. mapisaga* Trel, *A. americana* L, *A. salmiana* Otto ex Salm, estas utilizadas para la producción de pulque y agua miel; para la producción de mezcal se utiliza principalmente *A. angustifolia*, *A. salmiana*, *A. potatorum* Zucc y *A. asperima* Jacobi; la bebida de bacanora se obtiene principalmente de *A. pacifica* Trel y una de las bebidas más importantes a nivel mundial el tequila el cual se elabora únicamente a partir de *A. tequilana* Weber var. azul (Loera-Quezada, 2000).

2.1.2 *Agave tequilana* Weber Var. azul

El *Agave tequilana* Weber var. azul, también conocido como agave tequilero y agave azul, debe su nombre en honor a la región donde comenzó a producirse y al naturalista alemán Franz Weber, quien a finales del siglo XVIII tras casi siete años de estudio seleccionó entre los agaves aquel que por sus características daba los mejores resultados y lo tipificó como *A. tequilana* (Aviña-Padilla *et al.*, 2008). Este

presenta hojas lanceoladas de color azul-verdoso o verde claro, delgadas y casi planas, de aproximadamente 1.25 m de largo por 8 a 10 cm de ancho; la espina terminal es de color rojo oscuro de 2 cm. Los dientes son rojizos, triangulares, de 3 a 4 mm y separados a una distancia de 1 a 1.5 cm y el margen que los une es ligeramente de color blanco. Lo característico de esta especie es una pigmentación de color azul, lo cual lo hace diferenciarse de las demás especies presentes en la región; además de que las piñas o cabezas llegan a pesar hasta 120 kg; su cabeza es esférica y madura entre los 6 a 9 años según las condiciones climáticas (CRT, 2004; **Figura. 2.1**). Su reproducción sexual, es a través de semilla, que no es muy usual en el cultivo de *A. tequilana*, ya que al alcanzar la madurez entre siete y nueve años de edad se forma la inflorescencia lo que disminuye el contenido de azúcares fermentables en el tallo teniendo que ser eliminada (CRT, 2004), mientras que la asexual, es mediante vástagos llamados "hijuelos" (que emergen de rizomas de la planta madre, creciendo cerca de la base de la roseta o mediante bulbillos, pequeñas plántulas que surgen de la inflorescencia) siendo esta la más utilizada para la producción de *A. tequilana* (Rodríguez-Garay *et al.*, 2004).

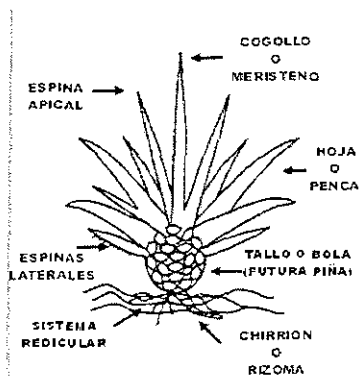


Figura 2.1 Anatomía del agave tequilero. (Imagen tomada de la red)

Otras características representativas de las plantas, son una mayor resistencia y adaptación a las condiciones climáticas propias de la región, así como una mayor producción en la cantidad de azúcares y el tiempo de cosecha es menor en

comparación con las demás especies, características que en general lo hacen el más apto para producir tequila (Virgen-Calleros, 2004). Por lo tanto, el cultivo de *A. tequilana* presenta dos características importantes la primera es ser la materia prima para la producción de tequila, por lo que, su tallo o "piña" tiene que ser de buena calidad y tamaño sin pudriciones ni infestaciones por plagas y la segunda es por su reproducción mediante hijuelos sanos de plantas madres para los nuevos cultivos.

2.1.3 Clasificación taxonómica

Clasificación taxonómica del *Agave tequilana* Weber var. azul (tomada de Cronquist, 1981).

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida (Monocotiledóneas)

Subclase: Liliidae

Orden: Liliales

Familia: Agavaceae

Género: *Agave*

Especie: *Agave tequilana* Weber (Figura. 2.2)



Figura 2.2 *Agave tequilana* WEBER variedad azul.

2.2 EL TEQUILA

El tequila era conocido en la época prehispánica como un elixir divino por la creencia de ser un regalo de los dioses (CRT, 2004). El término “tequila” proviene del náhuatl y tiene varios conceptos. Desde el punto de vista epistemológico *téquitl* que significa trabajo, oficio, empleo, encargo y *tlan* que quiere decir lugar, por lo que refiere el sitio o lugar donde se efectúa cierto tipo de labores (Mendoza-Chagolla, 2004).

El tequila, como bebida destilada surge en el siglo XVI como resultado de combinar una materia prima auténticamente americana con un proceso de producción europeo, por esta razón, puede considerarse símbolo del encuentro de las dos culturas (CNIT, 2008). El tequila es una bebida alcohólica regional obtenida por destilación y rectificación de mostos, originalmente preparados directamente del material extraído de la molienda de las cabezas maduras de agave previa o posteriormente hidrolizadas o cocidas y sometidos a fermentación alcohólica con levaduras. Esta bebida, de acuerdo a su tipo es incolora o amarillenta cuando es madurada en recipientes de madera de roble o encino, o cuando se aboque sin madurarlo. Para que esta bebida alcohólica sea considerada como “Tequila” tiene que incluir al menos 51% de azúcares de agave y hasta un 49% de azúcares de otras fuentes y para la denominación como “Tequila 100% de agave” o “Tequila 100% puro de agave”, debe ser un producto que no es susceptible de ser enriquecido con otros azúcares distinto de los obtenidos del *A. tequilana*. Siendo la única materia prima autorizada por la Norma Oficial Mexicana (NOM-006-SCFI-2005) y el envasado debe ser controlado por el fabricante que deberá estar ubicada dentro de la zona de Denominación de Origen del Tequila (DOT) (CRT, 2004), entre los cuales se encuentran los estados de Jalisco, Nayarit, Guanajuato, Michoacán y Tamaulipas.

Según la Cámara Nacional de la Industria Tequilera (CNIT), el tequila cuenta con una gran presencia en todo el mundo entre las bebidas alcohólicas más consumidas es considerado como un símbolo de México en el extranjero con un consumo nacional de 105 millones de litros y en exportación con 152.5 millones de L a del 2010. Se estima una producción total a esta fecha de 257.5 millones de L,

considerando solo a los municipios productores principales del estado de Jalisco como son Amatitán, Arandas, Atotonilco, Guadalajara, Tequila, Tototlán y Zapotlanejo (CNIT, 2010). El Consejo Regulador del Tequila, A.C. (CRT) estima que existen cerca de 253,033,239 plantas registradas a del 2010 (CRT, 2010) en las regiones de México mencionadas y referentes a la DOT, y que tan solo dentro del estado de Jalisco la superficie dedicada a la producción de agave tequilero ha tenido un avance sustancial en los últimos años, reportándose al año del 2007 más de 120 mil ha cultivadas (Flores-López *et al.*, 2010).

Actualmente hasta febrero del año 2011, existen 72 empresas productoras de tequila certificadas por el CRT, que cuentan con 1151 marcas de tequila de envasado de origen certificadas y 202 marcas certificadas de envasado en el extranjero, que producen millones de litros de tequila con una óptima calidad (CNIT, 2010). La industria tequilera da empleo directo a más de 38,000 personas y es un gran generador de divisas para el Estado de Jalisco. Por lo que el tequila se considera la segunda industria en importancia aportando más del 4% de la producción manufacturera de la entidad. Sin embargo, la única materia prima autorizada para la producción del tequila, está siendo afectada por diferentes problemas fitosanitarios que llegan a convertirse en un mal de carácter endémico. Se considera que entre un 20 y 30% del inventario del agave tequilero padece problemas de plagas, lo que implica que alrededor de 69 millones de las 253 millones de plantas sembradas en la zona geográfica de la DOT, enfrentan un mayor o menor grado de problemas fitosanitarios, provocando grandes pérdidas económicas y poniendo en peligro el abasto futuro de la materia prima para el tequila (CRT, 2010).

2.3 ENFERMEDADES DEL AGAVE

El cultivo de agave se ha visto afectado por una serie de problemas fitosanitarios, que incluyen plagas y enfermedades por fitopatógenos microbianos. Las plagas principalmente por insectos pueden causar graves pérdidas, o bien sólo provocar daños fisiológicos dependiendo del estado fenológico de la planta y la cantidad de inoculo o individuos que estén presentes (CRT, 2005). Por otra parte, las

enfermedades destacan por su fácil diseminación en conjunto con las prácticas tradicionales de cultivo, siendo aquellas las relacionadas con bacterias y hongos como los principales patógenos al agave (Virgen-Calleros, 2004). Las enfermedades causadas por hongos se manifiestan como pudriciones semisecas, inodoras que se encuentran generalmente en las pencas, piña y raíz teniendo la facultad de entrar a la planta por sus propios medios, mientras que las bacterias aprovechan las heridas de la planta para ingresar y se presentan como pudriciones húmedas con olor desagradable que generalmente aparecen en el cogollo y pencas (CESAVEG, 2008). La principal enfermedad en *Agave* causada por bacterias es la llamada “pudrición de cogollo” o “pudrición blanda” asociada con *Erwinia* sp. (*Pectobacterium* sp.) que ataca principalmente al cogollo (CESAVEG, 2008). Los síntomas del daño se inician en la base de la espina apical del cogollo o de las espinas apicales y laterales de las hojas intermedias, la lesión avanza hacia el centro de las hojas y del cogollo provocando una pudrición descendente (CRT, 2005).

Por otra parte, según el Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Guanajuato (CESAVEG, 2008) las principales enfermedades causadas por hongos son:

- “Antracnosis” (*Colletotrichum* sp., *Botryodiplodia* sp, *Diplodia* sp y *Diplodinia* sp), que se manifiestan en forma de manchas hundidas, círculos concéntricos regulares y produce necrosis en la hoja.
- “Tizón” o “mancha anular” (*Alternaria* sp.), el síntoma inicial comienza por clorosis luego el cogollo tiende a inclinarse y después aparecen pudriciones blandas en la parte media de las pencas o en el cogollo, finalmente avanza formando grandes áreas de coloración gris azulosa, que se desarrollan en la superficie de las hojas formando anillos concéntricos.
- “Mancha foliar” (*Botryodiplodia* sp, *Didymosphaeria* sp y *Phytophthora* sp), el daño se inicia en la punta de las hojas jóvenes e intermedias donde se aprecia un arrugamiento y color violáceo oscuro con áreas mohosas y formación de cristales de exudado de color café-rojizo en las hojas afectadas, se pueden unir varias manchas que se endurecen y en

ocasiones se roturan provocando encarrujamiento y endurecimiento de las hojas.

Sin embargo, las enfermedades causadas por hongos más destructivas son:

- “Mancha gris” o “tizón foliar” (*Cercospora* sp., *C. agavicola*), produce manchas ovaladas y secas de color gris en las hojas cercanas al cogollo, luego alcanza las hojas del cogollo y avanza hacia el centro del mismo hasta alcanzar la piña, manifiesta una clorosis generalizada y finalmente las lesiones de las hojas avanzan hacia la piña.
- “Tristeza” y “muerte” del Agave (*Thielaviopsis paradoxa*), que produce un enrollamiento de las hojas hacia adentro y detiene el crecimiento de las raíces esto debido a que el hongo produce gases específicamente etileno y acetato de etilo, los cuales inhiben el desarrollo de las raíces, siendo confundida en muchas ocasiones con la marchitez del agave (Fucikovsky-Zack, 2004).

Finalmente, una de las enfermedades que presentan mayores problemas para su control es:

- La “Marchitez del agave tequilero”, cuyo agente causal se considera a *Fusarium oxysporum* (Ávila-Miranda et al., 2010), se presenta en cualquier cultivo y se debe a la deshidratación de los tejidos por la reducción o muerte del sistema radical o bien por la destrucción de los haces vasculares.

2.3.2 Marchitez del agave

La marchitez del agave tequilero es un problema fitosanitario que se agrava principalmente cuando existe una sobreproducción, se puede presentar en cualquier cultivo y se manifiesta un marchitamiento más o menos rápido, el cual se debe a la presencia y actividad del patógeno en el xilema de las plantas (Agrios, 2005) y es atribuido al género *Fusarium* sp. Los síntomas que presentan las plantas infectadas son: pérdida de la turgencia, las plantas se debilitan y

adquieren una tonalidad que va del verde claro al amarillo-verdoso, observándose principalmente en la base de la piña y presionando el cogollo. Posteriormente, las hojas se marchitan, lo cual puede presentarse como la extensión, enrollamiento o “encarrujamiento”, necrosando la base de la piña y produciendo la muerte de la planta (Agrios, 2005; Flores-López *et al.*, 2010), por la destrucción del sistema radical, o bien, por la destrucción o taponamiento de los haces vasculares (CRT, 2005), algo que puede observarse en las plantas de cualquier edad y etapa de desarrollo (Flores-López *et al.*, 2010). De acuerdo a Flores-López y colaboradores (2010), la marchitez del agave tequilero se asocia al hongo *F. oxysporum* presentando síntomas que determinan su identificación, siendo: (1) Enrollamiento y deshidratación de las hojas basales e intermedias de la piña; (2) Cambio de color a un verde pardoso; y (3) Pérdida del anclaje al suelo por la pudrición de la raíz.

Se ha reportado a los insectos rizófagos, como uno de los factores que por su misma acción y al alimentarse del agave tequilero, pueden provocar síntomas de marchitamiento o pueden provocar heridas que permitan el paso de los patógenos (e.g. *Fusarium sp.*). Otros factores que desencadenan los síntomas del marchitamiento son la sequía, el exceso de humedad y la aplicación de herbicidas (CRT, 2005). Existen tres géneros de hongos que producen marchitamientos vasculares como lo son: *Ceratocystis*, *Fusarium* y *Verticillium* (Agrios, 2005). La dispersión de estos fitopatógenos en el suelo depende de varios factores como la temperatura, humedad, tamaño de las partículas del suelo y los microcanales producidos por la actividad de artrópodos del suelo y animales (Flores-López *et al.*, 2010). La marchitez es una de las enfermedades que presentan mayores problemas para ser controladas, principalmente por las características del patógeno y los síntomas que se observan durante su ciclo de vida. Al ser una enfermedad predominantemente radicular, cuando se observan los síntomas de marchitez (“encarrujamiento”, cambio de color de la planta, etc.), el proceso de infección y la enfermedad ya se encuentra en un estado muy avanzado, que hace que la muerte de la planta sea eminente. Aunado a estas características, se considera que la fisiología de la planta provoca que la enfermedad y sus síntomas

no sean evidentes, incluso se considera que una planta con síntomas fue infectada en uno o dos años anteriores a la presencia de marchitez, siendo que esta enfermedad se observa en una gran cantidad de plantas en un predio contribuyendo a una disminución de la producción de manera importante aun cuando el daño causado a la planta y la muerte no son inmediatos, las condiciones ambientales pueden acelerar el daño (Rodríguez-Garay *et al.*, 2004; Flores-López *et al.*, 2010; Fuscikovsky-Zak, 2000; **Figura. 2.3**).



Figura 2.3 Desarrollo de la marchitez del agave tequilero. Donde A: es planta aparentemente sana; B: se observa inicios de marchitez en las hojas y C: la planta presenta síntomas graves de marchitez y muerte del agave tequilero.

2.3.3 Características del género *Fusarium*

El género *Fusarium* (Fusarios) comprende un gran número de especies fúngicas, muchas de ellas son conocidas como patógenos importantes de plantas o como contaminantes de alimentos por su producción de micotoxinas (Di Prieto *et al.*, 2003). Habita en el suelo o en restos de plantas en forma de esporas asexuales de pared gruesa que pueden ser de tres tipos: microconidias, macroconidias y clamidosporas (Mora-Castillo, 2001) o bien en forma de micelio (Agrios, 2005). Afectan a diferentes especies vegetales y animales con excepción de los pastos y árboles, la mayoría de los cultivos son ampliamente susceptibles a una forma patógena de *F. oxysporum*, por lo que es muy difícil de controlar. Su identificación se ha basado generalmente en caracteres morfológicos, tales como la forma de las micro y macroconidias, por la estructura de los microconidioforos y la formación, disposición y tamaño de las clamidosporas (Di Prieto *et al.*, 2003). Las clamidosporas se encuentran dispersas en el micelio aéreo o en esporodoquios o masas limosas (pionotos); las macroconidias son curvadas, pluriseptadas, con una

célula apical más o menos puntiaguda y en muchas especies se presenta una célula basal en forma de pie; las microconidias son comúnmente unicelulares, elipsoidales, fusiformes, claviformes, piriformes o subglobosos, similares en ancho a las macroconidias, con una base redondeada o truncada, por lo general formando cabezuelas mucosas, pero en algunas especies en cadenas basípetas. Las colonias de los distintos fusarios crecen moderada a profusamente, presentando diversos colores que va de incoloro a amarillo pálido que se vuelve de color rosa o púrpura con la edad (Di Prieto *et al.*, 2003), también puede ser de color blanco, rojo, naranjado, celeste, verde aceituna o pardo, especialmente en el reverso de la colonia, el micelio es ralo o denso y/o algodonoso, como un fieltro o con una zona central de funículos, pero en algunos casos es limoso (Carrillo, 2003). La reproducción es asexual y predominante en *F. oxysporum* que se considera como una “especie compleja”, es decir, que dentro del género existen varias líneas clónales (Michielse y Rep, 2009).

Algunas cepas de *F. oxysporum* son patógenas para diferentes plantas, mostrando un alto nivel de especificidad del hospedero, por lo que se han clasificado más de 120 formas especiales (*formae speciales*; f.sp.) de *F. oxysporum* (Fravel *et al.*, 2002) que se origina del suelo y es un parásito facultativo (Inoue *et al.*, 2002), que produce en gran abundancia macroconidias, microconidias y clamidosporas sobre la materia orgánica y tejido muerto colonizando el suelo, las clamidosporas permiten que el patógeno se encuentre inactivo en el suelo cuando se carece de un huésped adecuado y sobrevivir en condiciones desfavorables y se activan cuando la raíz de las plantas crece cerca de las clamidosporas (Sutherland, 1990).

2.3.4 Clasificación taxonómica

Clasificación taxonómica de *Fusarium oxysporum*, según Agrios (2005).

Reino: Fungy

División: Amastigomycota

Clase: Deuteromycetes

Subclase: Hyphomycetidae

Orden: *Monialiales*

Familia: Tuberculariacea

Género: *Fusarium*

Especie: *Fusarium oxysporum* (Figura. 2.4)

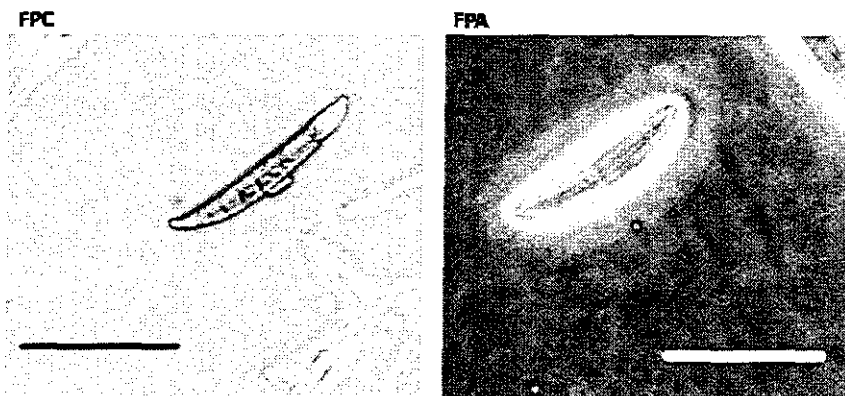


Figura 2.4. Esporas de las cepas patogénicas de *Fusarium oxysporum* (FPA y FPC), tomadas al microscopio óptico. La barra representa a 25 μm .

2.3.5 Características de las enfermedades causadas por *Fusarium oxysporum*.

A nivel mundial los hongos fitopatógenos originan pérdidas que ascienden a miles de millones de dólares al año. El daño que ocasionan no solo se refiere a las pérdidas económicas, sino también a las pérdidas en la producción biológica como las plantas de *A. tequilana*. La capacidad que tienen los hongos fitopatógenos de adaptarse va a depender en gran medida del grado de relación que han desarrollado con las plantas hospedantes es decir, si son parásitos obligados, parásitos facultativos o saprofitos (Rodríguez-Guzmán, 2001). Los hongos patógenos de las plantas utilizan diversas estrategias para infectar a sus plantas hospederas (Inoue *et al.*, 2002). El género *Fusarium* sp. es de amplia distribución y se atribuye a su capacidad para crecer en gran número de sustratos y a su eficaz mecanismo de dispersión como el viento y la lluvia, que juegan un importante papel en su diseminación (Monzón y Rodríguez, 2001). Por lo tanto,

algunas formas especiales de *Fusarium oxysporum* producen pudriciones de semillas, plántulas, raíces, tallos inferiores, coronas, cornos, bulbos, etc. (Agris, 2005), siendo una de las especies más comunes del género, que causa marchitamiento vascular en diferentes y variadas especies vegetales (Di Prieto *et al.*, 2003), además que en el hombre puede llegar a causar queratitis, esto debido a que presenta una gran variedad morfológica sufriendo frecuentemente de mutaciones en los cultivos o clínica (Monzón y Rodríguez, 2001). El proceso de infección se ha estudiado mediante la proteína verde fluorescente y microscopía electrónica, según Michielse y Rep (2009) se puede dividir en varios pasos: (1). El reconocimiento del hongo por las raíces, (2). El apego a la superficie de la raíz y su colonización y (3). La penetración en la raíz en la cual se reproducen y diseminan por toda la raíz induciendo la pudrición o marchitamiento, invadiendo todo el sistema vascular.

Debido a las grandes pérdidas ocasionadas por *F. oxysporum*, las medidas utilizadas para el control han sido el uso de productos químicos y prácticas culturales. Sin embargo, a la fecha no existen reportes de agroquímicos que puedan controlar a la enfermedad de manera eficiente o efectiva, mientras que el control cultural se ve restringido por razones económicas y ecológicas. Uno de los productos más usados y dañinos es el bromuro de metilo, que lesiona gravemente al ambiente y promueve el desarrollo de nuevas razas de patógenos que superan la resistencia del hospedero (Fravel *et al.*, 2002). Por este motivo, se han buscado opciones para combatir a este patógeno sin los efectos adversos que acarrear los agroquímicos, como el empleo de agentes de control biológico una de esas opciones en donde se intenta restablecer el perturbado equilibrio ecológico para así eliminar o reducir los daños causados por los patógenos y agroquímicos (Badii y Abreu, 2006).

2.3.6 Control biológico

El control biológico fue concebido como tal, a inicios del siglo XIX por algunos naturistas de diferentes países, que describieron la importancia de los microorganismos en la naturaleza y sus diferentes interacciones que establecen entre ellos (Siddiqui-Zaki, 2006). El control biológico de plagas y de enfermedades ha sido utilizado en la agricultura de manera empírica desde sus inicios (Serrano-Carreón y Galindo-Fentanes, 2007), tiene una historia de casi 120 años donde en 1889 se logró el primer control biológico de la escama algodonosa de los cítricos en California E.U.A, introduciendo una catarina depredadora proveniente de Australia (Rodríguez-del Bosque y Arredondo, 2007). El término "control biológico" o "biocontrol" se refiere al uso de uno o más organismos vivos, de sus metabolitos y/o sus subproductos que supriman y/o reduzcan el crecimiento y la proliferación de las actividades de los organismos patógenos que pueden ser también a través de la manipulación del ambiente, de un hospedero, de un antagonista o la producción masiva de uno o más antagonistas (McSpaden-Gardener y Fravel, 2002).

El uso de plaguicidas y agentes químicos antimicrobianos adquirieron un papel preponderante en la protección de cultivos contra plagas y enfermedades, sin embargo, su empleo intensivo y a veces desmedido, ha tenido efectos negativos sobre el ambiente y la calidad de vida de las poblaciones humanas, su eficacia puede ser de corta duración ya que presentan un efecto de selección de las poblaciones de plagas y patógenos resistentes. Los pesticidas, agroquímicos o antimicrobianos químicos, generalmente hacen disminuir rápidamente la densidad de la plaga o la severidad de la enfermedad, en contraste con los productos de control biológico generalmente su acción no es inmediata, además de esto, la eficacia de los productos biológicos en el campo depende sensiblemente de factores ambientales difíciles de controlar como son la temperatura, humedad, acidez del suelo, la exposición a la luz ultravioleta, etc. (Serrano-Carreón y Galindo-Fentanes, 2007) y de un manejo adecuado. Se ha reportado que los productos formulados a base de microorganismos, presentan una menor efectividad del control que los productos químicos, aunque en muchas ocasiones

esto va relacionado con una deficiente transferencia tecnológica o la falta de las condiciones adecuadas de uso. Las principales ventajas que presenta el uso de microorganismo para el biocontrol es la especificidad en su actuación, respeto al ambiente y que los patógenos tienden a desarrollar menor resistencia a productos microbianos que los productos químicos (Fernández y Juncosa, 2002). Los microorganismos (hongos o bacterias) empleados en el biocontrol de fitopatógenos son generalmente (o se recomienda) aislados a partir del suelo o de la planta en la cual se pretende emplear. La complejidad de los modos de acción de muchos agentes de control biológico representa una ventaja sobre los productos químicos, pues el patógeno tendrá mayor dificultad para desarrollar resistencia hacia ellos (Serrano-Carreón y Galindo-Fentanes, 2007).

Los agentes de biocontrol implican el aprovechamiento de los microorganismos para la supresión de enfermedades, mejorar la sanidad de las plantas, así como las interacciones que se desarrollan entre los microorganismos y las plantas, o entre ellos mismos (Siddiqui-Zaki, 2006). La presencia natural de agentes de biocontrol en la rizósfera son capaces de antagonizar con las plagas o patógenos, estos organismos antagonistas presentan diferentes tipos de mecanismos siendo el principal la competencia por espacio y nutrientes, así como el parasitismo, la producción de enzimas liticas, la producción de antibióticos y la inducción de resistencia (Serrano-Carreón y Galindo-Fentanes, 2007).

2.3.7 Interacciones planta-microorganismos

A lo largo de su ciclo de vida, en condiciones naturales las plantas interactúan con una amplia variedad de microorganismos que pueden mostrar varios tipos de relaciones desde las altamente perjudiciales para el hospedante, hasta aquellas que benefician tanto al hospedante como al microorganismo (Madriz-Ordeñana, 2002). La interacción puede tener lugar en el suelo, la rizósfera o incluso dentro de la propia planta (Alabouvette *et al.*, 2006). Los tipos de interacción se conocen como mutualismo, proto-cooperación, comensalismo, neutralismo, competencia, amensalismo, parasitismo y depredación. Las interacciones con patógenos pueden afectar significativamente la sanidad de las plantas de diversas maneras,

pero para fines prácticos también son importantes las interacciones que se pueden presentar entre los mismos microorganismos (Pal y McSpadden-Gardener, 2006). Los mecanismos de acción de estas interacciones pueden ser la antibiosis, que es la inhibición del patógeno por los compuestos antimicrobianos, que inhiben el crecimiento o matan al patógeno. La competencia, ya sea de los sitios de colonización y/o de los nutrientes suministrados por semillas y raíces. La inducción de resistencia de las plantas o por la degradación de los factores de patogenicidad del patógeno, tales como toxinas (Whipps, 2001).

Otros organismos pueden suprimir la actividad de los agentes patógenos con respecto a los mecanismos específicos del biocontrol como micoparasitismo e hipovirulencia o la competencia entre hongos asociados a plantas, bacterias y otros organismos, incluyendo insectos en asociación mutualista y/o como endófitos (Jeger, 2001). Las dos especies interactúan directamente compitiendo por el espacio y nutrientes que inhiben el crecimiento de una o es posible que se entremezclen sin discernir efectos sobre otras (Klepzig *et al.*, 2001). Los microorganismos son capaces de poner a disposición de las plantas los nutrientes no asimilables directamente por ella, además de aquellos retenidos en la materia orgánica del suelo y en compuestos minerales. La actividad microbiana y los ácidos excretados por los microorganismos edáficos se hacen asimilables para las raíces como son el fósforo, azufre y potasio (Whipps, 2001). Un ejemplo de interacción entre planta y microorganismo benéfico son las micorrizas, en donde las raíces de las plantas son colonizadas por el micelio de hongos simbióticos, de forma que todo el micelio participa en la absorción de nutrientes para la planta (Agrios, 2005). La planta obtiene del hongo principalmente nutrientes minerales como el fosforo así como agua, mientras que el hongo obtiene nutrientes y metabolitos que es incapaz de sintetizar por sí mismo (Barea *et al.*, 2008). Otro ejemplo de interacción benéfica son las bacterias que colonizan las raíces de las plantas promoviendo su crecimiento y/o reduciendo enfermedades producidas por patógenos (Sarabia-Ochoa *et al.*, 2010) a esta relación benéfica entre las bacterias y las plantas se le denomina "mutualismo", el cual se define como la condición en la que dos seres vivos de diversas especies

viven juntos habitualmente (Hernández-Montiel y Escalona-Aguilar, 2003), algunas de estas bacterias invaden los tejidos de las plantas vivas y causan infecciones asintomáticas e inaparentes (Sarabia-Ochoa *et al.*, 2010).

Debido a la gran diversidad de microorganismos que se pueden encontrar en la rizósfera de las plantas, y la variedad de interacciones entre microorganismo y las plantas (inocuas, patógenas o benéficas), actualmente se considera aprovechar estas interacciones con fines biotecnológicos como son el control biológico y la biofertilización, lo que representa una ventana de oportunidades para la disminución paulatina de la dependencia a los agroquímicos que afectan de manera importante al ambiente y a la salud humana (Figura. 2.5).



Figura 2.5 Productos de control biológico disponibles en el mercado (imágenes tomadas de la red).

3. ANTECEDENTES

3.1 EL ESTUDIO DE LA MARCHITEZ DEL AGAVE TEQUILERO Y LA BÚSQUEDA DE SU AGENTE CAUSAL

La marchitez es un problema fitosanitario que enfrenta el agave tequilero, que ha provocado que el costo de producción aumente a niveles poco rentables para el productor, ocasionando el abandono de los cultivos, una condición que a su vez, es propicia para la proliferación de malezas y plagas relacionadas con el incremento de la incidencia y severidad de la marchitez a niveles críticos. Esto ha provocado un círculo vicioso de esta y otras enfermedades y plagas, que en la actualidad se ha convertido en una seria amenaza para el abasto futuro de la industria tequilera y otras industrias relacionadas con este cultivo. Un hito importante en esta enfermedad, ha sido el aislamiento de su agente causal, al presentarse controversias al momento de definir y reportar al microorganismo responsable de la marchitez. Por lo tanto, existen diferentes reportes de estudios que buscan al o los microorganismos causantes de la marchitez, así como productos y microorganismos antagonistas para el control de la enfermedad, siendo atribuido al género *Fusarium* sp. y *F. oxysporum* como los principales candidatos como agentes causales (Flores- López *et al.*, 2010; Avila-Miranda *et al.*, 2010). Un ejemplo lo encontramos con el estudio de Castañeda-Vázquez (2002) donde aisló e identificó organismos que producían síntomas de marchitez en el agave tequilero. Para lo cual, obtuvo material vegetal con síntomas (raíz, cogollo, hojas y pina) de las principales zonas productoras de agave con incidencia de marchitez, obteniendo aislamientos en diferentes medios de cultivo (agar de Saboraud, agar agua y agar de papa y dextrosa). Logró la identificación aquellos hongos con potencial patogénico mediante claves morfológicas establecidas macroscópicamente. Sus resultados mostraron que los géneros fúngicos más frecuentes fueron *Fusarium* con 46 aislamientos destacando las especies *F. moniliforme* y *F. oxysporum*, *Rizhopus* sp. con 19 aislamientos; *Mycelia sterilia* y *Alternaria* con cinco y a *Botrytis* y *Diplosporium* en solo dos aislamientos. En el caso de las bacterias se encontró a *Erwinia* aislada en seis

ocasiones y *Pseudomonas* con cuatro aislamientos, siendo esta una de las más virulentas. Otro reporte fue presentado por Soltero-Quintana (2002) en donde evaluó el efecto patogénico de *Fusarium oxysporum*, *Erwinia* sp y *Pseudomonas* sp. en plantas de *A. tequilana* bajo condiciones *in vitro*. El inoculo del hongo se obtuvo de un concentrado de esporas de cultivos fúngicos aislados de plantas enfermas en campo y para *Erwinia* sp. y *Pseudomonas* sp., se utilizó un caldo de cultivo. Las plantas de *A. tequilana* cultivadas *in vitro* se inocularon en hojas con heridas provocadas y se realizaron observaciones cada segundo día. En el caso de *F. oxysporum*, los resultados mostraron que el 90% de las plantas desarrollaron la infección y se encontró que el hongo no penetra por las heridas en las hojas, sino por la base de la planta. En el caso de *Erwinia* sp., el 90% de las plantas desarrollaron la infección y cerca del 85% murieron por esa causa; por su parte, en *Pseudomonas* el 100% de las plantas desarrollaron la infección y todas murieron, aunque la infección inició en la base de la planta y no en los sitios de inoculación. Por otra parte, Aceves-Rodríguez y Byerly-Murphy (2002) describieron el aislamiento de *F. oxysporum* y *Pseudomonas* como los organismos causantes de la marchitez del agave tequilero. En este estudio los aislamientos fueron inoculados a plantas de *A. tequilana*, con una suspensión de esporas aplicada en estiércol de res, pollo o cerdo, en el caso de *F. oxysporum* y mediante punción múltiple en las hojas, en el caso de *Pseudomonas*; las plantas en los dos casos fueron colocadas en una cámara de humedad relativa del 100% por dos meses. Sus resultados no fueron concluyentes al no presentarse los síntomas característicos de marchitez, lo que atribuye a la falta de luz y transpiración de las plantas. Por su parte Ávila-Miranda y colaboradores (2010), describieron la evaluación de diez campos comerciales de *A. tequilana* que presentan alta incidencia de marchitez del agave tequilero en los estados de Jalisco y Nayarit, con el objetivo de evaluar la escala de gravedad en el campo del marchitamiento y observar una correlación positiva entre el grado de daño vascular del xilema o pudrición de la raíz con el nivel de severidad de la marchitez en las plantas de campo. Se realizaron veintidós aislamientos de *F. oxysporum* obtenidas del tallo de las plantas, las cuales fueron analizadas para determinar su diversidad genética. A

partir de esto, se seleccionaron cinco cepas de tres grupos genéticos para evaluar su patogenicidad en plántulas bajo condiciones de invernadero. Los resultados mostraron síntomas de marchitez en las plantas después de 200 días de la inoculación con *F. oxysporum*, además de encontrarse evidencia de daño y presencia de micelio en los vasos del xilema, entre estos aislamientos se encontró a varios cepas de *Fusarium solani*, lo que indica que al menos dos especies de *Fusarium* son responsables de la enfermedad de marchitamiento en el agave tequilero. En cambio, la pudrición de la raíz no se presentó en ninguna planta. A partir de estos estudios, ha sido posible el fortalecimiento de la hipótesis de que la marchitez del agave tequilero se asocia al menos a dos especies del género *Fusarium*. Sin embargo, uno de los principales problemas que representa la denominación final del agente causal (o agentes causales) es la comprobación de los postulados de Koch, de manera particular por los tiempos necesarios para observar los síntomas en plantas bajo condiciones de campo, lo que complica las investigaciones que tienen en la actualidad tiempos cortos para la obtención de los resultados. Aún cuando se han reportado algunos ensayos *in vitro* de patogenicidad, es necesario mejorarlos para obtener una mejor selectividad y equivalencia con pruebas en invernadero y campo. Por lo tanto, aun cuando existe información generada hasta el momento muy importante con respecto a la marchitez, diversos grupos de investigación trabajan abordando diferentes temas que generen nuevo conocimiento que permita el desarrollo de tecnología capaz de controlar esta enfermedad, destacando los avances en la definición de los principales microorganismos asociados a la marchitez del agave tequilero.

3.2 LA BÚSQUEDA DEL CONTROL DE LA MARCHITEZ DEL AGAVE TEQUILERO

Debido a su devastador efecto en los cultivos de esta enfermedad se han realizado diferentes estudios enfocados a la búsqueda de alternativas al control de la marchitez. Un ejemplo es el estudio de Flores-López y Byerly-Murphy (2002), donde evaluaron la efectividad biológica para el control de la marchitez por fungicidas y bactericidas comerciales. Sus experimentos consistieron en la

aplicación de estos productos cada dos meses durante ocho meses de manera directa sobre plantas de *A. tequilana*. Los resultados mostraron que los tratamientos Tecto 60, Sulfato de cobre pentahidratado y Phyton tuvieron un efecto significativo para el control de la marchitez del agave tequilero y observaron que el efecto de los pesticidas se muestran hasta que la disponibilidad de humedad es nula. Por otro lado, Flores-López (2002), buscó validar el uso del sulfato de cobre pentahidratado para el control de la marchitez del agave tequilero, el cual se utilizó a una concentración del 98% y a una dosis de 10 kg por cada 200 L de agua, la aplicación duro una semana y la evaluación se realizó de manera cualitativa durante dos meses después de la ultima aplicación. Sus resultados mostraron que el sulfato de cobre pentahidratado fue adecuado para el control de la marchitez bajo sus condiciones de evaluación, incluso recomendando una cantidad mínima y la adición de abundante agua.

Sin embargo, una constante en estos estudios ha sido la búsqueda de un control "curativo" algo que en la realidad es algo muy complicado, además de que en estos estudios se utilizaron campos comerciales de agave, sin definir claramente el agente causal para estas plantas. Esta misma directriz, la encontramos en la mayor parte de las evaluaciones de efectividad biológica contra la marchitez, enfocándose casi de manera universal en plantaciones comerciales y bajo condiciones de campo, lo que implica el efecto de demasiadas variables sobre los experimentos. Por lo tanto, también se hace importante explorar y desarrollar metodologías que permitan la evaluación bajo condiciones controladas de las pruebas de efectividad biológica. Aunado a esta problemática, se ha encontrado que las enfermedades de raíz, asociadas al género *Fusarium* son de las difíciles de controlar con el uso de agroquímicos convencionales, debido a su naturaleza y características de la infección, en contraste con las enfermedades del tipo foliar o "aéreo". Por lo tanto, la búsqueda de nuevas alternativas de control, o el utilizar aquellas que han sido efectivas en otros cultivos de importancia comercial, se consideran como un punto de partida para encontrar una herramienta de control en este cultivo.

3.3 EL CONTROL BIOLÓGICO DEL GÉNERO *Fusarium*

Una estrategia para el control de enfermedades de raíz asociadas al género *Fusarium*, ha sido el uso de agentes de control biológico, principalmente por hongos del género *Trichoderma*. Por lo tanto, la búsqueda de agentes de control biológico para enfermedades de raíz se ha convertido en una herramienta de gran importancia. Existen trabajos encaminados al control de diferentes especies de *Fusarium* sp. empleando el control biológico, por ejemplo una estrategia involucra el utilizar cepas no patogénicas de *F. oxysporum*, aisladas de los denominados suelos supresores (Fravel *et al.*, 2002). Un trabajo pionero en esta estrategia fue realizado por Larkin y Fravel (1999) en donde evaluaron tres cepas no patógenas de *Fusarium spp.*, demostrando previamente la incidencia para reducir la enfermedad de la fusariosis vascular del tomate, donde debido a la competencia por nutrimentos se presentó una reducción en el crecimiento del patógeno lo que fue equivalente a una reducción entre un 39 a 53% de la enfermedad. Otro ejemplo, lo encontramos en el trabajo realizado por Bolwerk (2005), en cual observo que en los suelos supresivos las interacciones entre patógenos y no patógenos de cepas de *Fusarium* tienen un efecto positivo en el control de la enfermedad, advirtiendo un patrón de penetración en la epidermis y de colonización de las raíces de algunas cepas no patógenas de *Fusarium spp.* en diferentes especies vegetales.

Se han reportado diferentes especies de hongos con potencial como agentes de control biológico de *Fusarium*. Uno de estos reportes fue por Melgarejo y colaboradores (2005), en donde evaluaron varios hongos antagonistas, entre ellos a *Penicillium oxalicum*, el cual demostró su eficacia y la resistencia frente a la marchitez vascular del tomate causada por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) Fol. Otra investigación de Sunil y Satish (2005), en donde aislaron una cepa de suelos áridos resistente al calor nativa de *Aspergillus versicolor* que resultó ser altamente antagonico contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *cumini* (Focu) patógeno del comino. En este reporte se comparara su efectividad con relación a *Trichoderma harzianum* y se demostró que *A. versicolor* presenta una mayor efectividad al obtener una reducción del 99.2 al 96.4% de propágulos de *Focu* en general, un

aumento en las concentraciones del inoculo, las densidades de población de *Focu* en el suelo disminuyeron.

A partir de estos trabajos, se han generado algunos productos comerciales de control biológico, que han sido evaluados en otros estudios con otros cultivos. Uno de estas investigaciones fue realizada por Mora Castillo (2001), quien evaluó los agentes de control biológico Rootshield®, Mycobac® (*Trichoderma harzianum*) y Mycoral® (endomicorrizas vesículo-arbusculares o VAM), para el control del hongo *F. oxysporum* el cual reduce el sistema radicular más del 90% en plantas de café (*Coffea arabica*). Estos bioinsumos fueron aplicados a la siembra del café en suelo infestado y no infestado por el patógeno, utilizando las dosis recomendadas por los fabricantes. Después de 120 d de siembra, los resultados mostraron una reducción de la incidencia y severidad de la enfermedad y un efecto positivo para la longitud y peso seco de la raíz. Partiendo de estos trabajos, y considerando que la marchitez del agave tequilero ha sido asociada principalmente con el género *Fusarium* y *F. oxysporum*, el uso del control biológico en esta enfermedad, podría significar una opción de gran relevancia.

3.4 EL CONTROL BIOLÓGICO UTILIZANDO *Trichoderma* sp.

Sin embargo, aún cuando se han encontrado diferentes géneros de hongos con actividad antagonista contra *Fusarium*, uno de los géneros más importantes utilizados con resultados sobresalientes es *Trichoderma* sp. y *Gliocladium* sp. Por este motivo, se han realizado diversos estudios enfocados al control biológico por *Trichoderma* spp. el cual ha incluido mecanismos que protegen a la planta de agentes patógenos ya sea directamente como la antibiosis y micoparasitismo, o indirectamente como la competencia por espacio, la desactivación de enzimas del patógeno y la inducción de resistencia vegetal (Bolwerk, 2005; Infante *et al.*, 2009). Un ejemplo es *Trichoderma harzianum* en la que los mecanismos de acción se basan en el micoparasitismo siendo este el mejor en el control biológico de distintas enfermedades fúngicas, parasitando un amplio espectro de especies de hongos como *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Sclerotinia*, *Helminthosporium*, *Fusarium*, *Armillaria*, *Colletotrichum*, *Verticillium*, *Venturia*, *Endothia*, *Pythium*, *Phytophthora*,

Rhizopus, *Diaporthe*. También encontramos a la antibiosis como un mecanismo que inhibe el desarrollo o causa la muerte del patógeno mediante la producción de enzimas líticas extracelulares como son las quitinasas y proteasas (Howell, 2003) y/o por la producción de antibióticos como son: trichodermina, suzukacilina, alameticina, dermadina, trichotecenos y trichorzianina (Infante *et al.*, 2009), también se ha podido encontrar a la competencia por el espacio de la rizósfera y los nutrimentos, como otro mecanismo de acción, lo que suprime o hace que no se exprese la enfermedad (Galeano y Urbanejo., 2009). Por otro lado *Trichoderma virens* es un efectivo agente de control biológico para plantas con enfermedades causadas por hongos (Jiménez-Pinto, 2005), los mecanismos de acción pueden ser el micoparasitismo; la producción de antibióticos como la gliotoxina y la competencia por los nutrimentos y nichos en la rizósfera de la planta, en la cual se ha demostrado el remplazo de algunos patógenos en las raíces por *T. virens* (Howell, 2003).

Entre los trabajos que fundamentan este conocimiento encontramos el realizado por Sivan y colaboradores (1987), quienes demostraron el control en la enfermedad de la corona y pudrición de la raíz de tomate inducida por *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (*For-f*), utilizando una combinación de *T. harzianum* con bromuro de metilo y un tratamiento con *T. harzianum* en solitario. Los resultados mostraron una reducción en la colonización definitiva de *Fusarium* spp. en la superficie de la corona en un 76 ó 94% respectivamente de acuerdo al tratamiento, además mostraron que *T. harzianum* se encuentra principalmente en la corona y la punta de la raíz del tomate, promoviendo el crecimiento vegetal. Este mecanismo fue descrito como de control biológico indirecto por Inbar y colaboradores (1994), además de incluir la competencia por nutrimentos y/o nichos. Su estudio reveló que tanto una combinación de *T. harzianum* con dosis sub-letales de bromuro de metilo o tan solo *T. harzianum* es eficaz en el control de *For-f* en tomate.

Por otra parte, Michel-Aceves y colaboradores (2005), evaluaron el efecto antagónico *in vitro* de cepas nativas de *Trichoderma* spp., sobre *F. subglutinans* (*Fs*) y *F. oxysporum* (*Fo*), agentes causales de la "escoba de bruja" del mango

(*Mangifera indica* L). Para esto, aislaron 10 cepas de hongos antagonistas, posteriormente identificadas como *T. harzianum*, que presentaron porcentajes de inhibición contra ambos fitopatógenos, de un 62.9% en *Fo* y 42.0% en *Fs*. Por otro lado, Ezziyyani y colaboradores (2004), reportaron la evaluación de *Trichoderma harzianum* (*Th*) sobre *Phytophthora capsici* (*Phc*), agente causal de la podredumbre de pimiento (*Capsicum annuum* L.), encontrando que *Th* aumenta los niveles de enzimas hidrolíticas β -1,3- glucanasa (lisis enzimática), ejerce una mayor competencia por espacio y nutrientes, además de interactuar directamente con el patógeno que producen una reducción y destrucción de la colonia del patógeno optimizando la producción de la biomasa del antagonista *Th*. El tratamiento con *Th* fue capaz de reducir hasta en un 65% la "tristeza" causada por *Phc* en plantas de pimiento.

A partir de estos estudios, se han obtenido resultados alentadores que fomentan la búsqueda y aplicación de agentes de control biológico en nuevos cultivos, destacando la variedad de productos de biocontrol que existen en el mercado como ejemplo: "Mycobac" (*Trichoderma lignorum*), "Trianium®", "Lithan®" y "Tricozam®" (*T. harzianum*), en los cuales la interacción de *Trichoderma sp.* con la planta ha mostrado resultados favorables al inhibir o reducir la infección por *Fusarium sp.* en diferentes especies de hortalizas, principalmente en el tomate (Howell, 2003).

3.5 EL APROVECHAMIENTO DE LAS INTERACCIONES ENTRE PLANTAS Y MICROORGANISMOS COMO FUENTE DE BIOFERTILIZANTES Y AGENTES DE CONTROL BIOLÓGICO.

La principal fuente de los agentes de control biológico ha sido aquellos microorganismos asociados a los cultivos en los cuales se pretende realizar el control de un patógeno. Como previamente se ha descrito, la diversidad de interacciones bióticas que se presentan en la rizósfera de las plantas es enorme, y abarca desde aquellas benéficas, inocuas y negativas para la planta. Sin embargo, no solo se han aprovechado aquellas interacciones de manera aislada, actualmente también se exploran aquellas que involucran dos o más

microorganismos, ya sean entre bacterias y hongos en la rizósfera que se ha observado en muchos casos un efecto biocontrolador mayor, en comparación con los agentes de control biológico utilizados por separado (Whipps, 2001). Entre estos microorganismos importantes para el control de enfermedades en los cultivos, se encuentran las bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*, hongos de los géneros *Fusarium*, *Gliocladium* y *Trichoderma*, siendo este último de los más utilizado para el control de un grupo importante de patógenos del suelo (Infante *et al.*, 2009). En el caso de las bacterias, se encuentra *Pseudomonas fluorescens* y las del género *Bacillus*, que son consideradas las más eficaces para controlar enfermedades foliares y de raíces (Whipps, 2001). Estas interacciones múltiples son una situación normal en la rizosfera, las combinaciones de los hongos y las bacterias han demostrado un mayor control biológico. Un ejemplo es el estudio de Muñoz-Ruiz y colaboradores (2001), donde presentaron métodos de solarización y encalado como pre-tratamientos de suelo para la introducción de agentes de control biológico contra *Rhizoctonia solani*, utilizando una suspensión de esporas de *Bacillus* sp., *B. subtilis*, *B. subtilis* (Kodiak HB), *Trichoderma harzianum* IMI206040 y *T. harzianum* IMI206040. Los resultados mostraron que los mejores tratamientos fueron el encalado junto *B. subtilis* y el solarizado con *Bacillus* sp., con 100% de protección, en contraste con el testigo absoluto que tuvo una incidencia de 31.25%. Otro estudio es el de Lozoya-Saldaña y colaboradores (2006), en el cual determinaron la actividad antagonica de algunas cepas bacterianas y de *Trichoderma*, que habían sido aisladas en el Valle de Toluca, contra la enfermedad del "tizón tardío" causado por *Phytophthora infestans* en el jitomate (*Solanum lycopersicum* Mill) y en la papa causada por *Solanum tuberosum* L. Los resultados mostraron que las cepas de *Pseudomonas* (*Ps*) fueron las más efectivas en la supresión de los patógenos. En campo, *P. burkholderia* (*Ps-Bu*) indujo una mayor inhibición de la enfermedad, mientras que con la combinación de *Ps-Bu-Streptomyces*, así como *Trichoderma*, ejercieron un efecto equivalente tanto en maceta como en campo. Por otra parte, también se han evaluado otros usos de las interacciones microbianas, como en el caso de bioremediación de suelos contaminados, por ejemplo Maldonado-Chávez y

colaboradores (2008), que evaluaron el potencial de la combinación de diferentes organismos en la biorremediación del suelo contaminado con petróleos nuevo (PN) y con el intemperizado (PI). Para esto utilizaron un consorcio microbiano constituido por bacterias *Pseudomonas* sp., *Serratia marcescens* y los hongos *Aspergillus* sp y *Trichoderma* sp., además del pasto Egipto (*Brachiararia mutica*) y de la leguminosa guaje (*Leucaena leucocephala*) y adicionalmente un fertilizante inorgánico. Los resultados mostraron que el consorcio microbiano y el fertilizante promovieron la degradación del PN y el PI, además que la leguminosa guaje inoculada con el consorcio y fertilizante tiene un amplio potencial en la fitorremediación de suelo.

Estos ejemplos nos muestran que las asociaciones microbianas representan un enorme potencial para la búsqueda de insumos de uso agrícola. Tomando como referencia estos trabajos se considera que las diferentes especies de agave pueden formar una interacción con una gran variedad de microorganismos presentes en la rizosfera, proporcionándole una ventaja con respecto a las que no la tienen, por lo que el continuo contacto con estos microorganismos bajo condiciones naturales provoca una interacción compitiendo por ganar acceso e influencia sobre los recursos sin colonizar y a los nutrientes, debido a esta interacción natural entre planta-hongo se pretende aprovechar y desarrollar nuevas alternativas contra *F. oxysporum* y de biofertilización que no ocasionen daños al ambiente ni a la salud humana.

3.6 EL APROVECHAMIENTO DE LA INTERACCIÓN PLANTA-HONGO CONTRA LAS ENFERMEDADES DE RAÍZ EN EL AGAVE TEQUILERO.

Hay una gran variedad de especies de hongos y aislados que se han examinado como agentes de control biológico, siendo las más predominantes *Trichoderma*, especies no patógenas de *Pythium* sp., (*P. oligandrum*), *Fusarium* y *Rhizoctonia*, aislamientos de especies de *Phialophora* o los hongos micorrízicos, como simbiontes mutualistas, tales como *Glomus intraradices*. Los cultivos que han visto el desarrollo de métodos efectivos de control de enfermedades de raíz asociadas a hongos, utilizando hongos antagonistas van en aumento (Whipps, 2001;

Bolwerk, 2005; Infante *et al.*, 2009). Partiendo de estos resultados, y de la problemática que representa la marchitez del agave en *A. tequilana*, se hace necesario explorar el potencial de los microorganismos asociados a la rizósfera del agave como potenciales biofertilizantes y/o agentes de control biológico contra la principal enfermedad de raíz para este cultivo. Existen reportes sobre la búsqueda y aprovechamiento de microorganismos para el cultivo del agave. Entre estos estudios encaminados en la exploración de hongos asociados al agave tequilero, con potencial para ser usados como biocontroladores o biofertilizantes, se encuentra la investigación de Armenta y colaboradores (2003) sobre micorrizas, donde estudiaron a los hongos filamentosos y micorrízicos asociados con *Agave angustifolia* Haw, reportando un porcentaje de colonización micorrizica en las raíces del 42 al 95 %, al encontrar hifas, arbusculos, ovillos y vesículas en las células corticales, indicando una asociación funcional que favoreció la disponibilidad de nutrimentos para *A. angustifolia*, siendo las micorrizas las principales vías de absorción y solubilización de fósforo.

Por otra parte, Obledo y colaboradores (2003), describieron una cepa no patogénica de *F. oxysporum* (*npFo*) aisladas de las plantas de *Agave victoria-reginae* Moore, que al ser reintroducida en plantas micropropagadas de la misma especie en condiciones de invernadero, induce un efecto benéfico que se traduce en un aumento del 225% en la longitud de raíces, 50% en el número de raíces, 50% en el número de estomas en la superficie adaxial de las hojas, además de un incremento del 167% en acidez nocturna y un 122% en ácido málico, aunado a esto, la clorofila total y el contenido de azúcares aumentó un 14 y 172% respectivamente. A partir de estos resultados, se reportó que la asociación de *npFo* con *A. victoria-reginae* se considera como una simbiosis benéfica. De manera paralela, Barragán-Barragán (2001), evaluó el efecto de la inoculación de la cepa *npFo* aislada de *A. victoria-reginae*, en cuatro especies del género *Agave*: *A. tequilana*, *A. parrasanna*, *A. vilmoriniana* y *A. victoria-reginae*, las cuales fueron propagadas *in vitro* y adaptadas a condiciones de invernadero. Estas plantas fueron inoculadas con *npFo* y se evaluó variables anatómicas y fisiológicas. Los resultados mostraron que la asociación que se establece entre la cepa de *npFo* y

las cuatro especies de agave es benéfica o inocua en términos generales, siendo la especie *A. parrasanna* la que manifestó una mayor respuesta favorable.

Por otra parte, en cuanto a trabajos encaminados al control biológico de la marchitez del agave tequilero, Sánchez y colaboradores (2007), reportaron el antagonismo *in vitro* de *Trichoderma longibrachiatum* contra *Thielaviopsis paradoxa*, un hongo aislado de la rizósfera de *A. tequilana* en plantaciones comerciales con síntomas de enfermedad, que fue confrontado contra setenta y nueve cepas de *Trichoderma*. Los resultados mostraron que nueve de estas cepas produjeron metabolitos volátiles inhibiendo completamente el crecimiento de *Th. paradoxa*, las cepas fueron identificadas como *T. longibrachiatum*, demostrando que los modos de acción de *T. longibrachiatum* contra *Th. paradoxa* en experimentos *in vitro* fueron por micoparasitismo y la producción de metabolitos volátiles. A partir de estos reportes, se puede corroborar que la amplia gama de interacciones microbianas presentes en la mayor parte de los cultivos, puede encontrarse en *A. tequilana*, lo que hace importante el realizar trabajos equivalentes como los realizados en otras especies vegetales, en donde se han obtenido efectivos agentes de control biológico u organismos con asociaciones benéficas para el cultivo al cual está asociado. Partiendo de esta premisa, en este trabajo se pretende evaluar el potencial como posibles biofertilizantes y agentes de control biológico de diferentes aislamientos de hongos, asociados a la rizósfera del agave tequilero, principalmente del género *Trichoderma*.

4. JUSTIFICACION

El *Agave tequilana* Weber var. azul es un cultivo muy importante al ser la materia prima para la producción del tequila, una industria que genera importantes ingresos económicos a nivel regional y nacional, así como un gran número de empleos. Sin embargo, debido a la forma de propagación del agave tequilero, se genera una desventaja en cuanto a su susceptibilidad a plagas y enfermedades. Haciéndose evidente con las estadísticas disponibles, en donde se estima que alrededor 69 millones de las 220-230 millones de plantas de agave sembradas en la zona geográfica de la denominación de origen enfrentan en un mayor o menor grado problemas fitosanitarios. Entre éstos, sobresale el marchitamiento y pudrición de raíz del agave tequilero causada por el hongo fitopatógeno *F. oxysporum*, ocasionando un daño económico impactante en los cultivos. Actualmente, para el control de este fitopatógeno se hace uso de fungicidas químicos (ejemplo bromuro de metilo), que causan graves daños al ambiente y a la salud humana, además de generar nuevas razas de patógenos resistentes. Las desventajas en el uso de los agroquímicos disponibles actualmente en el mercado, ha promovido que se exploren nuevas alternativas para combatir a *F. oxysporum* para que estas no se presenten o que estén en una proporción mucho menor. En este sentido una alternativa que se ha estado explorando tanto en el agave como en otros cultivos de importancia comercial para el combate de *F. oxysporum*, son los agentes de control biológico. Estos organismos presentan características particulares que les permiten competir, parasitar o eliminar organismos dañinos como son los hongos fitopatógenos, utilizando diferentes mecanismos de acción que incluyen la producción de metabolitos antibióticos, competición por espacio o nutrientes o hiperparasitismo. Cabe destacar que estos agentes de control biológico, han sido encontrados estableciendo una asociación benéfica con las plantas, como es el caso de las micorrizas, o en el caso de inocua como algunas especies de *Trichoderma*, o al menos interaccionan en la rizósfera de las plantas. Existen diferentes investigaciones donde se muestra que a partir de la gran diversidad de microorganismos asociados a la rizósfera de las plantas se han obtenido

prometedores agentes antagonistas y benéficos que permiten el desarrollo de productos comerciales que sustituyen a los agroquímicos por alternativas orgánicas.

Partiendo de estos estudios y se han retomado trabajos previos con el agave tequilero o especies relacionadas, se considera que a partir de la diversidad de microorganismos presentes en la rizósfera del agave tequilero se pueden hallar tanto organismos con potencial para agentes de control biológico como benéficos, que presenten una asociación con el agave tequilero, además de poder encontrarse bajo las condiciones ambientales en los cuales se desarrolla este cultivo. Aunado a estas características la búsqueda en este trabajo estaría dirigida al combate de un patógeno cuyo control es muy complicado como es *F. oxysporum*. Con base en este conocimiento se formuló la siguiente hipótesis y objetivos:

5. HIPOTESIS

Debido a que en la rizósfera de *Agave tequilana* weber var. azul se presentan una gran diversidad de interacciones entre los microorganismos presentes en ella, es posible encontrar hongos filamentosos con actividad benéfica para la planta y/o con potencial como agentes de control biológico contra *Fusarium oxysporum* al realizar un estudio exploratorio.

6. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el potencial de los hongos filamentosos asociados a la rizósfera de *Agave tequilana* Weber var. azul como agentes de biocontrol contra *F. oxysporum* y/o biofertilizantes.

6.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Caracterizar la patogenicidad de dos aislamientos de *Fusarium oxysporum* (FPA y FPC) asociados a plantas con síntomas de marchitez del agave tequilero.
- Evaluar la actividad antagónica *in vitro* contra *F. oxysporum* de los aislamientos fúngicos obtenidos de medio selectivo para *Fusarium* y *Trichoderma* asociados a la rizósfera de *A. tequilana*.
- Determinar la patogenicidad *in vitro* y *in planta* de los aislamientos fúngicos con actividad antagónica *in vitro* sobresaliente.
- Obtener la actividad antagónica contra *F. oxysporum* de los aislamientos fúngicos obtenidos de medio selectivo para *Fusarium* y *Trichoderma* asociados a la rizósfera de *A. tequilana* en planta bajo condiciones controladas.
- Estimar la actividad como biofertilizante de los aislamientos fúngicos asociados a la rizósfera en planta bajo condiciones controladas.

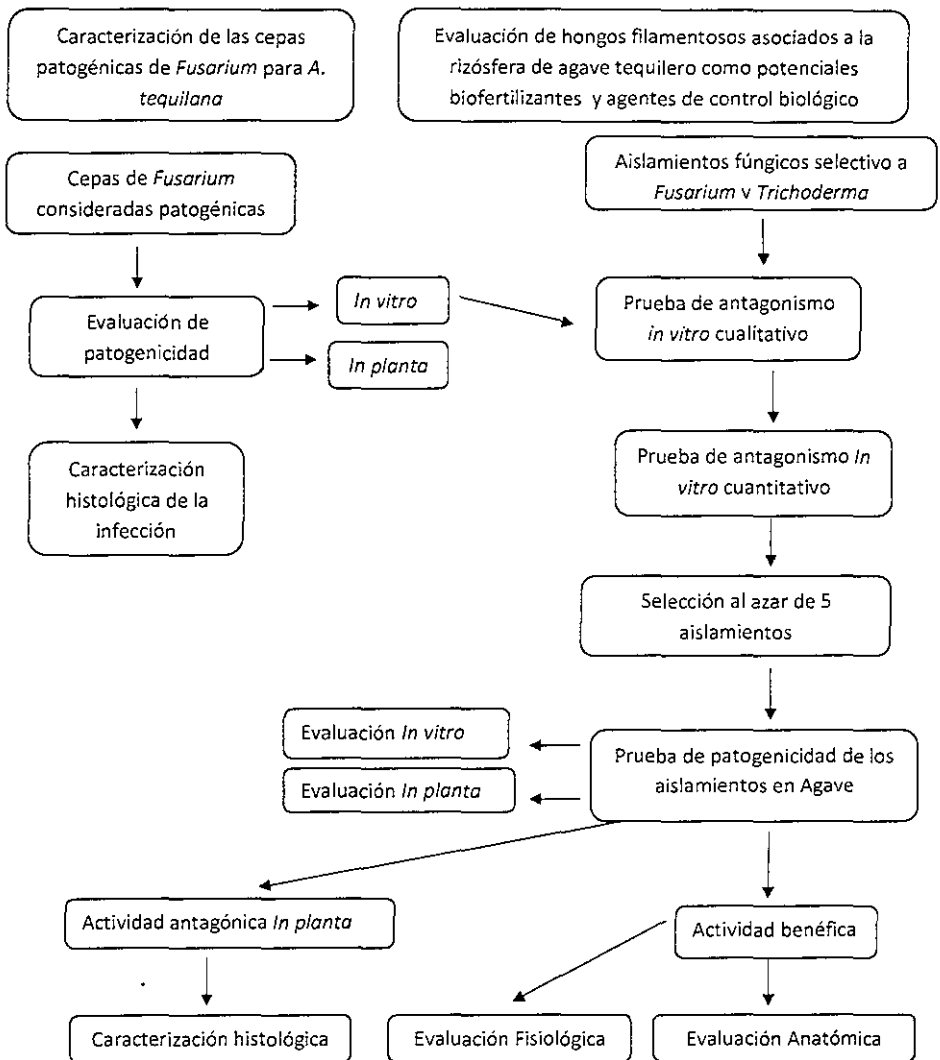


Figura 7.1 Diagrama de flujo de la metodología realizada.

7. METODOLOGÍA

A hongos asociados a la rizósfera de *A. tequilana*, previamente aislados de medio selectivo para los géneros *Fusarium* y *Trichoderma*, se les evaluó de manera cualitativa su actividad antagónica *in vitro* utilizando cepas patogénicas de *F. oxysporum*, aquellas que fueron sobresalientes, se les evaluó su actividad antagónica *in vitro* de manera cuantitativa, para obtener su porcentaje de inhibición contra *F. oxysporum*. De manera paralela, se realizó una caracterización de las cepas de *Fusarium* consideradas como patogénicas, se utilizaron ensayos de patogenicidad *in vitro* e *in planta*. A partir de los aislamientos que fueron sobresalientes se seleccionaron cinco aislamientos para evaluarse su patogenicidad *in vitro* e *in planta* y, así como su potencial como agentes de control biológico y biofertilizantes, evaluando su actividad antagónica contra cepas de *F. oxysporum* previamente caracterizadas y su efecto benéfico a nivel anatómico y fisiológico en plántulas de *A. tequilana* bajo condiciones de laboratorio controladas. Finalmente, aquellos aislamientos que tuvieron una actividad sobresaliente fueron identificados a nivel de género. (Figura. 7.1).

7.1 MATERIAL VEGETAL

El material vegetal (*Agave tequilana* Weber var. azul) usado fue mantenido y micropropagado en frascos de vidrio, con 25 mL de medio de cultivo MS (Murashige y Skoog; 1962), suplementado con vitaminas L2 y reguladores de crecimiento 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D, 1 mg/L) y Benciladenina (BA, 10 mg/L), resemebrándose cada 30 d. Para el enraizamiento, se utilizaron las plántulas más grandes y vigorosas, que fueron transferidas a medio MS suplementado con ácido indolbutírico (IBA, 1 mg/L), en frascos de vidrio bajo condiciones de fotoperiodo 16:8 h (luz-oscuridad) a 27°C. Para la aclimatación de las plantas a condiciones de invernadero, se tomaron plantas enraizadas *in vitro*, a las cuales se les eliminó los restos del medio de cultivo con agua corriente y de manera preventiva, se sumergieron por 5 min en una mezcla de fungicida y bactericida comercial (Captan 1 g/L y Bactroí 1 g/L), después se trasplantaron a sustrato

estéril (proporción 7:3 peat-moss y vermiculita) distribuido en charolas de unicel de 90 cavidades, se cubrieron con una bolsa de plástico para mantener las condiciones de humedad relativa alta, gradualmente se disminuyó las condiciones de humedad realizándose un orificio en la cubierta cada tercer día hasta el noveno día que se retiró la cubierta totalmente.

7.2 AISLAMIENTO Y CULTIVO DE HONGOS

7.2.1 Aislamiento e identificación

Los hongos evaluados en este estudio fueron previamente aislados a partir de muestras de la rizósfera de plantas de *A. tequilana* de diferentes localidades de la DOT (Qui *et al.*, datos no publicados). Estas plantas fueron seleccionadas por presentar una condición fitosanitaria aparentemente óptima, que resaltaron por su vigor y tamaño sobre las otras plantas en parcelas comerciales aparentemente sanas. El aislamiento se realizó de suelo previamente tamizado, del cuál se tomó 1 g y se realizaron diluciones seriadas a diferentes concentraciones 1:1, 2:1, 3:1, 4:1 y 5:1. A partir de las dos últimas diluciones se tomaron alícuotas de 1 ml y se colocaron en cajas de Petri con medio de cultivo selectivo para el aislamiento de hongos del género *Fusarium* sp. y *Trichoderma* sp. (Nash-Snyder, Komada y THSM respectivamente), estos cultivos se mantuvieron en un incubador vertical (Modelo, Bod incubator 818 Marca, Labcare América) por 72 h en total oscuridad y posteriormente, fueron colocados a un fotoperiodo de luz/oscuridad (12:12 h) durante 7 d, a una temperatura de $26\pm 2^{\circ}\text{C}$. Transcurrido este tiempo se tomaron los aislamientos de los medios selectivos y se pasaron a medio de papa dextrosa agar (PDA) para obtener un mejor crecimiento del hongo y su posterior evaluación. Para la identificación de los hongos a nivel de género, se prepararon microcultivos, como se describe a continuación: sobre un porta-objetos esterilizado al fuego se colocó en el centro un trozo delgado de medio PDA y se inoculó con micelio del hongo a identificar tomado de los cultivos "padres", posteriormente se le colocó un cubre-objetos esterilizado al fuego. Los porta-objetos inoculados fueron colocados bajo condiciones de humedad relativa alta en cámaras de humedad y dejados en incubación en las condiciones de cultivo previamente descritas por 14 d

aproximadamente. Transcurrido este tiempo, los microcultivos se tiñeron con lactofenol-azul de tripano (Fenol-ácido láctico-agua-azul de tripano al 1%, proporción 1:1:1:0.3 respectivamente), agregado por las orillas del cubre-objetos para tratar de cubrir todo el micelio, esta preparación se selló con barniz de uñas transparente. Posteriormente, se realizaron observaciones en el microscopio óptico (Modelo, DMRA2, Marca, Leica) y con la ayuda de claves taxonómicas convencionales, se realizó la identificación morfológica a nivel de género.

7.2.2 Cultivo y mantenimiento

Los aislamientos de los hongos que se obtuvieron, fueron mantenidos como cultivos "padres" en tubos con medio de cultivo PDA para las posteriores metodologías, el cual consiste en colocar el medio en tubos de vidrio de manera inclinada, esto para facilitar la toma del hongo y con el fin de mantener por más tiempo su vida, haciendo la resiembra aproximadamente cada seis meses. Para largo plazo y respaldo, los aislamientos se mantienen en ultracongelación. Para la obtención del inóculo experimental se realizaron cultivo "semilla", el cual consiste en tomar un trozo de micelio de los cultivos "padres" colocándolo en medio PDA, los que se mantuvieron en el incubador vertical, en las condiciones previamente descritas durante aproximadamente 15 d, en este tiempo el hongo cubrió por completo la caja Petri con el medio.

7.3 MATERIAL BIOLÓGICO

Para las evaluaciones, se utilizaron diferentes cepas fúngicas como referencias, testigos y cepas a evaluar (**Cuadro 7.1**). Como cepas patogénicas se utilizaron dos cepas de *Fusarium oxysporum* aisladas de plantas con síntomas de marchitez del agave (**FPA** y **FPC**) de diferentes localidades de la DOT. Además, se utilizó una cepa de referencia considerada como no hospedera en *A. tequilana* (**Fol**). Finalmente, de los aislamientos fúngicos obtenidos, después de haber sido sometidos a los ensayos de antagonismo *in vitro*, se seleccionaron al azar cinco de ellos con una actividad antagónica sobresaliente para su evaluación *in planta* con potencial como antagonistas y biofertilizantes.

Cuadro 7.1. Cepas de hongos utilizados en este estudio con actividad antagónica *in vitro* sobresaliente.

Clave	Nombre	Características
FPA	<i>Fusarium oxysporum</i>	Patogénica / Referencia
FPC	<i>Fusarium oxysporum</i>	Patogénica / Referencia
Fol	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	No hospedera en agave / Referencia
TRIEL1B1	<i>Trichoderma</i> sp.	Cepa evaluada
FÜHER424A1	<i>Penicillium</i> sp.	Cepa evaluada
TRIHER425A2	<i>Trichoderma</i> sp.	Cepa evaluada
KOESP84A2	<i>Trichoderma</i> sp.	Cepa evaluada
TRIHER42B2	<i>Trichoderma</i> sp.	Cepa evaluada

7.4 CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS PATOGENICAS DE *Fusarium oxysporum* ASOCIADAS A LA MARCHITEZ DEL AGAVE TEQUILERO.

Las cepas de *Fusarium oxysporum* fueron aisladas previamente de plantas de *A. tequilana* con síntomas de la marchitez del agave tequilero. Sin embargo, su patogenicidad no había sido caracterizada. Por este motivo, se evaluó su patogenicidad en pruebas *in vitro* e *in planta*, así como las características histopatológicas que presentan al infectar la planta, en comparación con una cepa no hospedera para *A. tequilana*.

7.4.1 Prueba de patogenicidad *in vitro* de las cepas de *Fusarium*

7.4.1.1 Preparación del inoculo *in vitro*

Para la obtención del inoculo de las evaluaciones *in vitro* de las cepas de *Fusarium* sp. utilizadas (FPA, FPC y Fol), fue crecida como cultivo “semilla” en medio PDA, por aproximadamente 15 d en el incubador vertical, pasando primero 72 h en total oscuridad y posteriormente, fueron colocados a un fotoperiodo de luz/oscuridad (12:12 h) durante 11 d, a una temperatura de 26±2°C. Transcurrido este tiempo, se agregaron 5 mL de agua estéril e inmediatamente se realizó un

barrido con un pincel estéril para la liberación de las esporas. Esta suspensión se recuperó en tubos Falcón de 15 mL y se adicionaron 10 mL de agua estéril. Para determinar la concentración de esporas de la suspensión, se tomó una alícuota de 100 μ L y se realizó un conteo en el microscopio con una cámara Neubauer. A partir del conocimiento del número de esporas de la suspensión, se agregó agua estéril hasta obtener una concentración final entre 3 y 5×10^6 esporas/mL. Para el inóculo final, se preparó en matraces Erlenmeyer medio MS sin sacarosa ni vitaminas a una concentración de agar de 5 g/L, que fue disuelto y a una temperatura entre 45 y 50°C se agregó la suspensión de esporas de FPC, FPA y Fol para obtener una concentración final de 1×10^6 esporas/mL, finalmente esta suspensión fue homogeneizada completamente. Esta suspensión fue utilizada para los ensayos *in vitro*.

7.4.1.2 Preparación del material vegetal para las evaluaciones *in vitro*

El material vegetal utilizado para la evaluación *in vitro* fueron plántulas de *A. tequilana* micropropagadas y trasplantadas a medio de cultivo de enraizamiento, al menos 30 d antes de la prueba. Una vez que las plántulas presentaron una raíz bien desarrollada, fueron trasplantadas a frascos de vidrio con 20 mL de medio MS sin sacarosa, ni vitaminas. Antes del trasplante, se tomaron las medidas de altura de planta, número de hojas, número de raíces y la raíz se les corto de manera uniforme a 3 cm de longitud, teniendo precaución de dejar parte de la raíz fuera del medio de cultivo. Las plántulas fueron mantenidas por al menos 5 d en observación, para descartar una contaminación microbiana antes de realizar el inóculo con las cepas de *Fusarium* y que pudiera interferir con las pruebas.

7.4.1.3 Prueba de patogenicidad *in vitro*

A partir de la suspensión de esporas-agar obtenida, se inocularon plantas cultivadas *in vitro* de *A. tequilana* enraizadas. Se agregaron 5 mL de la solución a la base de la plántula cuidando de cubrir las raíces descubiertas y evitando que las hojas entren en contacto con la solución. Las plantas se mantuvieron en incubación a 27°C con fotoperiodo 16:8 h luz-oscuridad, realizándose cuatro

repeticiones por tratamiento y se evaluó el grado de patogenicidad cada semana de 30 a 60 d, de acuerdo a una escala arbitraria de: 1 a 5, donde:

- 1 es planta sana;
- 2 es que entre un 25 al 49% de la superficie de la planta presenta de síntomas de enfermedad;
- 3 es que entre un 50 al 74% de la superficie de la planta presenta de síntomas de enfermedad;
- 4 es que entre un 75 al 90% de la superficie de la planta presenta de síntomas de enfermedad;
- Y 5 es que entre un 91 al 100% de la superficie de la planta presenta de síntomas de enfermedad (De-Cai *et al.*, 2000).

Como testigos se colocaron plántulas inoculadas solamente con agar a la misma concentración y condiciones.

7.4.2 Prueba de patogenicidad *in planta* de las cepas de *Fusarium*

7.4.2.1 Preparación del inóculo

Para las evaluaciones *in planta* el inóculo fue preparado en medio denominado como medio sustrato-avena-agua (SAA) para el crecimiento de los hongos, el cual está compuesto de sustrato (Peat-moss y vermiculita estéril en proporción 7:3), hojuelas de avena y agua destilada en proporción 20:2:4 respectivamente, de acuerdo a Ezziyyani y colaboradores (2004) con modificaciones, el cuál se combinó, esterilizó y posteriormente fue inoculado con la suspensión de esporas de las cepas de *F. oxysporum* (FPA y FPC) a una concentración de 1×10^6 esporas/mL y como testigo un hongo no patógeno (Fol, no hospedero), se mantuvieron en botes sellados herméticamente de 500 mL a 26°C en total oscuridad para un mayor crecimiento de los hongos por aproximadamente 15 d, en los que se observó presencia de micelio en la mayor parte del sustrato. Para determinar la concentración de Unidades Formadoras de Colonias (UFC), se realizó una dilución de 100 mg de medio SAA inoculado con la cepa fúngica correspondiente, y se transfirió una alícuota de 200 μ L a medio PDA para

determinar las UFC. El medio SAA con crecimiento abundante de la cepa de *Fusarium* correspondiente, fue combinado en una proporción 1:2 con sustrato estéril para obtener el inóculo denominado como "sustrato infestado".

7.4.2.2 Preparación del material vegetal para las evaluaciones

El material vegetal utilizado para la evaluación *in planta* fueron plántulas de *A. tequilana* aclimatadas en invernadero, por al menos 60 d después de ser transferidas al invernadero desde el cultivo *in vitro*. Estas plántulas fueron trasplantadas a macetas individuales de 10 cm² con sustrato estéril y colocado en invernadero bajo condiciones de luz natural y 26°C aproximadamente.

7.4.2.3 Prueba de patogenicidad *in planta*

Las plántulas en macetas individuales fueron lavadas con agua corriente, eliminando los restos de sustrato, antes de la inoculación se tomaron datos del número de hojas y raíces, altura de planta y la raíz se corto de manera uniforme a 3 cm. Posteriormente estas plántulas fueron trasplantadas a sustrato infestado con su correspondiente cepa de *Fusarium*. Las plántulas fueron colocadas en recipientes de plástico bajo condiciones controladas a 27°C con fotoperiodo 16:8 luz-oscuridad, durante un periodo de 60 a 90 d. Se tomaron lecturas cada 15 d evaluando el grado de patogenicidad en las plantas de acuerdo a la escala establecida previamente mencionada (De-Cal *et al.*, 2000). Al final de los 60 o 90 d, las plántulas fueron separadas de las macetas y sus raíces lavadas con agua corriente para eliminar los restos de sustrato. Se tomaron las lecturas finales que consistieron en determinar el número de hojas y raíces infectadas, longitud de la raíz y la planta. A partir de estas plantas se realizó la caracterización histopatológica de la interacción *Fusarium-Agave*. Como testigos se colocaron plántulas inoculadas con sustrato estéril o sustrato infestado con *Fol*.

7.4.3 Evaluación histopatológica de la interacción *Fusarium oxysporum*-*Agave tequilana*

7.4.3.1 Cortes histológicos

A partir de las plántulas obtenidas en las pruebas de patogenicidad *in planta* (día final de la evaluación), se tomaron muestras de hoja, tallo (piña) y raíz, que se colocaron en solución fijadora (FAA: Formol, ácido acético, etanol y agua destilada, 10:5:50:35 v/v respectivamente) y mantenidas a 4°C. A partir de estas muestras, se realizaron cortes histológicos de la raíz de las plantas de *A. tequilana* inoculadas con las diferentes cepas de *Fusarium*. Para esto, se tomaron pequeños trozos de la raíz, para realizar una inclusión en series de soluciones graduales de polietilenglicol y agua destilada a concentraciones de 10:90, 40:60, 60:40 respectivamente y 100% de polietilenglicol (Sandoval, 2005), en cada cambio de solución las muestras se colocaron al vacío en un desecador por una hora. Transcurrido este tiempo, se colocaron en refrigeración a una temperatura de 4°C por 24 h aproximadamente. Previo al montaje de los cortes histológicos, se preparó una solución de gelatina (1.5 g/L de gelatina y 0.5g/L de sulfato de cromo y potasio). Los cortes se realizaron en un criótomo (marca Leica, modelo CM1850), una vez colocada la muestra en la base y congelada con el polietilenglicol se cortaron a una medida de 18 µm, tomándose el tejido con un pincel fino y montándose sobre un porta-objetos. Posteriormente se agregó la solución de gelatina sobre el tejido por aproximadamente 24 h o más para fijarlo al porta-objetos. Las preparaciones fueron teñidas y observadas por microscopia óptica (azul-algodón) y de fluorescencia (Uvitex 2B).

7.4.3.2 Tinción Uvitex 2B

Para la observación al microscopio de los cortes histológicos mediante fluorescencia, se preparó el fluorocromo Uvitex 2B al 0.1% en buffer tris-HCl al 0.1M a pH 8.5, se almacenó en frasco ámbar a una temperatura de 4°C hasta su utilización (Patto y Niks, 2001). La tinción consistió en colocar una gota sobre la muestra montada en el porta-objetos, dejándose actuar por una hora, para

posteriormente realizarse cuatro lavados de 10 min cada uno con agua destilada para eliminar el exceso de fluorocromo. Las observaciones se realizaron con un microscopio equipado con epifluorescencia (marca Leica, modelo DMRA2 equipado con epifluorescencia) y filtros adecuados para el Uvitex 2b (Bender *et al.*, 2000; Rohringer *et al.*, 1977).

7.4.3.3 Tinción con azul de tripano

Para la tinción de los cortes histológicos se utilizó lactoglicerol-azul de tripano (glicerol-ácido láctico-agua destilada-solución stock de azul de tripano al 1% en proporción 1:1:1:0.3 respectivamente). La tinción consistió en agregar después de la tinción con Uvitex 2B, una gota sobre el tejido dejándose por aproximadamente 30 min y posteriormente se lavó con agua destilada para eliminar el exceso de colorante y finalmente ser observado en un microscopio óptico.

7.5 EVALUACIONES DE LAS CEPAS FÚNGICAS ASOCIADAS A LA RIZÓSFERA DE *Agave tequilana*.

A partir de los aislamientos fúngicos obtenidos de la rizósfera de *A. tequilana*, se seleccionaron aquellos aislamientos obtenidos de los medios de cultivo selectivos para los géneros *Trichoderma* (THMS; Askew y Laing, 1993), *Fusarium* (Nash-Snyder; Leslie y Summerell, 2006) y *Fusarium oxysporum* (Komada; Leslie y Summerell, 2006) (Cuadro 7.2), para evaluar su potencial como control biológico y/o como biofertilizante. Se consideró como principal referente la actividad antagonica contra *Fusarium oxysporum* asociado a la marchitez del agave tequilero, de los aislamientos. Como primer filtro, se consideró la realización de una prueba cualitativa de la actividad antagonica *in vitro* contra *F. oxysporum*. Aquellos aislamientos que presentaron una actividad antagonica *in vitro* sobresaliente en esta prueba preliminar, se evaluó su porcentaje de inhibición para *F. oxysporum* (considerada como actividad antagonica cuantitativa). A partir de la lista de aislamientos con un porcentaje de inhibición sobresaliente, se seleccionaran al azar cinco de ellos para evaluarse su actividad antagonica

(control biológico) y benéfica (biofertilizante) *in planta* bajo condiciones controladas.

Cuadro 7.2. Lista de aislamientos seleccionados de la rizósfera de *A. tequilana*, a las que se les asignó una clave dependiendo del medio selectivo del que se obtuvo ya fuera para *Trichoderma sp.* (TRI), *Fusarium sp.* (FU) y *Fusarium oxysporum* (KO).

CLAVE ASIGNADA	AISLAMIENTO DE MEDIO SELECTIVO PARA:	CLAVE ASIGNADA	AISLAMIENTO DE MEDIO SELECTIVO PARA:
FUHER424A1	<i>Penicillium sp.</i>	TRIEDU62A3	<i>Trichoderma sp.</i>
FUHER424A2	<i>Fusarium sp.</i>	TRIEDU62B1	<i>Trichoderma sp.</i>
FUHER424A3	<i>Fusarium sp.</i>	TRIEDU62B2	<i>Trichoderma sp.</i>
FUHER424B1	<i>Fusarium sp.</i>	TRIEDU62B3	<i>Trichoderma sp.</i>
FUHER424B2	<i>Fusarium sp.</i>	TRIELI1B1	<i>Trichoderma sp.</i>
FUHER424B3	<i>Fusarium sp.</i>	TRIELI1B2	<i>Trichoderma sp.</i>
FULLO1B2	<i>Fusarium sp.</i>	TRIELI1B3	<i>Trichoderma sp.</i>
FUPAD33A1	<i>Fusarium sp.</i>	TRIESP83A1	<i>Trichoderma sp.</i>
FUPAD33A2	<i>Fusarium sp.</i>	TRIESP83A2	<i>Trichoderma sp.</i>
FUPAD33B1	<i>Fusarium sp.</i>	TRIESP83A3	<i>Trichoderma sp.</i>
FUPAD33B2	<i>Fusarium sp.</i>	TRIESP83A4	<i>Trichoderma sp.</i>
KOCOF3A1	<i>Fusarium sp.</i>	TRIESP83A5	<i>Trichoderma sp.</i>
KOCOF3B1	<i>Fusarium sp.</i>	TRIESP83B1	<i>Trichoderma sp.</i>
KOCOF3B2	<i>Fusarium sp.</i>	TRIESP83B2	<i>Trichoderma sp.</i>
KOEDU62A1	<i>Fusarium sp.</i>	TRIESP83B3	<i>Trichoderma sp.</i>
KOEDU62B1	<i>Fusarium sp.</i>	TRIESP93A1	<i>Trichoderma sp.</i>
KOESP83A1	<i>Fusarium sp.</i>	TRIESP93A2	<i>Trichoderma sp.</i>
KOESP83A2	<i>Fusarium sp.</i>	TRIESP93B1	<i>Trichoderma sp.</i>
KOESP83A3	<i>Fusarium sp.</i>	TRIESP93B2	<i>Trichoderma sp.</i>
KOESP83B1	<i>Fusarium sp.</i>	TRIESP94A1	<i>Trichoderma sp.</i>
KOESP83B2	<i>Fusarium sp.</i>	TRIEZA43A1	<i>Trichoderma sp.</i>
KOESP84A1	<i>Fusarium sp.</i>	TRIPHER424A1	<i>Trichoderma sp.</i>
KOESP84B1	<i>Fusarium sp.</i>	TRIPHER424A2	<i>Trichoderma sp.</i>
KOESP84B2	<i>Fusarium sp.</i>	TRIPHER424B1	<i>Trichoderma sp.</i>
KOESP85A1	<i>Fusarium sp.</i>	TRIPHER424B2	<i>Trichoderma sp.</i>
KOEZA43B1	<i>Fusarium sp.</i>	TRIPHER425A2	<i>Trichoderma sp.</i>
KOLCO4A1	<i>Fusarium sp.</i>	TRIPHER425B2	<i>Trichoderma sp.</i>
KOLCO4A2	<i>Fusarium sp.</i>	TRILCB2A1	<i>Trichoderma sp.</i>
KOLCO4B1	<i>Fusarium sp.</i>	TRILCB2B1	<i>Trichoderma sp.</i>
KOPAD33A1	<i>Fusarium sp.</i>	TRILCO4A1	<i>Trichoderma sp.</i>
KOPAD33B1	<i>Fusarium sp.</i>	TRILCO4A2	<i>Trichoderma sp.</i>
KOPAD33B2	<i>Fusarium sp.</i>	TRILCO4B1	<i>Trichoderma sp.</i>
TRICOF3A1	<i>Trichoderma sp.</i>	TRILLO1A2	<i>Trichoderma sp.</i>
TRICOF3A2	<i>Trichoderma sp.</i>	TRILLO1B1	<i>Trichoderma sp.</i>

TRICOF3A3	<i>Trichoderma</i> sp.	TRILLO1B2	<i>Trichoderma</i> sp.
TRICOF3A4	<i>Trichoderma</i> sp.	TRIPAD33A1	<i>Trichoderma</i> sp.
TRICOF3B1	<i>Trichoderma</i> sp.	TRIPAD33B1	<i>Trichoderma</i> sp.
TRICOF3B2	<i>Trichoderma</i> sp.	TRIYER1A1	<i>Trichoderma</i> sp.
TRICOF3B3	<i>Trichoderma</i> sp.	TRIYER1A2	<i>Trichoderma</i> sp.
TRICOF3B4	<i>Trichoderma</i> sp.	TRIYER1B1	<i>Trichoderma</i> sp.
TRIEDU622B2	<i>Trichoderma</i> sp.	TRIYER1B2	<i>Trichoderma</i> sp.
TRIEDU62A1	<i>Trichoderma</i> sp.	TRIEZA2B3	<i>Trichoderma</i> sp.
TRIEDU62A2	<i>Trichoderma</i> sp.	FUESP93B2	<i>Fusarium</i> sp.
FUHER423A1	<i>Fusarium</i> sp.	KOESP84A2	<i>Fusarium</i> sp.

7.5.1 Pruebas de antagonismo *in vitro*

7.5.1.1 Prueba de antagonismo *in vitro* cualitativa

Las pruebas de antagonismo *in vitro* se realizaron de acuerdo a la metodología de cultivos duales propuesta por Sánchez *et al.*, (2007) con modificaciones, se utilizaron dos cepas patógenas de *F. oxysporum* obtenidas de plantas con síntomas de marchitez en diferentes localidades de la DOT (FPA y FPC). La prueba consistió en colocar en un extremo de la caja de Petri con medio PDA, un trozo de micelio de cultivo "semilla" de la cepa de *Fusarium*, y en el otro extremo un trozo de aproximadamente el mismo tamaño del aislamiento fúngico de la rizósfera de *A. tequilana*. Se realizó una evaluación cualitativa del efecto de confrontación entre los dos hongos y se observaron las características de inhibición, en este caso se observó la capacidad del hongo para inhibir el crecimiento, confinar al hongo patógeno y la capacidad del hongo para crecer sobre el patógeno inhibiéndolo (considerado como micoparasitismo). Las observaciones se realizaron los días 7 y 14 después de la inoculación, siendo el punto intermedio y final respectivamente del crecimiento de las cepas patógenas como referencia. Se anotaron las características de la confrontación así como el grado de actividad que presentaron de acuerdo a una escala arbitraria (Cuadro 7.3); esta prueba cualitativa sirvió como primer filtro para obtener las cepas de los hongos aislados de la rizósfera de *A. tequilana* con algún grado de actividad antagonista *in vitro*, reduciendo la cantidad de cepas a evaluar. Se hicieron dos repeticiones por cada aislamiento y para cada cepa patógena. Cuando los

resultados no fueron concluyentes, cada aislamiento fue repetido con tres repeticiones una vez más.

Cuadro 7.3. Descripción de la escala de actividad antagonica utilizada en la prueba de antagonismo *in vitro* cualitativa.

ACTIVIDAD	DESCRIPCIÓN
-	Sin actividad, negativo
+	Actividad antagonica mínima
++	Actividad antagonica ligera
+++	Actividad antagonica moderada
++++	Actividad antagonica sobresaliente
+++++	Actividad antagonica máxima

7.5.1.2 Prueba de antagonismo *in vitro* cuantitativa

Para obtener el porcentaje de inhibición de los aislamientos fúngicos con algún grado de actividad antagonica (consideradas como pruebas de antagonismo *in vitro* cuantitativas) se utilizó la misma metodología previamente descrita de acuerdo a Sánchez *et al*, (2007) con modificaciones. En este caso se tomaron ciertas precauciones como fue el emplear un sacabocado de 0.9 mm de diámetro para que el inculo sea homogéneo de los aislamientos que tuvieron un grado de actividad antagonica sobresaliente y máxima. Se realizaron tres repeticiones de cada aislamiento para cada una de las cepas patogénicas tanto de FPA como de FPC. Como testigos y para obtener el porcentaje de inhibición se realizaron cultivos de las cepas patogénicas de *F. oxysporum* siguiendo las mismas condiciones de los cultivos duales, sin agregar los aislamientos fúngicos (consideradas como las condiciones de crecimiento normales). Se realizaron observaciones de los cultivos los días 7 y 14 después de la inoculación y se anotaron las características observadas de acuerdo a una tabla establecida a partir de las características observadas en la prueba de antagonismo *in vitro* cualitativo (**Cuadro 7.4.**), además de realizar mediciones del crecimiento de las cepas patogénicas y los testigos en los dos días establecidos. Para calcular el porcentaje de inhibición del crecimiento de las cepas patogénicas de *F. oxysporum*

se realizó un promedio o media geométrica de las tres repeticiones por tratamiento, utilizando la siguiente fórmula:

$$\%IC = 100 - (CE \times 100 / CT)$$

%IC: Porcentaje de inhibición del crecimiento de las cepas patógenas de *F. oxysporum*.

CE: Promedio del crecimiento de FPA o FPC cuando se confronta con el aislamiento fúngico.

CT: Promedio del crecimiento de FPA o FPC en condiciones normales.

7.5.2 Pruebas de patogenicidad en *Agave tequilana* de los aislamientos fúngicos con actividad antagónica *in vitro* sobresaliente

A partir de la evaluación de la actividad antagónica *in vitro* y el porcentaje de inhibición del crecimiento de cepas patógenas de *F. oxysporum*, se seleccionaron al azar cinco aislamientos con actividad sobresaliente o máxima (**Cuadro 7.1**). A estos aislamientos seleccionados se les evaluó su patogenicidad para *A. tequilana*, en condiciones *in vitro* e *in planta*.

7.5.2.1 Prueba de patogenicidad *in vitro*

7.5.2.1.1 Preparación del inóculo

Para la obtención del inóculo de estas evaluaciones (TRIEL11B1, FUHER42A1, TRIHER425A2, KOESP84A2 y TRIHER42B2), cada cepa fue crecida como cultivo “semilla” en medio PDA, de acuerdo a las condiciones previamente descritas. Se obtuvo una suspensión de esporas a concentración conocida de cada uno de los aislamientos, de acuerdo a la metodología descrita para las cepas patógenas de *Fusarium* (**Apartado 7.4.2.1**). Para el inóculo final, se preparó en matraces Erlenmeyer medio MS sin sacarosa ni vitaminas a una concentración de agar de 5 g/L, que fue disuelto y a una temperatura entre 45 y 50°C se agregó la suspensión de esporas de FPC, FPA y Fol para obtener una concentración final de 1×10^6 esporas/mL, finalmente esta suspensión fue homogeneizada completamente. Esta suspensión fue utilizada para los ensayos *in vitro*.

Cuadro 7.4. Características establecidas para la descripción de la actividad antagonista *in vitro* cuantitativa.

MARCA	DESCRIPCIÓN
FA	Cepa con efecto antagonista sobre FPA
FC	Activo con efecto antagonista sobre FPC
FAC	Cepa con efecto antagonista sobre FPA y FPC
GL	Cepa con crecimiento lento, cubriendo la caja Petri en menos del 50% después de 14 días
GV	Cepas con crecimiento intermedio, variable entre ellas
GS	Cepas con crecimiento rápido, cubriendo completamente la caja de Petri a los 3 o 5 días.
I	Cepas con inhibición del crecimiento de la cepa patogénica confinándola, en el que no se observa contacto.
Ix	Cepas que inhibe el crecimiento al contacto con la cepa patogénica
SC	Cepas que no presentan contacto entre ellas
Ap	Cepas con actividad <i>in planta</i> sobresaliente de las cepas evaluadas.
Av	Cepas con actividad <i>in vitro</i> sobresaliente de las cepas evaluadas.
SA	Cepas sin actividad antagonista sobresaliente de las cepas evaluadas.
Rx	Cepas productoras de metabolitos en los sitio de contacto, ya sea con la cepa patogénica o la cepa evaluada.
MB	Cepa con producción de metabolitos liberados al medio de color marrón o negro.
MO	Cepa que produce metabolitos liberados al medio de color naranja.
MR	Cepa con producción de metabolitos liberados al medio de color rojizo.
MY	Cepa con producción de metabolitos liberados al medio de color amarillos.
P1	Micoparasitismo, crecimiento sobre el micelio del hongo patogénico, cubre del 75 al 100%
P2	Micoparasitismo, crecimiento sobre el micelio del hongo patogénico, cubre un 30 a 70%
P3	Micoparasitismo, crecimiento sobre el micelio del hongo patogénico, cubre el sitio de contacto con el hongo

7.5.2.1.2 Preparación del material vegetal para las evaluaciones *in vitro*

El material vegetal utilizado para la evaluación *in vitro* fueron plántulas de *A. tequilana* micropropagadas y trasplantadas a medio de cultivo de enraizamiento, al menos 30 d antes de la prueba. Una vez que las plántulas presentaron una raíz bien desarrollada, fueron trasplantadas a frascos de vidrio con 20 mL de medio

MS sin sacarosa, ni vitaminas. Antes del trasplante, se tomaron las medidas de altura de planta, número de hojas, número de raíces y la raíz se les cortó de manera uniforme a 3 cm, teniendo cuidado de dejar parte de la raíz por fuera del medio de cultivo. Las plántulas fueron mantenidas por al menos 5 d en observación, para descartar una contaminación microbiana antes de realizar el inoculo con las cepas de *Fusarium* y los aislamientos a evaluar.

7.5.2.1.3 Prueba de patogenicidad *in vitro*

A partir de la suspensión de esporas-agar obtenida, se inocularon plantas cultivadas de *in vitro* de *A. tequilana* enraizadas. Se agregaron 5 mL de la solución a la base de la plántula cuidando de cubrir las raíces descubiertas y evitando que las hojas entren en contacto con la solución. Las plantas se mantuvieron en incubación a 27°C con fotoperiodo 16:8 h (luz-oscuridad), realizándose cuatro repeticiones por tratamiento y se evaluó el grado de patogenicidad cada semana de 30 a 60 d, de acuerdo a una escala arbitraria previamente descrita. Como testigos se colocaron plántulas inoculadas solamente con agar a la misma concentración y condiciones, así como plantas inoculadas con la cepa patogénica FPC y Fol.

7.5.2.2 Prueba de patogenicidad *in planta*

7.5.2.2.1 Preparación del inoculo

Para las evaluaciones *in planta* el inoculo fue preparado en medio SAA, infestado con la suspensión de esporas (5 mL) de los diferentes aislamientos fúngicos a una concentración de 1×10^6 esporas/mL que se mantuvieron en botes sellados herméticamente de 500 ml a 26°C en total oscuridad por al menos 15 d. El medio SAA con crecimiento abundante de los aislamientos y previa determinación de la concentración por UFC, fue combinado en una proporción 1:2 con sustrato estéril para obtener sustrato infestado.

7.5.2.2.2 Preparación del material vegetal para las evaluaciones

El material vegetal utilizado para la evaluación *in planta* se utilizaron plántulas de *A. tequilana* aclimatadas en invernadero, por al menos 60 d después de ser sacadas al invernadero desde el cultivo *in vitro*. Estas plántulas fueron trasplantadas a macetas individuales de 10 cm² con sustrato estéril y colocado en invernadero bajo condiciones de luz natural y 26°C aproximadamente.

7.5.2.2.3 Prueba de patogenicidad *in planta*

Las plántulas en macetas individuales fueron lavadas con agua corriente, eliminando los restos de sustrato, tomando los datos del número de hojas y raíces, altura de planta y la raíz se cortó de manera uniforme a 3 cm de longitud. Posteriormente estas plántulas fueron trasplantadas a sustrato infestado con su correspondiente aislamiento fúngico. Las plántulas fueron colocadas en recipientes de plástico bajo condiciones controladas a 27°C con fotoperiodo 16:8 h (luz-oscuridad), durante un periodo de 60 d. Se tomaron lecturas cada 15 d para evaluar el grado de patogenicidad en las plantas de acuerdo a la escala previamente descrita. Al final de los 60 d, las plántulas fueron separadas de las macetas y sus raíces lavadas con agua corriente para eliminar los restos de sustrato. Se tomaron como lecturas finales el número de hojas y raíces infectadas, longitud de la raíz y de la planta. Como testigos se colocaron plántulas inoculadas con sustrato estéril y sustrato infestado con FPC y Fol.

7.6 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS AISLAMIENTOS FÚNGICOS *in planta*

7.6.1 Preparación del inóculo

Para las evaluaciones *in planta* el inóculo fue preparado en medio SAA, infestado con la suspensión de esporas (5 mL) de los diferentes aislamientos fúngicos y de la cepa patogénica FPC a una concentración de 1×10^6 esporas/mL que se mantuvieron en botes sellados herméticamente de 500 mL a 26°C en total oscuridad por al menos 15 d. El medio SAA con crecimiento abundante de los

aislamientos y previa determinación de la concentración por UFC, fue combinado en una proporción 1:2 con sustrato estéril para obtener sustrato infestado.

7.6.2 Preparación del material vegetal para las evaluaciones

El material vegetal utilizado para la evaluación *in planta* fueron plántulas de *A. tequilana* aclimatadas en invernadero, por al menos 60 d después de ser transferidas al invernadero desde el cultivo *in vitro*. Estas plántulas fueron trasplantadas a macetas individuales de 10 cm² con sustrato estéril y colocado en invernadero bajo condiciones de luz natural y 26°C aproximadamente.

7.6.3 Prueba de antagonismo en planta

Las plántulas en macetas individuales fueron lavadas con agua corriente, eliminando los restos de sustrato, tomando los datos del número de hojas y raíces, altura de planta y la raíz se cortó de manera uniforme a 3 cm. Posteriormente estas plántulas fueron trasplantadas a sustrato infestado con su correspondiente aislamiento fúngico. Las plántulas fueron colocadas en recipientes de plástico bajo condiciones controladas a 27°C con fotoperiodo 16:8 h (luz-oscuridad), durante un periodo de 15 d. Transcurrido este tiempo, las plantas fueron lavadas con agua corriente, eliminando los restos de sustrato y trasplantadas e inoculadas con medio SAA infestado con FPC. Estas plántulas se mantuvieron bajo las mismas condiciones previamente descritas. Se tomaron datos cada 15 d evaluando el grado de patogenicidad en las plantas de acuerdo a la escala previamente descrita. Al final de los 60 d, las plántulas fueron separadas de las macetas y sus raíces lavadas con agua corriente para eliminar los restos de sustrato. Se tomaron como lecturas finales el número de hojas y raíces infectadas, longitud de la raíz y la planta. Como testigos se colocaron plántulas inoculadas con sustrato estéril y sustrato infestado con FPC y Fol. Finalmente, se compararon los valores obtenidos en las plántulas previamente infestadas con cada uno de los aislamientos fúngicos con respecto a las infestadas con FPC, para determinar el grado de protección de los aislamientos.

7.6.4 Prueba de actividad benéfica en planta

Las plántulas en macetas individuales fueron lavadas con agua corriente, eliminando los restos de sustrato, tomando los datos del número de hojas y raíces, altura de planta y la raíz se cortó de manera uniforme a 3 cm de longitud. Posteriormente estas plántulas fueron trasplantadas a sustrato infestado con su correspondiente aislamiento fúngico. Las plántulas fueron colocadas en recipientes de plástico bajo condiciones controladas a 27°C con fotoperiodo 16:8 h (luz-oscuridad), durante un periodo de 60 d. Al final de este periodo se tomaron lecturas finales de diferentes parámetros anatómicos y fisiológicos. Como testigos se colocaron plántulas inoculadas con sustrato estéril.

7.6.4.1 Variables anatómicas

Las variables anatómicas fueron: crecimiento de la raíz, ramificaciones de la raíz, crecimiento vegetativo y densidad estomática (Barragán-Barragán, 2001).

7.6.4.2 Crecimiento y ramificación de la raíz

Se tomó la medida de la raíz principal de todas las plantas tanto al inicio como al final del experimento, a las cuales inicialmente se les cortó la raíz con un bisturí dejándolas a 3cm de longitud y así, observar el incremento de la raíz después de dos meses de su inoculación. En las ramificaciones de la raíz, para observar el incremento de raíz se realizó un conteo al inicio del experimento de todas plantas y al final después de dos meses de inoculación.

7.6.4.3 Crecimiento vegetativo

Para la evaluación del crecimiento vegetativo se contaron la cantidad de hojas y se tomó la medida de la altura de la plantas al inicio del experimento, las medidas del ancho, la altura de la hoja más larga de planta y la cantidad de hojas por planta, se midieron con vernier tomando en cuenta la parte más ancha de hoja y el tamaño de la base al ápice. Esta toma de medidas se realizó al final del experimento.

7.6.4.4 Densidad estomática

La densidad estomática se realizó dos meses después de la inoculación en las plantas, la cual consistió en tomar un trozo de hoja de tres plantas por tratamiento, se colocaron sobre el porta-objetos una capa de esmalte de uñas transparente, se pegó el trozo de hoja por la parte adaxial presionando, se dejaron secar a temperatura ambiente por aproximadamente 48 h, para posteriormente realizar las observaciones en el microscopio óptico y cuantificar 10 campos con un área de 1cm^2 con objetivo 10x.

7.6.5 Variables fisiológicas

Las variables fisiológicas determinadas fueron: pH, porcentaje de ácido málico, acidez nocturna, determinación de clorofila y determinación de azúcares directos, parámetros considerados como indicadores de la eficiencia fotosintética (Barragán-Barragán, 2001).

7.6.5.1 Determinación del pH, porcentaje de ácido málico y acidez nocturna

El porcentaje de ácido málico, pH y acidez nocturna se cuantificaron de acuerdo a la metodología descrita por Nobel y Hartsock (1983) con modificaciones (Barragán-Barragán, 2001). Las evaluaciones se llevaron a cabo en las cuatro repeticiones por tratamiento 60 d después de la inoculación de las plantas con los diferentes aislamientos fúngicos. La prueba de acidez nocturna se determinó al atardecer (4:00 pm) y a la mañana siguiente (9:00 am), a fin de percibir los cambios en acidez y el contenido de ácido málico, para esta determinación se extrajo tejido con un sacabocado de 9 mm de diámetro, el cuál se seccionó con un bisturí y se homogeneizó con 4 mL de agua destilada agitándose con el mismo bisturí (López-Amezcuca, 1991). Posteriormente, se realizó la medición de pH utilizando un potenciómetro y para la determinación de ácido málico se utilizó el método de titulación adicionando hidróxido de sodio (0.001N) a la muestra anterior a fin de llevar el pH a 7.2, la cantidad de NaOH utilizado sirvió para calcular el porcentaje de ácido málico de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de ácido málico} = \frac{\text{mL utilizados de NaOH (N de NaOH)}}{\text{gramos de tejido}}$$

N= normalidad

Para la evaluación de la acidificación nocturna se utilizó el método de titulación adicionando hidróxido de sodio (0.001M) a la muestra anterior a fin de llevar el pH a 7.2, la cantidad de NaOH utilizado sirvió para calcular el porcentaje de acidez nocturna de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\mu\text{moles/cm}^2 = \frac{\text{mL utilizados de NaOH (M de NaOH)}}{\text{Área del tejido}}$$

M= molaridad

7.6.5.2 Determinación de clorofila

Esta determinación se llevo a cabo 60 d después de la inoculación de las plantas de acuerdo al método de análisis de clorofila descrito por Barragán-Barragán (2001). Se tomaron tres plantas por tratamiento, se pesaron 2 g de tejido a los cuales se les agrego 8 mL de acetona fría (80%) y se homogenizaron triturándolas en un mortero, posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min en una centrifuga refrigerada a -4°C. El sobrenadante fue colocado en un tubo Belfor precongelado envuelto en papel aluminio por aproximadamente 1 h, una vez obtenido el primer precipitado se le agregaron otros 8 mL de acetona fría (80%) y se centrifugó de nuevo a las mismas condiciones descritas, este segundo sobrenadante se combinó con el obtenido anteriormente. Posteriormente, se midió la absorbencia en un espectrofotómetro a 645 y 663 nm, tomando como blanco de referencia la acetona fría (80%). Con base en las lecturas obtenidas en ambas longitudes de onda se estimo la concentración de clorofila total, así como la de clorofila "a" y "b" empleando las siguientes formulas de Bruinsma, (1963).

7.6.5.3 Determinación de azúcares directos

Para la determinación de azúcares directos se utilizó la metodología descrita por Warwick *et al.*, (1982), para esto se preparó una solución de ácido dinitrosalicílico (reactivo DNS), el cual consistió en disolver NaOH (1.6 g), tartrato de sodio y potasio (30 g) y DNS (1 g) en agua destilada y se aforó en 100 mL, su almacenamiento fue en un frasco ámbar y en refrigeración a 4°C, hasta su uso. Se preparó una solución stock de glucosa de 4 mg/mL para su uso inmediato, y realizar una curva de calibración con concentraciones de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 g/L. Para esto, se colocó la concentración de la solución de glucosa y 0.5 mL del reactivo DNS y una muestra como blanco con 0.5 mL de agua destilada y 0.05 mL del reactivo DNS, las muestras se agitaron en vortex y se colocaron en baño María a punto de ebullición por 5 min. Transcurrido el tiempo se enfriaron en hielo y se adicionaron con 5 mL de agua destilada, se agitaron y dejaron reposar durante 15 min, para después leer en el espectrofotómetro a 540 nm. Esta curva sirvió como referencia en la determinación de azúcares directos en las muestras obtenidas de plantas inoculadas.

A partir de las plántulas de *A. tequilana* inoculadas, se tomó con un sacabocado un segmento de 0.9 mm de diámetro de hoja de tres plantas por cada tratamiento, el cuál fue pesado. Este segmento fue macerado en un mortero y se le agregó 2 mL de agua destilada. La mezcla resultante fue filtrada para evitar el paso de partículas que pudieran interferir con la lectura. Posteriormente, se colocaron en tubos Eppendor 0.380 mL de la muestra y 1.2 mL del reactivo DNS, se agitaron en el vortex y colocaron a baño maría en agua a punto de ebullición durante 15 min. Después de esto, se dejaron enfriar en hielo, se colocaron en tubos de ensayo a los que se les adicionó 8 mL de agua destilada y se agitaron nuevamente, dejándolos reposar por 15 min. Transcurrido este tiempo, se realizó la lectura de absorbancia en el espectrofotómetro a 540 nm. De acuerdo con los resultados de la curva de calibración se realizó un análisis de regresión lineal, generando la siguiente ecuación:

$$Y = 0.0724 + R = 0.0047$$

7.7 EVALUACIÓN HISTOLÓGICA DE LA ACTIVIDAD ANTAGÓNICA DEL AISLAMIENTO FÚNGICO

7.7.1 Cortes histológicos

A partir de las plántulas obtenidas de las pruebas finales de antagonismo *in planta* de los aislamientos fúngicos con actividad protectora contra *Fusarium oxysporum*, se tomaron muestras de hoja, tallo (piña) y raíz, se colocaron en solución fijadora FAA y almacenadas a 4°C. A partir de estas muestras, se realizaron cortes histológicos de la raíz, como se describió anteriormente en el **Apartado 7.4.3**.

7.7.2 Tinción Uvitex 2B

Para la observación al microscopio de los cortes histológicos mediante fluorescencia, se tiñó con Uvitex 2B como previamente se describió. Las observaciones se realizaron con un microscopio equipado con epifluorescencia y filtros adecuados para el Uvitex 2B (Patto y Niks, 2001).

7.7.3 Tinción con azul de tripano

Para la tinción de los cortes histológicos se utilizó lactoglicerol-azul de tripano. La cual fue realizada después de la tinción con Uvitex 2B y observado en el microscopio óptico.

7.8 ANÁLISIS DE DATOS PARAMÉTRICOS

7.8.1 Análisis de datos paramétricos

Se estableció un experimento en un diseño completamente al azar. Los tratamientos probados fueron un total de 6 tratamientos y 4 repeticiones por tratamiento, siendo la unidad experimental cada contenedor con una planta. Las variables de respuesta fueron analizadas mediante un análisis de varianza unifactorial a un nivel de significancia de $P \leq 0.05$ y pruebas de separación de medias con Tukey ($P \leq 0.05$) mediante el software estadístico STATGRAPHICS Centurion XVI.

7.8.2 Análisis de datos no paramétricos

Se estableció un experimento en un diseño completamente al azar. Los tratamientos probados fueron un total de 8 tratamientos y 4 repeticiones por tratamiento, siendo la unidad experimental cada contenedor con una planta. Las variables de respuesta fueron analizadas mediante un análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis a un nivel de significancia de $P \leq 0.05$. Las diferencias entre las medias de la variable de respuesta fue analizada mediante un grafico de Caja y Bigotes, ambos análisis fueron realizados con el software estadístico STATGRAPHICS Centurion XVI.

8. RESULTADOS

8.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS PATOGENICAS DE FUSARIUM

Para la caracterización de las cepas patogénicas de *Fusarium* (FPA y FPC) se realizaron pruebas de patogenicidad *in vitro* e *in planta* evaluándose de manera visual cada 7 o 14 d respectivamente, de acuerdo a la escala arbitraria previamente descrita. A partir de estas observaciones, se obtuvo el grado de patogenicidad de estos aislamientos en las plantas de agave, y se observó cuál de estos 2 aislamientos presentaba una mejor uniformidad en los síntomas de la enfermedad de la marchitez en el Agave.

8.1.2 Prueba de patogenicidad *in vitro*

Después de la inoculación con las cepas patogénicas de *Fusarium* en plántulas de *A. tequilana* cultivadas *in vitro*, como se describe en el apartado 7.4.1.3 de la metodología, se realizaron evaluaciones cada 7 d, de acuerdo a la escala del grado de patogenicidad, con la finalidad de caracterizar el efecto de las diferentes cepas de *Fusarium*. Como testigos, se utilizaron plántulas inoculadas con medio de cultivo sin hongo y otras inoculadas con *Fol*. Para la evaluación del grado de patogenicidad, se tomaron 0, 15 y 30 d como representativos (Figura.8.1). En las lecturas finales (día 30) se observó, que tanto FPA como FPC presentaron una diferencia estadísticamente significativa con respecto al testigo negativo y positivo. Sin embargo, entre ellas no hubo una diferencia estadística significativa, en contraste con las plantas inoculadas con FPA que mostraron un grado de patogenicidad de 4, lo que equivale que entre un 75% del área de la plántula presenta síntomas de enfermedad o que más de la mitad de las hojas se observan necróticas o con pudrición, además de la presencia de micelio sobre la superficie foliar (Figura.8.2.D), estas características solo se presentaron en un 75% de las plantas. Por otra parte, FPC presentó un grado de patogenicidad de 3.63, lo que equivale que entre 50-75% del área de la plántulas presenta síntomas de enfermedad, o que por lo menos la mitad de las hojas se observan necróticas o con pudrición, además de la presencia de micelio sobre la superficie foliar y un

crecimiento mínimo sobre el medio de cultivo, siendo observado en más del 90% de las plántulas evaluadas (**Figura.8.2.C**). A partir de estas observaciones se considera que FPC presentó una mayor homogeneidad de los síntomas de la enfermedad, en comparación con los testigos, como Fol que presentó al menos dos hojas con síntomas y con presencia ligera de micelio sobre la superficie foliar (**Figura.8.2.B**).

Previamente a la prueba descrita anteriormente, se realizó una prueba de patogenicidad buscando mejorar el manejo del experimento con la adición de otro agente gelificante (Gel Rite® a una concentración de 1 g/L), que podría aumentar la solubilidad de la suspensión de esporas que se refleje en una mayor reproducibilidad. Los resultados de esta evaluación mostraron que tanto la cepa FPA como FPC presentaron una diferencia estadísticamente significativa con respecto a los testigos pero no así entre ellas, observando en los dos un equivalente a un 75-100% del área de la plántula presenta síntomas (**Figura.8.3**). En el caso de FPA (**Figura.8.4.B**), a partir del día 15 se empiezan a presentar síntomas en la hoja, observándose una necrosis en la punta de la hoja, y al día 30 esta misma hoja ya se encontró completamente necrótica y con micelio sobre su superficie y el medio de cultivo. Por otro lado, en el caso de FPC (**Figura.8.4.C**), se observó que a partir del día 15, por lo menos una hoja presentó necrosis, mientras que al día 30 la planta queda completamente necrosada y podrida con micelio sobre su superficie y el medio de cultivo. Sin embargo, aun cuando el tiempo para observar los síntomas es mucho menor (se observan a partir del día 15), se presencio micelio no solo en la plántula, sino también de manera importante sobre el medio de cultivo con Gel Rite, lo que da indicios para suponer que este agente gelificante puede ser utilizado por el hongo como fuente de carbono o nutrimentos, lo que representa un problema al momento de visualizar los resultados de la prueba. Por este motivo, se prefirió el uso de agar como agente gelificante a una concentración menor a la recomendada. A partir de estos resultados, se considera la prueba de patogenicidad *in vitro* descrita anteriormente, como una herramienta importante en la caracterización preliminar de los aislados de *Fusarium* sp. en plántulas que presenten los síntomas de

marchitez, que constituyen el primer filtro para la caracterización de su patogenicidad destacando su rapidez y sobre todo un punto primordial como es el sitio de penetración del hongo, que es equivalente a lo que se observa bajo condiciones de campo permitiendo disminuir la presencia de falsos positivos.

8.1.3 Prueba de patogenicidad *in planta*

Después de la evaluación *in vitro* de la patogenicidad de las cepas de *Fusarium*, se realizó la estimación en plántulas bajo condiciones controladas, como se describe en el apartado 7.4.2.3. (sustrato ST). Además de las cepas patogénicas, se utilizaron como testigos sustrato estéril inoculado con agua estéril y sustrato infestado con *Fol*. Las lecturas se tomaron cada día 15 durante 60 d, fecha considerada como la evaluación final del experimento. Se realizaron dos tipos de lecturas, la primera consistió en las observaciones de los síntomas (grado de patogenicidad) de acuerdo a la escala arbitraria y se tomaron 0, 30 y 60 d como representativos, en los cuales se observaron los cambios más evidentes (Figura.8.5). Por otra parte, se evaluaron variables anatómicas en las plántulas de agave para observar las características de la infección después de inocularse con las diferentes cepas de *Fusarium*, tomándose datos al inicio del experimento (día 0) y al final (día 60). Además del ensayo descrito en la metodología se comparó con un método de inoculación diferente (suspensión SP), el cual consistió en agregar una suspensión de esporas de concentración conocida (1×10^6 esporas/mL) a la base de la plántula de *A. tequilana*, una de los métodos de inoculación más utilizados y descritos para otros cultivos.

Los resultados obtenidos de las lecturas del grado de patogenicidad, nos muestran que FPC-ST (ST: inóculo obtenido a partir de sustrato SAA infestado con FPC o FPA), presentó una diferencia estadísticamente significativa con respecto a los testigos con un grado de patogenicidad de 3, equivalente a que un 50% del área de la plántula presenta síntomas de enfermedad, como se muestra en la Figura 8.8 C donde se observó que al menos una de las hojas principales presenta síntomas de necrosis, el cual inicia en la base hacia la punta de la hoja. Con respecto al día 30, se observó un marcado doblez en las puntas de las hojas (un

síntoma denominado como "encarrujamiento", característico de la marchitez del agave), y finalmente al día 60 se observó un encarrujamiento y necrosis total de la hoja, con la presencia de micelio sobre la superficie foliar. Por su parte, en FPC-SP (SP: inóculo obtenido a partir de una suspensión de esporas de FPA o FPC), se presentó un grado entre 2 y 3, lo que equivale a un 25 al 49% del área de la plántula presentaron síntomas de enfermedad, mientras que al día 60 se obtuvo al menos una hoja con necrosis total, iniciando de la base hacia la punta de la hoja y con ligero doblez hacia el interior de la hoja marchita (Figura.8.8.D). A partir de estos resultados, se observó que el método de inoculación, en este caso se utilizó sustrato infestado (medio SAA) con *Fusarium*, presentó una respuesta marcada y con un mayor grado de patogenicidad en comparación que con el método tradicionalmente utilizado para las evaluaciones de patogenicidad de *Fusarium*. Por otra parte, en FPA-ST y FPA-SP no se observó una diferencia significativa en el grado de patogenicidad (Figura.8.5). Sin embargo, en las lecturas se observó que al día 15, FPA-ST presenta un ligero marchitamiento de la hoja comenzando por la punta y recorriéndose hacia la base de la planta. Finalmente, al día 60 se observó una necrosis en las hojas, ligero encarrujamiento en las puntas de las hojas y presencia de micelio en la superficie foliar (Figura.8.8.E). En contraste, FPA-SP presentó síntomas en un grado menor, al día 30 se observó un ligero cambio de coloración que comenzó en el centro y manteniéndose así hasta el día 60 (Figura.8.8.F). A partir de estos resultados se observó que FPA presenta los síntomas de la enfermedad en un tiempo más prolongado que FPC, además de ligeras diferencias con respecto a los síntomas entre una y otra cepa, como fueron los primeros síntomas en las puntas de las hojas, con un marchitamiento que provocó que la hoja afectada se marchite por completo y se observó la presencia de micelio sobre su superficie. En contraste, FPC presentó una mayor virulencia, ya que los primeros síntomas desde se evidenciaron el día 15 después de la inoculación, se inició con un marchitamiento que va de la base hacia la punta de las hojas, además de que presentó una mayor uniformidad en los experimentos.

Por otra parte, los resultados obtenidos de los parámetros anatómicos se muestran en la **Figura 8.6 y 8.7**. Los parámetros evaluados como son la altura de planta, número de hojas, número de hojas con síntomas, longitud de raíz, raíz de mayor longitud y número de raíces no presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al testigo, aun cuando las plantas no presentaron una uniformidad en cuanto tamaño. Los datos finales mostraron que FPA-ST presentó una diferencia significativa en los primeros tres parámetros con respecto a los otros tratamientos, mientras que FPC-SP presentó una diferencia significativa en el promedio con respecto al testigo en el número de raíces (**Figura.8.7**). Por otro lado, en el promedio de la longitud de la raíz, FPA-SP presentó una diferencia con respecto al testigo, aunque estadísticamente no fue significativa (**Figura.8.7**). Por su parte, FPC-ST presentó un mayor promedio con respecto a todos los tratamientos en la raíz de mayor longitud, mientras que en el número de raíces con síntomas, resultó con una diferencia estadísticamente significativa con respecto al testigo, al igual que *Fol* (**Figura.8.6**). El número de raíces con síntomas se obtuvo del conteo de las raíces con presencia de oscurecimiento y ablandamiento de las raíces principales, lo que no corresponde, necesariamente, a una respuesta adversa de las raíces. La evaluación de estos parámetros no mostró diferencias significativas estadísticamente en la mayoría de los casos, lo que se hizo evidente la importancia del establecimiento de una escala que refleje el grado de patogenicidad, con mayor prioridad en la descripción de los síntomas de manera clara y precisa, en contraste con los parámetros previamente evaluados como son altura de la planta, número de hojas o de raíces.

8.1.4 Caracterización histológica de la infección

A partir de las muestras obtenidas de las plantas inoculadas con las cepas patógenas (FPA y FPC) almacenadas en la solución fijadora, se tomaron trozos de la raíz se tomó de la parte cercana a la base y de la parte media, se realizaron los cortes en el criótomo y se observaron al microscopio. La tinción se realizó empleando el azul de tripano lo cual permite identificarla presencia de micelio y esporas de la cepa fúngica que se encontraran dentro o fuera de la raíz,

posteriormente se observó con la fluorescencia (Uvitex 2B), para verificar su presencia. Los resultados mostraron que en los cortes de la raíz inoculada con las cepas patogénicas tanto FPC como FPA presentaron micelio dentro y fuera de la raíz, sobresalió la colonización del hongo en el sistema vascular, así como también la presencia de esporas por todo el haz vascular (Figura 8.9).

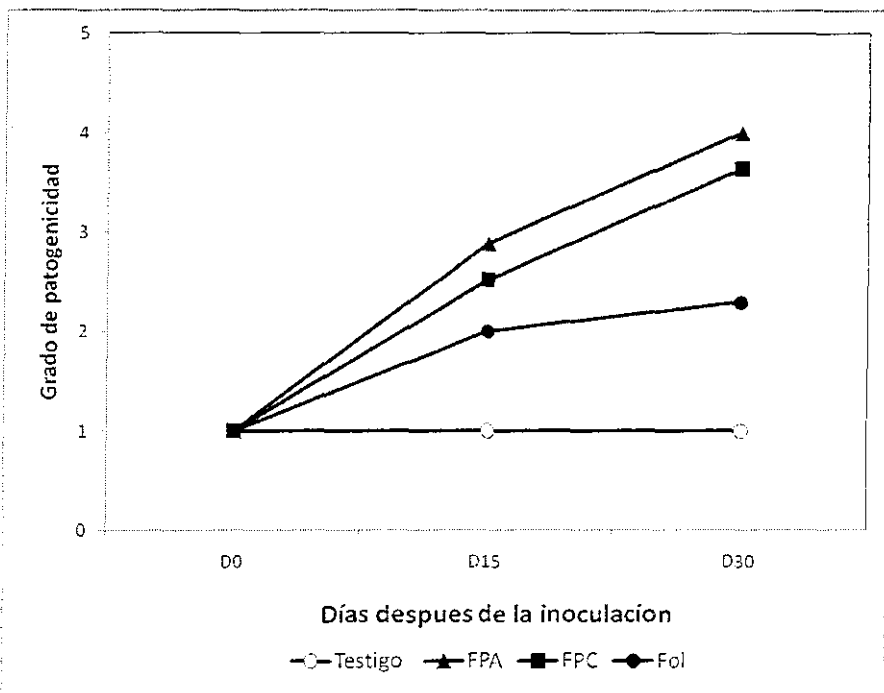


Figura 8.1. Evolución del grado de patogenicidad *in vitro* de las cepas patogénicas de *Fusarium oxysporum* asociadas a la marchitez del agave tequilero. Tomando el día cero (D0), día 15 (D15) y día 30 (D30), de acuerdo a la escala arbitraria de 1 a 5. (0): Testigo negativo, medio de cultivo sin hongo; (FPA): Cepa patogénica A de *F. oxysporum* asociada a la marchitez del agave tequilero; (FPC): Cepa patogénica C de *F. oxysporum* asociada a la marchitez del agave tequilero y (Fol): Testigo negativo, *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, cepa patogénica no hospedera de agave tequilero. Se evaluó una n=3, los cuales fueron calculados a partir de un análisis no paramétrico Kruskal-Wallis con $P \leq 0.05$.

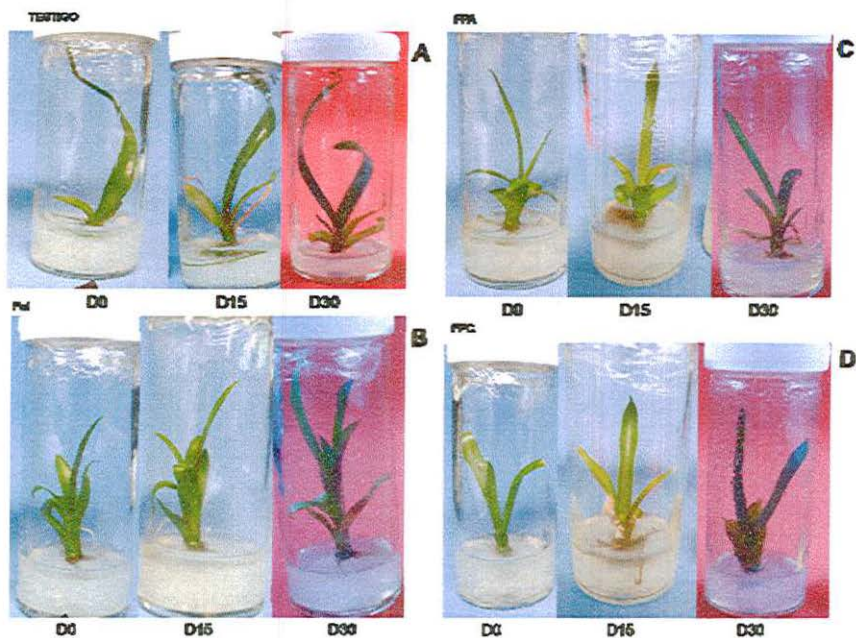


Figura 8.2. Prueba de patogenicidad *in vitro* de las cepas patogénicas de *F. oxysporum* asociadas a la marchitez del agave tequilero. Síntomas observados después de la inoculación de *Fusarium oxysporum* en plantas de *Agave tequilana* cultivadas *in vitro* al día cero (D0), día 15 (D15) y día 30 (D30), de acuerdo a la escala arbitraria de 1 a 5. (A, TESTIGO): Testigo negativo, medio de cultivo sin hongo; (B, Fol): Testigo negativo, *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, cepa patogénica no hospedera de agave tequilero; (C, FPA): Cepa patogénica A de *F. oxysporum* asociada a la marchitez del agave tequilero y (D, FPC): Cepa patogénica C de *F. oxysporum* asociada a la marchitez del agave tequilero.

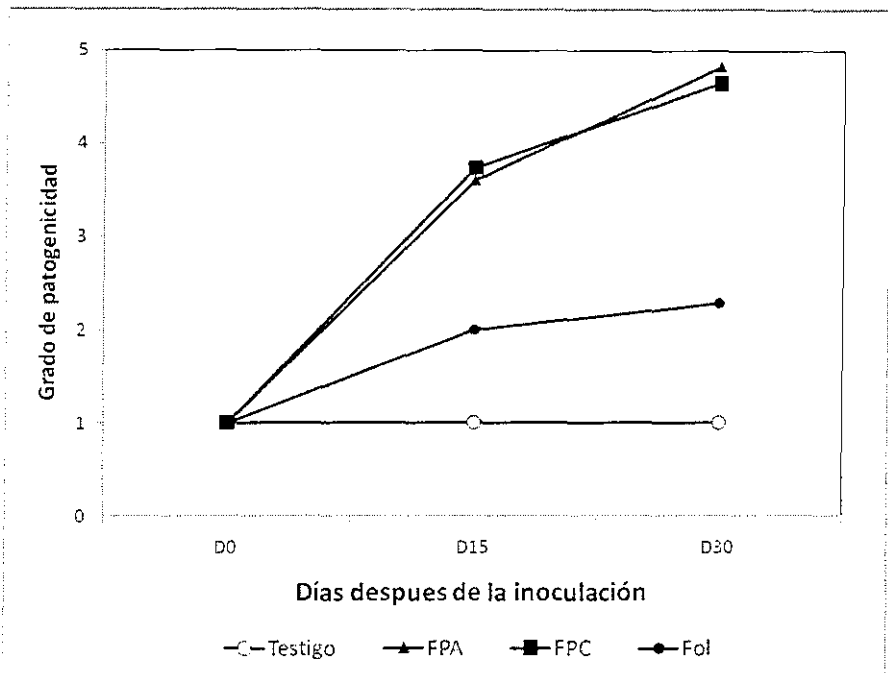


Figura 8.3. Evolución del grado de patogenicidad *in vitro* de las cepas patogénicas de *F. oxysporum* asociadas a la marchitez del agave, utilizando Gel Rite como agente gelificante. Patogenicidad *in vitro* tomada al día cero (D0), día 15 (D15) y día 30 (D30), de acuerdo a la escala arbitraria de 1 a 5, se utilizó como agente gelificante del medio de cultivo Gel Rite. (0): Testigo negativo, medio de cultivo sin hongo; (FPA): Cepa patogénica A de *F. oxysporum* asociada a la marchitez del agave tequilero; (FPC): Cepa patogénica C de *F. oxysporum* asociada a la marchitez del agave tequilero y (Fol): Testigo negativo, *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, cepa patogénica no hospedera de agave tequilero. Se evaluó una n=3, los cuales fueron calculados a partir de un análisis no paramétrico Kruskal-Wallis con $P \leq 0.05$.

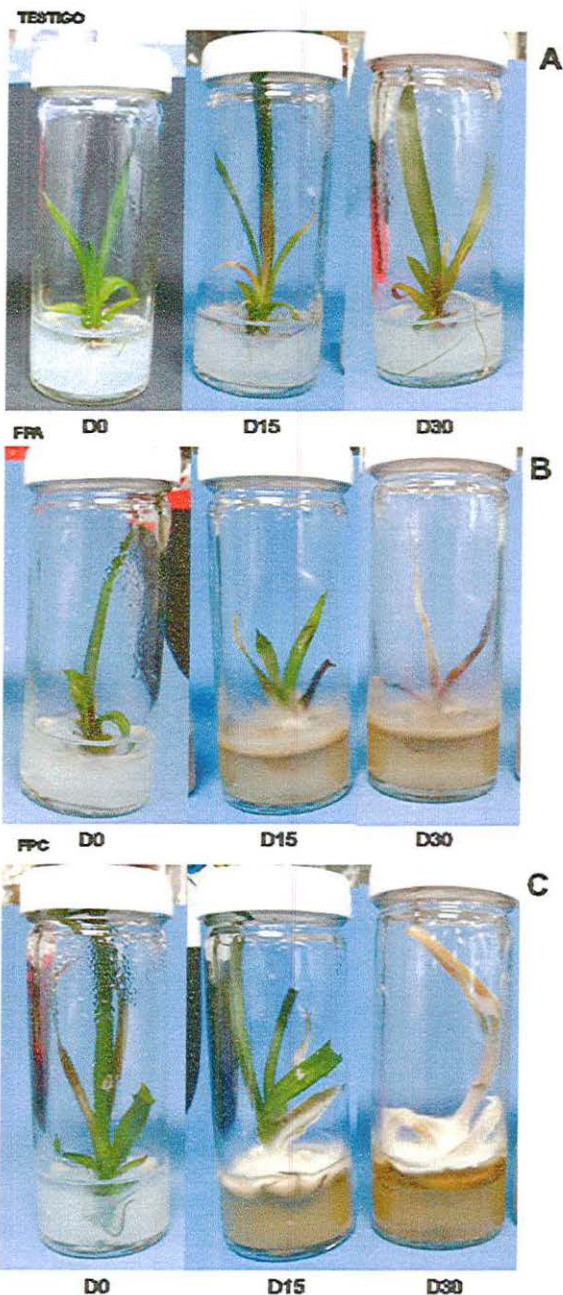


Figura 8.4. Prueba de patogenicidad *in vitro* de las cepas patogénicas de *F. oxysporum* asociadas a la marchitez del agave tequilero, utilizando Gel Rite como agente gelificante. Síntomas observados al día cero (D0), día 15 (D15) y día 30 (D30), de acuerdo a la escala arbitraria de 1 a 5. Se utilizó como agente gelificante Gel Rite. (A, TESTIGO): Testigo negativo, medio de cultivo sin hongo; (B, FPA): Cepa patogénica A de *F. oxysporum* asociada a la marchitez del agave tequilero; (C, FPC): Cepa patogénica C de *F. oxysporum* asociada a la marchitez del agave tequilero.

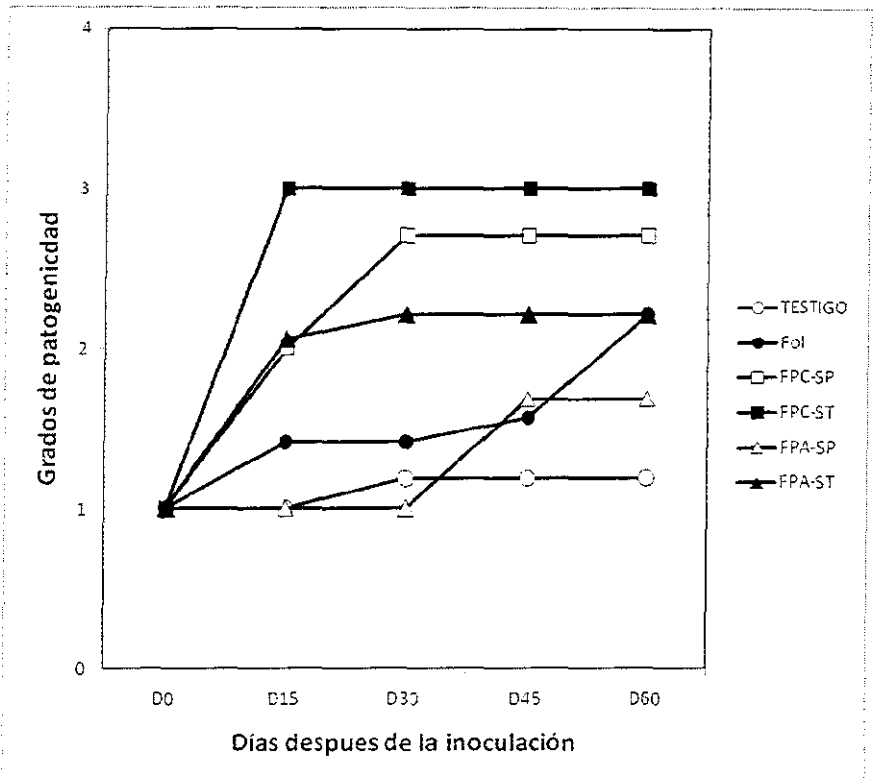


Figura 8.5. Evolución del grado de patogenicidad *in planta* de las cepas patogénicas de *F. oxysporum* asociadas a la marchitez del agave. Plantas de *Agave tequilana* cultivadas en invernadero al día cero (D0), día 15 (D15), día 30 (D30) y día 60 (D60), de acuerdo a la escala arbitraria de 1 a 5, se utilizó como inóculo sustrato infestado y suspensión de esporas. (TESTIGO): Testigo negativo, sustrato estéril; (FoI): Testigo negativo, *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, cepa patogénica no hospedera de agave tequilero, (FPA-SP): Cepa patogénica A de *F. oxysporum* asociada a la marchitez del agave tequilero inoculada como una suspensión de esporas a la base de la planta; (FPA-ST): Cepa patogénica A inoculada en sustrato infestado. (FPC-SP): Cepa patogénica C inoculada como una suspensión de esporas a la base de la planta; (FPC-ST): Cepa patogénica C inoculada en sustrato infestado. Se evaluó una n=4, los cuales fueron calculados a partir de un análisis no paramétrico Kruskal-Wallis con $P \leq 0.05$.

TESTIGO

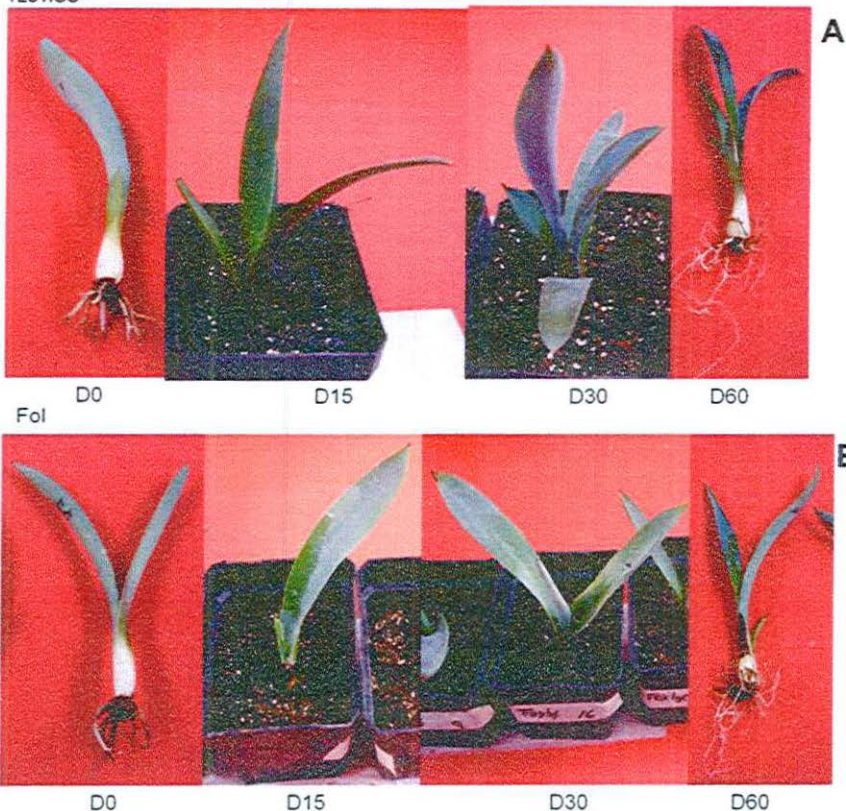


Figura 8.8. Prueba de patogenicidad *in planta* de las cepas patogénicas de *F. oxysporum* asociadas a la marchitez del agave tequilero. Plantas de *Agave tequilana* cultivadas en invernadero al día cero (D0), día 15 (D15), día 30 (D30) y día 60 (D60), de acuerdo a la escala arbitraria de 1 a 5, se utilizó como inóculo sustrato infestado y suspensión de esporas. (A: TESTIGO): Testigo negativo, sustrato estéril; (B: Fol): Testigo negativo, *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, cepa patogénica no hospedera de agave tequilero; (C: FPC-ST): Cepa patogénica C inoculada en sustrato infestado; (D: FPC-SP): Cepa patogénica C inoculada como una suspensión de esporas a la base de la planta; (E: FPA-ST): Cepa patogénica A inoculada en sustrato infestado (F: FPA-SP): Cepa patogénica A de *F. oxysporum* asociada a la marchitez del agave tequilero inoculada como una suspensión de esporas a la base de la planta.

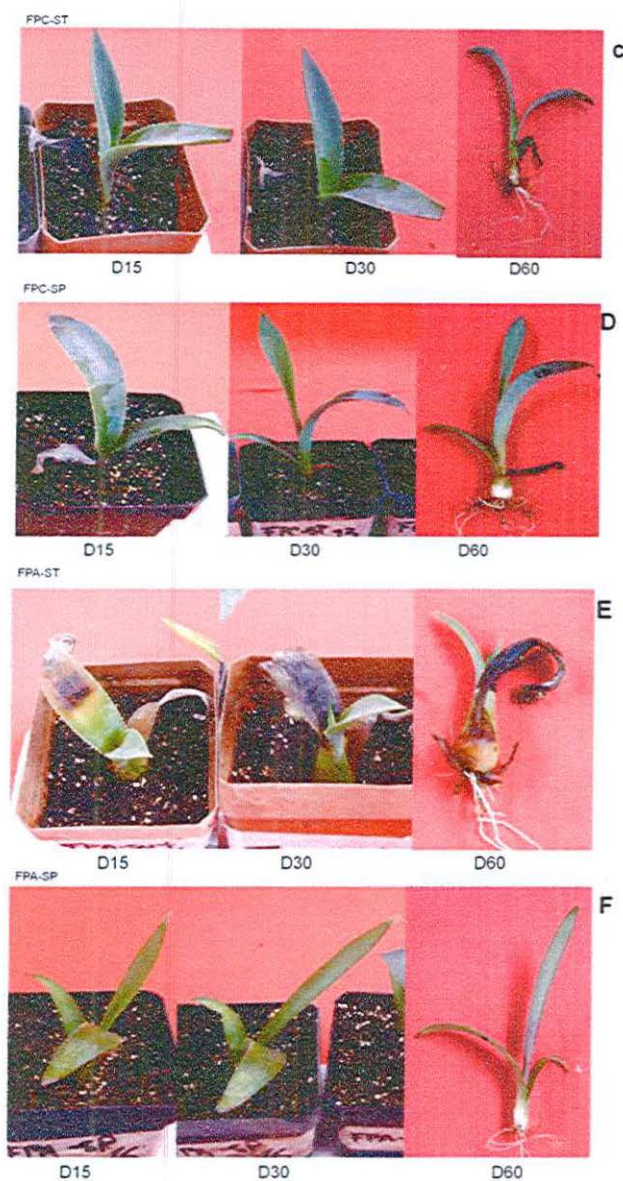


Figura 8.8. Prueba de patogenicidad *in planta* de las cepas patogénicas de *F. oxysporum* asociadas a la marchitez del agave tequilero (Continuación).

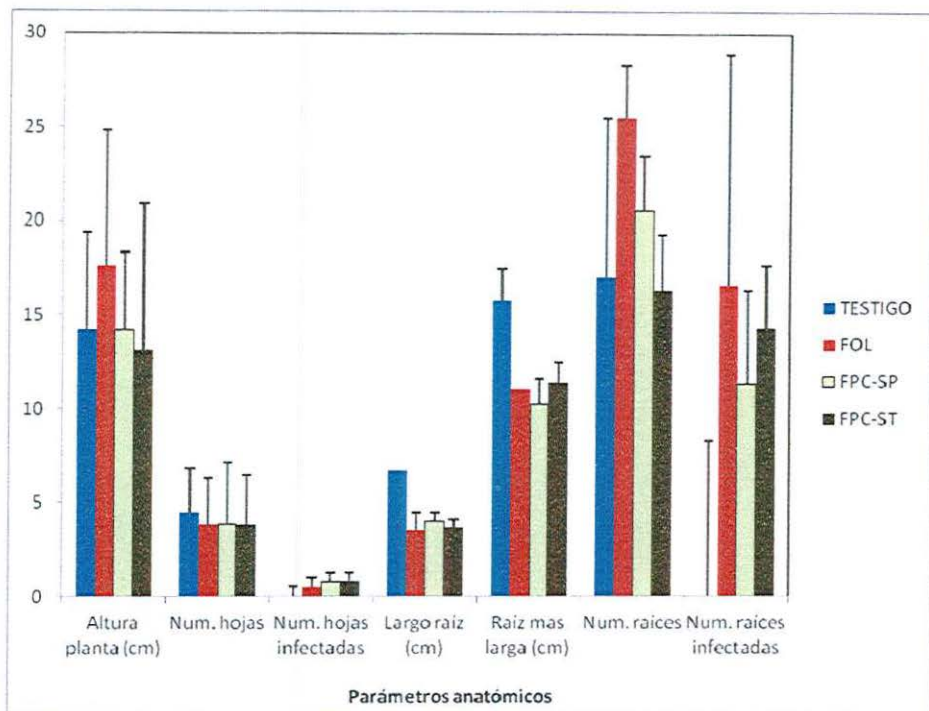


Figura 8.6. Parámetros anatómicos evaluados en la prueba de patogenicidad *in planta* de las cepa patógena FPC de *F. oxysporum* asociadas a la marchitez del agave. (TESTIGO): Testigo negativo, sustrato estéril; (FOL): Testigo negativo, *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, cepa patógena no hospedera de agave tequilero, (FPC-SP): Cepa patógena C inoculada como una suspensión de esporas a la base de la planta; (FPC-ST): Cepa patógena C inoculada en sustrato infestado. Se evaluó una n=4, los cuales fueron calculados a partir de un análisis no paramétrico Tukey con $P \leq 0.05$.

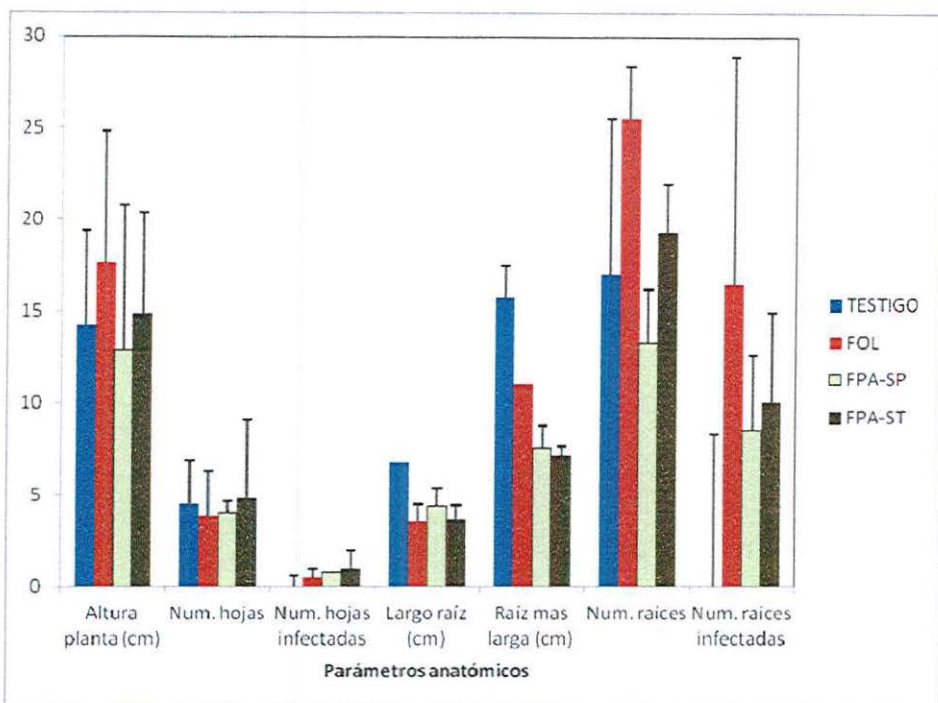


Figura 8.7. Parámetros anatómicos evaluados en la prueba de patogenicidad *in planta* de las cepa patógena FPA de *F. oxysporum* asociadas a la marchitez del agave. (TESTIGO): Testigo negativo, sustrato estéril; (Fol): Testigo negativo, *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, cepa patógena no hospedera de agave tequilero, (FPA-SP): Cepa patógena A de *F. oxysporum* asociada a la marchitez del agave tequilero inculcada como una suspensión de esporas a la base de la planta; (FPA-ST): Cepa patógena A inculcada en sustrato infestado. Se evaluó una n=4, los cuales fueron calculados a partir de un análisis no paramétrico Tukey con $P \leq 0.05$.

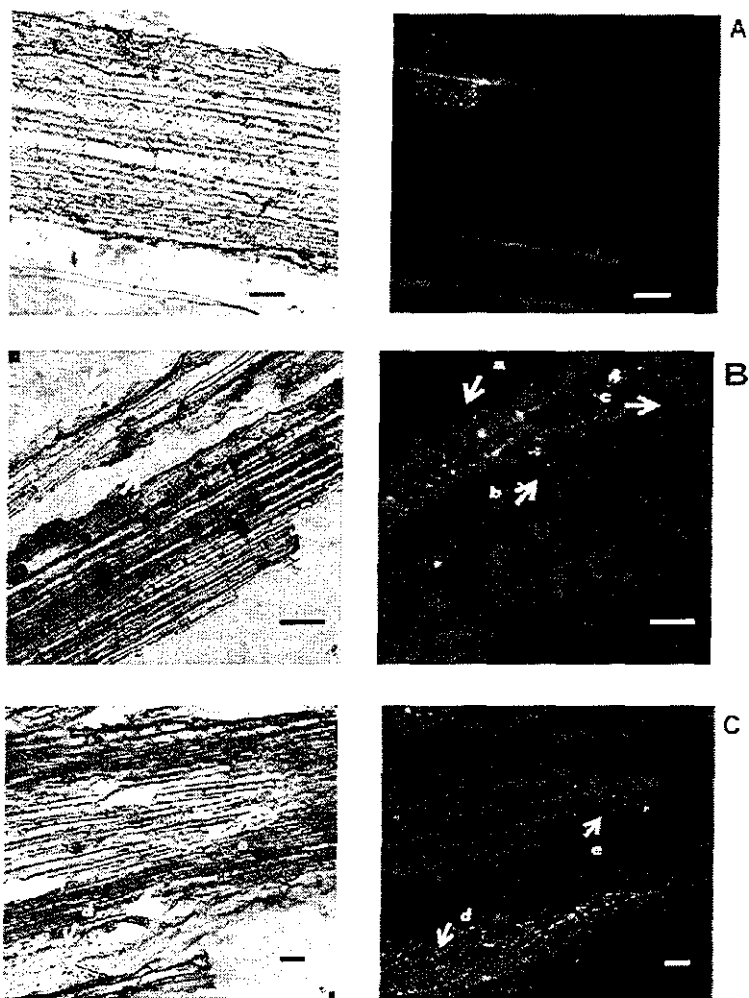


Figura 8.9 Caracterización histológica de la infección de raíces de *A. tequilana* por las cepas patogénicas de *F. oxysporum*. Cortes histológicos de la raíz de plántulas de *Agave tequilana*, a la izquierda se presenta el tejido teñido con azul de y a la derecha el tejido con la tinción con Uvitex 2B (epifluorescencia). La barra equivale a 50 μ m. **A:** Testigo, raíz sin inoculo de hongo; **B:** Raíz inoculada con la cepa patogénica FPA, las flechas indican la presencia de micelio o esporas (**a**: micelio en la superficie de la raíz, **b** y **c**: micelio dentro del tejido de la raíz); **C:** Raíz inoculada con la cepa patogénica FPC, las flechas indican la presencia de micelio o esporas (**d**: micelio en la parte externa de la raíz y **e**: micelio dentro de la raíz en el haz vascular).

8.2 AISLAMIENTOS FÚNGICOS

Se aislaron cepas de hongos de la rizósfera de *Agave tequilana* Weber var. azul, utilizando medios de cultivo selectivos para los géneros *Trichoderma* sp. y *Fusarium* sp. Del total de los aislamientos obtenidos, se evaluaron solamente 74 cepas, en su mayoría aquellos aislados de medio selectivo para *Trichoderma* y *Fusarium*, se tomaron como referencia los reportes en los cuales se describen a estos dos géneros con un efecto antagónico sobresaliente sobre *Fusarium oxysporum* patógeno de otros cultivos de importancia comercial y agrícola (Figura.8.11).

8.3 ANTAGONISMO *IN VITRO*

De aquellos aislamientos seleccionados, se evaluó su actividad antagónica *in vitro* contra las dos cepas patogénicas de *Fusarium* previamente caracterizadas. Se realizó una evaluación preliminar de los aislamientos, a esta evaluación se le denominó como "actividad antagónica *in vitro* cualitativa". Aquellos aislamientos con una actividad antagónica *in vitro* sobresaliente se les realizó una evaluación de la actividad antagónica denominada como "cuantitativa", a partir de la cuál se obtuvo el porcentaje de inhibición de cada aislamiento para cada una de las cepas patogénicas de *Fusarium*.

8.3.1 Antagonismo *in vitro* cualitativa

Como prueba preliminar, o primer filtro, con la finalidad de descartar aquellos aislamientos que no presentan algún grado de actividad antagónica contra las cepas patogénicas de *Fusarium*, se realizó una evaluación de actividad antagónica *in vitro* cualitativa, se tomaron los datos de los días 7 y 14, y sus características observadas en la interacción, así como el grado de antagonismo a partir de una escala arbitraria previamente descrita. Las cepas que mostraron un crecimiento indefinido y/o variable se repitieron al menos en otra ocasión. Algunas de los aislamientos obtenidos fueron eliminados ya que al realizar la prueba no crecieron en el medio de cultivo utilizado, o durante el proceso de resiembra no crecieron adecuadamente. Al final de los experimentos se observó que un 91.67% de los

aislamientos tuvieron algún grado de actividad antagónica, mientras que solo un 8.33% no mostró algún grado de actividad antagónica (**Figura.8.10**).

A partir de la prueba cualitativa se obtuvo una lista de aislamientos con algún grado de actividad antagónica *in vitro* (**Cuadro.8.1**), en donde se observó que un 22.22% de los aislamientos evaluados presentaron una actividad antagónica sobresaliente y un 25% actividad antagónica máxima (**Figura.8.11**). A partir de esta lista, se seleccionaron aquellos aislamientos que presentaron una actividad antagónica sobresaliente y máxima para su evaluación de manera cuantitativa.

En las observaciones de las características de interacción de las cepas evaluadas en confrontación con las patogénicas se presentaron dos características principales como es la producción de metabolitos al contacto con la cepa patogénica como se observa en la **Figura 8.12** en que FUHER424A1 (**Figura.8.12.A**) y KOESP84A2 (**Figura.8.12.B**) producen metabolitos de color rojo al tener contacto con el patógeno, también pudo observarse la liberación de metabolitos en el medio de cultivo que inhiben al patógeno (**Figura.8.12.C.D.E.F**) estos metabolitos pueden ser de color rojo, amarillo o naranja. La segunda característica principal observada en las cepas evaluadas fue el micoparasitismo como se muestra en la **Figura 8.13** donde FUHER424A1 (**Figura.8.13.D**) y KOESP84A2 (**Figura.8.13.E**) crecen sobre la zona de contacto con la cepa patogénica, en TRIHER425A2 (**Figura.8.13.B**) y TRIHER42B2 (**Figura.8.13.C**) actúan cubriendo un 75-100% del patógeno y en el micoparasitismo que cubre por completo la cepa patogénica se observa en FUESP93B2 (**Figura.8.13.F**). En contraste KOCOFA1 (**Figura.8.13.A**) no presentó un contacto con ninguna de las dos cepas patogénicas.

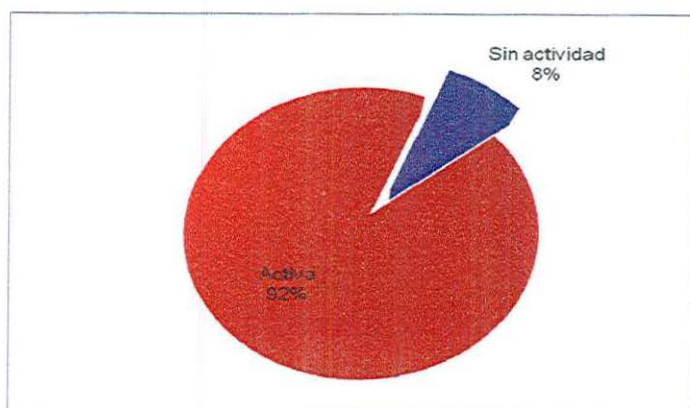


Figura 8.10. Actividad antagonica *in vitro* contra *Fusarium oxysporum* asociado a la marchitez del agave, de los aislamientos obtenidos de la rizósfera de *Agave tequilana*.

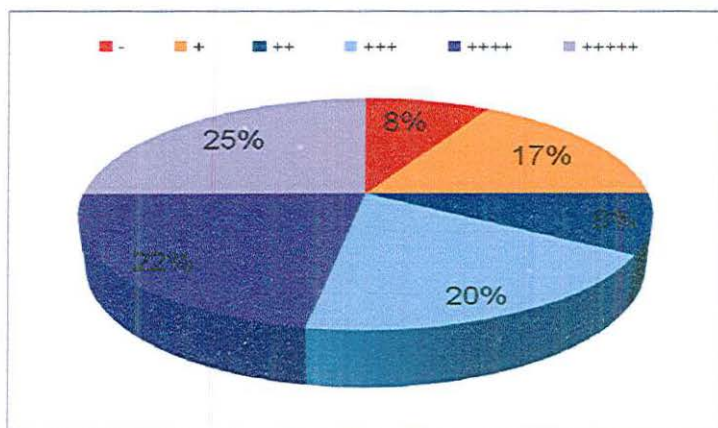


Figura 8.11. Tipo de actividad antagonica *in vitro* contra *F. oxysporum* asociado a la marchitez del agave tequilero, de los aislamientos obtenidos de la rizósfera de *Agave tequilana*. Donde: (-): sin actividad; (+): Actividad antagonica minima; (++): Actividad antagonica ligera; (+++): Actividad antagonica moderada; (++++): Actividad antagonica sobresaliente y (+++++): Actividad antagonica máxima.

Cuadro 8.1. Características de la actividad antagónica *in vitro* contra *F. oxysporum* asociado a la marchitez del agave tequilero, de los aislamientos obtenidos de la rizósfera de *A. tequilana*.

CLAVE	ACTIVIDAD	OBSERVACIONES
FUESP93B2	+++++	MY, P3
FUHER423A1	+++++	GS, P3
FUHER424A1	+++++	MYR, GS, P3
FUHER424A3	+++++	MR, I, P3
FUHER424B1	++++	I, MR, P3
FUHER424B2	++++	I, P3, GS, MR
FULLO1B2	+	MR, I
FUPAD33A1	+++++	MY, P3
FUPAD33A2	++++	GS, P3, MO
FUPAD33B1	-	SA
FUPAD33B2	+	SA, MY
KOCOF3A1	+	I, SA
KOCOF3B1	+++	GV
KOCOF3B2	++++	GS, P3, FC
KOEDU62A1	+	GL, MY, I
KOEDU62B1	+	GV, M, P3
KOESP83A1	+++++	MR, P1
KOESP83A3	+++++	MR, FAC
KOESP83B1	+++	GV, MR, P3FA, FC
KOESP83B2	+++	GS, GV, I, MY
KOESP84A1	++++	MY, RxMR, I
KOESP84A2	+++++	RXMR, FAC
KOESP84B1	+++	MR, RxMY, FAC
KOESP84B2	+++	FA, P3
KOESP85A1	+++	GS, MY, P3, FAC
KOEZA43B1	-	GL
KOLCO4A1	++++	P3, I, MY, RxMR
KOLCO4A2	+++	P3, FAC
KOLCO4B1	+++	GL, I, SC
KOPAD33A1	++	SA, GL, I
KOPAD33B1	+++++	I, MY, PK
KOPAD33B2	+++	I, MY
TRICOF3A1	+	GV
TRICOF3A2	-	GL
TRICOF3A4	-	SA
TRICOF3B1	+	CV, FC
TRICOF3B2	+++	CV, FA

TRICOF3B4	+++	I, CV
TRIEDU62A1	++++	I, Pk
TRIEDU62A2	+++	I, MY
TRIEDU62A3	+	I, GS
TRIEDU62B2	+	I
TRIEDU62B3	++++	Ix
TRIEL1B1	+++++	GS, P3
TRIEL1B2	+++	I, RxMY
TRIEL1B3	++++	I, MY
TRIESP83A1	+++++	GS, P1
TRIESP83A2	++	I
TRIESP83A3	++++	I, MO
TRIESP83A4	++++	GS
TRIESP83A5	+++++	RxMR, P3
TRIESP83B1	+++++	P1, GS
TRIESP83B2	+	GL
TRIESP93A1	++++	GS, I, RxMB
TRIESP93A2	+++++	I, P3
TRIESP93B1	++	I, MY
TRIESP93B2	++	GL, SC, MY, I
TRIEZA2B3	+++++	P3, GS, FAC
TRIEZA43A1	-	GS, SA
TRiHER424A1	+	I, GL
TRiHER424B1	++++	MO, P3, I
TRiHER424B2	+++++	I, MR
TRiHER425A2	+++++	I, MR
TRILCB2A1	+	GL
TRILCB2B1	++++	RxMO, I
TRILCO4A1	++++	MO, I, GL
TRILCO4A2	+++	I, RxMR
TRILLO1A2	+	I, GL
TRILLO1B1	+	GL, SA
TRILLO1B2	++	I, GL, FCMR, FAMy
TRIPAD33B1	++++	I, MY, FA
TRIYER1A1	+++++	GS, P3, MY, FAC
TRIYER1B1	++	GL, I, FAC
TRIYER1B2	-	SA, GL

(-): sin actividad. (+): Actividad antagónica mínima. (++) : Actividad antagónica ligera. (+++): Actividad antagónica moderada. (++++): Actividad antagónica sobresaliente. (+++++): Actividad antagónica máxima.

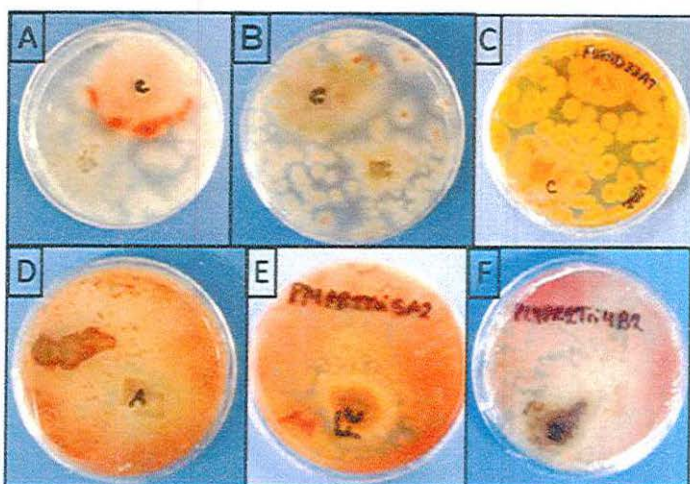


Figura 8.12. Características de la actividad antagonística *in vitro*, producción de metabolitos; liberados al medio de cultivo en confrontación con las cepas patogénicas FPA y FPC. Liberación de metabolitos al contacto con la cepa patogénica: (A): FUHER424A1 y (B): KOESP84A2; liberación de metabolitos al medio de cultivo: (C): KOPAD33A1, (D): TRIELI1B1, (E): TRIHER425A2 y (F): TRIHER42B2.

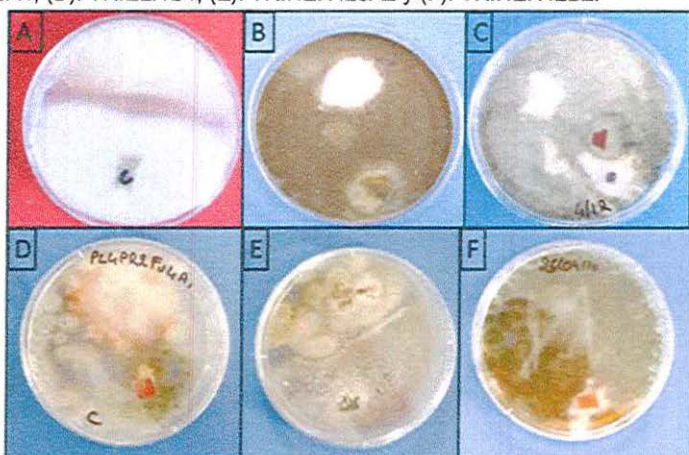


Figura 8.13. Características de la actividad antagonística *in vitro*, micoparasitismo e inhibición del crecimiento; observado sobre las cepas patogénicas FPA y FPC. Inhibición sin contacto entre las dos cepas: (A) KOCOFA1, micoparasitismo P1: (D) FUHER424A1 y (E): KOESP84A2; micoparasitismo P2: (B) TRIHER425A2 y (C) TRIHER42B2 y micoparasitismo P3: (F) FUESP93B2.

8.3.2 Antagonismo *in vitro* cuantitativa

Los aislamientos fúngicos que presentaron actividad antagonica *in vitro* sobresaliente y máxima, fueron evaluados de nueva cuenta en la prueba de antagonismo *in vitro*, aunque en esta ocasión se buscó obtener el porcentaje de inhibición contra cada una de las cepas de *Fusarium* previamente caracterizadas, lo que se consideró como la evaluación de la actividad antagonica *in vitro* cuantitativa. Para esto, se tomaron las medidas de su crecimiento en confrontación con las cepas patogénicas al día 7 y 14, teniéndose como testigos FPA y FPC en medio de cultivo libre de hongo, lo que fue considerado como las condiciones normales de crecimientos, además de que se observaron las características de inhibición presentes en la confrontación (Figura.8.14).

En el cuadro 8.2 se presenta el porcentaje de inhibición que se obtuvieron de los aislamientos evaluados, donde se observó que para FPA el porcentaje mínimo de inhibición fue de 45.54% y el máximo de 83%, y las características de inhibición que se presentó con mayor frecuencia fue la producción de metabolitos observado en más del 90% de los aislamientos. Otra de las características presentadas fue la presencia de algún tipo de micoparasitismo con un 98% y en cuanto al crecimiento rápido se observó en menos del 50% de los aislamientos. Por otro lado, FPC presentó un porcentaje de inhibición que abarcó del 43.14% al 80.12%, mientras que en las características de su antagonismo las más recurrentes fueron la producción de metabolitos y el micoparasitismo presentes en un 99% los aislamientos y en cuanto al crecimiento rápido se observó en un 50% de los aislamientos. Los aislamientos que presentaron un mayor porcentaje de inhibición en confrontación con las dos cepas patogénicas fueron TRIESP83A4 y FUESP93B2, en contraste con los porcentajes mínimos los presentaron TRIEDU62A1 y KOESP84A2 (Figura.8.14.C).

En las observaciones del crecimiento de los testigos al día final (14) de las cepas patogénicas se observó un crecimiento equivalente entre ellas (Figura.8.14.A.B). Algunos de los aislamientos presentan ciertas características como es la falta de contacto entre su micelio y la de las cepas patogénicas, esto se observó como una inhibición del crecimiento de la cepa patogénica y la presencia de un espacio libre

de micelio entre ambos hongos, como ejemplo esta KOESP84A2 (Figura.8.14.C.D). Por otra parte, los aislamientos FUHER424A1 (Figura.8.14.K.L) y TRIHER425A2 (Figura.8.14.G.H) presentaron un tipo de micoparasitismo P3, cubriendo solo la zona de contacto, mientras que TRIEL1B1 (Figura.8.14.E.F) presentó el micoparasitismo tipo P2 al cubrir un 50-74% de la cepa patogénica. Por otro lado en TRIHER42B2 en confrontación con FPA (Figura.8.14.I) presento micoparasitismo tipo P1 al cubrir un 75-100% de la cepa patogénica y en confrontación con FPC (Figura.8.14.J). Finalmente, se presenta TRIHER42B2 en donde no se presenta un contacto directo equivalente a lo descrito con KOESP84A2 (Figura.8.14.D).

8.4 PATOGENICIDAD DE LOS AISLAMIENTOS FÚNGICOS EN *Agave tequilana*

A los aislamientos seleccionados al azar se les evaluó su grado de patogenicidad tanto *in vitro* como *in planta*.

8.4.1 Patogenicidad *in vitro*

Se evaluó el grado de patogenicidad en plántulas cultivadas y mantenidas *in vitro* para cada uno de los cinco aislamientos fúngicos seleccionados, se utilizaron como testigos plántulas inoculadas con medio de cultivo sin hongo, plántulas inoculadas con *Fol* y la cepa patogénica de referencia FPC, como se describe en el apartado 7.5.2.1. Se tomaron como fechas representativas los días 0, 15 y 30, al observarse que se presentaron los mayores contrastes de los síntomas de acuerdo a la escala de patogenicidad propuesta. Donde el día 30 fue considerado como el final del experimento, los resultados mostraron que cuatro aislamientos no presentaron diferencias significativas con respecto al testigo sin hongo (Figura.8.15). Sin embargo, TRIHER425A2 si presentó una diferencia significativa, equivalente al observado en las plántulas inoculadas con *Fol*, pero menor a lo observado con la cepa patogénica FPC. Por otro lado, KOESP84A2 y TRIHER42B2 presentaron un menor grado de patogenicidad aunque no presentó una diferencia significativa con respecto al testigo, destacaron las cepas

FUHER424A1 Y TRIELI1B1 las cuales presentaron un grado de patogenicidad por debajo de 1.6, y no ser significativamente diferentes con respecto al testigo (**Figura.8.16.F.D**).

Entre las características observadas en cada una de las plántulas, en caso de las inoculadas con FPC, utilizado como testigo positivo, se observó que al día 15 se presentó al menos una hoja muerta y al día final la plántula está completamente muerta, con presencia de micelio sobre su superficie foliar y una presencia mínima sobre el medio de cultivo (**Figura.8.16.B**). Sin embargo, el aislamiento que presentó una diferencia aunque no estadística con respecto al testigo sin inóculo fue TRIHER425A2 con un grado de patogenicidad de 2.29 que equivale que entre un 25-50% del área de las plántulas presentan síntomas de enfermedad. También se observó que al día 15 las plántulas presentaron un cambio de coloración en el margen de las hojas de las plántulas y al día 30 estas hojas se comenzaron a marchitar, el cual inicio por las puntas y recorriéndose a la base de la plántula (**Figura.8.16.H**). Por otro lado, con los aislamientos TRIHER42B2 y KOESP84A2 se observó un grado de patogenicidad de 2, que equivale un 25% del área de las plántulas con síntomas de enfermedad. Para TRIHER42B2 (**Figura.8.16.G**) se observó que al día 15 se presentó un marchitamiento que inició en las puntas de las hojas y al día final al menos una hoja se marchita completamente, presentando crecimiento de micelio sobre su superficie y ligeramente sobre el medio de cultivo. Por parte en KOESP84A2 (**Figura.8.16.E**), se observaron características similares a TRIHER42B2. Finalmente, a partir de los resultados se obtuvo que en la prueba de patogenicidad *in vitro*, el aislamiento TRIHER425A2, presentó el grado de patogenicidad mayor con respecto a los cinco aislamientos evaluados, aunque no fue equivalente al testigo positivo (FPC).

Cuadro 8.2. Evaluación cuantitativa de la actividad antagonica *in vitro*. Porcentaje de inhibición del crecimiento de los aislamientos fúngicos contra las cepas patogénicas FPA (A) y FPC (C), y las características del antagonismo que presentaron.

CLAVE	INHIBICIÓN (%)		CARACTERÍSTICAS DE INHIBICIÓN	
	A	C	A	C
FUESP93B2	78.59	74.95	GS, MO, P3, I	GS, M, I, P3
FUHER423A1	54.29	49.50	IRX	I
FUHER424A1	50.88	46.67	I, MR, MORX, P3	I, MR, MBRX, P3
FUHER424A3	63.71	57.17	I, MO, P2	I, MR, P3
FUPAD33A2	66.89	56.79	I, MY, P3	I, MY, P3
KOESP83A3	49.84	56.15	I, MR, P3	GS, I, MR, P3
KOESP83A1	64.98	71.33	MR, RXMO, I, P3, G	MO, I, G, P3
KOESP84A2	48.05	43.14	I, MYRX, P3	I, MYRX
KOPAD33B1	63.38	69.12	GS, I, P3, RXR	GS, I, P3, RXMR
TRIEDU62A1	45.54	51.55	I, P3	I, P3
TRIEL1B1	57.43	62.44	GS, I, MYRX, P1	GS, I, MY, P1
TRIESP83A3	49.48	56.15	GS, I, MY, MO, P3	GS, I, MO, P3
TRIESP83A4	83.00	80.12	I, G, P1	IRXMR, I, P1, G
TRIESP83A5	56.47	54.17	MR, GS, P3, IRX, I	MR, GS, I, IRX, P3
TRIESP83B1	65.45	64.04	GS, I, MY, P1	GS, I, MY, P1
TRIEZA2B3	57.92	71.74	GS, I, MY, MORX, P3	GS, I, MY, MO, P3
TRIIHER425A2	60.38	54.15	GS, I, MR, MORX, P3	GS, I, MY, MO, P3
TRIIHER425B2	48.73	47.96	I, MR, MY	I, MR, MY, P3
TRIIYER1A1	59.12	65.01	GS, I, MY, MB	GS, I, MY, MO, P3

GS: Crecimiento rápido, I: Inhibición, IRX: Inhibición sin contacto con la cepa patogénica, MR: Producción de metabolitos rojos al medio, MY: Producción de metabolitos amarillos al medio, MO: Producción de metabolitos naranjas al medio, MB: Producción de metabolitos cafés al medio MRX: Producción de metabolitos al contacto con la cepa patogénica, P1: Micoparasitismo cubre del 75 al 100% de la cepa patogénica, P2: Micoparasitismo cubre del 30 al 70% de la cepa patogénica, P3: Micoparasitismo cubre el sitio de contacto con la cepa patogénica.

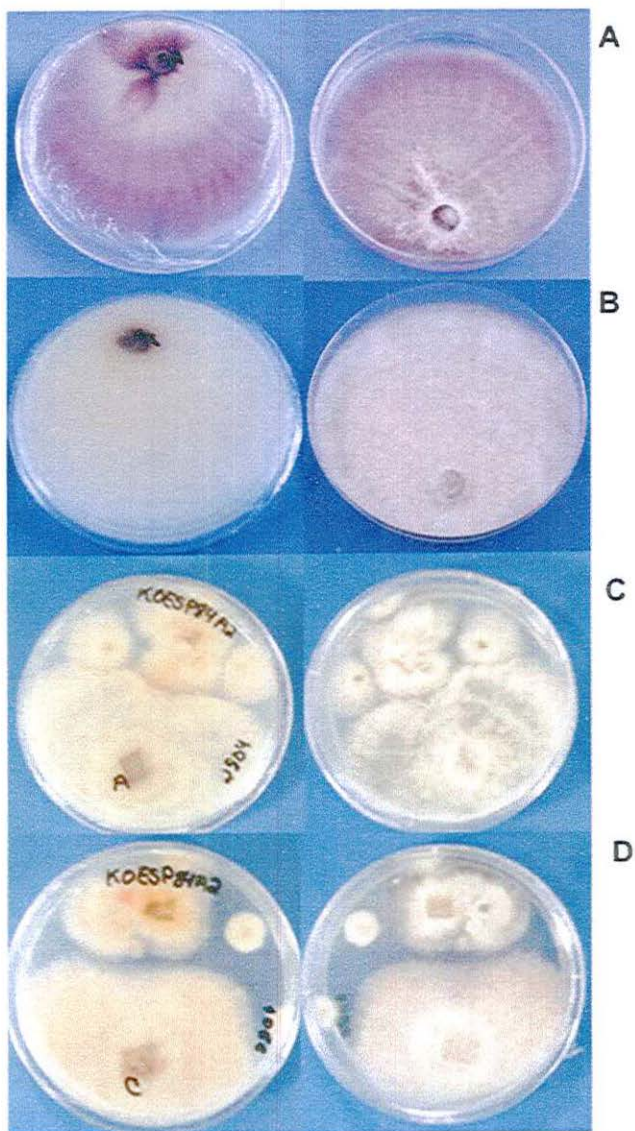


Figura 8.14. Características de la evaluación cuantitativa de la actividad antagonista *in vitro*. Los aislamientos seleccionados en confrontación con las cepas patogénicas FPA y FPC al día 14.
A: Testigo FPA;
B: testigo FPC;
C: KOESP84A2 vs FPA;
D: KOESP84A2 vs FPC.

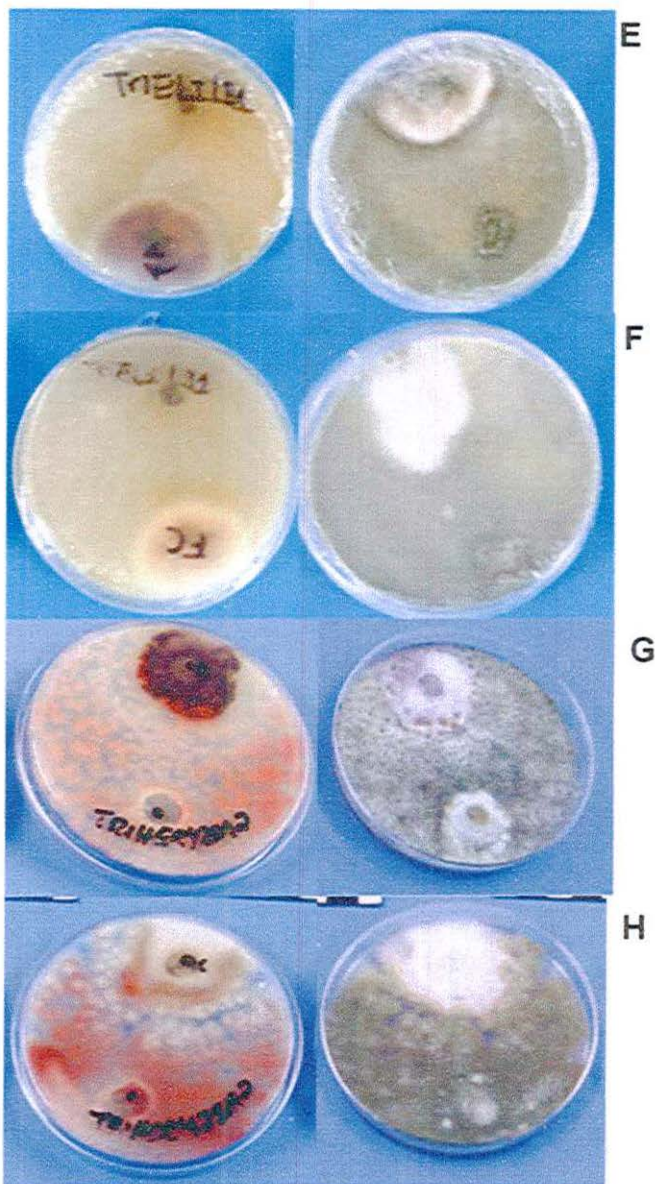


Figura 8.14
(Continuación).
Características de la evaluación
cuantitativa de la
actividad
antagónica *in vitro*.

E: TRIELI1B1 vs
FPA;

F: TRIELI1B1 vs
FPC;

G: TRIHER425A2
vs FPA;

H: TRIHER425A2
vs FPC

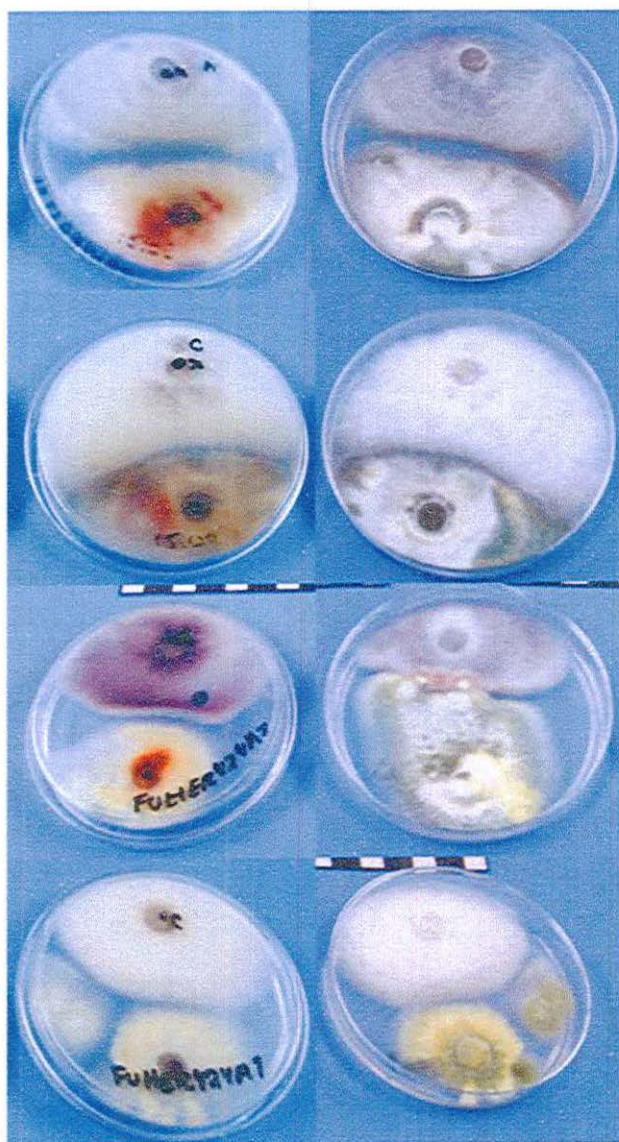


Figura 8.14
 (Continuación). Características de la evaluación cuantitativa de la actividad antagonica *in vitro*.

I: TRIHER42B2 vs FPA;

J: TRIHER42B2 vs FPC;

K: FUHER424A1 vs FPA y

L: FUHER424A1 vs FPC.

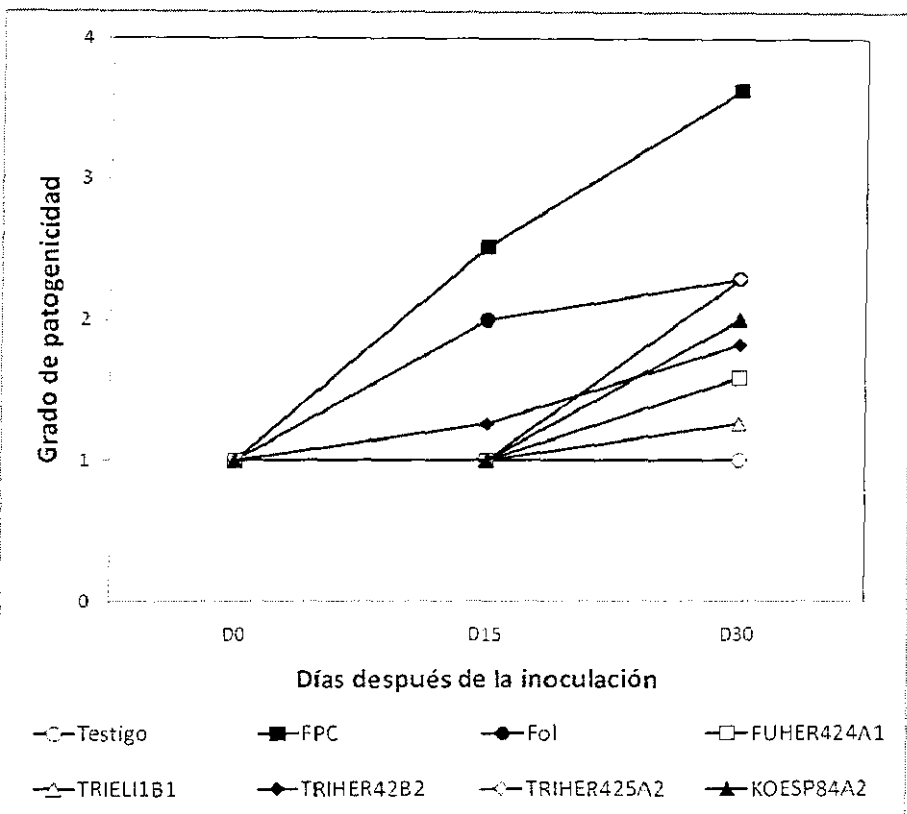


Figura 8.15. Evolución del grado de patogenicidad *in vitro* de los aislamientos seleccionados. Aislamientos seleccionados en plantas de *Agave tequilana* cultivadas *in vitro* al día cero (D0), día 15 (D15) y día 30 (D30), de acuerdo a la escala arbitraria de 1 a 5. (0): Testigo negativo, medio de cultivo sin hongo; (FPC): Cepa patogénica de referencia C; (Fol): Testigo negativo, *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, cepa patogénica no hospedera de agave; FUHER424A1, KOESP84A2, TRIELI1B1, TRIHER42B2, TRIHER425A2: aislamientos seleccionados. Se evaluó una n=4, los cuales fueron calculados a partir de un análisis no paramétrico Kruskal-Wallis con $P \leq 0.05$.

TESTIGO



D0

D15

D30

A

Figura 8.16. Prueba de patogenicidad *in vitro* de los aislamientos seleccionados.

Inoculación de *Fusarium oxysporum* en plantas de *Agave tequilana* cultivadas *in vitro* al día cero (D0), día 15 (D15) y día 30 (D30), de acuerdo a la escala arbitraria de 1 a 5. (A, TESTIGO):

Testigo negativo, medio de cultivo sin hongo; (B, FPC): Testigo positivo, cepa patogénica de referencia (C, Fol):

Testigo negativo, *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, cepa patogénica no hospedera de agave; Aislamientos seleccionados:

D: FUHER424A1;

E: KOESP84A2;

F: TRIEL1B1;

G: TRIHER42B2 y

H: TRIHER425A2.

FPC



D0

D15

D30

B

FOL



D0

D15

D30

C

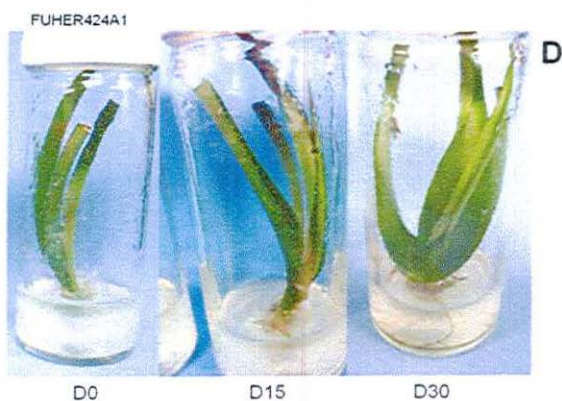
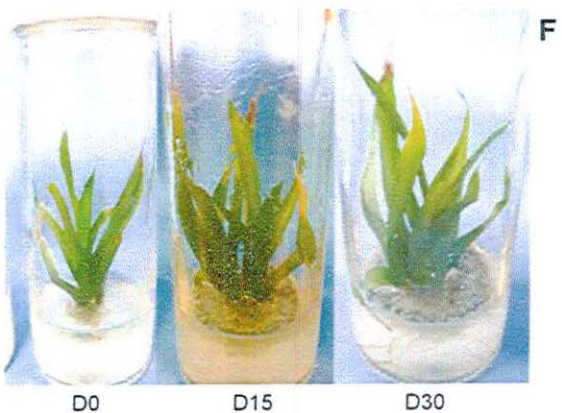
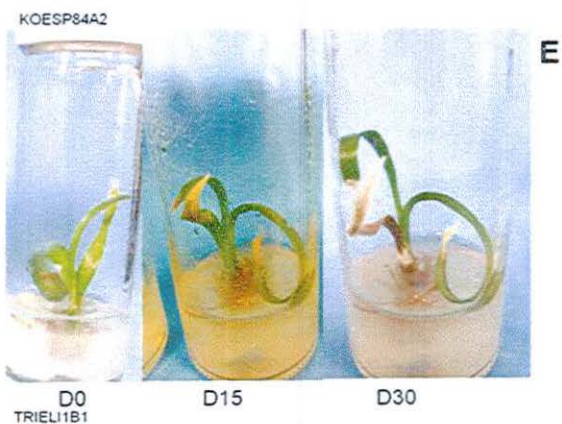
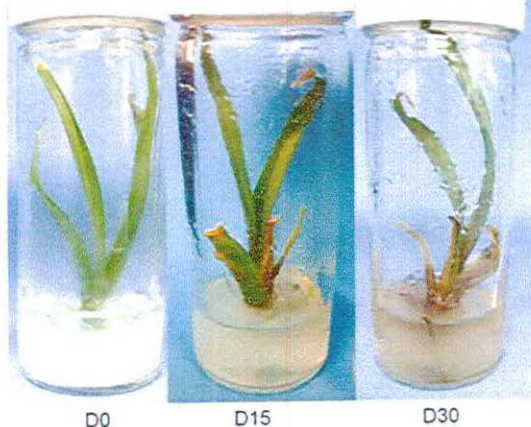


Figura 8.16.
 (Continuación) Prueba de
 patogenicidad *in vitro* de
 los aislamientos
 seleccionados.
 D: FUHER424A1;
 E: KOESP84A2;
 F: TRIEL1B1;



TRiHER42B2



D0

D15

D30

G Figura 8.16.
(Continuación) Prueba de
patogenicidad *in vitro* de
los aislamientos
seleccionados.
G: TRIHER42B2 y
H: TRIHER425A2.

TRiHER425A2



D0

D15

D30

H

8.4.2 Patogenicidad *in planta*

Se evaluó el grado de patogenicidad de cada aislamiento fúngico seleccionado en plántulas cultivadas y mantenidas en invernadero bajo condiciones controladas. Como testigo negativo se utilizaron medio SAA inoculado con agua estéril (0) y sustrato infestado de *Fol*, como testigo positivo se utilizó la cepa patogénica de referencia FPC de acuerdo a la descripción del apartado 7.5.2.2. Se tomaron datos representativos a los días 0, 15, 30 y 60, al observarse que en éstos se presentan los mayores contrastes en los síntomas de acuerdo a la escala de patogenicidad propuesta, considerado como el final del experimento el día 60 después de la inoculación. De nueva cuenta, se obtuvo una diferencia significativa con respecto al testigo (0) de TRIHER425A2, además de alcanzar el valor presentado por FPC. Por otro lado, KOESP84A2 no presentó una diferencia estadísticamente significativa pero sí una tendencia considerable en el incremento del grado de patogenicidad, en comparación con el testigo. Por el contrario, FUHER424A1 no presentó ningún síntoma de enfermedad en las plantas manteniendo las plántulas en condiciones consideradas como óptimas (Figura.8.17). El aislamiento TRIHER25A2, presentó síntomas evidentes desde el día 15 (Figura.8.18.H), como un cambio de coloración en las hojas (“amarillamiento”) y un plegado en la parte media de las hojas o encarrujamiento, mientras que al día 60 estas hojas se comenzaron a secar iniciando por la punta y con micelio sobre su superficie, también se observó que al menos una hoja completa se marchita completamente con necrosis. En el caso de KOESP84A2 (Figura.8.18.E), en el día 15 se observó una mancha necrótica con un halo clorótico en una hoja, además de la presencia de clorosis en los bordes foliares, mientras que al día 60 presentó una mayor clorosis en los bordes foliares y aumentó la presencia de manchas cloróticas aunque de menor tamaño. Por su parte, el aislamiento TRIHER42B2 (Figura.8.18.G) presenta un ligero encarrujamiento y al menos una hoja pequeña completa de la base de la planta con necrosis, además de que algunas plántulas presentan pequeñas manchas necróticas. En contraste, FUHER424A1 y TRIELI1B1 que no presentaron hojas con síntomas, solo un ligero encarrujamiento en alguna hoja (Figura.8.18.D.F).

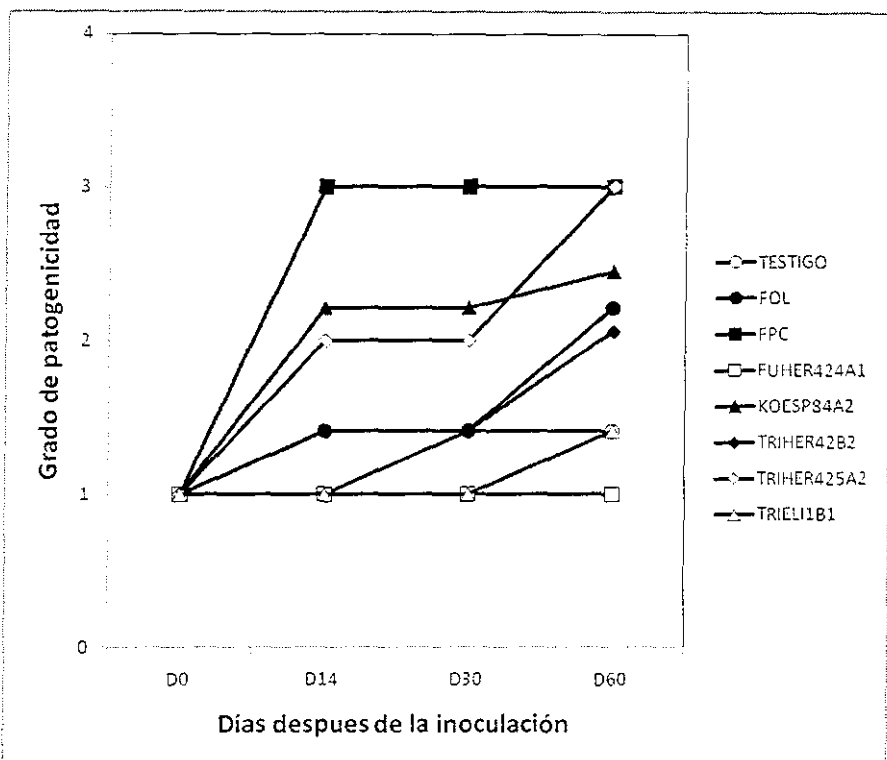


Figura 8.17. Evolución del grado de patogenicidad *in planta* de los aislamientos seleccionados. Plantas inoculadas con *Fusarium oxysporum* en plantas de *Agave tequilana* cultivadas en invernadero al día cero (D0), día 15 (D15), día 30 (D30) y día 60 (D60), de acuerdo a la escala arbitraria de 1 a 5. (TESTIGO): Testigo negativo, medio de cultivo sin hongo; (FPC): Cepa patogénica de referencia C; (FOL): Testigo negativo, *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, cepa patogénica no hospedera de agave; (FUHER424A1, KOESP84A2, TRIEL1B1, TRIER42B2, TRIER425A2): aislamientos seleccionados. Se evaluó una n=4, los cuales fueron calculados a partir de un análisis no paramétrico Kruskal-Wallis con $P \leq 0.05$.

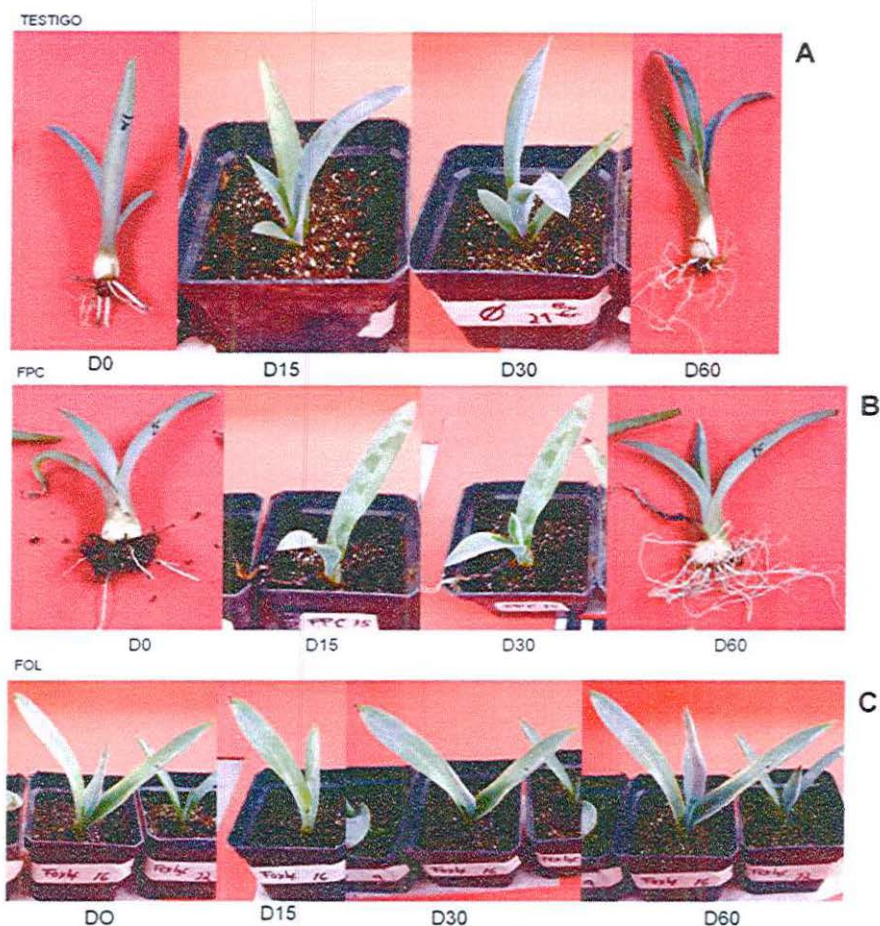


Figura 8.18. Prueba de patogenicidad *in planta* de los aislamientos seleccionados. Plantas inoculadas con los aislamientos fúngicos seleccionados en plantas de *Agave tequilana* cultivadas en invernadero al día cero (D0), día 15 (D15), día 30 (D30) y día 60 (D60), de a cuerdo a la escala arbitraria de 1 a 5, se utilizó como inoculo sustrato infestado. (A, TESTIGO): Testigo negativo, sustrato estéril; (B, FPC): Cepa patogénica C inoculada en sustrato infestado; (C, FOL): Testigo negativo, *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, cepa patogénica no hospedera de agave; aislamientos fúngicos seleccionados (D): FUHER424A1; (E): KOESP84A2; (F): TRIEL1B1; (G): TRIHER42B2 y (H): TRIHER425A2.

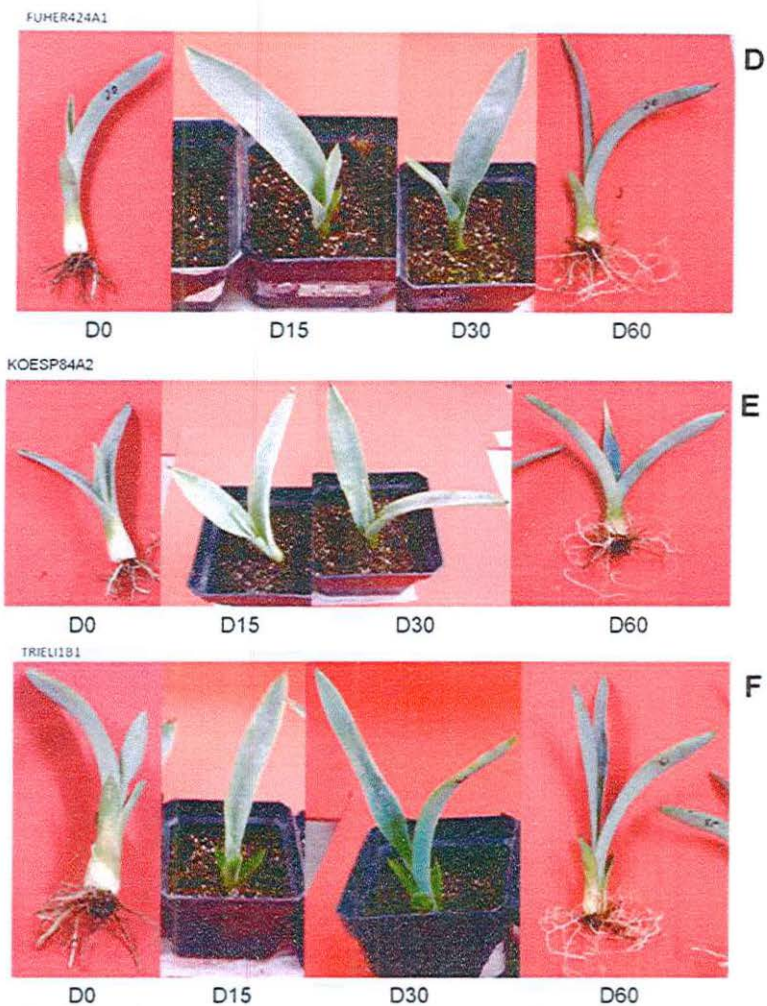


Figura 8.18 (Continuación). Prueba de patogenicidad *in planta* de los aislamientos seleccionados. (D): FUHER424A1; (E): KOESP84A2; (F): TRIEL11B1.

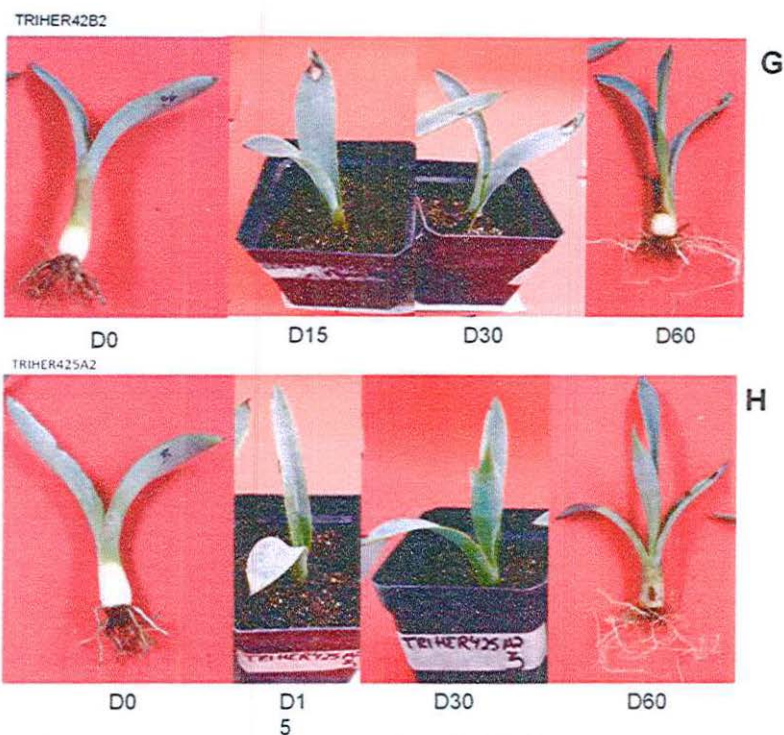


Figura 8.18 (Continuación). Prueba de patogenicidad *in planta* de los aislamientos seleccionados. (G): TRIHER42B2; (H): TRIHER425A2.

8.5 EVALUACIÓN DEL POTENCIAL COMO AGENTES DE CONTROL BIOLÓGICO Y BIOFERTILIZANTES DE LOS AISLAMIENTOS FÚNGICOS.

8.5.1 Evaluación de actividad antagónica *in planta*

A los cinco aislamientos fúngicos se les evaluó su actividad antagónica en planta, para conocer su potencial como agente de control biológico contra la marchitez del agave tequilero asociado a *Fusarium* sp. Para esto, se utilizaron plántulas de *A. tequilana* aclimatadas en invernadero obtenidos a partir de cultivos *in vitro*. Estas plántulas fueron inoculadas con cada uno de los aislamientos fúngicos y mantenidas en contacto con los aislamientos durante 15 d. Posteriormente, el sustrato fue retirado y trasplantado en sustrato infestado con la cepa patogénica

de referencia (FPC), y dejado en contacto durante 75 d bajo condiciones controladas. Como testigos negativos se utilizaron plántulas mantenidas en sustrato al cual se le agregó agua estéril y sustrato infestado con FoI (no-hospedero para el agave tequilero), como testigo positivo sustrato infestado con FPC sin previa inoculación de algún aislado fúngico. Se determinó el grado de patogenicidad de acuerdo a la escala arbitraria previamente descrita, se tomaron datos cada 15 d durante 75 d, cabe señalar que los días 15, 30 y 60 se consideraron determinantes para observar los cambios más evidentes. Los resultados mostraron que de los cinco aislamientos, FUHER424A1 presentó un grado de protección contra FPC, equivalente al testigo sin inocular (**Figura.8.19**), solo se observaron como síntoma un ligero encarrujamiento en la parte media de las hojas (**Figura.8.20.D**). Por otro lado, los cuatro aislamientos restantes no presentaron un grado de protección contra la cepa patogénica, al presentar un grado de patogenicidad equivalente a FPC. Destacó TRIHER42B2, en donde se observó que el grado de patogenicidad, fue incluso mayor al observado en FPC, lo que puede considerarse como un efecto coadyuvante para la patogenicidad de FPC (**Figura.8.20.G**). Los tres aislamientos (KOESP84A2, TRIHER42B2 y TRIHER425A2) presentaron al menos una hoja con síntomas, iniciando el marchitamiento en las puntas y con micelio sobre las hojas muertas, además se observó un ligero encarrujamiento en las puntas de estas hojas (**Figura.8.20.E.G.H**), un síntoma adicional en TRIHER425A2 fue la presencia de un cambio en la coloración de la plántula (**Figura.8.20.H**). Los síntomas iniciales pudieron observarse a partir del día 15 después de la inoculación con FPC, en prácticamente todos los tratamientos, aunque se vuelven más evidentes al día 60.

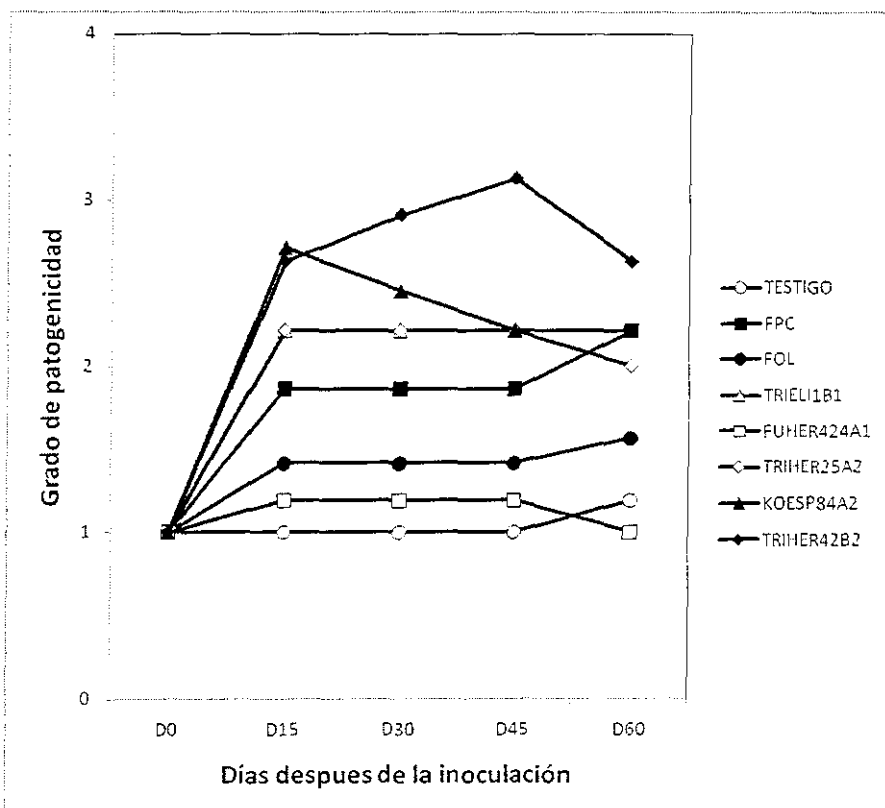


Figura 8.19. Evolución de la actividad antagonista *in planta* de los aislamientos seleccionados. Protección de los aislamientos contra la cepa patogénica de referencia FPC en plántulas de *Agave tequilana* cultivadas en invernadero al día cero (D0), día 15 (D15), día 30 (D30) y día 60 (D60), de acuerdo a la escala arbitraria de 1 a 5. (TESTIGO): Testigo negativo, sustrato estéril; (FPC): Cepa patogénica de referencia C; (FOL): Testigo negativo, *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, cepa patogénica no hospedera de agave; (FUHER424A1, KOESP84A2, TRIEL1B1, TRIHER42B2, TRIHER425A2): aislamientos seleccionados. Se evaluó una n=4, los cuales fueron calculados a partir de un análisis no paramétrico Kruskal-Wallis con $P \leq 0.05$.

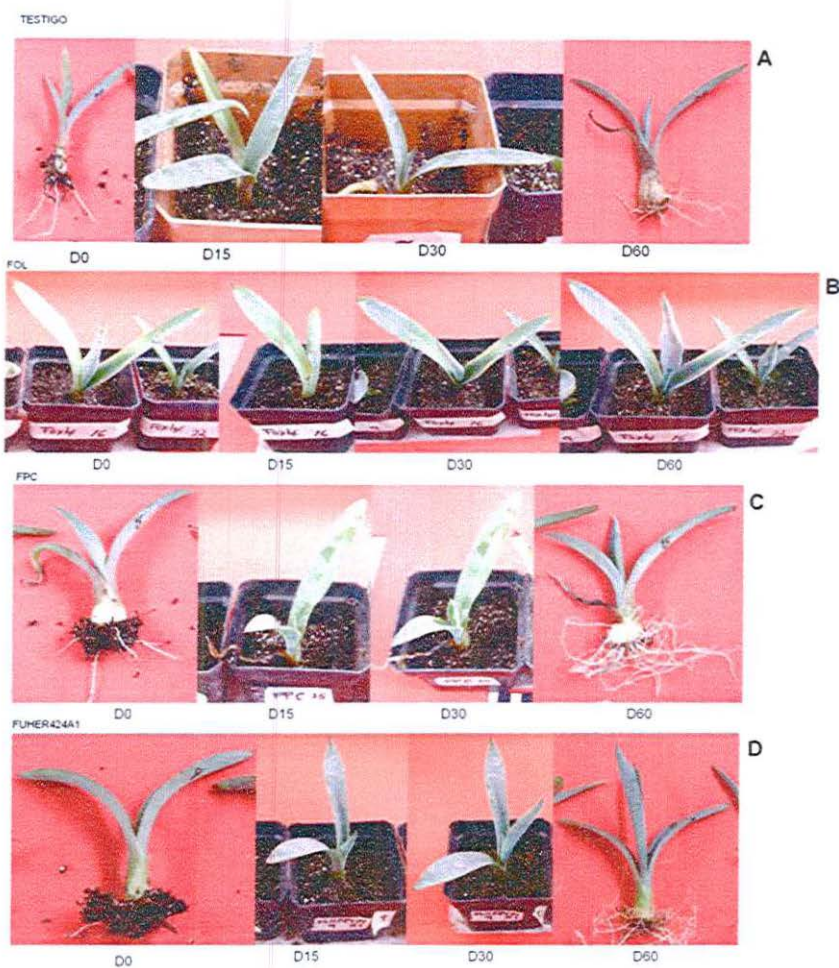


Figura 8.20. Prueba de actividad antagonística *in planta* de los aislamientos seleccionados. Plantulas de *Agave tequilana* cultivadas en invernadero previamente inoculadas con los aislamientos fúngicos seleccionados y confrontadas con la cepa patogénica de referencia al día cero (D0), día 15 (D15), día 30 (D30) y día 60 (D60), de acuerdo a la escala arbitraria de 1 a 5. (A, TESTIGO): Testigo negativo, sustrato estéril; (B, FPC): Cepa patogénica C inoculada en sustrato infestado; (C, FOL): Testigo negativo, *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, cepa patogénica no hospedera de agave; aislamientos fúngicos seleccionados (D): FUHER424A1; (E): KOESP84A2; (F): TRIELI1B1; (G): TRIHER42B2 y (H): TRIHER425A2.

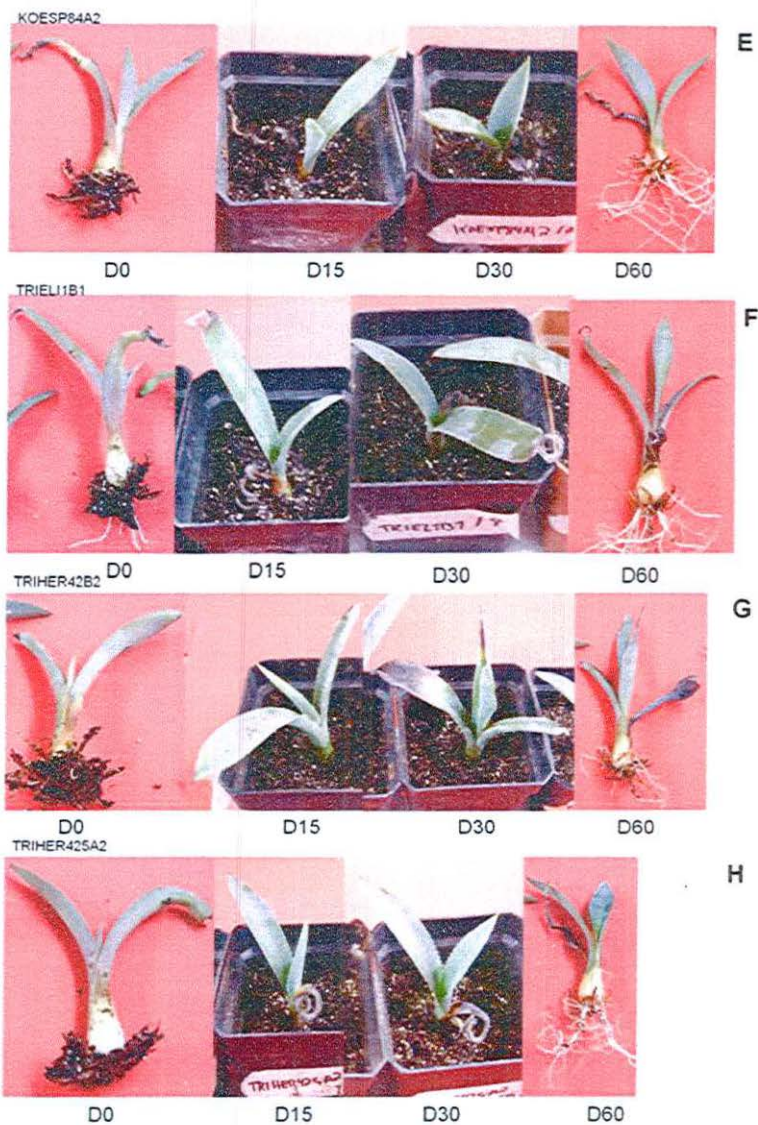


Figura 8.20. (Continuación) Prueba de actividad antagonística *in planta* de los aislamientos seleccionados. (E): KOESP84A2; (F): TRIEL1B1; (G): TRIHER42B2; (H): TRIHER425A2.

En lo que respecta a los cambios en los parámetros anatómicos evaluados, los resultados mostraron que en el número de hojas y raíces, longitud de la raíz mayor no presentaron una diferencia estadísticamente significativa con respecto a los testigos. Sin embargo, en la altura de la planta FUHER424A1 si presentó un incremento significativo estadísticamente, mientras que KOESP84A4 y TRIHER42B2, presentaron una disminución de su altura atribuible a los síntomas presentes en estas plántulas (**Cuadro 8.3**). En lo que respecta al número de hojas con síntomas, TRIHER425A2 obtuvo una diferencia estadísticamente significativa con respecto al testigo (0). En la longitud de raíz, KOESP84A4 y TRIELI1B1 presentaron una diferencia estadísticamente significativa. Por otra parte, TRIHER425A2, FUHER424A1, TRIHER42B2 y FPC en el número de raíces con síntomas presentaron una diferencia estadísticamente significativa con respecto al testigo (**Cuadro 8.3**). Finalmente, FUHER424A1 fue el tratamiento que se mantuvo en el rango equivalente al testigo negativo (0). A partir de estos resultados, se observó que los parámetros anatómicos que presentaron diferencias significativas y que podrían ser de interés para futuras evaluaciones serían el número de raíces y hojas infectadas.

Cuadro 8.3. Parámetros anatómicos evaluados en la prueba de antagonismo *in planta* de los aislamientos fúngicos seleccionados.

TRATAMIENTO	ALTURA PLANTA	No HOJAS	No HOJAS CON SINTOMAS	LARGO RAIZ	RAIZ DE MAYOR LONGITUD	No RAICES	No RAICES CON SINTOMAS
TESTIGO	1.22 ab	1.00 a	0 ab	2.71 b	10.89 a	18.56 a	1.25 a
FPC	0.50 ab	1.00 a	1.00 b	0.50 a	5.01 a	27.25 a	10.13 b
FUHER424A1	2.53 b	0.50 a	0 a	0.50 a	14.93 a	26.26 a	7.87 b
KOESP84A2	-1.38 a	1.00 a	1.00 b	0.38 ab	12.86 a	24.37 a	7.88 b
TRIELI1B1	0.50 ab	1.00 a	1.19 b	0.50 a	14.04 a	25.35 a	6.40 ab
TRIHER42B2	1.38 ab	0.75 a	2.45 c	0.25 ab	6.00 a	27.25 a	12.13 b
TRIHER425A2	-1.50 ab	0.50 a	1.00 b	0.50 a	11.01 a	22.61 a	9.08 b

(TESTIGO): Testigo negativo, sustrato estéril; (FPC): Cepa patogénica de referencia C; (FoI): Testigo negativo, *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, cepa patogénica no hospedera de agave; (FUHER424A1, KOESP84A2, TRIELI1B1, TRIHER42B2, TRIHER425A2): Aislamientos seleccionados. Se evaluó una n=4, donde las letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas, según la prueba de Tukey con $P \leq 0.05$.

8.5.2 Actividad benéfica en planta

De manera paralela a la evaluación de antagonismo en planta, se realizó la evaluación de la actividad benéfica de los cinco aislamientos fúngicos para obtener su potencial como biofertilizante. Para esto, se evaluaron diferentes parámetros anatómicos y fisiológicos de las plántulas de *A. tequilana* inoculadas con cada aislamiento y como testigo se utilizaron plántulas inoculadas con agua estéril. Se realizaron inspecciones visuales del grado de patogenicidad cada 15 d por 60 d. Al inicio (D0) y al final (D60) del experimento se tomaron las medidas de los parámetros anatómicos (crecimiento de la raíz, ramificaciones de la raíz, crecimiento vegetativo y densidad estomática) y los parámetros fisiológicos se evaluaron al día 60 de acuerdo a Barragán-Barragán (2001).

Sin embargo, aun cuando se trato de utilizar plántulas de *A. tequilana* con características anatómicas homogéneas provenientes de cultivo *in vitro*, estas presentaron ligeras diferencias, que no fueron estadísticamente significativas, en los parámetros como el número de hojas, raíces y altura de la planta, por este fin se tomaron estas variables para cada planta al día 0 (D0). A partir de estos datos fue posible obtener los porcentajes de aumento tanto de crecimiento, número de raíces, longitud de la raíz, etc. (**Cuadro 8.4**). Para esto se utilizó la siguiente formula según correspondió:

$$\%Cr = (CD60 - CD0) \times 100 / C60$$

%Cr: Porcentaje de crecimiento del parámetro anatómico.

CD0: Promedio del valor inicial del parámetro anatómico en el día cero (D0).

CD60: Promedio del valor final del parámetro anatómico en el día 60 (D60).

8.5.2.1 Variables anatómicas evaluadas

8.5.2.1.1 Crecimiento de la raíz

Se evaluó el crecimiento de la raíz, se tomaron datos del crecimiento promedio de la raíz, así como la raíz con mayor longitud. Los resultados se muestran en el **Cuadro 8.5**. Se observó que el crecimiento promedio de raíz fue menor con

respecto al testigo en tres de los aislamientos (FUHER424A1, TRIHER42B2 Y TRIHER425A2), mientras que TRIEL1B presentó un ligero aumento con respecto al testigo, destacando KOESP84A2 con 3.1 cm, aunque no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$). En cuanto al crecimiento de la raíz con mayor longitud, destaca TRIEL1B1 que presentó un aumento con respecto al testigo, en contraste a los otros cuatro aislamientos, que presentaron una disminución con respecto al testigo. En contraste, FUHER424A1 no presentó una raíz con longitud sobresaliente como en los otros aislamientos o el testigo (**Cuadro 8.5**).

8.5.2.1.2 Ramificaciones de la raíz

Para la evaluación de las ramificaciones de la raíz se contó el número de raíces de cada plántula como se muestra en el **Cuadro 8.4**. En el número de raíces no se encontró una diferencia estadísticamente significativa, pero si hubo un ligero incremento con respecto al testigo en los cuatro aislamientos que va de 3.5 a 8.75 raíces. Por otra parte, se contó el número de raíces que presentaron síntomas de infección o colonización, observada como un oscurecimiento, pudrición o marchitamiento de la raíz. De todos los aislamientos, destacó de manera importante KOESP84A2 al presentar una diferencia significativa con respecto al testigo, aunque todos los aislamientos presentaron un incremento en el número de raíces con síntomas que va de 2.4 a 6.8 raíces (**Cuadro.8.5**).

8.5.2.1.3 Crecimiento vegetativo

Para la evaluación del crecimiento vegetativo de las plántulas después de la inoculación con cada uno de los aislamientos evaluados, se midió la altura de la plántula, longitud y ancho de las hojas. La altura de las plántulas se midió de la base de la planta hasta la punta de la hoja más larga, se encontró un incremento estadísticamente significativo con respecto al testigo en FUHER424A1, TRIEL1B1 y TRIHER425A2, mientras que los 2 aislamientos restantes KOESP84A2 y TRIHER42B2 presentaron una disminución en el crecimiento vegetal ($P \leq 0.05$). En la medición del largo de hoja se tomó en cuenta la hoja mas larga midiendo desde

la base hasta la punta, siendo TRIHER425A2 la que presentó una diferencia estadísticamente significativa, mientras que para el ancho de hoja KOESP84A2 fue la que sobresalió significativamente. En lo que respecta al número de hojas no se presentaron diferencias significativas con respecto al testigo. Finalmente, para el número de hojas con síntomas no se presentó una diferencia estadística, pero si se observó una tendencia en el incremento con respecto al testigo de TRIHER425A2 (**Cuadro 8.5**).

8.5.2.1.4 Densidad estomática

La variación de la densidad estomática se obtuvo mediante un conteo del número de estomas de la parte axial de las hojas que no presentaban ningún síntoma de enfermedad o de hojas que tuvieran menos daño, el día final del experimento. Las mediciones mostraron que FUHER424A, KOESP84A2 y TRIHER42B2 presentaron un incremento significativo con respecto al testigo del 303, 190 y 110% respectivamente (**Cuadro 8.5**). Los aislamientos restantes no mostraron un incremento estadísticamente significativo manteniéndose dentro del rango del promedio del testigo.

8.5.2.2 Variables fisiológicas evaluadas

8.5.2.2.1 Evaluación de la actividad fotosintética

Para determinar de manera indirecta la actividad fotosintética se determinó el contenido de clorofila total, así como de clorofila a y b. En los **Cuadros 8.6** y **8.7**, se muestran los niveles del contenido de clorofila total, clorofila "a" y clorofila "b" en las plantas de *A. tequilana* inoculadas con cada uno de los aislamientos seleccionados. Se observó que FUHER424A1 presentó un incremento estadísticamente significativo con respecto al testigo en el contenido de clorofila total de 7.55 µg/mL, en clorofila "a" de 3.08 µg/mL y clorofila "b" 4.5 µg/mL. El otro aislamiento que presentó un incremento aunque no fue estadísticamente significativo con respecto al testigo fue TRIEL11B1 aunque solo fue en el contenido de clorofila total y clorofila "b".

8.5.2.2.2 Evaluación de la eficiencia fotosintética

Para la evaluación de la eficiencia fotosintética se determinó el cambio del pH, porcentaje de ácido málico y acidez nocturna, parámetros relacionados con la eficiencia fotosintética, al día 60 después de la inoculación del aislamiento. A cada plántula inoculada se tomó el pH diurno y nocturno, el cual no presentó diferencias estadísticamente significativas con respecto al testigo pero si se observó una tendencia a disminuir su pH (**Cuadro 8.6 y 8.7**).

En lo que respecta al porcentaje de ácido málico, se observó que las plántulas inoculadas presentaron un incremento significativo con respecto al testigo, destacando de manera importante KOESP84A2 y TRIHER42B2 con un incremento mayor a 20 veces los valores del testigo, mientras que FUHER424A1, TRIELI1B1 y TRIHER425A2 presentaron un incremento del 200, 300 y 100% respectivamente en comparación al testigo (**Cuadro 8.6 y 8.7**).

Finalmente con respecto a la acidez nocturna, se observó un incremento importante de los niveles con respecto al testigo, destacando KOESP84A2 y TRIHER42B2 con respecto a lo encontrado en el testigo y a los otros aislamientos, mientras que FUHER424A1, TRIELI1B1 y TRIHER425A2 no presentaron un incremento estadísticamente significativo con respecto al testigo (**Cuadro 8.6 y 8.7**)

8.5.2.2.3 Evaluación de la acumulación de azúcares

En el **Cuadro 8.6 y 8.7** se muestran los valores obtenidos de la evaluación de azúcares directos de los cinco aislamientos y el testigo, después de 60 días de la inoculación. Se observó que no se presentó un incremento estadísticamente significativo, aunque si se encontró una tendencia positiva en cuanto al incremento en el contenido de azúcares con respecto al testigo aproximadamente del 30% para TRIHER425A2.

8.6 CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA DE LA COLONIZACIÓN DE FUHER424A1

A partir de las muestras de raíz obtenidas de las plántulas de *A. tequilana* inoculadas con los aislamientos, previamente almacenadas en la solución fijadora (FAA), se tomaron fragmentos de la raíz de su parte cercana a la base y de la parte media. Se realizaron cortes en el criótomo y se observaron al microscopio óptico y de fluorescencia. Las raíces observadas fueron de FUHER424A1 que presentó un efecto como control biológico contra *F. oxysporum*. La observación al microscopio se realizó con la tinción de azul de tripano identificando la presencia de micelio y esporas de la cepa fúngica que se encontraran dentro o fuera de la raíz, posteriormente se observó con la fluorescencia (Uvitex 2B) y se comprobó su presencia. En el caso de FUHER424A1 se encontró micelio sobre la superficie de la raíz y dentro en el haz vascular, así como esporas (Figura 8.21).

Cuadro 8.4. Evaluación de la actividad benéfica de los aislamientos fúngicos seleccionados. Parámetros anatómicos.

VARIABLES	TRATAMIENTO					
	TESTIGO	FUHER424A1	KOESP84A2	TRIH42B2	TRIH25A2	TRIEL1B1
ALTURA DE LA PLANTA	2.50 a	4.38 ab	2.13 ab	2 ab	4.50 b	4.13 b
# DE HOJAS	1.25 ab	0.75 a	0.75 ab	1.50 ab	1.25 ab	1.25 b
# DE HOJAS INFECTADAS	0.25 a	0.00 a	0.50 a	0.50 a	1.00 a	0.50 a
LARGO DE HOJA	13.18 a	18.31 ab	16.38 ab	19.12 ab	20.84 b	20.14 ab
ANCHO DE HOJA	2.74 a	3.05 a	3.19 a	2.76 a	2.74 a	3.08 a
LONGITUD DE RAÍZ	5.68 a	5.49 a	8.55 a	4.70 a	5.36 a	6.92 a
RAÍZ CON MAYOR LONGITUD	15.50 b	3.00 a	14.34 ab	12.82 ab	14.25 ab	18.80 b
# DE RAICES	3.50 a	8.25 a	11.75 a	9.75 a	7.00 a	12.25 a
# DE RAICES CON SINTOMAS	0.00 a	2.45 ab	6.82 b	5.69 ab	3.46 ab	5.03 ab
# DE ESTOMAS AXIALES	16.93 a	73.28 c	51.16 b	37.80 ab	17.44 a	22.29 a

(TESTIGO): Testigo negativo, sustrato estéril; (FUHER424A1, KOESP84A2, TRIEL1B1, TRIH42B2, TRIH25A2): Aislamientos seleccionados. Para la evaluación de los parámetros anatómicos se tomó una n=4; las letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas, según la prueba de Tukey con $P \leq 0.05$.

Cuadro 8.5. Porcentaje diferencial de los parámetros anatómicos inducidos por los aislamientos fungicos seleccionados con respecto al testigo.

TRATAMIENTO	Crecimiento longitudinal (%)	Aumento foliar (%)	Aumento del # de raíces (%)	Raíces con síntomas (%)	Hojas con síntomas (%)	Aumento en la longitud de la raíz (%)	Aumento estomático (%)
FUHER42A1	7.75	-7.50	13.07	10.74	-6.25	12.50	303.74
KOESP84A2	-2.79	-8.75	19.53	22.88	5.00	104.17	190.55
TRIELI1B1	3.82	-4.94	24.83	17.78	2.32	33.33	26.53
TRIPHER42B2	-4.28	5.42	15.52	18.77	3.75	-37.50	110.75
TRIPHER425A2	6.53	1.25	10.44	13.92	16.25	-12.50	-1.56

Cuadro 8.6. Evaluación de la actividad benéfica de los aislamientos fungicos seleccionados. Parámetros fisiológicos.

VARIABLES	TRATAMIENTO						
	TESTIGO	FUHER424A1	KOESP84A2	TRIPHER42B2	TRIPHER425A2	TRIELI1B1	
CLOROFILA ($\mu\text{g/g}^{-1}$ PF)	A	6.21 ab	9.29 b	4.14 a	3.49 a	3.52 a	5.32 ab
	B	3.81 ab	8.31 b	2.27 a	2.25 a	2.88 ab	5.21 ab
	Total	9.99 ab	17.54 b	6.39 a	5.67 a	6.38 a	10.5 ab
pH		5.70 a	5.20 a	5.40 a	5.40 a	5.20 a	5.10 a
% ÁCIDO MÁLICO	NOCHE	0.069 a	0.047 a	0.056 a	0.059 a	0.075 a	0.079 a
	DIA	0.064 a	0.0548 a	0.0774 a	0.0918 a	0.078 a	0.0801 a
ACIDEZ NOCTURNA ($\mu\text{moles/cm}^2$)	NOCHE	0.0027 ab	0.002 ab	0.0017 a	0.0019 a	0.0026 ab	0.0031 b
	DIA	0.0028 ab	0.0023 a	0.0039 ab	0.0042 b	0.0028 ab	0.0035 b
CONCENTRACIÓN DE AZUCARES		1.380 a	1.370 a	1.49 a	1.12 a	1.80 a	1.21 a

(TESTIGO): Testigo negativo, sustrato estéril; (FUHER424A1, KOESP84A2, TRIELI1B1, TRIPHER42B2, TRIPHER425A2): Aislamientos seleccionados. En las pruebas del contenido de clorofila, de pH, en porcentaje de ácido málico y acidez nocturna se evaluó una n=4 y en la concentración de azúcares n=3. Las letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas, según la prueba de Tukey con $P \leq 0.05$.

Cuadro 8.7. Porcentaje diferencial de los parámetros fisiológicos inducidos por los aislamientos fungicos seleccionados con respecto al testigo.

VARIABLES (%)		TRATAMIENTO				
		FUHER424A1	KOESP84A2	TRIPHER42B2	TRIPHER25A2	TRIELI 1B1
DIFERENCIA EN LA	A	49.60	-33.33	-43.80	-43.32	-14.33
CONCENTRACIÓN	B	118.11	-40.42	-40.94	-24.41	36.75
DE LA CLOROFILA	Total	75.58	-36.04	-43.24	-36.14	5.11
DIFERENCIA DE pH		-8.77	-5.26	-5.26	-8.77	-10.53
DIFERENCIA EN EL	NOCHE	-31.88	-18.84	-14.49	8.70	14.49
% ÁCIDO MÁLICO	DÍA	-15.30	19.63	41.89	20.56	23.80
DIFERENCIA DE LA	NOCHE	-25.93	-37.04	-29.63	-3.70	14.81
ACIDEZ NOCTURNA	DIA	-17.86	39.29	50.00	0.00	25.00
DIFERENCIA EN LA						
CONCENTRACIÓN DE AZUCARES		-0.72	7.97	-18.84	30.43	-12.32

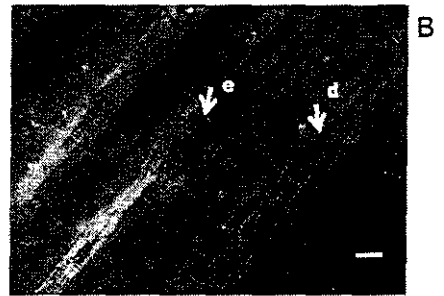
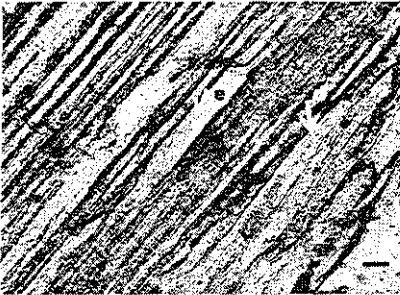
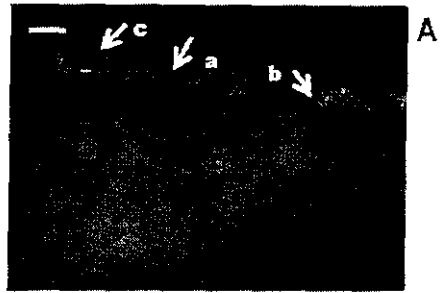
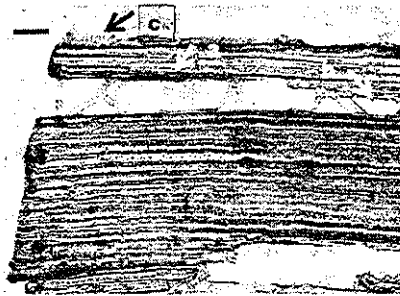


Figura 8.21. Caracterización histológica de la colonización de raíces de *A. tequilana* por FUHER424A1. Cortes histológicos de la raíz de plántulas de *A. tequilana*, a la izquierda se presenta el tejido teñido con azul de y a la derecha el tejido con la tinción con Uvitex 2B (epifluorescencia). La barra equivale a 50 μm . **A y B:** raíz inoculada con el aislamiento FUER424A1 (**a**, **b**, **e** y **d**: micelio dentro del tejido de la raíz y **c**: micelio en la superficie de la raíz).

9. DISCUSIÓN

9.1 Caracterización de las cepas patogénicas de *Fusarium*

La marchitez del agave tequilero es una de las principales enfermedades que afectan al agave azul, aunque puede estar relacionada con diferentes factores como pueden ser deficiencias nutrimentales, condiciones climáticas como la sequía y el uso de herbicidas, se le atribuye principalmente a los hongos fitopatógenos como *Fusarium* sp. y *F. oxysporum*. Este problema, sin embargo, fue hasta el reporte de Ávila-Miranda *et al.*, (2010) donde fue posible comprobar y desarrollar pruebas de patogenicidad que evidencien a nivel experimental la relación entre *F. oxysporum* y la marchitez del agave tequilero. Aunado a esto, los criterios principales para validar que un aislamiento de *Fusarium* sp. o *F. oxysporum* sea el agente causal de la marchitez del agave tequilero, es que haya sido aislado de plantas con síntomas avanzados de la enfermedad, y evaluar la patogenicidad con pruebas rápidas convencionales, las cuales han sido adaptadas de otras especies vegetales con características muy diferentes al agave tequilero, por ejemplo pruebas de patogenicidad en hojas (Loera-Quezada, 2000), o agregando una suspensión de esporas sobre la parte aérea de cultivos *in vitro* aun cuando su sitio de ingreso del patógeno es por la raíz (Soltero-Quintana, 2002). Por este motivo, en este trabajo un paso inicial fue la caracterización de la patogenicidad de dos aislamientos de *Fusarium oxysporum*, que previamente habían sido aislados de plantas de agave con síntomas avanzados de marchitez en zonas de cultivo dentro de la DOT. La caracterización de las dos cepas de *Fusarium* asociadas a la marchitez, sirvió además para obtener aquella cepa que presentaran síntomas de marchitez con mayor uniformidad y virulencia en las plántulas de *A. tequilana*, para su uso como cepa patogénica de referencia.

Como primer paso para la evaluación de la patogenicidad, se desarrollo un ensayo utilizando plántulas de agave cultivadas *in vitro*, se considero como principal prioridad, que la inoculación fuera realizada por la raíz, establecida como el sitio de penetración de *F. oxysporum* (Inoue *et al.*, 2002; Bolwerk *et al.*, 2005). La

inoculación se realizó sobre las raíces de las plántulas cuidando de no tocar las hojas, permitiendo que el contacto de las esporas con la planta fuera solo por las raíces y que este fuera el primer sitio de infección, además se observó que si alguna hoja estaba en contacto con el inoculo esta era colonizada por el hongo y causaba los síntomas de marchitez. Sin embargo esto no está correlacionado con la patogenicidad en las plantas de *A. tequilana* con la marchitez causada por *F. oxysporum* (Loera-Quezada, 2000), al se este un sitio que de manera natural no sucede en campo. Uno de los problemas que se presentaron durante el desarrollo de esta prueba, fue la inadecuada homogenización de la suspensión de esporas en el agente gelificante utilizado (agar 8 g/L) observada como una falta de uniformidad en el desarrollo de los síntomas, por lo que se optó por utilizar otro agente (Gel Rite). No obstante, al utilizar Gel Rite, aun cuando los síntomas fueron uniformes y se presentaron a un tiempo menor, se observó un crecimiento importante de micelio sobre el medio de cultivo y sobre la superficie foliar de las plántulas, acelerando el proceso de infección, por lo que el hongo utilizó este agente gelificante como fuente de carbono o nutrimentos. Por este motivo, se optó por utilizar de nueva cuenta al agar como agente gelificante, que disminuye de manera importante su concentración (5 g/L) lo que se reflejó en una mejor uniformidad de la evolución de los síntomas, sin el crecimiento importante de micelio sobre el medio de cultivo. A partir de estas modificaciones se logró obtener una prueba de patogenicidad *in vitro*, reproducible, uniforme y con resultados en un tiempo menor comprendido entre 15 y 30 d.

Por otra parte, tomando de referente la prueba de patogenicidad *in vitro*, se optó por realizar dos métodos de inoculación en uno se utilizó la suspensión de esporas convencional y otra con sustrato infestado con el hongo a evaluar (sustrato SAA). El método de inoculación con sustrato SAA infestado, aunque implicó más tiempo al tener que ser medida la cantidad de sustrato estéril y sustrato infestado en cada plántula, presentó crecimiento de micelio en la mayor parte e indicó una gran cantidad de clamidosporas y que al estar en contacto directo con la raíz permitió que los síntomas de marchitez en las plántulas fue de manera homogénea y rápida. Un método similar fue el empleado por Ezziyyani *et al.*, (2004), donde

utilizaron una combinación de Agua-Avena-Vermiculita resultando ser rentable por su rápido y abundante crecimiento, viabilidad y bajo costo para la producción de biomasa de *Trichoderma harzianum*; por lo que el método utilizado en este trabajo permitió que el proceso de penetración en las raíces fuera con mayor rapidez y homogeneidad. Por otra parte, la inoculación con la suspensión de esporas aunque presenta menor complejidad al agregar solo el inóculo alrededor de las plántulas los síntomas de marchitez no se presentaron de manera uniforme y expresándose en un tiempo más prolongado que en el inóculo con sustrato, por lo que, se considera que en la suspensión las esporas estas primero tendrían que germinar y después penetrar a la raíz e infectarla. De acuerdo a estos resultados, se utilizó el sustrato SAA infestado en todas las pruebas *in planta*.

Por otro lado, los resultados de la caracterización de cepas patogénicas presentaron que la cepa *F. oxysporum* f.sp. *lycopercisi* (Fol) utilizada como testigo negativo presentó ligeros efectos de la marchitez en las plántulas de *A. tequilana*, aunque no al nivel de las cepas patogénicas evaluadas, lo que plantea nuevas preguntas al respecto de la susceptibilidad que pudiera existir por parte de *A. tequilana* para el género *Fusarium*, algo diferente a lo que se plantea comúnmente ya que *F. oxysporum* presenta un alto nivel de especificidad hacia el hospedero, sobre todo con respecto a formas especiales definidas (Fravel *et al.*, 2002). Sin embargo, en las cepas patogénicas se observaron diferencias en la presencia de los síntomas de la marchitez. En el caso de FPA, inició con necrosis en las puntas de las hojas, el tiempo de infección fue más prolongado que en FPC y una menor homogeneidad del desarrollo de los síntomas en las plántulas. Por el contrario, en FPC los síntomas de marchitez se presentaron en un tiempo más corto y fue más homogéneo en las plántulas, iniciando con necrosis en la base de las plántulas extendiéndose hacia las puntas de las hojas hasta producir necrosis total; tal como reportó Soltero-Quintana (2002) donde el desarrollo de la infección se inicia por la base de las plántulas cultivadas *in vitro* y no por las heridas provocadas en las hojas. En cuanto a los síntomas de las raíces producidas por las dos cepas de *Fusarium* se observó un oscurecimiento y ablandamiento en las raíces principales, tomando como raíces infectadas o colonizadas por el hongo. Debido a estos

resultados la cepa patogénica FPC se consideró como la más virulenta y con síntomas de marchitez homogéneos, que presentaron un crecimiento rápido dentro del sistema vascular por lo que los síntomas iniciaron en la base de las plántulas. En contraste con FPA que presentó un crecimiento lento invadiendo el sistema vascular en tiempo más prolongado iniciando los síntomas en las puntas de las hojas.

En las observaciones al microscopio de los cortes histológicos de raíz de plántulas de agave tequilero, las cuales se tiñeron con flourocromo Uvitex 2B y posteriormente con azul de tripano. Esta última tinción permitió localizar al hongo para después confirmar su ubicación y características con la fluorescencia. Sin embargo, el uso del Uvitex 2B presentó problemas ocasionados por el exceso de fluorocromo en el tejido ocasionando que no se distinguiera la presencia del hongo, por lo que la observación de los cortes se realizó tres días después de la tinción, para permitir que este exceso se degradara y así, observar con mayor facilidad la presencia del hongo en el tejido. En la observación de las raíces inoculadas con las dos cepas patogénicas se observó micelio alrededor de las raíces y dentro del sistema vascular y esporas, es decir, que el proceso de infección inició con la colonización de la raíz y que mediante la producción de péptidos o fitotoxinas (Di-Prieto et al., 2003) degradan la pared celular de las raíces de las plántulas para penetrar y bloquear el sistema vascular lo que produce los síntomas de marchitez; este mismo proceso se observó en los trabajos de Di Prieto y colaboradores (2003) y Michelse y Rep (2009), los cuales estudiaron el proceso de infección de *F. oxysporum* en plantas de tomate.

Debido a estos resultados y con la caracterización de las cepas patogénicas se seleccionó a FPC como cepa de referencia, ya que el proceso de infección fue mayor, al igual que su uniformidad y virulencia. Por otro lado, el uso de sustrato SAA infestado con las cepas patogénicas proporcionó que el proceso de infección fuera con mayor rapidez y en el caso del ensayo *in vitro*, el tipo de inoculación, permitió que el desarrollo de los síntomas se observaran de afuera hacia adentro, algo que se correlaciona con lo reportado en la literatura.

9.2 Evaluación preliminar del potencial los aislamientos fúngicos para el control biológico.

A lo largo del ciclo de vida del agave azul se presentan una gran diversidad de interacciones en la rizósfera donde es posible encontrar microorganismos que pueden ser benéficos, inocuos o patógenos para la plantas (Madriz, 2002). Por lo que en diversos estudios se ha encontrado que varias especies de agave forman interacciones con una gran variedad de microorganismos que proporcionan cierta ventaja en la búsqueda de agentes que actúen como biocontrol contra plagas o fitopatógenos, con este aprovechamiento se pretende mejorar la sanidad de las plantas. Estos microorganismos pueden actuar de manera solitaria, dos o más microorganismos ya sean bacterias y hongos, se utilizaron diferentes mecanismos de acción en la inhibición del patógeno. Debido a esta gran diversidad de interacciones existen numerosos trabajos en búsqueda de microorganismos con actividad antagónica contra *Fusarium* y considerado uno de los más importantes y principales géneros utilizados y con resultados sobresalientes *Trichoderma* sp. el cual ha incluido mecanismos que protegen a la planta de agentes patógenos como la antibiosis, micoparasitismo, competencia por espacio, mediante desactivación de enzimas del patógeno y por la inducción de resistencia vegetal (Bolwerk , 2005; Infante *et al.*, 2009).

Se tomó como base estos estudios, en este trabajo se realizó una búsqueda de microorganismos con potencial para ser utilizados como agentes de control biológico o biofertilizantes, enfocándose en los hongos filamentosos, principalmente de los géneros *Trichoderma* y *Fusarium*, dos de los géneros que han presentado un efecto antagónico contra cepas patogénicas de *F. oxysporum* en diferentes cultivos (Michel-Aceves *et al.*, 2005; Obledo *et al.*, 2003). Para poder seleccionar aquellos aislamientos que presentaran un posible efecto antagónico, se evaluó su actividad antagónica *in vitro*, se descarto aquellos aislamientos que no presentaron un efecto antagónico contra cada una de las cepas patogénicas de *Fusarium* caracterizadas. A partir de estas evaluaciones se obtuvo un alto porcentaje de hongos con algún grado de actividad antagónica (Figura.8.10), que en su mayoría fueron aislamientos obtenidos de medio selectivo para *Trichoderma*

sp. Sin embargo, aun cuando es el procedimiento más ampliamente utilizado para la búsqueda de agentes de control biológico *in vitro* (Michel-Aceves, 2001; Guigón y González, 2004), no quiere decir que algunas de ellas puedan presentar algún tipo de antagonismo bajo condiciones de campo (Ezziyani *et al.*, 2004), la selección de estos aislamientos con actividad antagónica esta enfocada principalmente en la antibiosis y micoparasitismo. Sin embargo, para que el control biológico funcione debe de involucrarse la participación de la planta con el hongo, como por ejemplo: la inducción de la respuesta vegetal y competencia por espacio o nutrientes (Fravel *et al.*, 2003). A partir de esto, los resultados encontrados nos muestran que los mecanismos de acción que se presentaron fueron la producción de metabolitos liberados al medio o al contacto con la cepa patogénica se presento un color amarillo, rojo, naranja o negro, también se presento algún tipo de micoparasitismo, otra característica que fue determinante fue el crecimiento rápido, lento o intermedio de las cepas evaluadas, que se pudo dar por competencia por nutrimentos y/o por espacio (Jiménez-Pinto, 2005). Debido al alto porcentaje de aislamiento con algún tipo de actividad antagónica, se obtuvo el porcentaje de inhibición de las cepas con actividad antagónica sobresaliente y máxima, utilizando como referencia las cepas patogénicas de *Fusarium* en condiciones normales. En contraste con el trabajo de Martínez *et al.*, (2008), el cual tomó el porcentaje de inhibición del crecimiento radial a las 72 h en cepas de *Trichoderma*, el crecimiento de las cepas de *Fusarium* llego a su máximo al día 14, lo que hizo necesario seleccionar dos fechas una al día 7, donde se observa el contacto entre ambos aislamientos en su mayoría, y el día 14, cuando el cultivo de *Fusarium* cubre completamente la placa. Por lo que el porcentaje de inhibición se considero hasta este día. En los resultados se encontró que dos cepas sobresalen con alto porcentaje de inhibición contra las dos cepas patogénicas (Cuadro 8.2). Sin embargo, debido a las características de inhibición observadas se seleccionaron al azar cinco cepas para las evaluaciones de actividad antagónica y como biofertilizantes en plantas de *A. tequilana*. Las cepas fueron: KOESP84A2, TRIHER42B2, TRIELI1B1, TRIHER425A2 y FUHER424A. Las características observadas para estos aislamientos fueron crecimiento rápido, producción de

metabolitos color rojo al contacto con la cepa patogénica y liberados al medio de cultivo siendo principalmente de color amarillo, naranja o rojo, los cuales se han reportado en el género *Trichoderma* como: gliotoxina, viridina, pacibasina, trichodermina, furanona, trichorziaminas, suzukaclina, alameticina, dermatina, trichotecenos y 6 pentil- α -pirona (6PAP) que tienen efecto antagónicos sobre hongos fitopatógenos y entre estos metabolitos volátiles, el más conocido ha sido 6PAP debido a su fuerte actividad antifúngica, además se considera que entre mayor es la cantidad de metabolitos producidos el poder antagónico se incrementa (Michel-Aceves *et al.*, 2005; Infante *et al.*, 2009). Otra característica de este género es la producción de enzimas líticas extracelulares como son las quitinasas y proteasas que afectan directamente a otros hongos (Howell, 2003). También se observó el micoparasitismo, que en este trabajo fue clasificado en tres tipos de acuerdo a la capacidad de cubrir a *Fusarium* patogénico; P1: cubre del 75 al 100% de la cepa patogénica, P2: cubre del 30 al 70% de la cepa patogénica y P3: cubre solo el sitio de contacto con la cepa patogénica.

Un punto importante considerado para los aislamientos seleccionados al momento de evaluarse en las plántulas fue determinar su patogenicidad tanto *in vitro* como *in planta*, de acuerdo a los ensayos previamente descritos en la caracterización de las cepas patogénicas de *Fusarium*. Las pruebas de patogenicidad *in vitro* e *in planta* fueron equivalentes, de manera general no se observa un efecto severo de marchitez en los aislamientos seleccionados como fue en FUHER424A1 y TRIELI1B1 los cuales no se observó síntomas de marchitez en las plántulas de agave tequilero, en el cultivo *in vitro* FUHER424A1 se mantuvo en el mismo grado que el testigo sin hongo y en TRIELI1B1 se observó solo un ligero encarrujamiento que pudo ser debido al estrés de las plántulas al estar en contacto con el microorganismo y el medio de cultivo bajo en nutrimentos. Sin embargo, de entre los aislamientos seleccionados TRIHER425A2 fue la que destacó en el grado de patogenicidad con un cambio de coloración en las hojas e inicio de marchitez en las puntas. Por otro lado, en cultivo *in planta*, los síntomas fueron más evidentes en todos los tratamientos, siendo TRIHER425A2 la que destacó nuevamente sobre las demás presentando los mismos síntomas que el testigo patogénico

(FPC). En cuanto a KOESP84A2, se observó un efecto nocivo en las plántulas aunque, no tan evidentes como el testigo patogénico, se presentó en una hoja una mancha necrótica con un halo clorótico característica que no se observó en los otros tratamientos. Por otra parte, las cepas TRIHER42B2 y TRIEL1B1 presentaron síntomas ligeros de estrés que se pudo deber al estrés de las plántulas por las condiciones en las que se mantuvieron. Y por último, al igual que en la prueba *in vitro*, FUHER424A1 no presentó características de efectos nocivos manteniendo las plántulas igual que el testigo sin hongo o incluso bajo con un mejor aspecto visual. Para este trabajo se utilizaron cinco aislamientos, por cuestiones prácticas y tiempo, sin embargo, esto no implica que los demás aislamientos con algún tipo de actividad antagonista no sean efectivos contra *F. oxysporum*, por lo que se tendría que realizar las pruebas correspondientes para observar su posible actividad antagonista. Un punto importante en la búsqueda de microorganismos con potencial como biocontroladores, es el desarrollo de pruebas *in vitro* que puedan correlacionarse con las pruebas *in planta*, en este trabajo los aislamientos seleccionados tuvieron como base el ensayo *in vitro*, sin embargo, aún queda por determinar que tan conveniente es esta metodología, ya que lo observado *in vitro* ha sido difícil de correlacionar en condiciones de cultivo.

9.3 Potencial de los aislamientos fúngicos como agente de control biológico.

El control biológico de organismos patógenos en la actualidad presenta un gran interés a nivel mundial por razones económicas, de salud humana y ambientales, buscando desarrollar cada vez más productos con base en microorganismos antagonistas que actúen contra los patógenos (Rodríguez-Del bosque *et al.*, 2007), y aprovechar las interacciones que se presentan de manera natural entre planta-hongo para desarrollar nuevas alternativas contra *F. oxysporum*, que se ha convertido en una amenaza para el abasto futuro de la industria tequilera y otras relacionadas con este cultivo. Debido a este gran problema, se han realizado diversos estudios enfocados a explorar el potencial de los microorganismos asociados a la rizósfera de *A. tequilana* con potencial como agentes de biocontrol, obteniendo una efectividad biológica contra la marchitez en cultivos bajo

condiciones de campo. Entre los diversos estudios para combatir a *F. oxysporum*, se encuentran algunos dirigidos al control químico como el realizado por Flores y Byerly (2002) en donde evaluaron la efectividad de diversos fungicidas comerciales contra *F. oxysporum*., obteniendo algunas recomendaciones al respecto. Sin embargo, es importante resaltar que casi en su totalidad los estudios se han enfocado en el control curativo y bajo condiciones de campo (Córdova-Zapata, 2003), a lo que se agrega que en algunos casos no se reporta el método de diagnóstico utilizado para determinar el agente causal de la marchitez (Flores-López y Byerly-Murphy, 2002; Aceves-Rodríguez y Byerly-Murphy, 2002). Con estos antecedentes, se hace necesario el desarrollo de pruebas experimentales que permitan la adecuada evaluación de alternativas de control ya sea químico o biológico, bajo condiciones controladas, que luego puedan ser escaladas a nivel de campo. En este trabajo, se partió de la prueba de patogenicidad *in planta* establecida, se implementó una prueba de antagonismo bajo condiciones controladas. La prueba de antagonismo involucra obtener el grado de protección de los aislamientos seleccionados en comparación con la cepa patogénica de referencia (FPC). Los resultados mostraron que FUHER424A1 mantuvo el mismo grado que el testigo sin hongo manteniendo las plántulas sanas, es decir, que esta cepa obtuvo una buena y rápida colonización en las raíces de *A. tequilana* protegiéndola de la cepa patogénica, por lo que se considero como potencial en el control biológico de *F. oxysporum* bajo condiciones de campo. Un ejemplo es el de Michel-Aceves y colaboradores (2005) donde evaluaron la capacidad de diversas especies de *Trichoderma* para inhibir el crecimiento de *F. oxysporum* en plantas de mango bajo *in vitro*, los cuales obtuvieron 17 cepas de especies diferentes de *Trichoderma* con potencial como control biológico contra *Fusarium*. Por otra parte, en TRIEL11B1 y TRIHER425A2 se presentó síntomas ligeros de la enfermedad, lo que se relaciona a que pueden inducir algún grado de protección aunque no al grado que presentó FUHER424A1. Destaca el caso de TRIHER425A2 presentando efectos nocivos equivalentes al patógeno FPC, y en esta prueba sus efectos no son tan evidentes, lo que puede interpretarse como que esta cepa al entrar en contacto con el patógeno de alguna manera se activa la planta para no

permitir la infección y por lo tanto la protege. Con respecto a los aislamientos KOESP84A2 y TRIHER42B2, en esta evaluación se encontró que presentaron síntomas severos de marchitez, destacando TRIHER42B2 que incluso mostró un efecto adverso mayor que el testigo patogénico. A partir de estos resultados se observó que los síntomas presentados en las pruebas de patogenicidad *in planta* se expresaron con mayor fuerza después de ser inoculadas con *F. oxysporum*, por lo que se puede decir que *F. oxysporum* actuó de manera coadyuvante al expresar los síntomas con mayor rapidez y fueron más evidentes los síntomas de marchitez.

Algo importante que hay que destacar de estas pruebas de antagonismo, es la metodología utilizada. Para este trabajo, las plántulas de agave fueron incubadas en sustrato infestado con cada uno de los aislamientos durante 15 d, después de los cuales las plántulas fueron trasplantadas a sustrato infestado con la cepa patogénica de referencia. Lo importante en esto, es que se elimina completamente el sustrato infestado con los aislamientos evaluados, antes de ser colocados en el sustrato "patogénico", lo que implica que el aislamiento en ese tiempo debió de ser capaz de colonizar la raíz de agave, una acción que no necesariamente es implícita de un agente de control biológico (Howell, 2003), y por lo tanto margina aquellos otros aislamientos que no interaccionan con la planta pero pudieran ser efectivos antagonistas con mecanismo directos de control biológico (Fravel *et al.*, 2002; Bolwerk, 2005; Infante *et al.*, 2009). A partir de estas observaciones las cepas TRIELI1B1 y TRIHER425A2 que no presentan síntomas de patogenicidad en esta prueba, además de que *in vitro* su efecto antagónico es sobresaliente, pueden presentar mecanismos de control biológico que no fueron incluidos en esta prueba y no deberían ser descartados como potenciales antagonistas. Debido a este conocimiento es necesario desarrollar nuevos ensayos de antagonismo, como por ejemplo dejar por más tiempo el sustrato infestado con las cepas evaluadas en las plántulas de agave tequilero y posteriormente agregar el patógeno. Otro ejemplo sería no eliminar por completo el sustrato con las cepas evaluadas y combinarlo con el sustrato infestado con *F. oxysporum* para asegurar que el hongo este presente y pueda entablar una asociación con las plántulas y

observar si hay algún efecto como antagonistas. Entonces por los resultados obtenidos en este estudio es posible considerar a FUHER424A1 como una cepa que presento una rápida asociación a las plántulas protegiéndola del patógeno y es considerado con un gran potencial para el control biológico de *F. oxysporum* causante de la marchitez en el agave. Finalmente, la prueba de antagonismo empleada, aun cuando no cubre completamente todos los mecanismos de control biológico conocidos, si es útil para obtener aquellos aislamientos que pudieran establecer una interacción con la planta (Sarabia-Ochoa *et al.*, 2010; Armenta *et al.*, 2003); una estrategia que pudiera ser congruente y útil con el manejo agrícola que tiene el agave azul actualmente a nivel comercial, como son el uso de hijuelos y planta micropropagada (Rendón *et al.*, 2011), a los cuales podría agregarse una cepa fúngica de control biológico, que pudiera protegerla de una de las principales enfermedades para este cultivo.

9.4 Potencial de los aislamientos como biofertilizantes.

Existen diversas interacciones biológicas entre las plantas y microorganismos, que pueden llegar a desarrollar una asociación benéfica, donde ambas pueden obtener un beneficio (Whipps, 2001). Partiendo de este conocimiento se han generado productos elaborados a base de microorganismos para el control biológico de fitopatógenos y biofertilizantes aislados a partir del suelo o de la planta en la cual se pretenden emplear (Serrano-Carreón y Galindo-Fentanes, 2007). Debido a la interacción que se desarrolla entre hongo-planta se logra la supresión del patógeno para mejorar la nutrición y el desarrollo de las plantas, se logró obtener interacciones que pueden ser benéficas tanto para las plantas como para el microorganismo. Un ejemplo de una posible interacción benéfica en agave se presenta en el estudio de Armenta y colaboradores (2003), donde reportan la colonización simbiótica en las raíces de plantas de *A. angustifolia* por hongos filamentosos y micorrízicos, que puede reflejarse en una asociación benéfica que ayuda en la nutrición de la planta. Otro ejemplo es el reportado por Obledo y colaboradores (2003), donde observaron una cepa no patogénica de *F. oxysporum* aisladas de plantas de *A. victoria-reginae* Moore y que al ser reintroducida a la

misma especie obtuvieron una eficiencia fotosintética más alta que en las plantas que no fueron inoculadas, induciendo el incremento en la clorofila, largo y número de raíces, contenido de azúcares y número de estomas en las hojas.

A partir del conocimiento generado, en este trabajo se evaluó la actividad benéfica de los aislamientos seleccionados en las plantas de *A. tequilana* enfocándose en evaluar parámetros tanto fisiológicos como anatómicos. Los parámetros anatómicos de las plantas están determinados por el genotipo y las condiciones ecológicas en las que se desarrolla, por lo que podría decirse que la respuesta de estos parámetros está relacionada con una mayor eficiencia fotosintética (Wozniak y Martineau, 2008). Por lo tanto, en este trabajo se evaluaron parámetros que nos permitieran observar los cambios en esta eficiencia fotosintética.

Los resultados obtenidos mostraron que solo algunos parámetros destacaron en virtud de un efecto benéfico después de la inoculación con los aislamientos fúngicos. Entre estas características fue el porcentaje de crecimiento en donde destaca FUHER424A1, TRIEL1B1 y TRIHER425A2. Por otro parte, KOESP84A2 sobresalió en el crecimiento promedio de la raíz y en número de raíces con síntomas, para el conteo de estas raíces se tomaron en cuenta raíces con oscurecimiento y ablandamiento aunque esto no quiere decir que estén infectadas desde un punto de vista nocivo, sino puede deberse a la respuesta de la planta a la colonización del hongo o por las condiciones ambientales. Otro parámetro en el que se observó una diferencia altamente significativa fue la densidad estomática la cual está determinada por la intensidad luminosa y la disponibilidad de agua (Loera-Quezada, 1990), aunque en este trabajo la intensidad de luz y disponibilidad de agua fue la misma para todos los tratamientos, esta diferencia fue evidente en FUHER424A1, seguida de KOESP84A2 y TRIHER42B2. De acuerdo a estos resultados la cepa que obtuvo mayores parámetros anatómicos con diferencias significativas fue FUHER424A1 aunque no fueron tan marcados como para poder determinar que su efecto puede ser equivalente a un biofertilizante en cuanto a la eficiencia fotosintética (Wozniak y Martineau, 2008).

La fotosíntesis es un proceso fisiológico fundamental en las plantas, que genera energía y "bloques constructores" para todas las vías metabólicas, se usó la

energía de la radiación solar, por lo que está relacionada con la cantidad total de luz recibida durante la estación de crecimiento y se considera que en tanto las plantas tengan suficiente agua y nutrimentos, la producción de cultivos dependen totalmente de la fotosíntesis (Wozniak y Martineau, 2008). En las plantas crasuláceas los mecanismos de la fotosíntesis han evolucionado al disminuir la pérdida de energía asociada a la fotorespiración llamado metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM), es un ejemplo de adaptación al estrés ambiental que se presenta en plantas de sitios con periodos de escasa disponibilidad de agua o de CO₂ (Andrade *et al.*, 2007). Tomando como referencia lo anterior, en este trabajo se evaluaron algunos procesos fisiológicos implicados en la mejora de la fotosíntesis, como fueron las concentraciones de las moléculas de clorofila (clorofila "a", clorofila "b" y clorofila total) que su aumento se considera equivalente a una mejor eficiencia fotosintética (Wozniak y Martineau, 2008); además de cambios en pH, acidez nocturna, porcentaje de ácido málico y concentración de azúcares. En cuanto a la evaluación de la concentración de clorofila, FUHER424A1 presentó un incremento importante en el contenido de clorofila lo que puede considerarse en este parámetro como la más eficiente. En el mismo sentido, TRIEL1B1 mostró solo un incremento en la clorofila "b" y "total", lo que se relaciona con un efecto menor con respecto a FUHER424A1. En contraste las otras cepas disminuyeron el contenido de clorofila algo que pudiera interpretarse como, que el contenido de clorofila es el primer compuesto sensible que disminuye al ser atacada por patógenos y también está relacionada con la poca capacidad de asociación del hongo a las plántulas (Gange y Ayres 1999; Barragán-Barragán, 2001). Otros parámetros fisiológicos evaluados para determinar la eficiencia fotosintética de las cepas evaluadas fue el pH diurno y nocturno en el que no se presentaron diferencias significativas entre las cepas evaluadas, aunque si se observa una tendencia hacia la acidez, el porcentaje de producción de azúcares, de ácido málico y el porcentaje de acidez nocturna de nueva cuenta presentaron tendencias de un efecto benéfico, principalmente en los aislamientos TRIEL1B1, TRIHER42B2 y TRIHER425A2 que presentaron un incremento de ácido málico y acidez nocturna por la noche con respecto al testigo y en el día este incremento

fue aún mayor, sobresaliendo KOESP84A2 considerablemente sobre todas con un incremento tanto en la noche como en la mañana. En cuanto al ácido málico, TRIHER42B2 destacó al presentar una disminución por la noche, aumentando considerablemente por la mañana. El incremento en la acidez tisular es proporcional a la concentración de ácido málico ya que por cada molécula de CO₂ fijada se produce una molécula de ácido málico y dos iones de hidrógeno (Andrade *et al.*, 2007), es decir que estas diferencias entre el pH diurno y nocturno, la mayor acidificación nocturna y el mayor porcentaje de ácido málico de las plántulas evidencia una mayor eficiencia fotosintética (Sutton *et al.*, 1981). Por último en la evaluación de producción de azúcares no se presentaron diferencias estadísticas significativas solo tendencias en donde destacaron las cepas KOESP84A2 y TRIHER425A2, esta última es la que obtuvo el mayor porcentaje sobre todas las cepas y el testigo, lo que podría interpretarse que esta acumulación de azúcares, se debió a las reacciones de fijación de carbono (Wozniak y Martineau, 2008), entonces las plántulas inoculadas con estos aislamientos se considera que obtuvieron una mayor eficiencia fotosintética.

A partir de estas evaluaciones se observó que alguno de los aislamientos presentaron algún efecto benéfico equivalente a un biofertilizante sobre las plántulas de *A. tequilana* inoculadas ya que el incremento de los parámetros tanto anatómicos como fisiológicos no fueron homogéneos en alguna de las cepas presentándose variaciones de estos que pudieran decir cuál de ellos tiene un efecto como biofertilizante (Obledo *et al.*, 2003; Wozniak y Martineau 2008), en contraste con el trabajo reportado por Barragán-Barragán (2001) donde la inoculación con *F. oxysporum* resultó de manera benéfica para una de las especies de agave (*A. victoria-reginae*), lo que podría considerarse como una actividad como biofertilizante. Sin embargo, aun cuando KOESP84A2 y TRIHER42B2 sobresalieron con un mayor incremento en la eficiencia fotosintética, también presentaron efectos nocivos en alguna de las pruebas realizadas. En ambos casos se presentaron efectos nocivos ligeros sobre las plántulas en la evaluación de antagonismo al observarse síntomas severos de marchitez y en consecuencia no se observó una protección a la planta del patógeno. Por otro

lado, TRIHER425A2 y TRIELI1B1 presentaron un ligero incremento en la eficiencia fotosintética, sin embargo en la prueba de patogenicidad, TRIHER425A2 presentó un efecto nocivo severo sobre las plántulas, en contraste con la evaluación de control biológico donde se observó un ligero efecto de protección en la planta contra el patógeno. Por lo tanto, de los cinco aislamientos evaluados, los dos aislamientos que se consideran como candidatos como biofertilizantes serían FUHER424A1 y TRIELI1B1, principalmente por su característica de no producir síntomas nocivos en las plantas inoculadas, contrario a los tres aislamientos restantes, que presentaron algún grado de patogenicidad o interacción negativa en presencia de un organismo patogénico (Figura.8.11).

9.5 Consideraciones finales.

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo se presentan dos aislamientos fúngicos como posibles candidatos para biofertilizantes y un aislamiento como candidato a agente de control biológico contra cepas patogénicas de *Fusarium oxysporum* asociados a la marchitez del agave. Coincidentemente, un aislamiento presentó (FUHER424A1) el potencial de ser utilizado como biofertilizante y agente de control biológico. En cuanto al segundo aislamiento (TRIELI1B1), presentó un potencial como biofertilizante, destacándose por no presentar un efecto nocivo para la planta. Sin embargo, cuando fue evaluado como agente de control biológico no presentó algún grado de actividad protectora, en este punto se hace evidente la importancia del ensayo utilizado para la evaluación de la actividad antagónica. Aunque no presenta actividad protectora, podría tener relación con su pobre capacidad de colonizar la raíz de la planta, un punto que en este trabajo fue un factor relevante de acuerdo al ensayo utilizado. Por lo tanto, será importante considerar el utilizar una metodología diferente que contemple la evaluación del antagonismo directo como podría ser la antibiosis y el micoparasitismo. Otro punto a considerar, es la importancia de las evaluaciones de actividad benéfica como punto de partida para la búsqueda de usos potenciales de la micoflora asociada al agave, ya que al menos en este estudio, observamos que la mayoría de los aislamientos (3 de 5), presentaron algún tipo de actividad benéfica, pero al ser

confrontados con un hongo patogénico, se observa un aumento en los síntomas de la enfermedad, algo que podría ser un factor importante a considerar al momento de aplicarse como un biofertilizante. En contraste, siguiendo la estrategia de evaluar la capacidad biocontroladora es posible obtener un microorganismo potencialmente protector, que si presenta un efecto benéfico se consideraría como algo extra, pero no determinante. Partiendo del planteamiento propuesto en este estudio, enfocado en evaluar el potencial de los hongos filamentosos asociados a la rizósfera de *A. tequilana* como posibles biofertilizantes y agentes de control biológico para la marchitez del agave tequilero, de acuerdo a los resultados obtenidos podemos afirmar que este planteamiento ha sido el adecuado, considerándose que solo se evaluó una proporción muy pequeña del total de los aislamientos, y encontramos al menos un aislamiento con las características deseables, lo que fortalece la hipótesis del potencial que tienen estos aislamientos para ser considerados como fuente de biofertilizantes y agentes de control biológico para la marchitez del agave tequilero u otra enfermedad para este cultivo.

10. CONCLUSIONES

1. La caracterización de las cepas de *Fusarium oxysporum* asociadas a la marchitez del agave tequilero permitió obtener dos cepas patogénicas de referencia, de las cuales FPC fue la más virulenta.
2. Se desarrolló un ensayo de patogenicidad *in vitro* que ofrece una ventaja, a parte del tiempo corto para la obtención de los resultados y contempla el sitio de penetración "natural" de los patógenos de raíz del agave tequilero.
3. Se desarrolló un ensayo de patogenicidad *in planta* que permite el seguimiento de los síntomas de infección con *F. oxysporum* asociado a la marchitez del agave tequilero en menor tiempo al reportado en la literatura.
4. Se obtuvo una serie de aislamientos fúngicos obtenidos de medio selectivo para *Fusarium* y *Trichoderma* con actividad antagónica *in vitro*, con potencial como agentes de control biológico para *F. oxysporum* asociado a la marchitez del agave tequilero.
5. Se desarrolló un ensayo de antagonismo *in planta* para evaluar la protección de algunas cepas contra *F. oxysporum* asociado a la marchitez del agave tequilero.
6. Dos aislamientos fúngicos presentaron un efecto potencial como biofertilizante: TRIEL1B1 y FUHER424A1.
7. Un aislamiento fúngico presentó un efecto potencial como agente de control biológico para *F. oxysporum* asociado a la marchitez del agave tequilero: FUHER424A1.
8. El aislamiento fúngico FUHER424A1 presentó un potencial efecto tanto como biofertilizante como agente de control biológico.

11. LITERATURA CITADA

- Aceves-Rodríguez JJ y Byerly-Murphy KJ. 2002. Estudio de la efectividad de fungicidas y bactericidas para el control de la marchitez del *Agave tequilana* Weber var. azul en Atotonilco, Jalisco. Eds: INIFAP. Publicación especial Núm. 1. En: análisis agroecológico del *Agave tequilana* Weber var. azul con énfasis en problemas fitosanitarios en Jalisco. Jalisco, México. pp: 97-122.
- Aceves-Rodríguez JJ. 2002. Incremento e inoculación de patógenos asociados a la marchitez del agave. Eds: INIFAP. Publicación especial Núm. 1. En: análisis agroecológico del *Agave tequilana* Weber var. azul con énfasis en problemas fitosanitarios en Jalisco. Jalisco, México. pp: 45-49.
- Agrios GN. 2005. Fitopatología. Elsevier Academic Press. New York, USA. pp: 883.
- Alabouvette C, Olivain C y Steinberg C. 2006. Biological control of plant diseases: The European situation. *European Journal of Plant Pathology*. 114: 329–341.
- Andrade JL, De la Barrera E, Reyes-García Casandra, Ricalde MF, Vargas-Soto G y Cervera JC. 2007. El metabolismo ácido de las crasuláceas: diversidad, fisiología ambiental y productividad. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. (81): 37-50.
- Armenta AD, Sánchez A, Cervantes T, Higuera I y Esqueda M. 2003. Hongos filamentosos y micorrízicos asociados con *Agave angustifolia* Haw. *Boletín CIAD*. 12:1-2.
- Askew D y Laing D. 1993. An adapted selective medium for the quantitative isolation of *Trichoderma* species. *Plant Pathology*. 42: 686-690.
- Ávila-Miranda ME, López-Zazueta JG, Arias-Castro C, Rodríguez-Mendiola MA, Guzmán-De Peña DA, Vera-Núñez José A y Peña-Cabrales JJ. 2010. Vascular wilt caused by *Fusarium oxysporum* in agave (*Agave tequilana* Weber var. azul). *Journal of the Professional Association for Cactus Development*. 12:166–180.
- Aviña-Padilla K, Virgen-Calleros G, Ochoa-Sánchez J, Gómez-Leyva J, Martínez-Leal J y Martínez-Soriano R. 2008. El mal llamado SIDA del agave tequilero. *Claridades Agropecuarias*. 175: 27-33.
- Badii M.H y Abreu JL. 2006. Control biológico una forma sustentable de control de plagas. *International Journal of Good Conscience*. 1 (1): 82-89.
- Barea JM, Navarro E y Montoya E. 2008. Production of plant growth regulators by rhizosphere phosphate-solubilizing bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 48 (2): 129-134.

- Barragán-Barragán LB. 2001. Efectos de la inoculación del hongo *Fusarium sp* aislado del *Agave victoria-reginae* Moore, en cuatro especies del genero *Agave* propagadas *in vitro*. Tesis de Licenciatura. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jalisco, México. 46p.
- Bender CM, Pretorius ZA, Kloppers FJ y Spies JJ. 2000. Histopathology of leaf rust infection and development in wheat genotypes containing Lr12 and Lr13. *Phytopathology*. 148: 65-76.
- Bolwerk A, Lagopodi LA, Lugtenberg JJ y Bloemberg GV. 2005. Visualization of interactions between a pathogenic and a beneficial *Fusarium* strain during biocontrol of tomato foot and root rot. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 18 (7): 710-721.
- Bolwerk A. 2005. Cellular interactions during biological control of tomato foot and root rot. Doctoral thesis. University Leiden, Netherlands. 119 p.
- Bruinsma J. 1963. The quantitative analysis of chlorophyll a and b in plant extracts. *Protochemistry and Photobiology*. 2: 241-249.
- Cámara Nacional de Industria Tequilera (CNIT). 2008. El tequila. Disponible en: <http://www.tequileros.org/>. Consultado en 08/2011.
- Cámara Nacional de Industria Tequilera (CNIT). 2010. Estadística 2010. Disponible en: <http://www.tequileros.org/>. Consultado en 08/2011.
- Carrillo L. 2003. *Fusarium*. En: Microbiología agrícola. Universidad Nacional de Salta. Salta, Argentina. pp: 70-79.
- Castañeda-Vázquez H. 2002. Aislamiento e identificación de microorganismos responsables de la marchitez del agave tequilero. En: análisis agroecológico del *Agave tequilana* Weber var. azul con énfasis en problemas fitosanitarios en Jalisco. Eds: INIFAP. Publicación especial Núm. 1. Jalisco, México. pp: 21-22.
- Comité Estatal de Sanidad Vegetal Guanajuato (CESAVEG). 2008. Campaña de manejo fitosanitario del agave tequilero. Disponible en: www.cesaveg.org.mx. Consultado en 08/2011.
- Consejo Regulador del Tequila A.C (CRT). 2005. Enfermedades bióticas. Ed. Comité Técnico Agronómico. En: plagas y enfermedades del *Agave tequilana* Weber var. azul. Jalisco, México. pp: 91-100.
- Consejo Regulador del Tequila A.C (CRT). 2004. Inducción al Tequila una tradición refinada. Jalisco, México. 136 p.

- Consejo Regulador del Tequila A.C (CRT). 2010. Estadística 2010. Disponible en: <http://www.crt.org.mx/EstadísticasCRTweb>. Consultado en 08/2011.
- Córdova-Zapata MI. 2003. Biocontrol de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* por Trichozam (*Trichoderma harzianum*) y Mycoral (micorriza vesículo arbuscular) en el cultivo de tomate. Tesis de Licenciatura. Universidad Zamorano. Zamorano, Honduras. pp: 6-31.
- Cronquist A. 1981. An integrated system of classification of flowering plants. *Columbia University Press*, New York, USA. 1261p.
- De Cal A, Garcia-Lepe R y Melgarejo P. 2000. Induced resistance by *Penicillium oxalicum* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* histological studies of infected and induced tomato stems. *Phytopathology*. 90: 260-268.
- Di-Prieto A, Madrid MP, Caracuel Z, Delgado-Jarana J y Roncero MG. 2003. *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. *Molecular Plant Pathology*. 4(5): 315-325.
- Ezziyiani M, Pérez-Sánchez C, Sid-Ahmed A, Requena ME y Candela ME. 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). *Anales de Biología*. 26: 35-45.
- Fernández C y Juncosa R. 2002. Biopesticidas: ¿la agricultura del futuro?. *Phytoma*. 141: 14-19
- Fernández-Larrea OV. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Avances en el fomento de productos fitosanitarios no-sintéticos. *Manejo Integrado de Plagas*. 62: 96-100.
- Flores-López HE y Byerly-Murphy K. 2002. Estudio de efectividad biológica de fungicidas y bactericidas para el control de la marchitez de agave (*Agave tequilana* Weber var. Azul) en Tepatitlan, Jalisco. Eds: INIFAP. Publicación especial Núm. 1. En: análisis agroecológico del *Agave tequilana* Weber var. azul con énfasis en problemas fitosanitarios en Jalisco. Jalisco, México. pp: 123-139.
- Flores-López HE, Ireta-Moreno J y Ruiz-Corral JA. 2010. Tecnología para la prevención y/o control de la marchitez del agave tequilero en Jalisco. Folleto técnico núm. 2. Campo experimental Centro Aitos Jalisco. Tepatitlan Morelos, Jalisco, México. 36 p.
- Flores-López HE. 2002. Validación de sulfato de cobre pentahidratado para el control de la marchitez del agave tequilero. Eds: INIFAP. Publicación especial Núm. 1. En: análisis agroecológico del *Agave tequilana* Weber var. azul con énfasis en problemas fitosanitarios en Jalisco. Jalisco, México. pp:157-161.

- Fravel D, Olivain C y Alabouvette C. 2002. Research review: *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *New Phytologist*. 157:493-502.
- Fravel DR, Olivain C y Alabouvette C. 2003. Fusarium wilt and its biocontrol. *New Phytologist*. 157:493-502.
- Fucikovsky-Zack L. 2004. *Agave tequilana* weber var. azul y sus principales problemas fitosanitarios. En: *Avances en la investigación del agave tequilero*. Ed Consejo Regulador del Tequila A.C (CRT). Jalisco, Mexico. pp: 149-177.
- Fuscikovsky-Zak, L. 2000. Estudio de la fitosanidad de *Agave tequilana* Weber var. azul. Instituto de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados. Informe Técnico para el Programa General de Apoyo y Desarrollo Tecnológico a la Cadena Productiva Agave- Tequila.
- Galeano M, Méndez F y Urbaneja A. 2009. Efecto de *Trichoderma harzianum* Rifai (cepa T-22). Koppert Biological Systems. pp: 3-11. Disponible en <http://www.koppert.nl>. Consultado en 08/2011.
- Gange A y Ayres R. 1999. On the relation between arbuscular micorrhizal colonization and benefit. *Oikos*. 87(3): 615-621.
- García-Mendoza A. 2002. Distribution of *Agave* (Agavaceae) in México. *Cactus and Succulent Journal*. 74(4): 177-187.
- Guigón-López C y González-González PA. 2004. Selección de cepas nativas de *Trichoderma* spp. con actividad antagónica sobre *Phytophthora capsici* Leonian y promotoras de crecimiento en el cultivo de chile (*Capsicum annum* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología*. 22(1): 1-9.
- Hernández-Montiel LG y Escalona-Aguilar MA. 2003. Microorganismos que benefician a las plantas: las bacterias PGPR. *Divulgación Científica y Tecnológica de la Universidad Veracruzana*. 16(1): 29-32.
- Howell CR. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Disease*. 87(1): 5-10.
- Inbar J, Abramsky M, Cohen D y Chet I. 1994. Plant growth enhancement and disease control by *Trichoderma harzianum* in vegetable seedlings grown under commercial conditions. *European Journal of Plant Pathology*. 100: 337-346.
- Infante D, Martínez B, González N y Reyes Y. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal*. 24(1): 14-21

- Inoue I, Namiki F y Tsuge T. 2002. Plant colonization by the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* requires FOW1, a gene encoding a mitochondrial protein. *The Plant Cell*. 14: 1869-1883.
- Jeger MJ. 2001. Biotic interactions and plant-pathogen associations. Eds. Jeger MJ y Spence NJ. En: *Biotic interactions in plant-pathogen associations, reviews*. CABI, Publishing, Wallingford, UK. pp: 1-14.
- Jiménez-Pinto FA. 2005. Determinación de dosis y frecuencia de aplicación de *Trichoderma virens* para el control de enfermedades foliares en *Protea* cv. "Pink Ice" bajo condiciones de campo. Tesis de Licenciatura. Universidad de Talca, Talca, Chile. pp: 1-32.
- Klepzig KD, Moser JC, Lombardero MJ, Ayres Hofstetter RW y Walkinshaw CJ. 2001. Mutualism and Antagonism: Ecological Interactions Among Bark Beetles, Mites and Fungi. Eds. Jeger MJ y Spence NJ. En: *Biotic interactions in plant-pathogen associations, reviews*. CABI, Publishing, Wallingford, UK. pp: 237-263.
- Larkin RP y Fravel DR. 1999. Mechanisms of action and dose-response relationships biological control of *Fusarium* wilt of tomato by nonpathogenic *Fusarium* spp. *Phytopathology*. 89: 1152-1161.
- Leslie JF y Summerell BA. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell Publishing, Iowa, USA. 388 p.
- Loera-Quezada MM. 1990. Pudrición de tallo de *Agave tequilana* Weber en el estado de Jalisco. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Chapingo. Chapingo, México. 58 p.
- Loera-Quezada MM. 2000. Selección *in vitro* de *Agave tequilana* Weber var. azul para resistencia a *Fusarium oxysporum*. Tesis de Maestría. Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, México. pp: 1-92.
- López-Amezcu LO. 1991. Estudio anatómico-fisiológico comparativo en morfoespecies de nopal (*Opuntia* spp.) tunero. Tesis de Licenciatura. Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, México.
- Lozoya-Saldaña H, Coyote-Palma MH, Ferrera-Cerrato R y Lara-Hernández ME. 2006. Antagonismo microbiano contra *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary. *Agrociencia*. 40: 491-499.
- Madriz-Ordeñana K. 2002. Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. *Manejo Integrado de Plagas*. 63: 22-32.
- Maldonado-Chávez E, Rivera-Cruz MC, Izquierdo-Reyes F y Palma-López DJ. 2010.

Efectos de rizósfera, microorganismos y fertilización en la biorremediación y fitorremediación de suelos con petróleo crudo nuevo e intemperizado. *Universidad y Ciencia: Trópico Húmedo*. 26(2): 121-136.

- Martínez B, Reyes Y, Infante D, González E, Baños H y Cruz A. 2008. Selección de aislamientos de *Trichoderma* spp. candidatos a biofungicidas para el control de *Rhizoctonia* sp. en arroz. *Revista de Protección Vegetal*. 23(2): 118-125.
- McSpadden-Gardener BB y Fravel DR. 2002. Biological control of plant pathogens: Research, commercialization and application in the USA. Online. Plant health progress doi:10.1094/PHP-2002-0510-01-RV. *Plant Health*. pp: 1. In: <http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/review/biocontrol/>. Consulted in 08/2011.
- Melgarejo P, De Cal A, Larena I, Sabuquillo P y Guijarro B. 2005. Aplicaciones del control biológico al control de enfermedades vegetales. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). Disponible en: www.Agroinformacion.com. Consultado en 08/2011.
- Mendoza-Chagolla S. 2004. Caracterización molecular del hongo *Fusarium oxysporum* patógeno del *Agave tequilana* Weber var. Azul y la implementación de un método para su detección oportuna. Tesis de Licenciatura, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Michoacán, México. pp: 95-144.
- Michel-Aceves AC, Otero-Sánchez MA, Rebolledo-Domínguez O, Lezama-Gutiérrez R y Ochoa-Moreno ME. 2005. Producción y efecto antagónico de quitinasas y glucanasas por *Trichoderma* spp., en la inhibición de *Fusarium subglutinans* y *F.oxysporum* in vitro. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*. 11(2): 273-278.
- Michel-Aceves AC. 2001. Cepas nativas de *Trichoderma* spp. (Euascomycetes: Hypocreales), su antibiosis y micoparasitismo sobre *Fusarium subglutinans* y *F. oxysporum* (Hypomycetes: Hyphales). Tesis de Doctorado. Universidad de Colima, Tecoman, Colima, México. 115 p.
- Michielse C.B y Rep M. 2009. Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant Pathology*. 10(3): 311–324.
- Monzón A y Rodríguez-Tudela JL. 2001. Infecciones causadas por el genero *Fusarium*. En: *Centro nacional de microbiología instituto de salud Carlos III, Majadahonda*. Disponible en: http://www.seimc.org/control/revi_mico/fusarium.htm. Consultado en 08/2011
- Mora-Castillo JR. 2001. Control biológico de la pudrición radicular por *Fusarium oxysporum* en semilleros de café usando endomicorriza y *Trichoderma harzianum*. Tesis de Licenciatura. Universidad Zamorano. Zamorano, Honduras. pp: 1-25.

- Muñoz Ruiz C, Virgen-Calleros G, Herrera-Estrella A y Olaide-Portugal V. 2001. Introducción de agentes de control biológico de *Rhizoctonia solani* en suelos solarizados o encalados en condiciones de invernadero. *Manejo Integrado de Plagas*. 59: 10-14.
- Murashige T y Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15: 473–479.
- Nobel PS y Hartsock TL. 1983. Relationships between photo synthetically active radiation, nocturnal acid accumulation and CO uptake for a crassulacean acid metabolism plant. *Opuntia ficus-indica*. *Physiologia Plantarum*. 71: 71–75.
- Obledo EN, Barragán-Barragán LB, Gutiérrez-González P, Ramírez-Hernández BC, Ramírez JJ y Rodríguez-Garay B. 2003. Increased photosynthetic generated by fungal symbiosis in *Agave victoria-reginae*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 74: 237–241.
- Pal KK y McSpadden-Gardener B. 2006. Biological Control of Plant Pathogens. *The Plant Health Instructor*. 25 p.
- Patto MC y Niks RE. 2001. Leaf wax layer may prevent appressorium differentiation but does not influence orientation of the leaf fungus *Puccinia hordei* on *Hordeum chilense* leaves. *European of Journal of Plant Pathology*. 107: 795-797.
- Rendón-Salcido LA, Avila-Miranda ME, Rodríguez-Garay B y Del Real-Laborde JI (eds). 2011. Manual técnico para el establecimiento de huertas madre de agave azul. CRT, Libro técnico numero 1: 15-126.
- Robles-Murguía C. 1994. Estudio anatómico-fisiológico comparativo entre el nopal *Opuntia ficus indica* (L) Miller y el pitayo *Stenocereus queretaroensis* (Webb. Buxbaum). Tesis de Licenciatura. Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, México.
- Rodríguez- del Bosque LA y Arredondo. 2007. Teoría y aplicación del control biológico. *Sociedad Mexicana de Control Biológico*. DF, México. 303 p.
- Rodríguez-Garay B, Gutiérrez-Mora A, Loera-Quezada MM, Flores-Berrios EP. 2004. La materia prima *Agave tequilana* Weber var. azul. Eds. Consejo Regulador del Tequila A.C (CRT). En: *Avances en la investigación del agave tequilero*. Jalisco, México. pp: 3-46.
- Rodríguez-Guzmán MP. 2001. Biodiversidad de los hongos fitopatógenos. *Acta Zoológica Mexicana* 1: 53- 78.
- Rohringer R, Kim WK, Sambroski DJ y Howes NK. 1977. Calcofluor: An brightener for fluorescence microscopy of fungal plant parasites in leaves. *Phytopathology*. 67:

808-810.

- Sánchez V, Rebolledo O, Picaso RM, Cárdenas E, Córdova J, Gonzáles O y Samuels GJ. 2007. *In vitro* antagonism of *Thielaviopsis paradoxa* by *Trichoderma longibrachiatum*. *Mycopathologia*. 163: 49-58.
- Sandoval-Z. E. 2005. Técnicas aplicadas al estudio de la anatomía vegetal, Cuaderno 38. *Instituto de Biología*. Universidad Nacional Autónoma de México. DF, México. pp: 60-61.
- Sarabia-Ochoa M, Madrigal-Pedraza R, Martínez-Trujillo y Carreón-Abud Y. 2010. Plantas, hongos micorrízicos y bacterias: su compleja red de interacciones. *Ciencias Biológico Agropecuarias*. 12(1): 65-71.
- Serrano-Carreón L y Galindo-Fentanes E. 2007. Control biológico de organismos fitopatógenos: un reto multidisciplinario. *Ciencia*. 1(58): 77-88.
- Siddiqui-Zaki A. 2006. PGPR: Prospective biocontrol agents of plant pathogens. Ed. Zaki-Siddiqui A. En: PGPR: Biocontrol and Biofertilization. *Springer*. Aligarh, India. pp: 111-142.
- Sivan A, O Ucko y Chet I. 1987. Biological control of *Fusarium* crown rot of tomato by *Trichoderma harzianum* under field conditions. *Plant Disease*. 71: 587-592.
- Soitero-Quintana R. 2002. Pruebas de patogenicidad de *Fusarium oxysporum* y *Erwinia* sobre plantas de *Agave tequilana* Weber var. Azul "in vitro". Eds: INIFAP. Publicación especial Núm. 1. En: análisis agroecológico del *Agave tequilana* Weber var. azul con énfasis en problemas fitosanitarios en Jalisco. Jalisco, México. pp: 27-32.
- Sunil I y Satish L. 2005. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cumini* with *Aspergillus versicolor*. *Phytopathologia Mediterranea*. 44(1): 3-11.
- Sutherland Jack R. 1990. *Fusarium* Root Rot. Eds Hamm PB, Sally JC, Everett MH. En: *Growing Healthy Seedlings: Identification and management of pests in northwest forest nurseries*. Oregon, USA. pp: 8-9.
- Sutton BG, Ting: IP y Sutton R. 1981. Carbohydrate metabolism of cactus in a desert environment. *Plant Physiology*. 68: 784-787.
- Valenzuela, A. 2011. A new agenda for blue agave landraces: food, energy and tequila. *GCB Bioenergy*. 3: 15-24.
- Vázquez-García JA, Cházaro MJ. 2007. Agaves del occidente de México. Eds. Vázquez-García JA, Cházaro MJ, Hernández-Vera G, Flores-Berrios E. En: *Agaves del occidente de México*. Jalisco, México. pp: 23-25.

- Virgen-Calleros G. 2004. Epidemiología y manejo integrado de problemas fitosanitarios en *Agave tequilana* Weber var. azul. *Enfermedades del agave tequilero*. Eds. CRT. En: *Avances en la investigación del agave tequilero*. Jalisco, México. pp: 95-144.
- Warwick LM, Gray PP, Nippard GJ y Quinlan MR. 1982. Evolution of the DNS method for analysis lignocellulosic hydrolysates. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 32: 1016–1022.
- Whipps JM. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*. 2: 487-511.
- Wozniak E y Martineau J. 2008. Crop+ Estimula la fotosíntesis proceso clave para el crecimiento vegetal, el desarrollo y la productividad. *Cytozyme laboratories*. 4(1): 1-4.