

## INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COMITANCILLO

---

---

Diversidad génica de aislados de *Fusarium solani*, patógenos de agave tequilero (*Agave tequilana* Weber Var, *Azul*) determinada por comparación de secuencias del gen del factor de elongación 1 $\alpha$ , en Tlajomulco Jalisco.

TESIS PROFESIONAL

QUE PRESENTA

Aldo Michel Soriano Pérez

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
INGENIERO AGRÓNOMO  
CON ESPECIALIDAD EN FITOTECNIA

SAN PEDRO COMITANCILLO, OAX. NOVIEMBRE DEL 2015.



## ÍNDICE

## Página

ÍNDICE DE CUADROS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
TERMINOLOGÍA EMPLEADA.....	x
RESUMEN.....	xi
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO II. OBJETIVOS.....	4
2.1 Objetivo general.....	4
2.2 Objetivo específico.....	4
2.3 Hipótesis.....	5
CAPÍTULO III. FUNDAMENTO TEÓRICO.....	6
3.1 <i>Agave tequilana Weber var Azul</i> .....	6
3.2 Clasificación taxonómica.....	9
3.3 Importancia del cultivo.....	10
3.4 Importancia nacional.....	10
3.5 Importancia económica.....	10
3.6 El agave en la industria del tequila.....	11
3.7 El tequila.....	12
3.8 Plagas y enfermedades.....	14
3.8.1 Plagas del agave.....	14
3.8.2 Enfermedades del agave.....	15
3.9 Patógenos causantes de marchitez.....	18
3.10 Características del genero <i>Fusarium</i> .....	19
3.11 Clasificación taxonómica de <i>Fusarium</i> .....	21
3.12 <i>Fusarium oxysporum</i> .....	22
3.13 <i>Fusarium solani</i> .....	23
3.14 Marcadores moleculares.....	23
3.15 Reacción en cadena de la polimerasa.....	24

3.16 Electroforesis.....	25
3.17 Espaciadores transcritos internos (ITS).....	25
3.18 Factor de elongación 1- $\alpha$ (EF- $\alpha$ ).....	26
3.19 Método de secuenciación Sanger.....	27
3.20 Dendrograma.....	27
CAPÍTULO IV. PROCEDIMIENTOS.....	29
4.1 Descripción del área de estudio.....	29
4.1.1 Localización geográfica.....	29
4.2 Muestreo en campos comerciales de agave tequilero.....	30
4.3 Aislamiento a partir del tejido enfermo.....	31
4.4 Purificación de hongos fitopatógenos.....	32
4.5 Cultivo monosporicos.....	33
4.6 Cepario.....	35
4.7 Crecimiento de micelio para la extracción de DNA.....	36
4.8 Extracción de DNA.....	37
4.9 Electroforesis.....	39
4.10 Amplificación por PCR del fragmento ITS1-5.8S-ITS2 y del factor de elongación 1 $\alpha$ .....	43
4.11 Amplificación del factor de elongación 1 $\alpha$ (EF-1 $\alpha$ ).....	44
4.12 Amplificación de los espaciadores trascritos internos (ITS).....	45
4.13 Purificación de muestras de DNA amplificadas.....	45
4.14 Secuencia nucleotida.....	47
4.15 Edición y ensamblaje de secuencias.....	48
4.16 Ubicación taxonómica de acuerdo al GenBank.....	48
CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	49
5.1 Muestreo en campos comerciales de agave tequilero.....	49
5.2 Aislamiento.....	50
5.3 Purificación.....	51
5.4 Cultivo monosporico.....	53

5.5 Cepario.....	54
5.6 Crecimiento de micelio en papel celofán para la extracción de DNA.....	55
5.7 Extracción de DNA de muestras.....	57
5.8 Amplificación por PCR (EF1 $\alpha$ ) y (ITS).....	58
5.9 Purificación de los productos amplificados por PCR (EF1 $\alpha$ ) y (ITS).....	61
5.10 Secuencia nucleotida.....	63
5.11 Edición y ensamblaje de secuencias.....	63
5.12 Electroferograma de secuencia.....	64
5.13 Análisis filogenético.....	65
5.14 Algoritmo de BLAST.....	65
5.15 Dendrograma por el método matriz de similitud de correlación.....	67
CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	70
6.1 Conclusiones.....	70
6.2 Recomendaciones.....	72
CAPÍTULO VII. BIBLIOGRAFÍA.....	73

## ÍNDICE DE CUADRO

Página

Cuadro 1. Secuencia editada de 720 nucleótidos en el algoritmo BLAST del NCBI para determinar el grado de homología con respecto al GenBank.....	66
--	----

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Anatomía de Agave.....	8
Figura 2. <i>Agave tequilana</i> Weber variedad azul. ....	9
Figura 3. Apariencia de las macroconidias características de aislados de <i>Fusarium</i> (A) y apariencia de los conidióforos largos y microconidias (B) características morfológicas del hongo <i>Fusarium sp.</i> .....	22
Figura 4. Apariencia de plantas de agave sanas (A) y enfermas (B y C) en predios comerciales de agave tequilero propiedad de la empresa Cuervo de. México S.A de C.V.....	30
Figura 5. Muestras de tallo y corona de agave, con tejido necrosado o bien con destrucción o taponamiento de haces vasculares...	32
Figura 6. Apariencia de las macroconidias características de aislados de <i>Fusarium</i> (A) y apariencia de los conidióforos largos y microconidias (B) características morfológicas del hongo <i>Fusarium solani.</i> .....	33
Figura 7. Apariencia de conidios de <i>Fusarium</i> para en la cámara de NeuBauer utilizada para determinar su concentración.....	34
Figura 8. Forma en la que se colocaron los fragmentos de papel filtro estéril sobre cajas con medio de cultivo PDA.....	35
Figura 9. Colocación del papel celofán para crecimiento de micelio separado del medio de cultivo y así poder cosechar esta biomasa fácilmente.....	37
Figura 10. Pasos para la elaboración de la electroforesis.....	41

Figura 11. Planta de agave tequilero con síntomas de pudrición de tallo representada los síntomas en las puntas de las hojas encorvadas y marchitas.....	49
Figura 12. Aislamientos del patógeno <i>Fusarium sp.</i> Obtenidos a partir de muestras de raíz y tallo de plantas de agave, de los predios San Juan y Santo Domingo.....	50
Figura 13. A) Cultivo puro de <i>Fusarium solani</i> obtenido a partir de plantas de agave: B) Morfología de <i>Fusarium solani</i> .....	51
Figura 14. Desarrollo de un cultivo monosporico proveniente de una conidia.....	53
Figura 15. Cepario de cada muestra.....	54
Figura 16. Cepas en crecimiento de micelio en papel. Cepa (1, 6) pertenecientes a <i>Fusarium oxysporum</i> , Cepa (2, 3, 4, 5, 7) <i>Fusarium solani</i> .....	55
Figura 17. Resultados de las extracciones de DNA.....	57
Figura 18. Geles de agarosa mostrando los productos de la amplificaciones del factor de elongación 1 $\alpha$ , ITS.....	58
Figura 19. Se muestran los resultados de las purificaciones logradas del (EF-1 $\alpha$ ) a una reacción de 50 $\mu$ l de cada producto y la del ITS.....	61
Figura 20. Representación del alineamiento múltiple de secuencias de <i>Fusarium solani</i> , utilizado para la inferencia relaciones filogenéticas.....	63
Figura 21 Electroferograma de la secuencia reverse correspondiente al aislamiento de <i>Fusarium sp.</i> .....	64

Figura 22. Dendrograma elaborado por el método de matriz de similitud de correlación. Se observan los aislados de <i>Fusarium solani</i> y <i>Fusarium oxysporum</i> de tallo de agave ( <i>Agave tequilana</i> Weber var. azul) agrupados de acuerdo a relaciones filogenéticas del factor de elongación 1 $\alpha$ .....	67
Figura 23. Dendrograma por el método de matriz de similitud de correlación de la secuencias de gen (ITS) de los aislados de la pudrición de tallo de agave.....	68



## TERMINOLOGÍA EMPLEADA

1.- DNA	Acido desoxirribonucleico
2.-DNAr	ADN ribosomal
3.- dNTPs	Desoxinucleotido trifosfato
4.- ITS	Espacio interno transcrito
5.- ITS 1	Iniciador upstreaml
6.- ITS 4	Iniciador downstream
7.- pb	Pares de bases
8.- PDA	Papa-dextrosa-agar
9.- CTR	Consejo Regulador del Tequila
10.- ITTJ	Instituto Tecnológico de Tlajomulco Jalisco.
11.- PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
12.- Primers	Cebador o iniciador
13.- RNAs <sub>A</sub>	Enzima que corta el RNA
14.- TAE	Tris, Ácido Bórico
15.- UV	Ultravioleta
16.- µl	Microlitros
17.- DOT	Denominación de Origen del Tequila
18.- EF-1 $\alpha$	Factor de elongación uno alfa
19.- MM	Marcador molecular
20.- ML	Mililitros
21.-. CNIT	Cámara Nacional de la Industria Tequilera
22.- CESAPEG	Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Guanajuato
23.- EC	Electroforesis capilar
24.- OTU	Unidad taxonómica operativa
25.- 1:1:8	10% de alcohol, 10% de cloro y 80% de agua destilada
26.- Mg Cl <sub>2</sub> ;	Cloruro de magnesio
27.- Taq CLP	Polimerasa
28.- Mili-Q	Agua mili-Q
29.- LANGEBIO	Laboratorio de Nacional de Genómica de la Diversidad
30.- NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica

## RESUMEN

La presente investigación de la diversidad génica de aislados de *Fusarium solani*, patógenos de agave tequilero (*Agave tequilana* Weber Var, *Azul*) determinada por comparación de secuencias del gen del factor de elongación 1 $\alpha$ , en Tlajomulco Jalisco se llevó a cabo en Instituto Tecnológico de Tlajomulco en el área de posgrados del laboratorio de sanidad vegetal.

El cultivo del agave tequilero es parte de una larga tradición del estado de Jalisco, México. Esta actividad que culmina con la obtención del tequila, un tipo de mezcal tan característico, que se ha legislado su producción bajo la Denominación de Origen. La cadena producto agave-tequila es de suma importancia económica y social, no solo para región productora, sino para el país, dadas las elevadas cantidades de tequila que se exportan a todo el mundo. Esta investigación tuvo como objetivo principal identificar al agente causal de la pudrición del tallo de agave, enfermedad que ocasiona la aparición de grados de marchitez e incluso muerte o destrucción de la planta, las cuales se presentan como necrosis de color café en el tallo que genera el retraso del crecimiento, que afecta a la producción. A partir de muestras de tejido del tallo tomadas durante 2014 y el 2015 con los síntomas antes descritos, se aisló un hongo. En un enfoque fitopatológico que incluyó el análisis del perfil bioquímico y fisiológico, microscopía compuesta y la secuenciación del gen factor de elongación uno alfa (EF-1 $\alpha$ ) con los iniciadores ef-1H y ef-2T y los genes Espaciadores transcritos internos (ITS) con los iniciadores its-1H y its- 2T, así como elaboración de dendrograma con el método matriz de similitud de correlación. Se determinó que *Fusarium solani* es el agente causal de la pudrición del tallo de agave tequilero.

**PALABRAS CLAVE:** Agave, *Fusarium solani*, fitopatológico, dendrograma, pudrición del tallo.

## **AGRADECIMIENTOS.**

Al Instituto Tecnológico de Comitancillo (ITC), por proporcionarme las condiciones académicas y de infraestructura necesarias para desarrollar plenamente mis estudios de ingeniería

Al Instituto Tecnológico de Tlajomulco Jalisco (ITTJ), por brindarme su apoyo para lograr concluir mis estudios de ingeniería.

Quiero expresar mi agradecimiento a mi asesor externo de tesis, Dr. Martin Eduardo Ávila Miranda 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 y confianza y sus consejos que han sido fundamentales para la concreción de este trabajo.

A mi asesor interno Ing. Diego Armando Martínez Matus por su apoyo incondicional y sus valiosas aportaciones a este trabajo de tesis que lo enriquecieron.

A mis revisores M.C Pedro Márquez Castillo, Ing. Jesús Santos Osorio, M.C Carlos Antonio Martínez, por sus aportaciones para mejorar este escrito y por forman parte de esta revisión.

Al Ing. Leandro Marcos Ramos, por el apoyo que siempre me brindo, sus consejos, su amistad y sobre todo por ser uno de mis inspiradores para seguir mi formación profesional en Guadalajara Jalisco.

Al laboratorio de sanidad vegetal por su apoyo para llevar a cabo el trabajo de investigación.

## DEDICATORIA

*A mi padre todo poderoso, Dios, por su amor incondicional, su paciencia, sabiduría, instrucción y por mostrarme en todo momento la belleza de su presencia en mi vida.*

*Son muchas las personas especiales que me gustaría agradecer su amistad, apoyo, ánimo y compañía en las diferentes etapas de mi vida.*

*Algunos están conmigo y otros en mis recuerdos y en mi corazón. Sin importar en donde estén 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 Lidia Pérez Acevedo y Abel Soriano Soriano 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 “Amo” y muchas gracias por permitirme ser parte de su vida.*

*A mi hermana Mariana Soriano Pérez, por su apoyo incondicional, paciencia, sus consejos y por siempre estar conmigo en las buenas y malas.*

*A mi novia Ing. Nachieli Estudillo Román, por sus consejos para nunca decaer en esta etapa de mi vida, por su amor, comprensión y por siempre estar conmigo en las buenas y malas. Te amo mi novia hermosa.*

*A toda la familia Soriano y a la familia Pérez, 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.*

## **CAPITULO I**

### **INTRODUCCIÓN**

El cultivo del *Agave tequilana* Weber var. Azul ocupa una superficie de más de 82, 775 ha (SIAP, 2013) en el estado de Jalisco distribuido principalmente en tres zonas: altos, sur y centro. En los últimos años, el cultivo del agave se ha visto afectado por una serie de problemas fitosanitarios, destacando entre estos, aquellos causados por fitopatógenos. Sin embargo, es poca información existente con respecto a esta problemática en agave (CRT, 2004).

El agave azul está considerado como uno de los cultivos de mayor importancia en el estado de Jalisco desde 1995, debido a la creciente demanda de tequila que se derivó de la denominación de origen y la certificación de calidad; la promoción en los mercados internacionales por el Consejo Regulador del Tequila (CRT) y la proliferación de nuevas empresas. La demanda de materia prima para la industria del tequila aumentó la superficie del agave tequilero en Jalisco de 50 000 ha en 1995, a 82 000 ha en 2013. En consecuencia, también han crecido sus problemas fitosanitarios, causados por hongos, bacterias y nematodos (Consejo Regulador del Tequila, 2000).

El consejo regulador del tequila detectó en 2004, mediante un inventario en la zona de denominación de origen, el 40% de plantas enfermas por ataque de hongos y/o bacterias de un total de 302 millones de plantas cultivadas. En los años posteriores a pesar de no haberse realizado nuevas contabilizaciones, el problema persistió y el agricultor encontró dificultades para satisfacer la demanda que requería la industria (Consejo Regulador del Tequila, 2004). Sin embargo, la manera asexual de propagar el agave tequilero durante años, condujo a la clonación de diversos genotípicos seleccionados y, por lo tanto, a encontrar nuevas variantes fenotípicas dentro de las poblaciones cultivadas, lo anterior facilitó la incidencia y proliferación de enfermedades causadas por fitopatógenos (Fucikovsky, 2004). Estos fitopatógenos han provocado un incremento considerable en el desarrollo de las enfermedades, lo cual puede ocurrir debido a que existe poca variabilidad genética en esta planta y son monocultivo (Fucikovsky, 1995).

Actualmente la enfermedad denominada “marchitez del agave” o “pudrición del tallo” del A. tequilana en el estado de Jalisco, es la enfermedad de mayor relevancia, la cual ha provocado grandes pérdidas a los productores (Aceves 1999; CRT 2005).

Desde hace algunos años, se considera al hongo *Fusarium oxysporum* como agente causal de pudrición del tallo de a agave (Luna, 1998). Las cepas aisladas en esta investigación se encontró el patógeno *Fusarium solani*, causal de la pudrición de tallo de agave que se caracteriza por lesiones necróticas

rojizas en el sistema radicular y en el tallo, también especifica daños o tapamiento de los haces vasculares del xilema, provocando una apariencia de marchitez de agave (muerte ascendente).

El Instituto Tecnológico de Tlajomulco Jalisco en el área de investigación de posgrados del laboratorio de sanidad vegetal considera que los fitopatógenos han provocado un incremento considerable en el desarrollo de las enfermedades de la planta de agave, lo cual puede ocurrir debido a que existe poca variabilidad genética en esta planta. Es necesario realizar investigaciones que permitan conocer al patógeno y la especie causante de esta enfermedad, para desarrollar estrategias de prevención y control e implementar medidas fitosanitarias para reducir pérdidas económicas a los agricultores y a las industrias tequileras.

## **CAPITULO II**

### **OBJETIVOS**

#### **2.1. Objetivo general**

Amplificar genes conservados de cepas de *Fusarium solani*, con fines de analizar la diversidad de aislados patogénicos a agave, causantes de la pudrición del tallo.

#### **2.2. Objetivos específicos**

Amplificar mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), el gen del factor de elongación 1 $\alpha$ , y de espaciadores transcritos internos (ITS1 - 4). de aislados de *Fusarium solani* que conforman el cepario del laboratorio de fitopatología del Instituto Tecnológico de Tlajomulco Jalisco.



Enviar a secuenciar los fragmentos amplificados al Laboratorio de Nacional de Genómica de la Diversidad (LANGEVIO) en Irapuato, Guanajuato.

Comparar las secuencias obtenidas, con aquellas disponibles en el Gen Bank, para determinar la ubicación taxonómica de estos aislados.

A partir de las secuencias, elaborar un dendrograma que permita saber la diversidad entre aislados de *Fusarium solani*, que servirá de base para un diagnóstico específico de las variantes.

### **2.3 Hipótesis**

Las cepas de *Fusarium solani* aisladas de tejido necróticos de plantas de agave con síntomas de marchitez, van a evidenciar diversidad genética en la secuencia de los fragmentos conservados ITS1-5.6S- ITS2 y factor de elongación 1  $\alpha$ .

## **CAPITULO III**

### **FUNDAMENTO TEORICO**

#### **3.1 *Agave tequilana* Weber var. Azul**

Esta especie fue renombrada por el botánico alemán Franz Weber en 1902 y es la única variedad dentro de la especie, que está permitida para la producción de tequila por el gobierno mexicano. Con fines comerciales el cultivo de agave ha sido propagado vegetativamente a través de los últimos 200 años. Se sabe que la planta de agave son vulnerables a los patógenos, insectos y a condiciones ambientales adversas. Es una planta monocárpica perenne, que presenta el metabolismo ácido de las crasuláceas, o sea que es una planta CAM (Nobel, 1994; Valenzuela, 1994). Estas plantas fijan el CO<sub>2</sub> durante la noche (cuando las temperaturas son más bajas), reduciendo la pérdida de agua por transpiración. Debido a su mayor eficiencia en el uso del agua, las plantas CAM, toleran periodos prolongados de sequía (Nobel *et al.*, 1995).

El género *Agave* se caracteriza por un grupo de plantas monocotiledóneas, económicamente muy importante y cuenta con 136 especies. Algunas de ellas

eran ya consumidas por los antiguos habitantes de México, siendo apetecibles por su alto contenido de azúcar (Nobel, 1998). El *A. tequilana*, es una planta xerófila (que crece en zonas áridas y cálidas). 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 la 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. 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), En cambio la reproducción asexual, se realiza mediante vástagos llamados "hijuelos" (que emergen de rizomas de la planta madre, creciendo cerca de la base de la roseta o mediante hijuelos , pequeñas plántulas que surgen de la inflorescencia) siendo esta la más utilizada para la producción de *A. tequilana* (Rodríguez-Garay *et al.*, 2004).

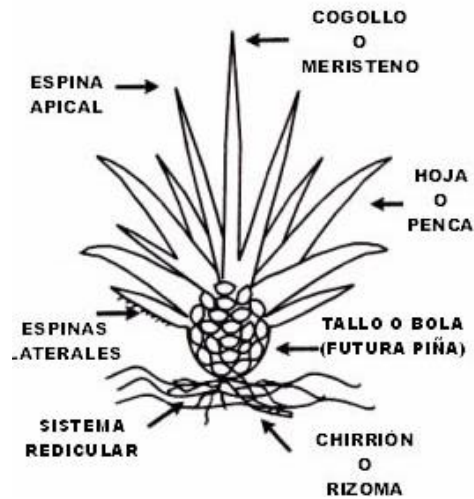


Figura 1. Anatomía del agave.

Del agave tequilero se obtiene el tequila, bebida alcohólica de gran demanda mundial. La industria tequilera alcanzó en 2004 una cifra récord de 109 millones de litros en la exportación de tequila (CRT, 2013). Esta situación ejerció una presión en productores e industriales para generar la materia prima necesaria que permitiera aprovechar el momento de bonanza para este producto, mismo hecho que convirtió a esta industria en un problema complejo desde diversos puntos de vista: agronómico, tecnológico, social, ecológico y por ende, económico.

### 3.2 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).



Figura 2. *Agave tequilana* weber variedad Azul.

### **3.3 Importancia del cultivo**

El cultivo del agave ha adquirido una mayor importancia debido a su creciente demanda. Esto cuando a que cultivo se encuentra protegido bajo la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-1994, la cual establece como única especie admitida para la producción de tequila *A. tequilana*, que haya sido cultivada dentro de territorio protegido por la Denominación de Origen del Tequila (DOT), que abarca todo el estado de Jalisco (124 municipios), siete municipios de Guanajuato, ocho de Nayarit, once de Tamaulipas y treinta de Michoacán. Esta norma no prohíbe el cultivo de *A. tequilana* en otras zonas, si no que el producto sea considerado como tequila, que es lo que respalda la calidad del producto en México (Yoldi, 2000).

### **3.4 Importancia nacional**

El *Agave tequilana* Weber var Azul, es la única especie autorizada para producir tequila. Esta bebida tiene una historia en México desde el siglo XVI. Pero es hasta el siglo XVIII que se produce con licencia, es el siglo XIX en el que se empieza la producción industrial en la región de tequila Jalisco y en el siglo XX se da a conocer nacional e internacionalmente (Martínez *et al.*, 2004).

### **3.5 Importancia económica**

El agave tequilero es uno de los cultivos de mayor importancia económica en México y principalmente en el estado de Jalisco. Algunos de los principales usos de esta planta incluyen: la alimentación, bebidas, construcción, fibras,

medicinas, ornamentales, doméstico, agrícola, entre otros (Macías y Valenzuela, 2010)

### **3.6 El agave en la industria del tequila**

La producción y comercialización del tequila tanto en el mercado interno, como en el de exportación, ha logrado una expansión notable, sobre todo en los años recientes de globalización neoliberal. Así, entre enero de 1994 y diciembre 2006, el tequila fue en el segundo producto del sector de alimentos, bebidas y tabaco que más exportó México, sólo por debajo de la cerveza. Por ello, el tequila es sin lugar a dudas, una de las industrias más importantes en México (Macías y Valenzuela, 2010).

La planta del agave tequilero, es un cultivo que constituye una importante fuente de trabajo para miles de mexicanos y un fuerte ingreso en la economía del país. La industria del tequila, constituye una fuente de empleo, para más de 30,000 personas en el estado de Jalisco.

Para dicho fin, es necesario contar con 40, 000,000 de plantas de agave maduras anualmente, para satisfacer la demanda de producción de tequila y tequila 100%, que ascendió a 261 millones de litros en el 2011 (CRT 2012).

La limitada área agrícola destinada para establecer nuevas plantaciones, aunado a las pérdidas provocadas por plagas y enfermedades en este cultivo, son un problema prioritario que debe ser atendido, para garantizar el abasto

suficiente de esta materia prima, imprescindible para la industria tequilera y el resto de los subproductos.

### **3.7 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 *téquiiff* que significa trabajo, oficio, empleo, encargo y *clan* 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 hidrolizada o cocida y sometida 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 litros en 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 *etal.*, 2010). Actualmente, hasta febrero del año 2011, existen 72 empresas productoras de tequila certificadas por el CRT, que cuentan con 1,151 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).

### **3.8 Plagas y Enfermedades**

#### **3.8.1 Plagas del agave**

Las plagas son animales (insectos, ácaros, arácnidos, etc.) que, al contrario que las bacterias y los hongos, tienen sistema digestivo y excretor, y su dieta es menos específica. Factores como el color de las hojas, pueden ser importantes para el reconocimiento u orientación de la plaga (Gárate y Bonilla 2000).

Dentro de las principales plagas que atacan a este cultivo se encuentra el picudo de agave (*Scyphophorus acupunctatus*) el cual, es un escarabajo de color negro brillante que barrena la superficie de las hojas y genera la pudrición

del cogollo (Rubio y Pérez, 2007); el gusano barrenador (*Acentrocneme hesperiaris*) el cual barrena las hojas del agave de la parte posterior hacia la superior construyendo un opérculo sedoso y debilitando a la planta; y el piojo harinoso (*Pseudococcus sp.*) que forman colonias algodonosas color blanco afectando la capacidad fotosintética de la planta y por lo tanto, el crecimiento y descogolle al atacar la zona radicular y las hojas (González y col., 2007). Como plagas que atacan a la raíz, predominan las larvas de la llamada gallina ciega de diversas especies de coleópteros de los géneros *Phyllophaga*, *Cyclocephala*, *Anomala*, *Macroductylus*, *Euetheola* y otras, causantes de severos daños de las raíces del agave y mordeduras en la parte inferior de la piña, lo que causa que se detenga el desarrollo de la planta (Morón y Morón, 2001).

### **3.8.2 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 inóculo 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-Galleros, 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 *Oiplodinia* 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,2004).

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

- La "Marchitez del agave tequilero", en la cual uno de los agentes causales 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.

### **3.9 Patógenos causantes de marchitez**

La marchitez es una enfermedad que inicia con una infección a través del sistema radicular, en donde el patógeno inactivo se encuentra en el suelo y la cantidad de sus propágulos dependerá de la cantidad de las plantas de agave que hayan enfermado por esta causa en el mismo sitio tiempo atrás. Al establecer una nueva plantación, el hijuelo a formar raíces y el patógeno inactivo, comienza su actividad creciendo hacia las raíces de su nuevo hospedero para iniciar el proceso de infección (Ávila, 2010).

El género *Fusarium*, está clasificado dentro del *Phylum Ascomycota* y son hongos que se encuentran extensamente distribuidos en todo el mundo, desde regiones tropicales hasta templadas (Leslie y Summerell, 2006). Las especies de *Fusarium* son reportadas comúnmente como endófitos, saprofitos y patógenos de varias plantas, especialmente de muchos de los cultivos económicamente importantes a nivel mundial (Nelson y col, 1983).

*Fusarium* está caracterizado por la producción de hifas delgadas, hialinas, septadas y con conidias en forma de canoa conocidas como macroconidias que, en la mayoría de las especies, son producidas en estructuras fructíferas llamadas esporodocios. Además de esto, algunas especies también producen claramente diferentes conidias en el micelio aéreo (a menudo conocidas como microconidias) (Seifert, 1996).

Las especies de *Fusarium* pueden causar enfermedades a las plantas, como marchitez, pudrición, crecimiento anormal y decaimiento. (Zainudin y col., 2001).

El nombre de *Fusarium* está enfocado por la forma de canoa o banana de la macroconidia producida por las distintas especies (Samuels y col., 2001).

Dentro de las especies de este género, se encuentra la responsable de la enfermedad de marchitez de agave, siendo *F. oxysporum* y *F. solani*. Estos hongos ingresan a la planta a través de la raíz y cuando esta muere y se degrada su tejido, se liberan esporas en el que iniciaran un nuevo ciclo de infección en el siguiente ciclo de cultivo (Beckman 1987).

### **3.10 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 microconidióforos 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 tonos de color rosa o púrpura con la edad (Di Prieto *et al.*, 2003), también puede ser de color blanco, rojo, anaranjado, 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. sp* 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 F.solani* (Fravel *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 y le permiten sobrevivir en condiciones desfavorables y se activan cuando la raíz de las plantas crece cerca de las clamidosporas (Sutherland, 1990).

### **3.11 Clasificación taxonómica de *Fusarium***

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

Reino: *Fungy*

División: *Amastigomycota*

Clase: *Deuteromycetes*

Subclase: *Hyphomycetidae*

Orden: *Monialiales*

Familia: *Tuberculariace*

Género: *Fusarium*

Especie: *Fusarium sp.* (Figura. 3)

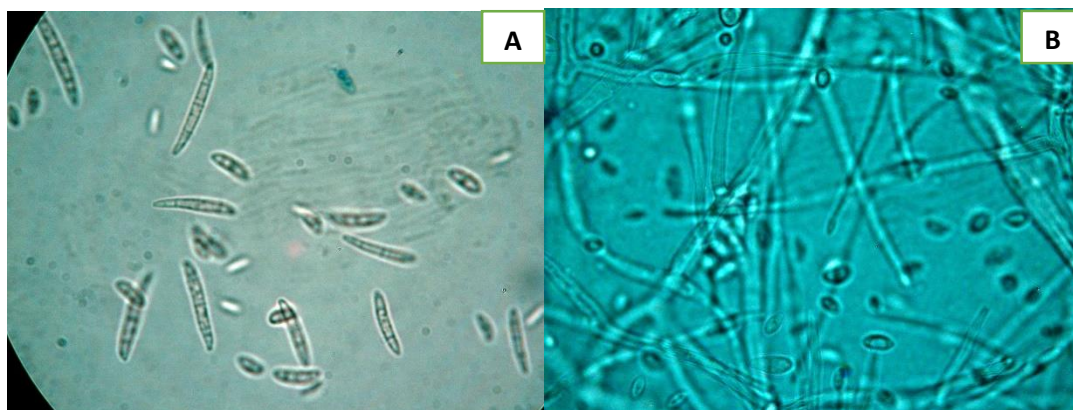


Fig. 3 Apariencia de las macroconidias características de aislados de *Fusarium* (A) y apariencia de los conidióforos largos y microconidias (B) características morfológicas del hongo *Fusarium sp.*

### **3.12 *Fusarium oxysporum.***

*Fusarium oxysporum* es un buen representante entre la microflora de la rizósfera. Mientras que todas las cepas existen saprofiticamente, algunas son bien conocidas por inducir marchitez o pudrición radicular en las plantas, mientras que otras son consideradas como patogénicas.

Causa principalmente marchiteces vasculares, ingresa por el sistema radicular y continua colonizando a través de la epidermis, el córtex y los tejidos de la endodermis, penetrando las vesículas del xilema, utilizándolo para moverse de manera ascendente y establecerse en la planta (Zvirin y col., 2010).

La infección de la planta por *Fusarium oxysporum* es un proceso complejo conformado de varias etapas de interacciones planta – patógeno: reconocimiento de las raíces hospedadas, penetración de la hifa por los diferentes tejidos radiculares, penetración y avance progresivo por el xilema y adaptación al ambiente interno de la planta (Beckman, 1987). Durante la última etapa de infección, el hongo secreta enzimas líticas y toxinas que generan los síntomas de la enfermedad, incluyendo lesiones necróticas, clorosis y marchitez (Zvirin y col., 2010).

### **3.13 *Fusarium solani***

Es un hongo fitopatógeno que causa pudrición de raíz, generando pérdidas económicas considerables en muchos cultivos importantes (Lim y col., 1991). Algunas de sus características morfológicas son: macroconidias en forma de canoa, delgadas. Su microconidia es elipsoidal producida en largas monofiálides en el micelio aéreo.

### **3. 14 Marcadores moleculares**

Los marcadores moleculares son una herramienta necesaria en muchos campos de la biología como evolución, ecología, bio-medicina, ciencias forenses y estudios de diversidad. Además se utilizan para localizar y aislar genes de interés. En la actualidad existen varias técnicas moleculares que nos permiten conocer cómo se encuentran las proporciones de genes en las poblaciones naturales de manera indirecta, como con los análisis de proteínas,

o de manera directa con estudios de ADN. Los diferentes tipos de marcadores se distinguen por su capacidad de detectar polimorfismos en loci únicos o múltiples y son de tipo dominante o co-dominante (Simpson, 1997).

### **3.15 Reacción en Cadena de la Polimerasa**

La PCR fue descrita en 1971 y 1974 por el grupo de Khorana aunque pasó sorprendentemente desapercibida durante años. Su reinención en 1983 por Kary B. Mullis ha representado una de las mayores revoluciones en las ciencias de la vida. Finalmente, la técnica fue automatizada y popularizada en 1988 mediante el empleo de una ADN polimerasa termoestable (Caballero et al., 2001).

La PCR se basa en la amplificación selectiva y exponencial de una región del ADN molde. Esta reacción es catalizada por una enzima ADN polimerasa termoestable, en presencia de dos oligonucleótidos (18- 30 nucleótidos) denominados iniciadores o cebadores, diseñados para que se unan a los extremos de la región a amplificar. Los iniciadores hibridan con el ADN desnaturalizado en dos zonas del mismo, creando así dos fragmentos de ADN de doble cadena que ceban a la ADN polimerasa y delimitan la región que se amplifica. De esta manera la ADN polimerasa duplica un fragmento de ADN, y repitiendo el ciclo varias veces se consigue una multiplicación exponencial del fragmento, que permite obtener una cantidad de ADN y visualizarla a partir de una sola molécula del mismo (Ward, 2001).

### **3.16 Electroforesis**

La electroforesis capilar (EC) es una técnica de separación en la que las sustancias a analizar se separan en función de su diferente movilidad, en sentido y velocidad, bajo la acción de un campo eléctrico. Entre sus ventajas pueden destacar: alta eficacia, rapidez de las separaciones, bajo coste de los análisis, pequeña cantidad de muestra requerida y bajo consumo de reactivos. Además, la EC puede ser aplicada para la separación de una gran variedad de muestras como son compuestos iónicos, polares no iónicos, así como compuestos apolares. También se puede aplicar al análisis de biomoléculas de altos pesos moleculares. (Electroforesis, 2001).

### **3.17 Espaciadores transcritos internos (ITS)**

Estos marcadores genéticos se refieren particularmente a dos secuencias no funcionales del rDNA, intercaladas una entre los genes ribosómicos y que se presen tan consecutivamente en múltiples copias que pueden ir desde cientos a miles, en un arreglo en un grupo y que codifican proteínas idénticas o casi idénticas. White et al. (1990) diseñaron iniciadores específicos para amplificar y secuenciar varios segmentos del rDNA mitocondrial y nuclear en hongos, abriendo la posibilidad de hacer estudios filogenéticos utilizando estos genes (Calle, 2005). La región ITS completa de 600 a 800 pb puede amplificarse fácilmente con iniciadores universales; la naturaleza multicopia de las repeticiones del rDNA hace de esta región una secuencia fácil de amplificar aun cuando se utilizan muestras pequeñas de DNA. Esto lo convierte en uno de los marcadores más populares para llevar a cabo inferencia filogenética a nivel

genérico e infra-genérico (Losdich et al., 2003). Entre las ventajas de los ITS, se menciona su herencia bi-paterna que permite revelar casos de reticulación, hibridación y poliploidía: su universalidad y amplia disponibilidad de “iniciadores” para su amplificación, su relativa abundancia que facilita su aislamiento, su uniformidad intragenómica atribuida al fenómeno de evolución concertada y su amplia variabilidad intergenómica que los capacita para la inferencia genética a diversos niveles taxonómicos, desde especies hasta familia.

### **3.18 Factor de elongación 1- $\alpha$ (EF- $\alpha$ )**

El factor de elongación en un gen que codifica una proteína altamente conservada que posee un importante papel en el ciclo de alargamiento y síntesis de la proteína en las células eucariotas (Merrick, 1992). En eucariotas el EF-1 $\alpha$  es la segunda proteína más abundante después de la actina, construyendo del 1 al 2 % del total de la proteína en el crecimiento normal de la célula (Condeelis, 1995). Las bandas cargadas de moléculas de RNAt transportan hacia los sitios receptores de los ribosomas adyacentes a una cadena polipeptídica en crecimiento. El gen EF- $\alpha$  puede presentarse en múltiples copias en algunos *Ascomycota* y *Zygomycota*; una de las ventajas que presentan el uso del gen que amplifica para el EF-1  $\alpha$  es su capacidad para resolver filogenias a nivel de especie, así como las divergencias más profundas en los hongos.

### **3.19 Método de secuenciación Sanger**

El método de Sanger se basa en el uso de la ADN polimerasa para sintetizar cadenas de ADN con una terminación específica. Con este método se generan fragmentos de ADN de todos los tamaños posibles que se puedan distinguir entre sí, por el tipo de marcaje que llevan o por la incorporación de un terminador específico. Las enzimas del tipo de la ADN polimerasa requieren de un templado de ADN de cadena sencilla, y realizan la síntesis de la hebra complementaria extendiéndola a partir de un iniciador en dirección 5' a 3'. Entre los componentes de la reacción se incluyen nucleótidos que no tienen un grupo hidroxilo en su extremo 3' (ddNTP), para poder obtener una terminación específica en las cadenas. Una vez que el ddNTP se incorpora como el residuo terminal, evita que la cadena de ADN sintetizada continúe extendiéndose. La incorporación de los ddNTPs es al azar, de tal forma que se obtienen fragmentos de todos los tamaños posibles que terminan en un residuo específico (Sanger, F. 1999).

### **3.20 Dendrograma**

Dendrograma es una representación gráfica en forma de árbol que resume el proceso de agrupación en un análisis de clústers. Los objetos similares se conectan mediante enlaces cuya posición en el diagrama está determinada por el nivel de similitud/disimilitud entre los objetos, lo que hace importante el estudio de esta diversidad mediante métodos cuantitativos que ayuden a agrupar poblaciones de un mismo género o especie, mediante similitudes de caracteres homólogos, Sokal y Sneath (1963). Propusieron el tratado de

taxonomía numérica, el cual mediante variables binomiales, multinomiales y cuantitativas analizadas con técnicas estadísticas multivariadas, agrupa poblaciones de acuerdo a similitudes de dichos caracteres, con la finalidad de facilitar su interpretación, desde el punto de vista taxonómico o agronómico de acuerdo con el interés del investigador. Para ello se hace referencia al concepto de unidad taxonómica operativa (OTU, “operational taxonomic unit”, por sus siglas en Inglés), que es definida como aquellos individuos o poblaciones que son el objeto del estudio y pueden ser representados en un dendrograma (González–Andrés, 2001).



## **CAPITULO IV**

### **PROCEDIMIENTOS**

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Fitopatología del Instituto Tecnológico de Tlajomulco Jalisco y en los predios comerciales de agave denominados San Juan, en el municipio de Zapotlanejo y Santo Domingo, en el municipio de Acatic, Jalisco, propiedad de la empresa Cuervo de México S. A. de C. V.

#### **4.1 Descripción del area de estudio**

##### **4.1.1 Localización geografica**

El Instituto Tecnológico de Tlajomulco se encuentra ubicado en el Km. 10 de la carretera a San Miguel Coyutlán, en el municipio de Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco. El laboratorio de Fitopatología, se ubica en las instalaciones de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de este instituto.

## 4.2 Muestreo en campos comerciales de agave tequilero

Con el fin de obtener aislados de hongos del género *Fusarium*, se realizó un muestreo en el predio comercial San Juan, de agave tequilero, propiedad de la empresa Cuervo de México S. A. de C. V, el objetivo del muestreo era tomar muestras de tejido necrótico, de plantas afectadas por pudrición del tallo.

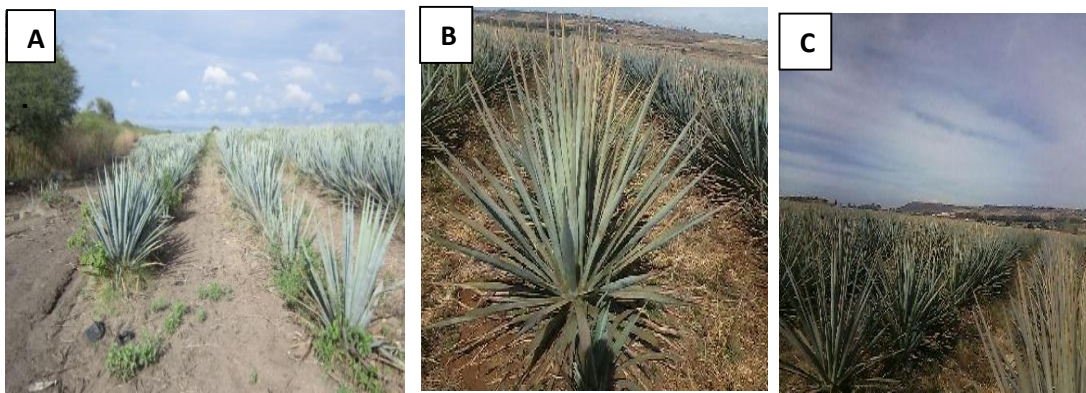


Figura 4. Apariencia de plantas de agave sanas (A) y enfermas (B y C) en predios comerciales de agave tequilero propiedad de la empresa Cuervo de México S.A de C.V.

La selección de las plantas a muestrear se realizó primeramente por observación visual (Figura 4). Una vez identificado el síntoma de marchitez en campo, se tomó una muestra de tejido necrótico de que se llevó al laboratorio de Fitopatología. Posteriormente, se hicieron siembras de fragmentos del tejido dañado en medio de Papa-Dextrosa-Agar (PDA), a partir de la región que presentaba la necrosis, contigua a regiones que no tenían esta necrosis, ya sea

en raíz, tallo o corona. Como es común, junto con los fitopatógenos en el tejido necrosado, existen bacterias hongos saprófitos, que también crecían, por lo que se requirió de purificar los aislados de hongos.

### **4.3 Aislamiento a partir de tejido enfermo**

Para poder realizar el aislamiento de los fitopatógenos, primeramente se esterilizó el material necesario, que consistía en frascos de vidrio transparentes pequeños de aproximadamente cinco ml, servilletas de papel dentro de bolsas de polietileno de doble densidad cerradas, agua destilada. Las pinzas y las agujas de disección fueron esterilizadas a la flama de un mechero de alcohol. Posteriormente se preparó una solución de 10% de alcohol, 10% de cloro y 80% de agua destilada (Solución 1:1:8). Esta solución se utilizó para la desinfección superficial del tejido dañado.

La Figura 5, muestra cómo se cortaron los trozos con un área aproximada de 1 cm<sup>2</sup>, dependiendo si la muestra era de tallo, corona o raíz. Estos fragmentos se desinfectaron sumergiéndolos en la solución 1:1:8 durante 2 minutos en un frasco de vidrio, enseguida se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril en dos frascos de vidrio adicionales, después, las muestras se secaron con las servilletas estériles y se sembraron en cajas de Petri con medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar (PDA), para que mediante una incubación a 28 °C por más de tres días, lograr el crecimiento del hongo. Para realizar este procedimiento se basó del reporte por Gil, (1995).



Figura 5. Muestras de tallo y corona de agave, con tejido necrosado o bien con destrucción o taponamiento de haces vasculares.

#### 4.4 Purificación de hongos fitopatógenos

Luego de transcurrido el periodo de incubación del aislado, se retiró una porción de micelio del centro de la colonia y se colocó en un porta objetos dentro de una gota de el colorante azul de algodón-lactofenol, enseguida se cubrió con un cubreobjetos y se observó al microscopio compuesto, utilizando primero el objetivo 10X para detectar la forma y ordenamiento característico de las esporas; posteriormente, se utilizó el objetivo de 40X para realizar una observación más detallada. Una vez identificado el hongo, primeramente como del genero *Fusarium*, por sus conidios en forma de canoa como se aprecia en la Figura 6A, adicionalmente se debían observar conidióforos largos con una microconidia en el extremo como se muestra en la Figura 6B. Corroborado la presencia de *F. solani*, se procedió a resembrar un fragmento similar al

observado en una nueva caja Petri con medio PDA para el crecimiento puro del hongo, en concordancia con el protocolo de identificación planteado por Agrios, (1998).

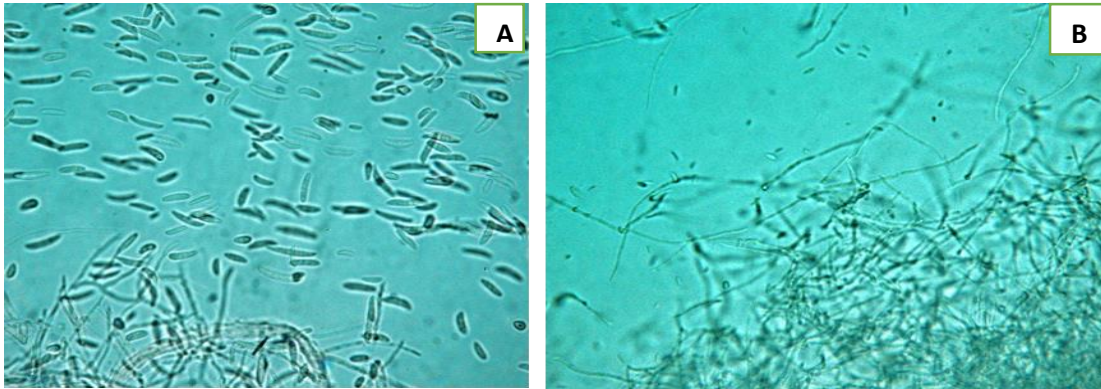


Figura 6. Apariencia de las macroconidias características de aislados de *Fusarium* (A) y apariencia de los conidióforos largos y microconidias (B) características morfológicas del hongo *Fusarium solani*.

#### 4.5 Cultivos monospóricos

Para obtener cultivos monospóricos que permitieran tener una uniformidad genética en las cepas de estudio, primeramente se preparó una suspensión de conidios del hongo, agregando 8 ml de agua destilada sobre el micelio de un cultivo puro. Esta suspensión se vertió en un contenedor estéril y con una micropipeta, se colocaron dos alícuotas de 50  $\mu$ l en una cámara de Neubauer y se cubrieron con un cubreobjetos. La cámara se llevó a un microscopio compuesto para proceder al conteo de conidias (Figura 7). Después de haber contado las conidias, se procedió a elaborar una suspensión de 5  $\mu$ l para

sembrarlos en una nueva caja Petri con medio de cultivo PDA, la que se dispersará sobre su superficie con un triángulo de aluminio, después de haber dispersado los 5 µl, se incubaron a 28 °C durante 24 h, transcurrido este tiempo, se buscó localizar el crecimiento inicial de una sola ramificación micelial a partir de una espora y a partir de ese crecimiento observado, se cortó un pequeño fragmento de agar que llevaba el nuevo crecimiento, transfiriéndolo a una nueva caja de medio de cultivo PDA, para su crecimiento puro a partir de la colonia de una sola espora (Leslie, 2006).

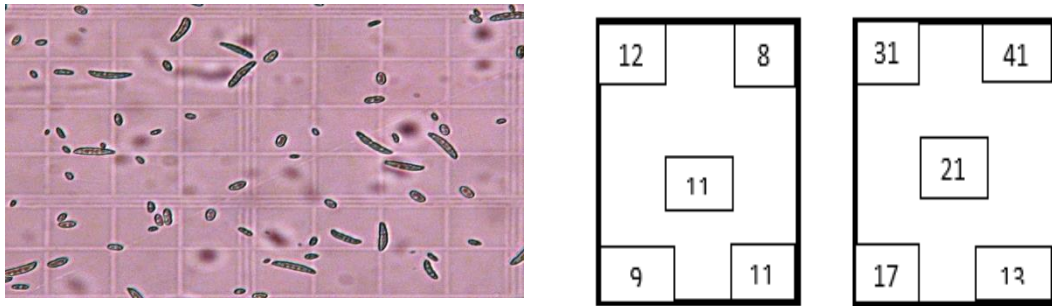


Figura 7. Apariencia de conidios de *Fusarium* para en la cámara de NeuBauer utilizada para determinar su concentración.

Los cálculos que se realizaron para determinar la densidad de conidios en una suspensión, son la suma de los cinco cuadros, se multiplica primero por cincuenta y después por mil como se ejemplifica a continuación tomando datos mostrados en la Figura 7.

$$\underline{\underline{((51 \times 50 \times 1000) + (245 \times 50 \times 1,000))/2 = 4,350,000}}$$

La cantidad obtenida serán los conidios que hay en un ml de la suspensión de donde se sacaron los 50 µl. Se promedian los dos conteos, con la finalidad de

calcular el colocar como máximo en la caja de Petri, una cantidad de suspensión de 20 a 30 conidios, y así facilitar su identificación y transferencia a otra caja de Petri.

#### 4.6 Cepario

Después de obtener el cultivo monosporico se cortaron cuadros pequeños de papel filtro que se esterilizaron dos veces a 121 °C y 15 psi, para eliminar la carga microbiana que estos pudieran tener. Ya estériles, seis de estos fragmentos de papel se colocaron en forma circular dentro de una nueva caja con medio de cultivo PDA (Figura 8). Antes de utilizarse estas cajas, se mantuvieron a temperatura ambiente durante 48 h, para detectar aquellas cajas que tuvieran crecimiento de microorganismos contaminantes. Después del periodo en observación, se sembró en el centro de las cajas, un trozo de agar que tuviera micelio del cultivo monosporico, para que con el crecimiento del micelio del hongo puro, se colonizaran los fragmentos de papel filtro estéril (Leslie, 1953).

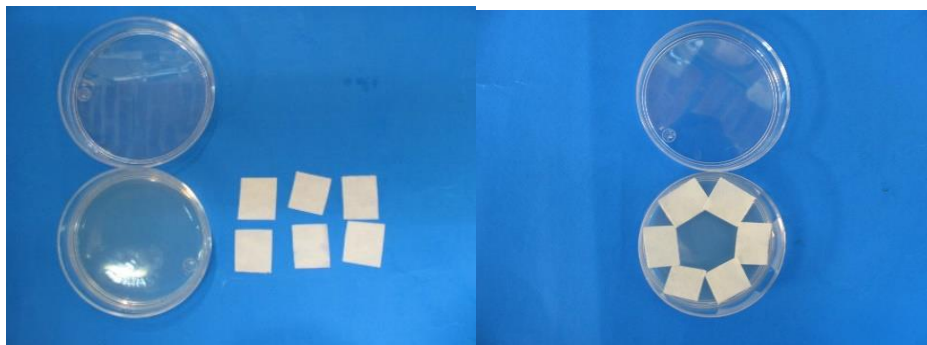


Figura 8. Forma en la que se colocaron los fragmentos de papel filtro estéril sobre cajas con medio de cultivo PDA.

#### **4.7 Crecimiento de micelio para la extracción de DNA**

Con el fin de extraer el DNA de los hongos purificados, se cortaron círculos de 8 cm de diámetro de papel celofán dulce, que se lavaron previamente con agua tibia en tres ocasiones para retirar la capa de azúcar que contiene este tipo de papel celofán. Estos círculos se colocaron dentro de una caja Petri de vidrio, para esterilizarlos de preferencia dos veces y así evitar que sobreviviera cualquier microorganismo. Después de esto, en cámara de flujo laminar, se colocaban, con precisión sobre el medio de cultivo estéril de una caja de Petri y se dejaron en observación al medio ambiente durante 24 h, para corroborar que no se tenía crecimiento de microorganismos (Figura 9). Después de transcurrido este periodo de tiempo, se tomó un fragmento de medio de cultivo y micelio de una caja con cultivo monosporico de la cepa y se colocó en el centro del área cubierta con papel celofán en la caja de Petri, para el crecimiento de micelio (Leslie, 1953). Después de un periodo de 4 a 5 días de crecimiento de micelio en el papel celofán se retiró con una aguja de intercesión estéril y se procesó con el kit ZR Plant/Seed/DNA Miniprep Zymo Research que a continuación se menciona para la extracción de DNA.



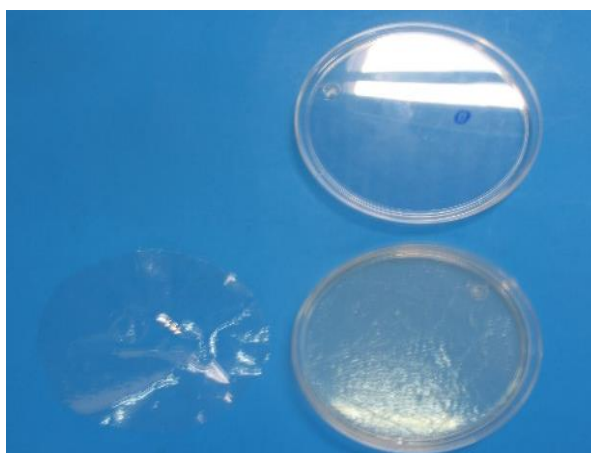


Figura 9. Colocación del papel celofán para crecimiento de micelio separado del medio de cultivo y así poder cosechar esta biomasa fácilmente.

#### **4.8 Extracción de DNA.**

Se realizó la extracción de DNA de las muestras P4, C7, R.A, P3, A3, TALLO DE AGAVE 1, TALLO DE AGAVE 2 utilizando el KIT de extracción ZR Plant/Seed/DNA Miniprep Zymo Research. Los pasos del protocolo utilizado Bio-Rad (2001) se mencionan a continuación.

Para una eficiencia óptima, se agregó  $\beta$ -mercaptoetanol al Plant/Seed DNA Binding Buffer a una dilución total de 0.5% (v/v). (50 microlitros en 100 microlitros es el 50%) Antes de iniciar, los tubos verdes Spin filters necesitan prepararse antes de su uso:

- 1.- Partiendo la base de los tubos verdes Spin filters.
- 2.- Se insertó en un tubo colector.
- 3.- Se centrifugó en una microcentrífuga a exactamente 8,000 x g x 3 minutos.
- 4.- Se agregaron 150 mg de tejido de micelio en el tubo ZR Bashing BeadLysin y se le agregan 750 µl de la solución de Lysis.
- 5.- Se aseguró un tubo colector de 2 ml a un Vortex y se agitó a la máxima velocidad durante 10 minutos.
- 6.- Se centrifugo el tubo ZR Bashing Bead Lysis en microcentrífuga a 10,000 X g X 1 minuto.
- 7.- Se transfirieron 400 µl del sobrenadante, a un filtro Zymo-spin IV (tubo de tapa naranja) en el tubo colector y se centrifugó a 7,000 X g X1 minuto.
- 8.- Se agregaron 1,200 µl del buffer Plant/Seed DNA Binding Buffer al filtrado en el volumen colectado del paso 4 y se mezclaron.
- 9.- Se transfirieron 800 µl de la mezcla del paso 5 a la columna Zymo spin IIC en el tubo colector y se centrifugaron a 10,000 X g X 1 minuto.
- 10.- Se desechó el líquido que pasó a través del tubo colector y repitió el pasó

6

- 11.- Se agregaron 200  $\mu$ l DNA pre-wash buffer a la columna Zymo-spin IIC al Zymo – spin IIC column en un nuevo tubo colector y centrifugaron a 10,000 rpm X 1 min
- 12.- Se agregaron 500  $\mu$ l del buffer Plant/Seed DNA wash Buffer a la columna Zymo-spin IIC y se centrifugaron a 10,000 rpm x 1min.
- 13.- Se transfirió la columna Zymo-Spin IIC a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml y se le agregaron de 50-100  $\mu$ l del buffer de elusión de DNA directamente a la columna y se centrifugó a 10,000 rpm por 30 seg para eluir el DNA.
- 14.- Se transfirió el DNA de los tubos spin filters del paso 10 a un tubo de microcentrífuga de 1.5ml (tapa verde) y se centrifugó a 8,000 rpm por 1min y el DNA filtrado, es desde ese momento adecuado para PCR y otras aplicaciones

#### **4.9 Electroforesis**

Para determinar la calidad y cantidad del DNA extraído, se corrió una alícuota de 2  $\mu$ l en un gel de agarosa. (Nelson y Cox, 2001). Siguiendo el protocolo que se describe a continuación.

- 1.- Para formular al TAE 1 X, se diluyó el TAE 50X a razón de 1 ml en 50 ml de agua destilada (Figura 10A).

- 2.- Para obtener la garosa fundida, se pesaron 0.8 g de agarosa en polvo Sigma® por cada 100 ml de TAE 1X.
- 3.- Se mezcló la solución en un matraz de Erlenmeyer sin tapón.
- 4.- Se calientó la mezcla en un horno de microondas durante 1:20 min, agitando la mezcla tomando el matraz con un guante de asbesto.
- 5.- Se dejó enfriar la mezcla durante 30 seg y se le agregó SYBR safe® (Marca del producto) en una proporción de 1 µl por cada 20 ml de solución agarosa en TAE 1x.
- 6.- Se limpiaron y sellaron con dos tapones, los bordes del molde de plástico en la cámara de electroforesis, que sirve para dar forma al gel de agarosa.
- 7.- La mezcla de SYBR safe® y la agarosa fundida se vació en el molde de la cámara de electroforesis al añadir de 40 a 90 ml de agarosa fundida dependiendo del tamaño del gel que se quería formar (Figura 10B).
- 8.- Se colocó el peine con el fin de formar los huecos rectangulares (pozos) en el gel de agarosa (Figura 10C).
- 9.- Se dejó solidificar durante 15 min.
- 10.- Ya solidificado el gel, se retiró el peine y se colocó el gel en la cámara de electroforesis (Figura 10D).
- 11.- Se llenó la cámara de electroforesis de la solución TAE 1X hasta cubrir los huecos del gel agarosa IBI científico® (Figura 10E).

- 12.- En el primero de los pozos, se colocaron 2  $\mu$ l de un marcador de peso molecular de DNA hypper ladder boline® de 100 pb.
- 13.- En los pozos siguientes, se colocaron las muestras de DNA, mezclándolo con 2  $\mu$ l de buffer de carga de azul de bromofenol 6x.
- 14.- Se tapó la cámara de electroforesis y se conectó a la fuente de poder; considerando las condiciones de 90 voltios, 90 mili- amperes y 11 watts durante 45 min (Figura 10G). Terminado el tiempo de corrida del gel en la cámara de electroforesis, se sacó y se colocó en el transiluminador de luz azul de alta calidad para la visualización de ADN y ARN (Figura 7H), y de esa manera se corroboró la cantidad y calidad del DNA extraído.

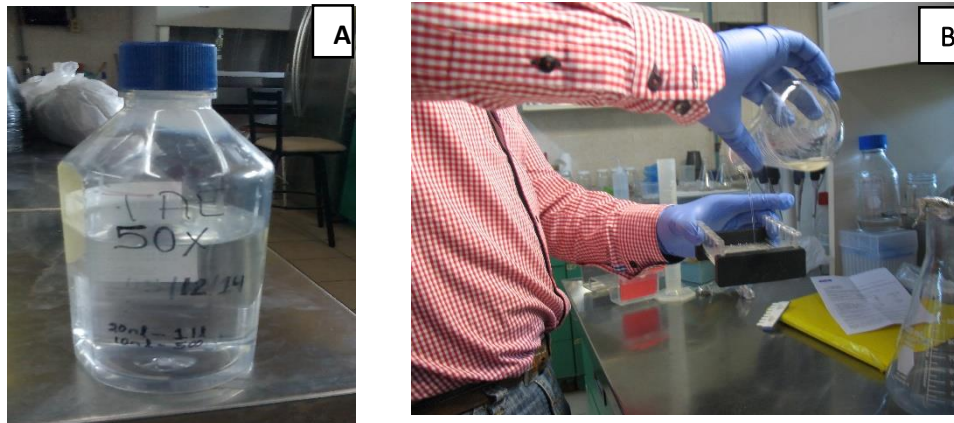


Figura 10. Solución TAE 50X para diluir a 1X (A), Colocación de SYBR safe® y la agarosa fundida en el molde de la cámara de electroforesis (B).

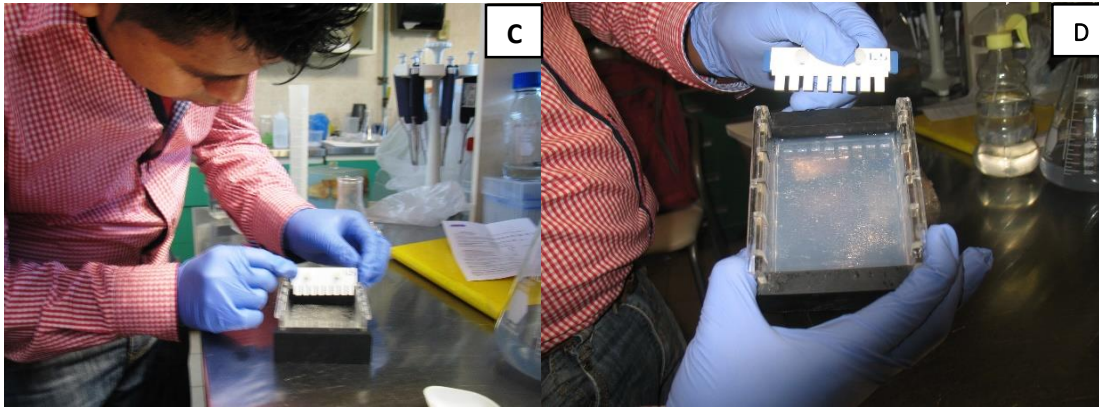


Figura 10. Colocación del peine para formar huecos rectangulares (pozos) en el gel de agarosa IBI scientific® (C), Extracción del peine del gel solidificado (D).

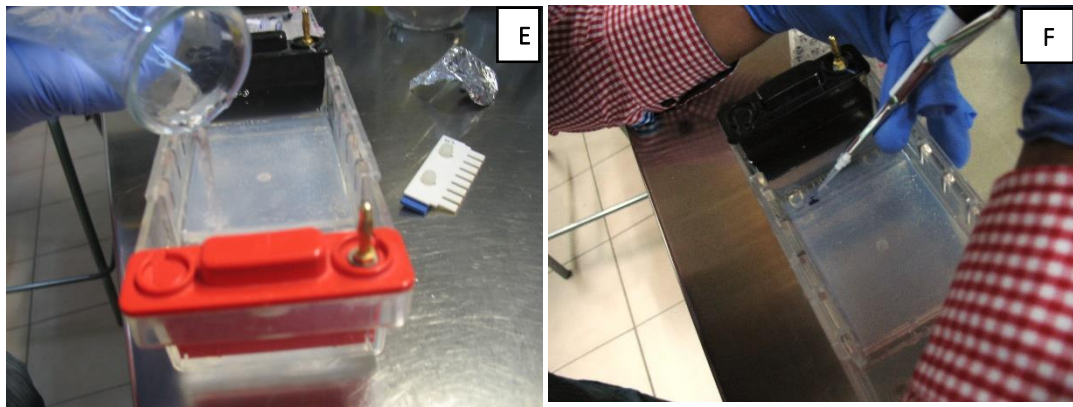


Figura 10. Llenado de la cámara de electroforesis de la solución TAE 1X hasta cubrir los huecos del gel agarosa (E), Colocación de las muestras de DNA, mezclado con 2  $\mu$ l de buffer de carga (F).

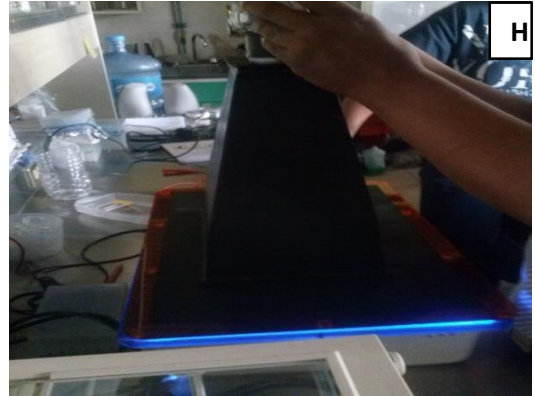
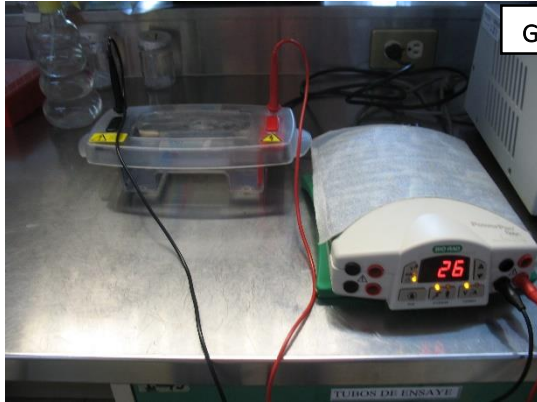


Figura 10. Fuente de poder considerando las condiciones para correr el gel de agarosa (G), Visualización de ADN y ARN en el transiluminador de luz azul de alta calidad (H).

#### **4.10 Amplificación por PCR del fragmento ITS1-5.8S-ITS2 y del factor de elongación $1\alpha$**

Para identificar las distintas especies de hongos asociados con la pudrición del tallo de agave se elaboraron las siguientes amplificaciones.

Se realizó las amplificaciones por elongación uno alfa ( $EF-1\alpha$ ) y los espaciadores transcritos internos (ITS1-5.8S-ITS2), de las 7 cepas de hongos del generó *Fusarium* P4, C7, RAIZ 1, P3, A3, TALLO 1, TALLO 2, obtenidas en los muestreos de los predios afectados por la pudrición del tallo del agave.

#### 4.11 Amplificación del factor de elongación 1 $\alpha$ (EF-1 $\alpha$ )

Se estandarizó la mezcla funcional de ingredientes, para la realización de la amplificación del fragmento EF-1 $\alpha$ , en un volumen total de 12.5  $\mu$ l de reacción. Esta mezcla contenía 5.88  $\mu$ l de agua Mili-Q; 1.25  $\mu$ l de Buffer 10X; 0.625  $\mu$ l de Mg Cl<sub>2</sub>; 0.3  $\mu$ l de Taq DNA polimerasa (Amplicasa®) de CLP; 1.0  $\mu$ l de iniciador 1H ATG GGG TAA GGA GAC AAG AC<sub>3</sub>, 1.0  $\mu$ l de iniciador 2T ATG GGG TAA GGA GAC AAG AA<sub>3</sub>, 1.0  $\mu$ l de *dNTPs* y 1.5 de *DNA*. Las mezclas se colocaron en un termociclador *Corbett® modelo Palm Cycler* para realizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con las siguientes condiciones de temperatura: Un paso inicial de 95°C por 2 min; 10 ciclos de 94°C por 1 min; 59°C por 1 min y 72°C por un minuto de desnaturalización, anillamiento y extensión respectivamente y un paso de extensión final a 72° por 6 min (*O´Donnell, k., et al, 1998*). Después de terminar el proceso de amplificación se verifico la amplificación mediante una electroforesis en gel de agarosa de una aliquota de 2  $\mu$ l del fragmento amplificado. Si se obtuvieron resultados favorables, se amplifico nuevamente este fragmento, pero en volumen de 50  $\mu$ l. Para obtener material suficiente para enviar a secuenciar las muestras amplificadas, que contenía: 23.52  $\mu$ l de agua Mili-Q, 5  $\mu$ l de amortiguador Buffer 10X, 2.5  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub>, 1.2  $\mu$ l de Taq DNA polimerasa (Amplicasa®), 4  $\mu$ l de iniciador 1H, 4  $\mu$ l de iniciador 2T, 4  $\mu$ l de *dNTPs*, 6  $\mu$ l de *DNA*. Las mezclas se sometieron a la amplificación PCR, y visualización en gel de electroforesis de acuerdo a las condiciones mencionadas anteriormente.



#### **4.12 Amplificación de los espaciadores transcritos internos (ITS)**

Se realizó la estandarización de mezclas para la amplificación del fragmento ITS1-5.8S- ITS2, en un volumen total de 12.5 µl de reacción, que contenía 6.5 µl de agua Mili-Q, 1.25 µl de amortiguador Buffer 10X, 0.625 µl de Mg Cl<sub>2</sub>, 0.125 µl de Taq CLP Amplicasa, 1.0 µl de iniciador 1H, 1.0 µl de iniciador 2T, 1.0 µl de *dNTPs*, 1.0 de *ADN*. Las mezclas se sometieron a PCR con las siguientes condiciones de temperatura: 94° por 2 min desnaturalización inicial, 94° por 1 min desnaturalización, 59° por 1 min anillamiento , 55° por 1 min extensión, 72° por 6 min extensión final (White et al, 1990) . Después de terminar el proceso de amplificación se verifico las reacciones de PCR mediante la electroforesis en gel de agarosa.

Se amplifico nuevamente en un volumen de 50 µl para enviar a secuenciar las muestras amplificadas incrementando proporcionalmente los componentes cocktail de amplificación. Considerando su cantidad en la reacción de 12.5 µl. Terminada la amplificación se volvió en un gel de agarosa, con las condiciones anteriormente mencionadas.

#### **4.13 Purificación de muestras de DNA amplificadas**

Las muestras amplificadas en el factor de elongación 1α y fragmentos ITS1-5.8S-ITS2, se purificaron independientemente utilizando el kit comercial Gel/PCR DNA Fragment Extracción Kit®, con el protocolo PCR Clean Up Protocolo de IBI, siguiendo las indicaciones del fabricante que básicamente consistían en:

*Pasó 1: Muestra de preparación.*

- Se colocaron los 50  $\mu$ l del producto de PCR en un tubo de microcentrífuga.
- Se añadieron 5 volúmenes de buffer DF a 1 volumen de la muestra y se mezclaron mediante agitación.

*Paso 2: DNA Binding.*

- Se colocó una columna DF en un tubo de colector.
- Se aplicó la mezcla de la muestra a partir del paso anterior en la columna DF.
- Se centrifugo a 6,000 x g (8,000 rpm) durante 30 segundos.
- Se desechó el líquido filtrado y se colocó la columna DF, en un tubo colector.

*Paso 3: Lavado.*

- Se añadieron 500  $\mu$ l de buffer de lavado (etanol añadido) en la columna DF.
- Se centrifugo a 6.000 x g (8,000 rpm) durante 30 segundos.
- Se desechó el filtrado y se colocó la columna DF de nuevo en un tubo de colector.
- Se centrifugo de nuevo durante 2 minutos a 14.000 rpm, para secar la matriz de la columna.

#### Paso 4: Elución del DNA

- Se colocó la columna seca a un nuevo tubo de centrífuga.
- Se añadieron 50 µl de buffer de elución o agua, en el centro de la matriz de la columna.
- Se dejó reposar la columna durante 2 minutos, hasta que el buffer de elución se absorbió por la matriz.
- Se centrifugo la columna a 14,000rpm, para eluir el DNA purificado.

Después de haber terminado la purificación de los fragmentos EF-1 $\alpha$  e ITS 5.8S-ITS2, se volvieron a correr en un gel de agarosa, para corroborar su pureza y cantidad suficiente, para enviar a secuenciar.

#### **4.14 secuenciación nucleotida**

Las muestras amplificadas por PCR se enviaron a secuenciar al Laboratorio de Nacional de Genómica de la Diversidad (LANGEBIO), en Irapuato, Guanajuato. Estos amplificados se secuenciaron mediante electroforesis capilar por el método de diodeoxi de Sanger *et al* (1997). Se utilizaron los terminadores Bigdye® v3.1 en un secuenciador Applied Biosystems modelo 3730XL. Para cada secuenciación, se utilizaron 10 µl del producto de amplificación, a una concentración aproximada de 30 a 50 ng /µl, para la secuenciación con los iniciadores de ambos sentidos.

#### **4. 15 Edición y ensamblaje de secuencias**

Las secuencias amplificadas, con los oligonucleótidos utilizados en este estudio, se editaron con el programa BioEdit (Hall, 1999). La edición de las secuencias se realizó con criterios conservadores, como el recorte de los extremos de la secuencia que mostraban bajo nivel de calidad en la lectura. Las secuencias editadas se ensamblaron a partir del par de secuencias generadas para cada producto de PCR, utilizando el programa BioEdit ([http://www.mbio.ncsu.edu /BioEdit/](http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/)), permitió realizar un alineamiento múltiple de las secuencias generadas en ambos sentidos para cada región,

#### **4.16 Ubicación taxonómica de acuerdo al GenBank**

Las secuencias obtenidas de cada aislado, de los dos fragmentos amplificados, se compararon con las secuencias de fragmentos similares disponibles, en la base de datos del GenBank del NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica) utilizando la herramienta Mega BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), para secuencias altamente similares. Para establecer las relaciones filogenéticas mediante dendograma.

## CAPITULO V

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 5.1 Muestreo en campos comerciales de agave tequilero

Durante los muestreos se observó que la incidencia de la enfermedad de pudrición tallo de agave en los predios del municipio de San Juan, fue mayor que en Santo Domingo. Además también fue bastante notorio la distribución espacial de la enfermedad, cuando la incidencia es alta, presentan grados de marchitez altos y en casos extremos muerte o destrucción de la planta (Figura 11).



Figura 11. Plantas de agave tequilero con síntomas de pudrición de tallo representada los síntomas en las puntas de las hojas encorvadas y marchitas

## 5.2 Aislamiento

En la Figura 12, se muestra la apariencia de los aislados de hongos del género *Fusarium sp*, obtenidos de los muestreos de plantas enfermas, en los predios San Juan en el municipio de Zapotlanejo, Jalisco y en el predio Santo Domingo, en el municipio de Acatic, Jalisco.

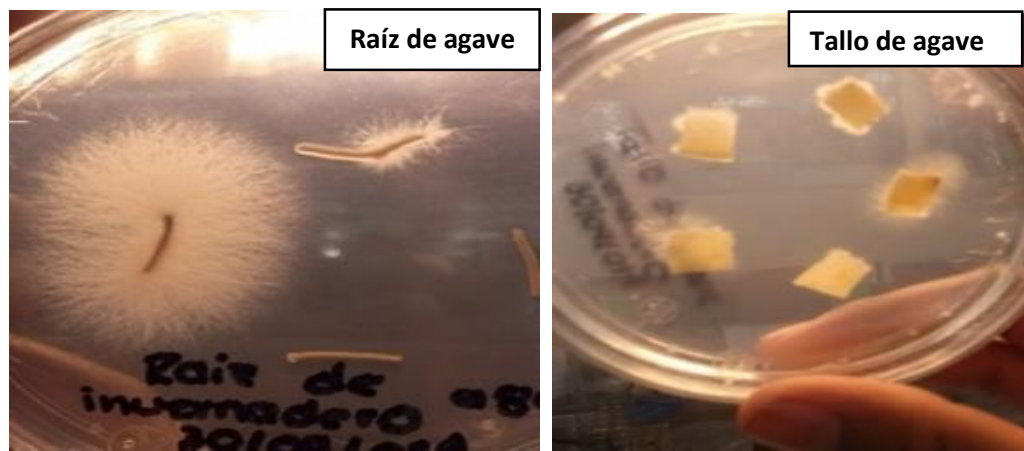


Figura 12. Aislamientos del patógeno *Fusarium sp*. obtenidos a partir de muestras de raíz y tallo de plantas de agave, de los predios San Juan y Santo Domingo.

En total se obtuvieron 12 muestras recolectadas en los predios afectados por la pudrición de tallo de agave. Se eligieron siete muestras que fueron las más patogénicas con las claves de identificación: P4, C7, R.A, P3, A3, TALLO DE AGAVE 1, TALLO DE AGAVE 2, para realizar los aislamientos como se observa en la (figura 12). Se sembró el material obtenido de las plantas con síntomas de pudrición de tallo en cajas Petri con Papa-Dextrosa-Agar (PDA), donde se logró

el crecimiento del hongo *Fusarium sp.*, y cumpliendo de esta forma con la adaptación del protocolo por (Gil, 1995). Según Loera-Quezada (1999) obtuvo resultados que mostraron que *A. tequilana* es altamente susceptible a tres especies de *Fusarium* (*F. solani*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum*), siendo *F. solani* la especie más agresiva. Por otra parte (Aceves 2003; CRT 2005) asocian a esta enfermedad “marchitez del agave” con la “pudrición del tallo”.

### 5.3 Purificación

En la Figura 13 se observa el crecimiento puro de uno de los hongos obtenidos, que tenía las características de *Fusarium solani*, que se resembró para su purificación.

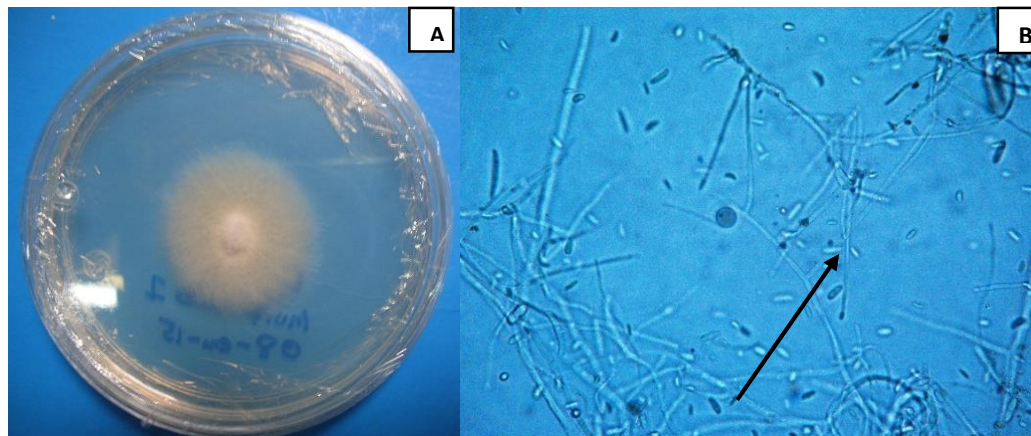


Figura 13. A) Cultivo puro de *Fusarium solani* obtenido a partir de plantas de agave; B) Morfología de *Fusarium solani*.

La purificación se inició a los dos días de crecimiento de los siete aislados en estudio del patógeno causante de la pudrición del tallo de *A. tequilana* en medios de cultivo Papa-Dextrosa-Agar (PDA), las características observadas fueron: forma redonda, el color variaba entre crema, púrpura, blanco, café claro, superficie lisa y en algunas rugosas, la apariencia del borde varia, entre acerrada y ondulada (Figura 13 A). Para observar la estructura del hongo se llevó a cabo a través de un montaje en un microscopio compuesto, mediante la técnica de tinción de esporas donde se observaron la forma y ordenamiento característico de las esporas en forma de canoa y conidióforos largos con una microconidia en el extremo como se muestra en la (Figura 13 B) corroborado la presencia de *Fusarium sp*, esto coincide con lo reportado Ávila (2010) quien reporta Veinte y siete de veintinueve aislados *Fusarium sp* del tejido del tallo de las plantas de campo, de acuerdo a las características macroscópicas en PDA.



#### 5.4 Cultivo monosporico

En la figura 14 se muestra el crecimiento inicial obtenido del patógeno *Fusarium sp.* de una sola ramificación micelar a partir de una sola espora.

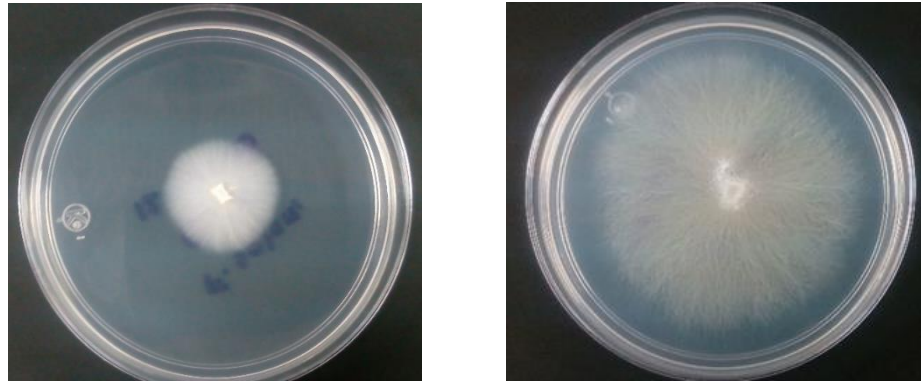


Figura 14. Desarrollo de un cultivo monosporico proveniente de una conidia.

En los resultados obtenidos en este estudio se identificó que el patógeno que crecía dentro de la caja petri pertenecía al género de *fusarium sp.* donde se logró localizar el crecimiento inicial de una sola ramificación micelar a partir de una espora, donde se cortó un fragmento de agar que llevaba el nuevo crecimiento, transfiriéndolo en una nueva caja de medio de cultivo PDA, para su crecimiento a partir de una sola colonia de una espora. Este procedimiento se realizó en cada una de las siete cepas en estudio que permitieron tener una uniformidad genética (Figura 14). Cañedo (2004), Para establecer una colección confiable, es necesario partir de aislamientos monospóricos que garanticen la autenticidad y pureza de los mismos, comparando resultados con Leslie y Summerell (2006) la caracterizaron de los cultivos monosporicos es mediante la forma y tamaño de las fiálides del patógeno de *Fusarium sp.*

## 5.5 Cepario.

En la Figura 15, se muestra el crecimiento de micelio del cultivo monospóricos obtenido en fragmentos de papel estéril, para la conservación del cepario del laboratorio de sanidad vegetal.



Figura 15. Cepario de cada muestra.

Los resultados obtenidos en este estudio, se lograron después de que el micelio de las cepas había colonizado los fragmentos estériles de papel filtro que se colocaron en cajas Petri estériles y secas, sellándolo con cinta Cleanpack, para guardarse posteriormente en refrigeración a una temperatura de 4 °C como se

muestra en la Figura 15, se lograron siete ceparios donde se identificó las cepas de la siguiente manera, cinco ceparios de *Fusarium solani* registradas con las claves: P4, C7, A3, TALLO DE AGAVE 1, TALLO DE AGAVE 2, y dos ceparios con las claves: P3, R1 pertenecientes a *Fusarium Oxysporum*, obteniendo los resultados y las características favorables estos aislados en estudio formaran parte del cepario del laboratorio de fitopatología vegetal.

### 5.6. Crecimiento de micelio en papel celofán para la extracción de DNA

En la Figura 16 se obtuvieron el crecimiento del patógeno *fusarium sp.* En cajas de PDA con papel celofán para la extracción del DNA en cada una de las cepas en estudio.



Figura 16. Cepas en crecimiento de micelio en papel. Cepa (1, 6) pertenecientes a *Fusarium oxysporum*, Cepa (2, 3, 4, 5) *Fusarium solani*.

Los resultados logrados en este proceso de crecimiento de micelio en papel celofán de las cepas en estudio se llevó mediante el método de celofán Dennis y Webster, (2001), donde consistió en colocar con precisión el papel celofán estéril en una caja nueva de PDA. Con la finalidad de poder cosechar la biomasa fácilmente de cada una de las cepas y así obtener suficiente micelio para la extracción de DNA.

Por otra parte se realizó el análisis visual de crecimiento de biomasa en papel celofán de las cepas en estudio donde podemos resumir que los aislados que se desarrollaron más fácilmente fueron las de *Fusarium oxysporum* en un periodo de cinco días con claves pertenecientes P3, R1. Por lo consiguiente los aislados de *Fusarium solani* se desarrolló lentamente en un periodo de diez días con las claves pertenecientes P4, C7, A3, TALLO DE AGAVE 1, TALLO DE AGAVE 2.

## 5.7 Extracción de ADN de muestras.

En la Figura 17 se observan los resultados logrados de las extracciones de DNA de las muestras de agave con el KIT de extracción de DNA ZR Plant/Seed/DNA Miniprep *Xpedition*<sup>TM</sup> Sample Processor (*XSP*).

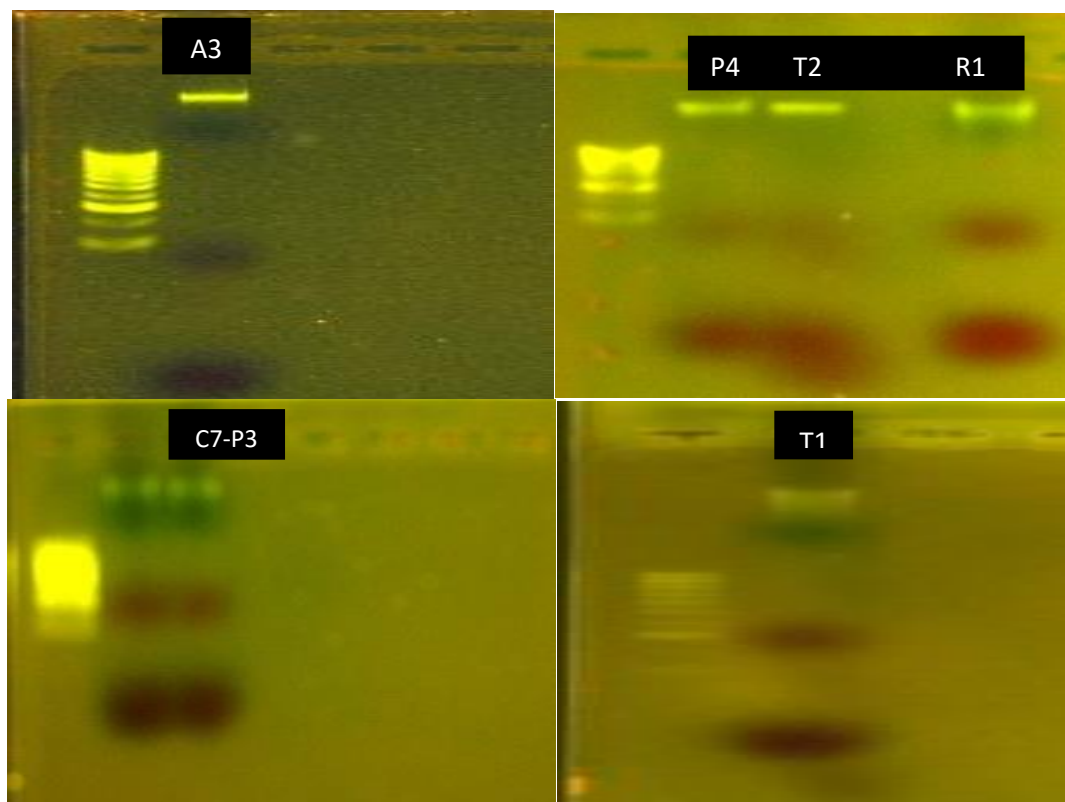


Figura 17. Resultados de las extracciones de DNA.

Al correr el DNA en el gel de agarosa al 0.8%, se logró apreciar una banda muy cercana al pozo donde se colocó la muestra y muy arriba de las bandas del marcador de peso molecular cuyo tamaño máximo era de 1500 pb, pero la banda se aprecia bien definida, como se observa en la Figura 17, en donde los

aislados A3, P4, T2 y R1 tienen una banda de aproximadamente la misma intensidad y tamaño, al haber corrido 2 microlitros del DNA extraído. Este DNA se apreció adecuado para realizar con él la amplificación por PCR de los fragmentos ef1alfa e ITS1-ITS4.

### 5.8 Amplificación por PCR por (EF 1 $\alpha$ ) y (ITS).

En la figura 18 se muestran las amplificaciones del factor de elongación 1 $\alpha$  logradas a 720 pb como se observa en la figura 18A y la amplificación ITS lograda a 540 pb en la figura 18B, con las condiciones y temperaturas establecidas en la estandarización de cada amplificación.

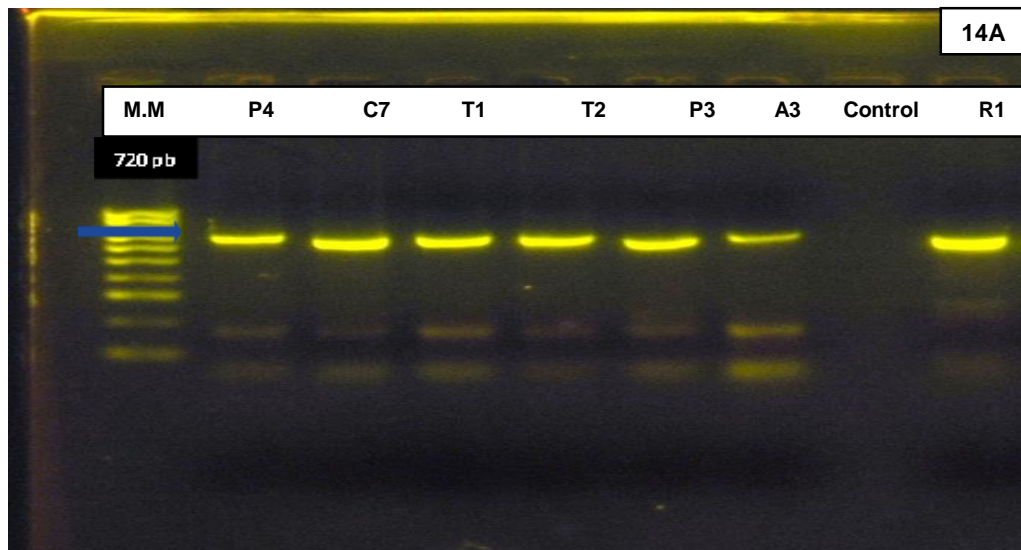


Fig 18A. Gel de agarosa mostrando los productos de la amplificación del factor de elongación 1  $\alpha$ .

El desarrollo de técnicas moleculares basadas en la reacción de la cadena de la polimerasa (PCR), la cual permitió la caracterización del ácido nucleico amplificado a partir de pequeñas cantidades de muestra, de acuerdo a *Donnell*,

(1998) y Leslie (2006) ha sido aplicada en hongos del genero *Fusarium sp* donde los caracteres morfológicos han sido un conflicto o simplemente ambiguos para su identificación.

La amplificación por PCR, con el juego de los cebadores ef-1H y ef-2T, del fragmento de EF-1 $\alpha$  de los 7 aislamientos de *Fusarium* dio como resultado amplificados de aproximadamente 720 pares de bases que corresponde a la región comprendida según O´Donnell, k., et al, (1998).

En el (carril 1, 2, 3, 4 y 6) se muestran amplificado las cepas pertenecientes a *Fusarium solani* donde coinciden entre si la misma talla, por otra parte en el (carril en 5,8) pertenecientes a *Fusarium oxysporum* también coinciden con la misma talla como se muestra en la Figura 18A. Para el control negativo (sin DNA) en el carril 7 donde no existe template de DNA esto prueba que no existe presencia de contaminantes en la mezcla de reacción.

En la Figura 18B muestra en cada uno de los carriles una sola banda bien definida que representa el amplificado de la región ITS con talla que varía de 500 a 700 pb aproximadamente de acuerdo a la regla molecular que se encuentra en el primer carril.

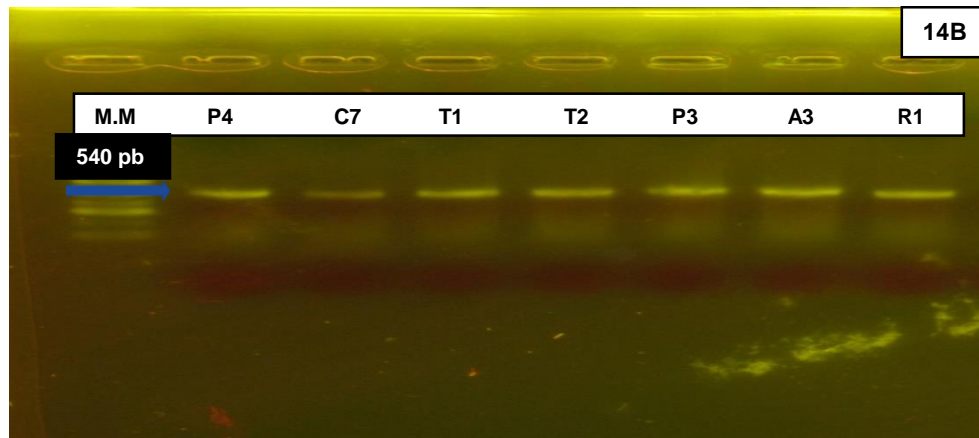


Fig 18B. Amplificaciones obtenidas con la amplificación ITS de 540pb.

La amplificación por PCR, con el juego de los cebadores *its 1H* y *its-2T*, del fragmento de ITS de los 7 aislamientos de *Fusarium sp* dio como resultado amplificados de aproximadamente 540 pares de bases que corresponde a la región comprendida.

De acuerdo a la longitud del fragmento amplificado por ITS, podemos distinguir una sola banda homogénea bien definida de la talla esperada confirmando la amplificación correcta del fragmento ITS. Según *White et al, (1990)* ha reportado una talla del ITS que varía de 520 a 850 dependiendo de la especie fúngica.

En el (carril 1, 2, 3, 4 y 6) se muestran amplificado las cepas pertenecientes a *Fusarium solani* donde coinciden entre si la misma talla, en el (carril en 5,8) pertenecientes a *Fusarium oxysporum* también coinciden con la misma talla como se muestra en la Figura 14B. Para el control negativo (sin DNA) se



observó que no existe DNA esto prueba que no existe presencia de contaminantes en la mezcla de reacción y a si obtienen las condiciones óptimas para amplificar a una reacción de 50X para la purificación de ITS y *EF-1 $\alpha$* .

### 5.9 Purificación de los productos amplificados por PCR (*EF 1 $\alpha$* ) y (ITS).

En la figura 19 se observan los resultados obtenidos de las purificaciones del (*EF 1 $\alpha$* ) en la figura 19A y de (ITS) en la figura 19B, con la finalidad de purificar el producto amplificado para la secuenciación nucleotida.

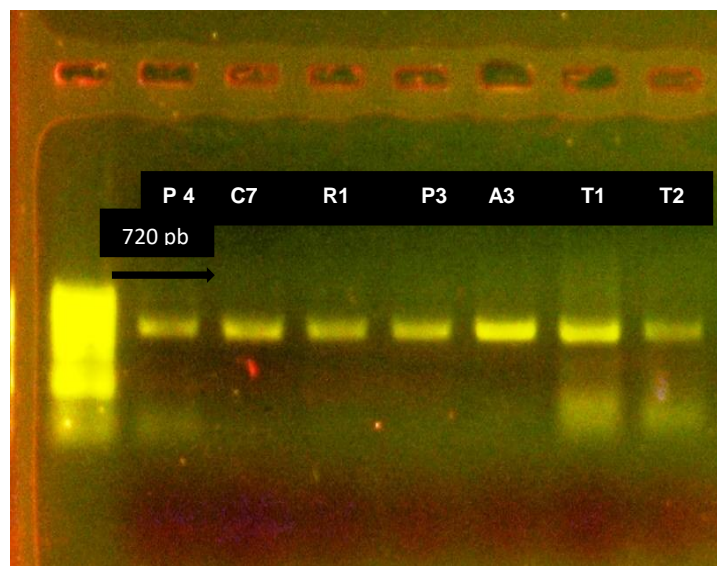


Fig 19A .Se muestran los resultados de las purificación lograda del (*EF-1 $\alpha$* ) a una reacción de 50  $\mu$ l de cada producto.

Para la purificación del producto amplificado por *EF-1 $\alpha$*  se sigue el protocolo descrito por IBI (2010), que se detalla en métodos. Cabe mencionar que se utiliza agarosa para la preparación de geles y la visualización mediante el

transiluminador de luz azul de alta calidad para la corroboración de visualización de DNA.

En la figura 19B se muestran los resultados obtenidos de las purificaciones del (ITS) a una reacción de 50 µl de cada una producto con la finalidad de purificar el producto amplificado.

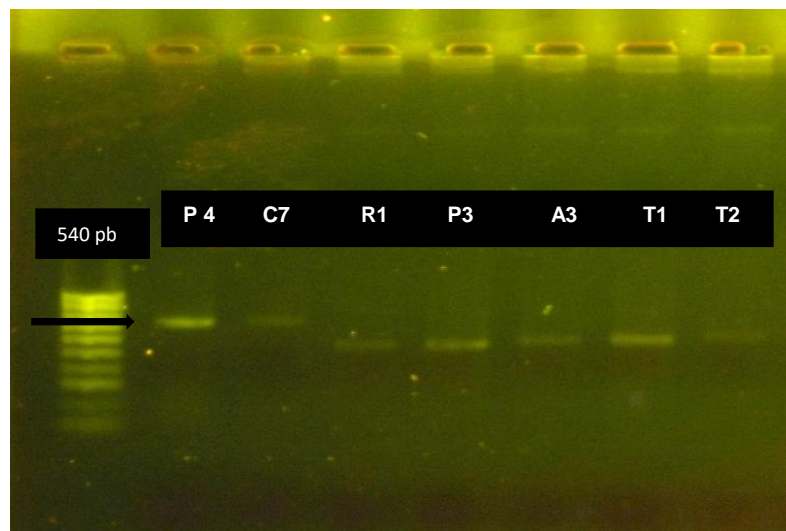


Figura 19B. Purificación de los productos amplificados de *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum*.

El método empleado por IBI (2010) en la purificación resulto bastante efectivo, se obtuvo el fragmento amplificado de alrededor de 540 a 580 integro, sin interferencias y de buena calidad. La purificación se realizó para poder secuenciar el fragmento ITS amplificado.

## 5.10. Secuenciación nucleotida.

Las secuencias nucleotidas de los productos amplificados fueron enviados al Laboratorio de Nacional de Genómica de la Diversidad (LANGEBIO) en Irapuato, Guanajuato. Donde se secuenciaron mediante electroforesis capilar por el método de diodeoxi de sanger. Se utilizaron los terminadores Bigdye® v3.1 en un secuenciador Applied Biosystems modelo 3730XL. Por cada uno de los ensayos de las regiones EF- $\alpha$ , ITS. Donde los resultados de las secuencias de cada amplificación se nos enviaron para editarla con el programa BioEdit.

## 5.11 Edición y ensamblaje de secuencias.

Los productos de PCR se editaron en cada una de las regiones individuales; el resultado del alineamiento y ensamblaje se indica, en la figura 20A donde se muestra las secuencias editas de la amplificación EF- $\alpha$ , y en la figura 16B se observa las secuencias editas de la amplificación ITS.

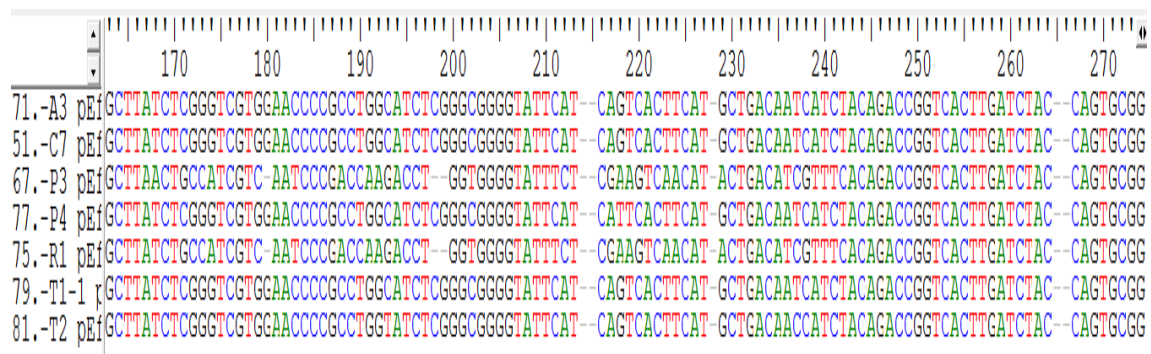


Fig. 20A. Representación del alineamiento múltiple de secuencias de *Fusarium solani*, utilizado para la inferencia relaciones filogenéticas.

En la figura 20. Se observan los resultados editados del alineamiento y ensamblaje de los aislados en la amplificación ITS.

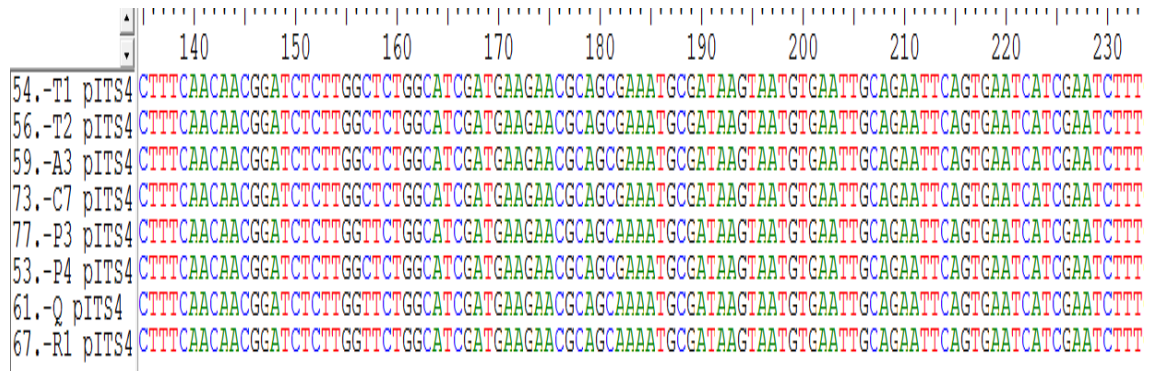


Fig 20B. Alineamiento múltiple de secuencias de *Fusarium solani*, utilizado para la inferencia relaciones filogenéticas.

Como resultado de la reacción de la secuenciación se obtuvo las secuencias editadas de cada uno de los productos amplificados, donde podemos resumir que la secuencia resultante no presentan ambigüedades significativas por lo que cumple con los requerimientos para poder realizar el análisis filogenético.

### 5.12 Electroferograma de secuencia.

En la figura 21. Se observan los resultados de la electroferograma de los aislados en las amplificaciones.

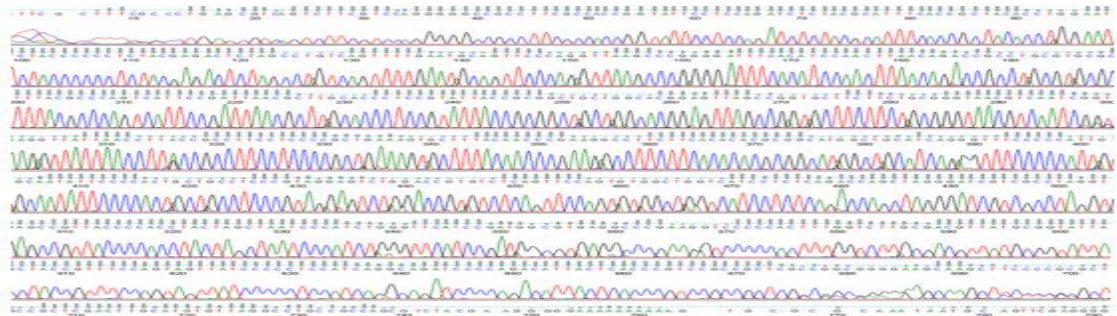


Figura 21. Electroferograma de la secuencia reverse correspondiente al aislamiento de *Fusarium sp.*

### **5.13 Análisis filogenético.**

### **5.14 Algoritmo de BLAST.**

La secuencia editada de EF-1 $\alpha$  de 720 nucleótidos fue corrida en el algoritmo BLAST (Herramienta de búsqueda de alineación local básico), del NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica) para determinar el grado de homología que guarda la secuencias del aislamientos de *Fusarium sp*, con respecto a las secuencias depositadas en el GenBank (base de datos de secuencias genéticas). Se encontraron 7 aislamientos con las cuales las secuencias de *Fusarium solani* mantienen el 100% de homología y las de *Fusarium oxysporum* mantienen un 99% homología.

En el cuadro 1 se observa las secuencias del EF-1 $\alpha$  contenidas en la base de datos GenBank, con las que la secuencia reverse 2T correspondiente al aislamiento de las cepas de *Fusarium solani*; A3, P4, C7, T1, y T2 presentan 100% de homología, mientras que las cepas de *Fusarium oxysporum* muestran un 99% de homología .

Cuadro 1. Secuencia editada de 720 nucleótidos en el algoritmo BLAST del NCBI para determinar el grado de homología con respecto al GenBank.

Cepa	Acceso	Descripción	Max score	Total score	Query coverage	Evalue	Max ident
C7	FJ939715.1	Fusarium solani isolate 61 translation elongation factor 1 alpha gene, partial sequence.	966	966	100%	0.0	100%
A3	KR673933.1	Fusarium solani Q7423 translation elongation factor 1 alpha gene, partial sequence.	998	998	100%	0.0	100%
P4	KM044418	Fusarium solani isolate 95-89-1 translation elongation factor 1-alpha (tef1) gene, sequence.	1022	1022	100%	0.0	100%
T1	FJ939715	Fusarium solani isolate 61 translation elongation factor 1 alpha gene, partial sequence.	961	961	100%	0.0	100%
T2	KR673965.1	Fusarium solani strain Q3523 elongation factor 1a (tef1) gene, partial cds.	1003	1003	100%	0.0	100%
R1	JQ809657	Fusarium oxysporum strain SH-LQ01 translation elongation factor alpha gene, partial cds.	961	961	100%	0.0	99%
P3	KM092402	Fusarium oxysporum isolate NRRL 40183 translation elongation factor 1 alpha (tef1) gene, partial cds	950	950	100%	0.0	99%

### 5.15 Dendrograma por el método matriz de similitud de correlación

En la figura 22 se muestra el resultado obtenidos de las huellas dactilares de 7 aislamientos utilizando la matriz de similitud de correlación muestra que la diversidad genética de los aislamientos de *F. solani* y *F. oxysporum* se separaron en dos grupos genéticos en un valor de coeficiente de 0.01. Un grupo está asociado sólo a aislar 5. El otro grupo se componía de dos aislamientos.



Figura 22. Dendrograma elaborado por el método de matriz de similitud de correlación. Se observan los aislados de *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum* de tallo de agave (*Agave tequilana* Weber var. azul) agrupados de acuerdo a relaciones filogenéticas del factor de elongación 1α.

En la figura 23 se observa los resultados obtenidos de las huellas dactilares de 7 aislamientos de la secuencias (ITS) utilizando la matriz de similitud de correlación, muestra que la diversidad genética de los aislamientos tiene un valor de coeficiente de 0.01.

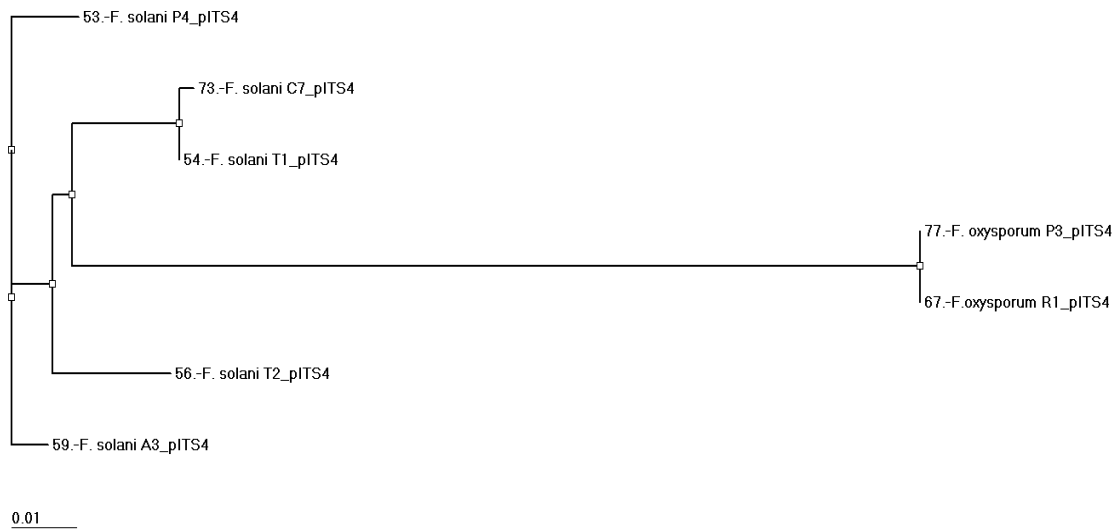


Figura 23. Dendrograma por el método de matriz de similitud de correlación de la secuencias de gen (ITS) de los aislados de la pudrición de tallo de agave.

Los valores de similitud o divergencia en análisis filogenéticos varían en menor grado, dependiendo del programa informático utilizado para generar los dendrograma. Sin embargo este análisis permite estimar la relación relativa entre los organismos. Además de la elaboración de dendrograma es necesario analizar el porcentaje de similitud o divergencia de las secuencias comparadas Clarridge (2004).



No existe un consenso en el grado de exactitud en la diferencia genética que define una especie además tampoco hay un consenso en el algoritmo matemático utilizado para generar ese dato. En la práctica se utiliza un rango de diferencia del 0.01 al 1% de diferencia Song et al (2003). Bosshard et al., utiliza 99% de similitud para definir una especie y 95% determinar para género.

## CAPITULO VI

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

#### 6.1 Conclusiones.

Los resultados de la presente investigación permiten concluir lo siguiente:

1. En las plantaciones de Agave tequilana Weber variedad Azul de San Juan municipio de Zapotlanejo fue mayor la incidencia de la enfermedad de pudrición de tallo de agave que en la de los predios de Santo Domingo, en el municipio de Acatic, Jalisco.
2. A partir de tejidos provenientes de plantas de agave con síntomas de pudrición de tallo, el patógeno más aislado fue *Fusarium solani*, con evidencia química y molecular.

3. Se logró obtener un cepario del presente trabajo donde se obtuvieron cinco ceparios de *Fusarium solani* y dos de *Fusarium oxysporum* que conformaran el cepario del laboratorio de fitopatología del ITTJ.
  
4. Las amplificaciones por PCR del gen del factor de elongación 1 $\alpha$ , se mostró aproximadamente a 720 pares de bases correspondiente a la región, mientras que la de espaciadores transcritos internos se mostró aproximadamente a 540 pares de bases logrando las condiciones óptimas para la purificación de las muestras para secuenciación nucleotida.
  
5. Se comparó las secuencias obtenidas en el GenBank para determinar la ubicación taxonómica de los aislados en estudio donde se comprobó que los aislados de *Fusarium solani* tienen un 100% de máxima identidad y los aislados de fusarium varían de 97 a 99% de máxima identidad.
  
6. Se elaboró dos dendogramas con el método matriz de similitud de correlación que permitió saber con mayor precisión la diversidad entre los aislados de *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum* en la secuencias de EF- 1 $\alpha$ , ITS.

## 6.2 Recomendaciones.

Se requiere más investigación acerca de esta enfermedad y su agente causal, como su identificación mediante el análisis de secuencias nucleotidas, dado que la identificación del hongo *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum* es complicada saber con claridad quien provoca la pudrición de tallo de agave; se requiere de estudios más histológicos más completos del tejido enfermo y estudios sobre la forma de propagación y desarrollo de la enfermedad, lo que ayudaría a desarrollar un método de control de la misma.

Se deben buscar mecanismos de control, basados en el conocimiento detallado de los agentes causantes de la pudrición del tallo de agave, con la finalidad de que el cultivo sea más rentable, dado su gran potencial de explotación.

Realizar con frecuencia el monitoreo de sanidad para prevenir las propagaciones de los focos de infección del hongo causante de la pudrición del tallo de agave.

## **CAPÍTULO VII**

### **BIBLIOGRAFIA**

- 1.- Aceves, R. J. J. (1999). Diagnóstico del sistema de producción de agave con énfasis en problemas fitosanitarios. Informe de investigación. Campo experimental Altos de Jalisco. CIRPAC-INIFAP. p 4.
  
- 2.- Aceves, R. J. J. (2003). Prevención y manejo integral de la marchitez del Agave tequilana Weber var. Azul en Jalisco. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Campo experimental Altos de Jalisco. Folleto Técnico No. 1. 62 p.
  
- 3.- Agrios, G. N. (2005). Fitopatología 2ª edición. Editorial Limusa, México. 838 p.
  
- 4.- Agrios G.N. (1998). Fitopatología, 3era Edición, México, 838 pp.
  
5. - Armstrong, G M., J. Armstrong (2004). Formae species and races of *Fusarium oxysporum* causing wit diseases. End: Nelson, P. E. T. A. Tousson, R. J. Cook,(ed).34-67pp

6. - Fusarium oxysporum, biology and taxonomy, University park, USA: state University press. pp 391-399.
- 7.- Ávila, M. M. E. (2011). Enfermedades del agave y su manejo. En: Manual técnico para el Establecimiento de Huertas de Agave Azul. Rendón, S. L. A., M. E. Ávila M., B. Rodríguez G., J. I. del Real L. (eds.) pp. 115-126.
- 8.- Ávila–Miranda, M. E., López–Zazueta, J. G., Arias–Castro, C., Rodríguez–Mendiola, M. A., Guzmán–de Peña, D. A., Vera–Núñez, J. A., & Peña–Cabriales, J. J. (2010). Vascular wilt caused by Fusarium oxysporum in agave (Agave tequilana Weber var. azul). *J. JOURNAL OF THE PROFESSIONAL ASSOCIATION FOR CACTUS DEVELOPMENT*, 12, 166-180.
9. - Beckman, C.H. (1987). The Nature of Wilt Diseases of Plants. APS Press, USA. 49 pp.
10. - Beckman, C. H., (2000). Phenolic-storing cells: Keys to programmed cell death and periderm formation in wit disease resistance and in general defense responses in plants physiological and Molecular plant pathology and Molecular plant pathology 57:101- 110.
- 11.- Bio-Rad: Protocolo que acompaña al “Quantum Prep Miniprep Kit”. Nelson DL, Cox MM (2001): “Principios de Bioquímica”, 3ª ed. Editorial Omega (Barcelona, España), pp 1119-1128.
- 12.- Bueno L, Gallardo R (2005). “Preservación de hongos filamentosos en agua destilada estéril”. En: Rev Iberoam Micol, 1998. 15: 166-168.

- 13.- Caballero et al, (2002). Aislamiento e identificación de los microorganismos responsables de la marchitez de agave tequilero. pp 22-24. In Flores López, H.E. (ed). Análisis agroecológico de Agave tequilana Weber var. Azul con énfasis en problemas fitosanitarios en Jalisco. INIFAP-CRIPAC. E. Altos de Jalisco. Publicación espacial No. Tepatitlán, Jalisco, México.
  
- 14.- Carrillo, J. A. (2003). Requerimientos agroecológicos y potencial productivo del agave *Agave tequilana* Weber en México. *In: conocimientos y prácticas agronómicas para la producción de Agave tequilana* Weber en la zona de denominación de origen del tequila. Pérez, J. F. y Del Real, J. I. (Eds.). Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Centro de Investigación Regional del Pacífico Centro, Campo Experimental Centro-Altos de Jalisco, México. Libro técnico Núm. 4. 11-36. pp.
  
- 15.- CESAVERG (2008). CONSEJO REGULADOR DEL TEQUILA, Manuales técnicos.
  
16. - Chagoya M. and M. Victor. 2004. Diagnóstico de la Cadena Productiva del Sistema Producto Maguey-Mezcal. Oaxaca. SAGARPA-OAXACA, SEDAF- Gobierno del Edo. De Oaxaca, Consejo Oaxaqueño del Maguey y Mezcal, AC.
  
- 17.- CNIT (Cámara Nacional de la industria Tequilera, 2008). Consultado en internet el 25 de Noviembre del 2014, [www.camaratequilera.com.mx](http://www.camaratequilera.com.mx)

- 18.- Cámara Nacional de la industria Tequilera, (2010). Consultado en internet el 27 de febrero del 2015. [www.camaratequilera.com.mx](http://www.camaratequilera.com.mx)
- 19.- Consejo Regulador del Tequila, (2010). Actualización de la base de datos y diagnostico fitosanitario: Agave tequilana Var. Azul. Comité técnico agronómico-subcomité de Fito sanidad. Consejo Regulador del Tequila (CRT) pp. 10.
- 20.- Consejo Regulador del Tequila, (2012). Diagnóstico de cortes sanitarios en los predios afectados por plagas y enfermedades folleto del CRT pp.25
- 21.- Consejo Regulador del Tequila, (2004). Establecimiento de un sistema de monitoreo de enfermedades por muestreos en Agave tequilana Weber variedad azul, dentro de la Denominación de Origen Tequila. Guadalajara, México. 15p.
- 22.- Consejo Regulador del Tequila, (2003). Períodos críticos de competencia entre agave (A. tequilana W. variedad azul) y malezas en el estado de Jalisco. "Congreso Nacional de la Ciencia de la Maleza". Morelia, Mich. pp 14.
- 23.- Consejo Regulador del Tequila, (2005). Plaga y Enfermedades del Agave Tequila Weber Var. Azul. Ed. Pandora. Impreso en México. pp.123.
- 24.- Electroforesis (2001). «Gel electroforesis of DNA» en: Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (Eds.) Molecular Cloning: a Laboratory



Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, capítulo 6.

- 25.- Flores-Lopez, H.E., Byerly, K, F., (2010). Diagnóstico del sistema de pudrición agave con énfasis en problemas sanitarios. Informe de Investigación , INIFAP-CIRPAC C, E, Altos de Jalisco. Pp.14.
- 26.- Fucikovsky, Z. L. (2004). Agave tequilana Weber var. Azul y sus principales problemas fitosanitarios. En: Avances de la investigación en el agave tequilero. Consejo Regulador del Tequila A. C. Guadalajara, México, 147-178 pp.
- 27.- Fucikovsky, Z. L. (1995). Estudio de la fitosanidad de *Agave tequilana* Weber var. Azul informe técnico para el Programa General de Apoyo y Desarrollo Tecnológico a la Cadena Productiva Agave-Tequila. Guadalajara, México, 38 p.
- 28.- Gárete, A., I. Bonilla. (2000). Nutrición mineral y producción vegetal, En fundamentos de fisiología vegetal. Azcón-Bieto, J., M. Talón, (eds). pp 113-130.
- 29.- GIL, V. K. (1997). Caracterización genética del *Agave* sp utilizando marcadores moleculares. Tesis de Maestría en Ciencias. CINVESTAV.

- 30.- González, H. H., Andrés, J. F. (2001). Manejo de plagas del Agave Tequilero. Colegio de Postgraduados-Tequila Sauza, S.A. de C.V. México. pp. 2-23.
- 31.- Gonzales, H. H., J. I. Del Real L., J. F. Solís A. (2007). Manejo de plagas del agave tequilero pp 123. CP. Tequila Sauza.
- 32.- Gottwald S, Germeier CU, Ruhmann W (2001) analysis Computeriz imagen in *Fusarium* taxonomy. Mycol. Res. 103: 206-214.
- 33.- Hall, T. BioEdit, (1999): a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic. Acids. Symp. Ser. 1999: 42: 95-98.
- 34.- IBI (2010). Consulta en página de internet del fabricante 23 de marzo del 2015.  
[http://shop.neobits.com/zymo\\_research\\_IBIc1017\\_20\\_zs\\_vi\\_column\\_w\\_maxi\\_filtr\\_20pk\\_zs\\_vi\\_column\\_w\\_maxi\\_filtr\\_20pk\\_pack\\_of\\_20\\_103\\_5024940.php](http://shop.neobits.com/zymo_research_IBIc1017_20_zs_vi_column_w_maxi_filtr_20pk_zs_vi_column_w_maxi_filtr_20pk_pack_of_20_103_5024940.php)
- 35.- Klister, H.C., (2001). Evolution of Host Specificity in *Fusarium oxysporum*. pp. 70–82. In: Summerell B.A., Leslie, J.F., Backhouse, D., Bryden, W.L., and Burgess, L.W. (Eds.). *Fusarium* Paul E. Nelson Memorial Symposium. APS Press, USA.
36. - Leslie, J.F., and Summer ell, B.A. (2006). *Fusarium* Laboratory manual. Blackwell Publishing USA.

37. - Leslie, John F... [et al.] (1953). *Fusarium laboratory manual*. First edition USA, 2006 Blackwell Publishing Asia.
38. - Lim, H., K. Y. Kim, S. Kim. (1991). *Pseudomonas stutzeri* YPL-1 Genetic Transformation and Antifungal Mechanisms against *Fusarium solani* pp. 54-57.
39. - Agent of Plant of Plant Root Rot. Applied and Environmental microbiology Pp. 510-516.
- 40.- Loera-Quezada, M. M. (1999). Selección *in vitro* de *Agave tequilana* Weber var. *Azul* para resistencia a *Fusarium Oxysporum*. Tesis de Maestria en Ciencias. Universidad de Guadalajara. 114 p.
- 41.- Luna, H.G. (1998). Hacia un manejo integrado de plagas, fundamentos y recomendaciones prácticas. Cheminova.
- 42.- Luna, H.G.(1996). Pudrición de tallo de *Agave tequilana* L. Weber en el estado de Jalisco, México. Tesis Profesional. Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma de Chapingo, México.
- 43.- Macías, M. A., A. G. Valenzuela Z. (2010). El campo económico del tequila en tiempo de globalización. Universidad de Guadalajara. Pp 1-31.

- 44.- Martínez. L.E.F., Calderwood, M. y Monsivais, C. (2004). Tequila tradición y destino. 2ª edición. Editorial Revimundo. 181 p.
- 45.- Martínez R. J.L. (1994). Informe sobre el diagnóstico de la marchitez en agave. Tequila Cuervo. Inédito.
- 46.- Mora- Castillo, O. R., De Anda, S. J., Rodríguez, G. E., Fernández, F. O., Perez, M. F., Hoell, E. G. (2001). Cosechadora y jimadora de agave. Patente MX 243917.
- 47.- Morón, R. A., M. A. Moron R. (2001). La fauna coleóptera melonthidae de la reserva de la biosfera "El Triunfo" Chiapas. Acta. Zool. Mex. 84:1-25.
- 48.- Nelson, P. E., T.A Tousson, W. F. O. Marasas. (1983). *Fusarium* species: An illustrated manual for identification. The pennsylvania State University Press.
49. - Nelson, DL and Cox, MM (2001). Lehninger Principles of Biochemistry, 5 ta edición, W.H. Freeman & Co., NY.
- 50.- Nirenberg H. I. & Aoki, T. (1976). *Fusarium nisikadoi*, a new species from Japan. Mycoscience 38, 329-333. O'Donnell, K., Kistler, H.C., Cigelnik, E. & Ploetz, R.C. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. Proceedings of the

National Academy of Sciences of the United States of America 95, 2044–2049.

- 51.- Nobel, P. S. (1994). Remarkable Agaves and Cacti. Cambridge University Press. NY. 166 p.
- 52.- Nobel, P. S. (1995). Environmental Biology. In: Barbera, G., Inglese, P., Pimienta-Barr (Eds). Agriecology, Cultivation, and User of Cactus Pear. FAO. Plant Productio Protection Paper, Roma, Italia. 216 p.
- 53.- Nobel, P. S. (1998). Los incomparables agaves y cactus. Trillas, México, D.F. 211 p.
- 54.- O'Donnell K, Gueidan C, Sink S, Johnston P, Crous P, Glenn A, et al (2009). A two-locus DNA sequence database for typing plant and human pathogens within the *Fusarium oxysporum* species complex. Fungal. Genet. Biol. 2009; 46:936–948.
- 55.- O'Donnell, K., Sutton, D.A., Rinaldi, M.G., Gueidan, C., Crous, P.W. & Geiser, D.M. (2009). Novel multilocus sequence typing scheme reveals high genetic diversity of Human pathogenic members of the *Fusarium incarnatum*- *F. equiseti* and *F. chlamyosporum* species complexes within the United States. Journal of Clinical Microbiology 47, 3851-3861.

- 56.- Pimienta, B. E. (1984). Estimación del tamaño de muestra para levantamientos ecológicos de maleza. Memorias del VI Congreso Nacional de la Ciencia de la maleza. Tapachula, Chiapas.
- 57.- Rodriguez-Garay, B, (2004). La materia prima *Agave tequilana Weber var. Azul*. Pp1-47. In: CRT (ed.) Avances en la Investigación del Agave Tequilero. Guadalajara, Mexico: CRT-CONACyT. 453 p.
- 58.- Rubio-Cortés, R. (2007). Enfermedades del cultivo de *Agave* spp. 169-195. In; J. F. Pérez-Dominguez y J.I. Del-Real-Laborde (eds.). Conocimiento y prácticas agronómicas para la procción de *Agave tequilana Weber* en la zona de denominación de origen del tequila. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigacion Regional del Pacifico Centro. 195 p.
- 59.- Samuels, G.J., (2001). systematics, the sexual state, and ecology. *Phytopathology* 96:195-206.
- 60.- Sanger, F., A. R. Coulson, G. F. Hong, and D. F. Hill , et al. (1999). Nucleotide sequence of DNA,.*J.Mol. Biol.* 162:729-773.
- 61.- Seifert, K. (1996). *Fusarium* Interactive Key. Agriculture and Agri-Food Canadá. Pp 2 – 16, 47-49 55-56.

- 62.- SIAP, (2013). Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera. Cierre de producción agrícola por estado SAGARPA. Página consultada el 24 febrero del 2015. <http://www.siap.gob.mx/index.php?option=comowrapper&view=wrapper&itemid=351>.
- 63.- Simpson J. (1997). Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLPs). *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 60:119-122.
- 64.- Sutherland S., (1990). Why hermaphroditic plants produce many more flowers than fruits: experimental tests with *Agave mckelveyana*. *Evolution*. 41:750–759.
- 65.- Valenzuela, A.G. (1994). El agave tequilero: su cultivo e industrialización. Editorial Ágata. 119p.
- 66.- Virgen-Caballeros, G., Martínez-Ramirez, J.L., Rodríguez- Ruvalcaba, R., Bernal, F.J. (2004). Epidemiología y manejo integrado de problemas fitosanitarios en *Agave tequilana Weber var. Azul*. Universidad de Guadalajara. Informe técnico para el Programa General de Apoyo y Desarrollo Tecnológico a la Cadena Productiva Agave-Tequila. Guadalajara, México. 50 p.
- 67.- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: a guide to methods and applications. (Innis MA, Gelfand

DH, Sninsky JJ, White TJ, eds). Academic Press, New York, USA: 315–322.

68.- Yoldi, M. (2000). El agave tequilero; pencas que abrazan al mundo. Claridades Agropecuarias, SAGAR. México. 48 p.

69.- Zainuddin M. F., Rosnah S., Noriznan M. M., Dahlan I. (2001). Effect of moisture content on physical properties of animal feed pellets from pineapple plant waste. Agric. Agric. Sci. Proc. 2, 224–230. 10.1016/j.aaspro.2001.11.032