



**EDUCACIÓN**  
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Tlajomulco



TESIS

**“INDUCCIÓN DIFERENCIAL DE MECANISMOS DE DEFENSA  
COMO ESTRATEGIA DE SELECCIÓN DE VARIANTES  
GENÉTICAS EN *Agave tequilana* TOLERANTES A MARCHITEZ  
DEL AGAVE.”**

QUE PRESENTA:

**Cristina Chávez Sánchez**

DIRECTOR DE TESIS:

**Martín Eduardo Avila Miranda**

---

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**DOCTORADO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA**

---

TLAJOMULCO DE ZÚÑIGA, JALISCO. SEPTIEMBRE, 2022.

El presente estudio fue realizado en los laboratorios de Fitopatología y de Bioquímica Vegetal de la División de Estudios de Posgrado e Investigación del Instituto Tecnológico de Tlajomulco.

El financiamiento del proyecto de investigación:

**“INDUCCIÓN DIFERENCIAL DE MECANISMOS DE DEFENSA COMO ESTRATEGIA DE SELECCIÓN DE VARIANTES GENÉTICAS EN *Agave tequilana* TOLERANTES A MARCHITEZ DEL AGAVE”**

fue emitido por el Tecnológico Nacional de México (TecNM) bajo el folio: 5885.16-P.

## ÍNDICE

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
II. HIPÓTESIS	5
III. OBJETIVOS	5
3.1 Objetivo general	5
3.2 Objetivos particulares	5
IV. ANTECEDENTES	6
4.1 Reproducción y genética del agave	6
4.2 Marchitez del agave	8
4.3 Mecanismos de defensa de las plantas ante el ataque de patógenos	9
V. MATERIALES Y MÉTODOS	16
5.1 Selección del material vegetal	16
5.2 Reproducción <i>in vitro</i> de plantas de <i>Agave tequilana</i> Weber var. azul	17
5.3 Marcadores moleculares mediante AFLP	18
5.4 Inoculación de conidias patogénicas causantes de la marchitez del agave	23
5.5 Extracción de ácido shikímico en raíces	24
5.6 Extracción de ácido salicílico y ácido <i>trans</i> -cinámico en raíces	24
5.7 Condiciones cromatográficas	25
5.8 Actividad fenilalanina-amonio liasa (PAL)	26
5.9 Actividad de proteínas relacionadas a la patogénesis	27
5.9.1 Extracción y cuantificación de proteínas totales	27
5.9.2 Actividad quitinasa	27
5.9.3 Actividad peroxidasa	28
5.9.4 Actividad $\beta$ -1,3-glucanasa	28
5.10 Cuantificación de fenoles totales	29
5.11 Incidencia de enfermedad en raíces causada por <i>Fusarium solani</i>	29
5.12 Cuantificación de la colonización de <i>Fusarium oxysporum</i> en la piña de agave mediante qPCR	30
5.13 Análisis estadístico	31

	Página
VI. RESULTADOS	32
6.1 Cultivo <i>in vitro</i>	32
6.2 Análisis de Marcadores moleculares AFLP	33
6.2.1 Extracción de DNA	33
6.3 Ácido shikímico en raíces	35
6.4 Actividad PAL	39
6.5 Ácido <i>trans</i> -cinámico y ácido salicílico en raíces	44
6.6 Proteínas PR y compuestos fenólicos	54
6.6.1 Actividad quitinasa	54
6.6.2 Actividad peroxidasa	59
6.6.3 Actividad $\beta$ -1,3-glucanasa	63
6.6.4 Compuestos fenólicos totales	68
6.7 Incidencia de enfermedades en raíces causada por <i>F. solani</i>	73
6.8 Correlación entre la incidencia y la respuesta temprana de los mecanismos de defensa	75
6.9 Cuantificación de colonización de <i>F. oxysporum</i> en la piña de agave mediante qPCR	76
VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	79
VIII. CONCLUSIONES	84
IX. LITERATURA CITADA	86

## **DEDICATORIA**

A mi familia por el amor incondicional demostrado por tanto apoyo durante el largo periodo que conllevó la realización de este objetivo.

## **AGRADECIMIENTOS**

Además de los agradecimientos obvios a quienes dentro y fuera del comité tutorial estuvieron siempre presentes con el apoyo para sobrellevar los obstáculos que se fueran presentando, para compartir un pedacito de sus amplios conocimientos en diversos temas y en la asesoría necesaria durante este trayecto, hay un agradecimiento especial al Consejo Regulador del Tequila por prestar todos los servicios necesarios, que incluían el material vegetal seleccionado, necesario para la realización de este proyecto.

**GRACIAS!**

## RESUMEN

El tequila es una de las bebidas alcohólicas con mayor demanda a nivel mundial, colocando a la industria tequilera en una de las más importantes en México. El insumo principal para su elaboración son los fructanos provenientes de la piña del *Agave tequilana* Weber var. azul. Este cultivo sufre pérdidas agronómicas importantes dentro de las que destaca la marchitez del agave, generando mermas de hasta el 25% anual en algunas áreas productoras. Los agentes causales de esta enfermedad reportados, incluyen cepas patogénicas de *Fusarium oxysporum* y *F. solani*. En este trabajo, se seleccionaron en campo plantas madre de agave, con una clara variabilidad fenotípica en susceptibilidad a la marchitez del agave. Hiluelos de plantas con este fenotipo, fueron reproducidos mediante técnicas de cultivo *in vitro* y se clasificaron como potencialmente resistentes o susceptibles. El polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP) a partir de tejido foliar de estos hijuelos, confirmó claramente diferencias genéticas entre individuos, pero esta diferencia no estuvo correlacionada a la variabilidad fenotípica observada. Las plántulas obtenidas por cultivo de tejidos, se confrontaron con una cepa patogénica de *F. oxysporum* y con una de *F. solani* en dos diferentes tiempos de confrontación, 72 horas y 30 días. Las respuestas bioquímicas tempranas a las 72 horas, evidenciaron niveles estadísticamente superiores en plántulas potencialmente resistentes con respecto a las susceptibles, en acumulación de ácido shikímico, ácido salicílico y compuestos fenólicos totales, así como de actividad quitinasa. Se determinó una correlación negativa de la magnitud de estas respuestas bioquímicas tempranas con la incidencia de células dañadas de tejido radicular en plántulas isogénicas confrontadas durante 30 días con la cepa de *F. solani*, lo que sugiere que esas actividades y moléculas acumuladas, fueron primordiales en la defensa en contra de este patógeno. El análisis de AFLP de nueva cuenta evidencia la diversidad genética presente en *Agave tequilana* Weber var. azul, y nuestros datos sugieren que esta diversidad, es en parte explicada con las diferencias en la forma en que responden las plantas de agave a los patógenos causantes de marchitez del agave, y este criterio puede ser utilizado en futuros programas de mejoramiento de este cultivo para resistencia a la enfermedad.

Con respecto a las evaluaciones en plántulas confrontadas con *F. oxysporum* se observó un incremento en actividades quitinasa y peroxidasa de plántulas potencialmente resistentes con respecto a las susceptibles. Por otro lado, la acumulación de ácido shikímico, ácido cinámico y actividad glucanasa permanecen estadísticamente iguales en todos los tratamientos, y la actividad PAL disminuye en presencia del patógeno, presentando el mismo comportamiento que en la confrontación con *F. solani*. Desafortunadamente, en el bioensayo confrontado con *F. oxysporum* no contamos con la evaluación del daño causado, de manera que no fue posible realizar la correlación para concluir la importancia de estos comportamientos con respecto a la resistencia y/o susceptibilidad de las plántulas tratadas.

## **ABSTRACT**

Tequila is one of the beverages with higher worldwide demand, putting its industry as one of the most important in Mexico. The main input for tequila manufacturing is agave fructanos, which are present in the core of the *Agave tequilana* Weber var. azul plants. This crop suffers important agronomical losses, within which it stands out the agave wilt which generates the depletion of over 25% annually in some production areas. Causal agents of this disease mainly reported, includes pathogenic strains of *Fusarium oxysporum* and *F. solani*. In this work, mother plants of agave (*Agave tequilana* Weber var. azul) that were commercially reproduced by vegetative, manners were selected in field because their clear phenotypic variability in susceptibility to agave wilt. Offshoot from rhizome of this plant, were *in vitro* reproduced and classified as being presumably resistant or susceptible. From DNA of leaves tissue of these offshoots, amplified fragments length polymorphism (AFLP) clearly confirmed genetic differences between individuals, but this difference was not correlated to the observed phenotypic variability. Plantlets obtained by tissue culture were confronted with a pathogenic strain of *F. oxysporum* and one of *F. solani*, in two time-lapse confrontations, 72 hours and 30 days. In *F. solani* confrontation, early biochemical response at 72 hours, evidenced statistically superior levels in accumulation of shikimic acid, salicylic acid and phenolic compounds as well as chitinase activity in potentially resistant plantlets respect to

susceptible ones. Additionally there was an indirect correlation of these biochemical early responses induced by *F. solani*, with the incidence of rotten root cells of plantlets product of the 30 days long confrontation with *F. solani*, suggesting that those activities and molecule accumulates, were primordial in the defense against this pathogen. The AFLP analysis evidence once more, genetic diversity in *Agave tequilana* Weber var. azul, and our data suggest that this diversity, is in part explained with differences in the way agave plants respond to agave wilt pathogens, and this criteria could be used in future programs of breeding this crop for disease resistance. Regarding the evaluations carried out on plantlets confronted with *F. oxysporum* we observed an increment in chitinase and peroxidase activities of potentially resistant plantlets with respect to the potentially susceptible plants. On the other hand, the accumulation of shikimic and cinnamic acid and the glucanase activity remains statistically the same in all treatments, meanwhile PAL activity diminishes in level when plantlets were in the pathogen's presence, showing the same behavior as in the *F. solani* confrontation. Unfortunately, in the *F. oxysporum* confrontation bioassay, we didn't get the tissue damage evaluation, hence we couldn't correlate it with those behaviors in order to conclude their importance in the resistance/susceptibility in the treated plants.

## I. INTRODUCCIÓN

Una de las bebidas alcohólicas con mayor demanda a nivel nacional e internacional es el tequila, que al ser endémica de México, convierte a la industria tequilera en una de las más importantes del país. El insumo principal para la elaboración del tequila, son los fructanos de agave, que por normatividad deben provenir invariablemente de la piña del agave tequilero (*Agave tequilana* Weber var. azul).

Este cultivo está actualmente establecido en poco más de 80,000 has en la zona de Denominación de Origen Tequila (DOT) y se propaga principalmente de manera asexual, utilizando hijuelos producidos por plantas madre a partir del segundo año de su ciclo de producción, estableciéndose de esta manera las nuevas plantaciones comerciales.

Se ha estipulado que, debido al tipo de reproducción asexual por medio de hijuelos, el agave utilizado para cultivo destinado al tequila presenta uniformidad genética, lo que causa la misma susceptibilidad ante los patógenos que lo atacan.

Sin embargo, la aparente prioridad de la planta de acumular fructanos a lo largo de su ciclo, para finalmente formar un escapo floral que le permita floración y reproducción sexual, hace pensar que la reproducción sexual en el agave tequilero, es un mecanismo evolutivamente bien establecido, como el que realizan en la actualidad, la mayor parte de las plantas silvestres, en las diversas especies del género *Agave*.

Este mecanismo de reproducción sexual realizado por la planta durante muchos miles de años previos combinando factores de selección, aunque ha sido inhibido en las últimas décadas por el hombre, debió haber generado variabilidad en las poblaciones nativas de esta especie al paso del tiempo, moldeando de manera importante los rasgos que permiten la adaptación y perpetuación de su especie, como son los mecanismos de defensa ante el ataque de fitopatógenos diversos. Al momento, existen ya diversos estudios que han comprobado la existencia de variabilidad genética entre plantas de la misma especie y variedad.

El suficiente abasto cualitativo y cuantitativo de esta materia prima, se ve permanentemente limitado, por diversos factores económicos, ambientales, y parasitológicos.

Entre las principales causas de pérdidas de plantas de agave, predominan las plagas y enfermedades y dentro de éstas últimas, la marchitez del agave genera pérdidas de hasta el 25% anual en algunas áreas productoras, dentro de la zona de denominación de origen del tequila (DOT).

En las poblaciones naturales de una determinada especie de planta, existe un mosaico amplio de fenotipos en resistencia-susceptibilidad a fitopatógenos, en estas poblaciones hay plantas muy susceptibles y pueden llegar a existir variantes de plantas muy resistentes, sobre todo si las plantas tienen la posibilidad de incorporar variabilidad a la población mediante reproducción sexual, la cual se estabiliza como rasgo favorable, mediante mecanismos de selección natural en su interacción a largo plazo con los fitopatógenos. Fenotípicamente hablando, parece fácil la detección de la variabilidad en plantas de agave tequilero, en relación a su resistencia o tolerancia a enfermedades comunes, especialmente en campos comerciales fuertemente conductivos a las mismas; sin embargo, con métodos agronómicos convencionales, se dificulta la selección de materiales tolerantes, considerando el tiempo para la producción de un limitado número de hijuelos en los que se aprecie de nuevo este fenotipo en confrontaciones posteriores con el fitopatógeno al cual se considera menos susceptible. Por otro lado, la aplicación de técnicas de cultivo de tejidos vegetales, disminuye el tiempo en la disponibilidad de plantas de agave para su evaluación y selección.

Con herramientas moleculares pertinentes, es posible evaluar cualitativa y cuantitativamente la respuesta de defensa de la planta ante el ataque de fitopatógenos, con lo que se pueden detectar genotipos sobresalientes por su resistencia a enfermedades, con la posibilidad de reproducirlos masivamente por medio de cultivo de tejidos vegetales.

Entre los mecanismos más estudiados en la resistencia a enfermedades, asociada al ataque de patógenos biótrofos, destaca la Resistencia Sistémica Adquirida (SAR) mediada por un reconocimiento gen por gen e incluye principalmente: reacción hipersensible (HR), expresión temprana de proteínas relacionadas a la patogénesis (PRs), acumulación de fitoalexinas, compuestos fenólicos, especies reactivas de oxígeno y lignificación de las paredes celulares. El reconocimiento de los elicitores liberados por el patógeno, da lugar rápidamente a cambios en el flujo de iones y la producción de especies reactivas de oxígeno que inician la cascada de señalización para la activación de factores de transcripción involucrados en la activación de genes de defensa. Dichos genes funcionan en la síntesis de reguladores como el ácido salicílico que es la molécula señal en el sitio de infección primaria que se transloca sistémicamente al resto de los tejidos; lo que genera la expresión de genes que provocará la activación de la síntesis de PRs, el engrosamiento de las paredes celulares y la acumulación de compuestos tóxicos para el patógeno.

El ácido salicílico es sintetizado por dos vías enzimáticas que involucran la vía shikimato; en una de ellas, la vía de los fenilpropanoides, la fenilalanina es convertida a corismato por acción de la enzima fenilalanina-amonio liasa (PAL) y la otra involucra la síntesis de ácido isocorísmico a partir del ácido corísmico por la acción de la isocorismato sintasa (ICS). Adicionalmente la vía de los fenilpropanoides, es precursora de la síntesis de gran cantidad de compuestos importantes relacionados con mecanismos de defensa como compuestos fenólicos, fitoalexinas y lignina entre otros. Por dicho motivo, la expresión temprana de actividad enzimática PAL está fuertemente asociada a una respuesta eficiente de defensa en las plantas ante el ataque de un fitopatógeno.

Algunos patógenos pueden ser claramente definidos como biótrofos o necrotróficos; sin embargo, muchos otros se comportan como biótrofos y necrotróficos dependiendo de las condiciones en las cuales se encuentren y son llamados hemibiótrofos.

En confrontaciones de plantas con patógenos necrotróficos, se ha reportado mayor contribución en la defensa por la activación de la Resistencia Sistémica Inducida (SIR)

que no está relacionada con un reconocimiento específico de genes de resistencia y está regulada por el etileno (ET) y jasmonato (JA).

En el presente trabajo, se propone la identificación de variantes genéticas en *Agave tequilana*, enfocadas a tolerancia contra marchitez causada por especies patogénicas de *Fusarium*, basada en la correlación encontrada entre expresión de mecanismos de defensa inducidos con respecto a evidencias físicas, histológicas y moleculares de resistencia o susceptibilidad por la interacción en distintas plantas seleccionadas por su apariencia fenotípica de resistencia.

El Consejo Regulador del Tequila A.C. en el Centro de Referencia Agave-Tequila (CRAT), cuenta con una gran cantidad de plantas establecidas, en un campo con historial de alta conducencia a marchitez del agave en las que se observa variabilidad fenotípica en sus niveles de severidad de la enfermedad de marchitez del agave. Se ha propuesto un método de micropropagación para *Agave tequilana* Weber var. azul, por medio de técnicas de cultivo de tejidos que asegura mantener la fidelidad genética de las plantas.

Estas plantas uniformes genéticamente fueron empleadas para confrontaciones con los patógenos causantes de la marchitez del agave y a partir de ahí, es posible evaluar bioquímica y molecularmente la intensidad de la expresión de mecanismos de defensa que nos pueden guiar a seleccionar aquellas resistentes o tolerantes. Estos resultados se pueden complementar, con evidencias histológicas de la interacción planta-patógeno *in situ*, durante el proceso de infección y colonización. Para la confrontación, se emplearon cepas con comprobada capacidad patogénica sobre el agave tequilero.

## II. HIPÓTESIS

La variabilidad fenotípica de resistencia a marchitez del agave en *Agave tequilana* Weber var. azul, es producto de diferencias en niveles de expresión de mecanismos de defensa resultado de variabilidad genética en la especie.

## III. OBJETIVOS

### 3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar en plantas de *Agave tequilana* Weber var. azul con supuesta tolerancia o susceptibilidad a marchitez su inducción de mecanismos de defensa al ser confrontados con *Fusarium oxysporum* y *F. solani* y asociar estas respuestas a evidencias de su variación genotípica.

### 3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Seleccionar plantas madre de *Agave tequilana* Weber var. azul con aparente resistencia o susceptibilidad a marchitez.
2. Micropropagar las plantas madre de agave mediante técnicas de cultivo *in vitro* a partir de tejido meristemático de sus hijuelos.
3. Determinar la variabilidad genética mediante marcadores moleculares de DNA AFLPs a partir de tejido de los hijuelos
4. Confrontar plantas micropropagadas con *Fusarium oxysporum* y *F. solani* en pruebas de patogenicidad.
5. Determinar porcentaje de incidencia o severidad en plantas confrontadas con los patógenos, cuantificando el tejido infectado mediante análisis histológico.
6. Cuantificar el nivel de actividad enzimática de proteínas relacionadas a patogénesis (PRs) quitinasa, Glucanasa y Peroxidasa. .
7. Determinar la actividad fenilalanina-amonió liasa (PAL) y la concentración de Ac, Shikimico, Ac Cinamico, Ac Salicilico y compuestos fenólicos en las diferentes interacciones.

## IV. ANTECEDENTES

### 4.1 REPRODUCCIÓN Y GENÉTICA DEL AGAVE

Las plantas de agave pueden reproducirse por dos mecanismos: La producción de semillas a través de la reproducción sexual y la multiplicación vegetativa o clonación formando bulbos aéreos o hijuelos rizomatosos (Arizaga y Ezcurra, 1995), indicando García-Mendoza (1995) que esta reproducción asexual provoca un proceso de disminución de variabilidad genética (. El proceso de reproducción sexual es muy importante debido a que garantiza el mantenimiento de la variabilidad genética en las poblaciones (Arizaga y Ezcurra, 2002). Se cree que el monocultivo en *Agave tequilana* Weber, en particular la propagación asexual, ha contribuido a la erosión genética y a una reducción en resistencia a plagas y enfermedades (Valenzuela, 2003). La manera asexual de propagar el agave tequilero durante años, condujo a la clonación de diversos genotipos seleccionados y por tanto, a encontrar pocas variantes fenotípicas dentro de las poblaciones cultivadas, lo que facilitó la incidencia y proliferación de enfermedades (Robert y col., 1992; Fucikovsky, 2004). La reducción en la recombinación sexual y la difusión de sólo algunas líneas clonales especializadas ha generado la aparición de nuevas enfermedades en cultivos (Stukenbrock y Bataillon, 2012).

A su vez, Gil y col. (2001) reportaron al agave tequilero como uno de los cultivos con más bajo nivel de polimorfismos detectado hasta la fecha mediante marcadores moleculares RAPDS. Sin embargo, publicaciones más recientes contradicen ese hecho como es el caso de Gil-Vega y colaboradores en 2006, que utilizando marcadores moleculares AFLPs, demostraron la existencia de un nivel significativo de diversidad entre plantas de *Agave tequilana* Weber var. azul obtenidas dentro de una misma plantación y entre distintas plantaciones, así como la diversidad entre variedades de la misma especie. Se ha observado variabilidad genética asexual incluso entre brotes de la misma planta madre en *Agave fougroydes* (Infante y col., 2003) empleando marcadores AFLPs. En 2005, Torres-Moran y col., demostraron mediante marcadores ISTRs que la variación somaclonal de *Agave tequilana* micropropagada por organogénesis fue de

30% entre los regenerantes. Por otra parte, Gil-Vega y col. (2006) e Infante y col. (2003) encontraron variación asexual en varias especies de agave, incluyendo *A. tequilana*, con lo que se puede asegurar que la variación sexual es muy activa en este género. Por último, Díaz-Martínez y colaboradores (2012) también evaluaron variación genética en plantas de *Agave tequilana* Weber var. azul propagadas por tres formas asexuales distintas por medio de análisis de AFLPs encontrando distintos niveles de variabilidad. Aunque los mecanismos por los cuales surge esta variabilidad en plantas propagadas asexualmente no están definidos, los diferentes niveles en ploidía existentes en *A. tequilana* podrían jugar un papel en la generación de esta variabilidad (Sharma y Bhattacharyya, 1962), además al tener un cariotipo relativamente estable, se espera que la especiación en el género se dé mediante mutaciones puntuales y reacomodo del ADN (Cavallini y col., 1996) y se sugiere que los elementos transponibles sean los responsables de esta variación (Osorio y col., 2006; Infante y col., 2003).

Existe evidencia que indica que la co-evolución es la interacción evolutiva recíproca entre una planta y uno o más de sus enemigos naturales (Whittaker y Fenny, 1971; Rausher, 1992). La selección natural impuesta por los enemigos de las plantas, causan la evolución de un nuevo carácter de resistencia en la planta que reduce el ataque del enemigo; esto genera la evolución de contra-resistencia en esos enemigos al evolucionar caracteres que superan la nueva evolucionada planta resistente (Rausher, 2001). Se ha postulado que la interacción gen por gen entre parásitos y plantas es el principal generador de evolución y mantenimiento de diversidad (Ravensdale y col., 2011).

En el reino fúngico, la habilidad de causar enfermedades en plantas parece haber surgido muchas veces durante la evolución. La presión de enfermedad favorece los cambios en las proteínas del hospedero, que son un blanco para el ataque del hongo, para neutralizar el efecto de factores de virulencia del patógeno. Así mismo el patógeno se verá presionado a seguir actualizando sus factores de virulencia para continuar siendo capaz de atacar a los blancos cambiados. La presión de selección en la población del patógeno favorecerá el reconocimiento por parte del hospedero, mientras que la selección en la población de plantas buscará favorecer el reconocimiento

temprano del patógeno (Van der Does y Rep, 2007). Las enfermedades pueden estructurar comunidades naturales (Dobson y Crawley 1994; Hiers y Evans 1997) y dar forma al curso de la evolución (May y Anderson, 1983).

## 4.2 MARCHITEZ DEL AGAVE

Ávila-Miranda y col., (2010) indican que la marchitez en plantas de agave es causada por al menos dos especies dentro del género *Fusarium* indicando como responsables a *F. oxysporum* y *F. solani*.

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 plantas de agave que hayan enfermado por esta causa en el mismo sitio tiempo atrás. Al establecer una nueva plantación, el hijuelo comienza 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-Miranda, 2001).

La infección de la planta por *F. oxysporum* es un proceso complejo conformado de varias etapas de interacciones planta-patógeno: reconocimiento de las raíces hospederas, penetración de la hifa por los diferentes tejidos radiculares, penetración y progresión por el xilema y adaptación al ambiente interno de la planta (Beckman, 1987; Michielse y Rep, 2009). 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). Se ha determinado que *F. oxysporum* es un hongo hemibiótrofo con la capacidad de detectar material de plantas vivo o muerto y así reprogramar la expresión de sus genes para cambiar al estado infeccioso solo cuando sea necesario (van der Does y col., 2008).

Por su parte *F. solani* es un hongo fitopatógeno que causa pudrición de raíz al emitir fitotoxinas y enzimas degradadoras como cutinasas y lignocelulosas degradando lignina,

celulosa y cutina (Vargas, 1992) generando así pérdidas económicas considerables en muchos cultivos importantes (Lim y col., 1991).

### **4.3 MECANISMOS DE DEFENSA DE LAS PLANTAS ANTE EL ATAQUE DE PATÓGENOS**

Las plantas se encuentran en constante amenaza de infección por patógenos con una diversa colección de efectores para colonizar a sus hospederos, por lo que han evolucionado sistemas sofisticados de detección y respuesta que descifran las señales de los patógenos e inducen las defensas apropiadas (Feys y Parker, 2000). Los mecanismos de defensa que las plantas presentan para protegerse del ataque de patógenos pueden ser constitutivos o bien inducidos que incluyen engrosamiento de la pared celular, producción del novo de compuestos antimicrobianos y una rápida muerte celular localizada (Sharma y col., 2011).

El uso de variedades resistentes es uno de los métodos de control en el que las plantas presentan genes de resistencia a ciertos productos de genes de avirulencia de un patógeno en particular (Dyakov, 2007). La expresión temprana de este tipo de genes que ciertas especies de plantas obtienen gracias a la evolución natural, son los que llegan a hacer la diferencia en la guerra de supervivencia entre planta y patógeno, creando así ventaja o desventaja para ambos (Ravensdale y col., 2011).

Las enfermedades pueden moldear el curso de la evolución (Dobson y Crawley, 1994) de modo que los procesos de selección co-evolutivos entre la planta y el patógeno son continuos (Ravensdale y col., 2011) con los cuales se ha generado mucha de la diversidad biológica de la Tierra (Rausher, 2001).

Las interacciones planta-patógeno pueden presentar varios tipos de asociaciones, que dependen en gran parte del contenido genético de cada organismo. La resistencia o susceptibilidad de una planta dependerá del conjunto de genes que intervengan tanto del hospedero como del patógeno (Dyakov, 2007).

Los fitopatólogos han descubierto al menos dos tipos de resistencia a muchas enfermedades, a las que denominaron: resistencia vertical y resistencia horizontal, describiéndolas como: Vertical, cuando un cultivar es resistente a un patógeno, siendo específica a una raza y gobernada por un gen principal. Se llama vertical porque la resistencia es específica a una raza de un patógeno y susceptible a otras además de ser cualitativa. Horizontal, cuando el cultivar es resistente a varias razas del patógeno sin ser específica a ninguna raza en particular y es gobernada por varios genes con pequeños efectos en la expresión del fenotipo, puede ser modificada por condiciones externas, además de ser una resistencia cuantitativa (Vidhyasekaran, 2004).

Los patógenos de plantas a menudo se dividen en biótrosfos y necrotróficos de acuerdo a su estilo de vida. Al ser los biótrosfos dependientes de material vivo para su supervivencia, es fácil imaginar que la resistencia está mediada por una resistencia gen por gen y dependiente de la señalización por ácido salicílico (Glazebrook, 2005). Sin embargo, en el caso de los necrotróficos, la muerte celular programada en el hospedero le facilitaría las cosas al patógeno por lo que una resistencia efectiva contra este tipo de patógenos es la dependiente del etileno y jasmonato (McDowell y Dangl, 2000) y la producción fitoalexina camalexina y acumulación de callosa contribuyen de manera muy significativa a la resistencia contra este tipo de patógenos (Bohman y col., 2004; Ton y Mauch-Mani, 2004).

La resistencia inducida sistémicamente puede ser adquirida (SAR) o inducida (SIR) y es expresada localmente en el sitio de inoculación primaria pero también sistémicamente en los tejidos localizados lejos del tratamiento inicial; por tanto contribuye a la resistencia general en las plantas y puede proveer una ventaja selectiva para su supervivencia (Sticher y col., 1997; Anderson y col., 2002; Vallad y Goodman, 2004).

Dentro de la resistencia sistémica, existen dos rutas de activación que pueden involucrar elicitores de diferentes naturaleza; el ácido salicílico (SA) en SAR o bien, ácido jasmónico (JA) y etileno en SIR como las moléculas señal clave. El desencadenamiento

de estas rutas de biosíntesis, da como resultado la acumulación de productos de diferentes genes de defensa (ej. proteínas PR en SAR) (Anderson y col., 2002).

Estas dos formas de resistencia (SAR o SIR) se pueden diferenciar en base a la naturaleza del elicitor y las rutas regulatorias involucradas (Vallad y Goodman, 2004). SIR es regulada por la ruta del ácido jasmónico/etileno y está asociada con las mordeduras de insectos tanto por el daño como por los componentes específicos de los insectos que participan en la estimulación (Anderson y col., 2002), así como por rizobacterias u otros microorganismos no patogénicos (Kloepper y Ryu, 2004; Haas y Défago, 2005; Lugtenberg y Kamilova, 2009). Por el contrario, la ruta del ácido salicílico (SA), está asociada con eventos que causan necrosis (Anderson y col., 2002). Existe gran evidencia de que SA juega un papel clave tanto de la señalización de SAR como en la resistencia a la enfermedad (Ryals y col., 1996).

SAR puede ser activada al exponer a la planta a microbios virulentos, avirulentos o no patogénicos; o artificialmente con químicos como el ácido salicílico, ácido 2,6-dicloro isonicotínico, entre otros. Las defensas innatas de la planta están, por tanto, potenciadas al elicitar por un estímulo ambiental específico o tratamiento que resulte en la resistencia o la tolerancia contra subsecuentes confrontaciones bióticas (Vallad y Goodman, 2004).

La ruta del SA está relacionada con la reacción hipersensible (HR), en donde la muerte programada de la célula de la planta es parte del mecanismo por el cual el patógeno es detenido en el sitio de invasión inicial. La muerte celular por HR, inicia los eventos de resistencia, llamado resistencia local, en las células alrededor del sitio de infección (Dangl y col., 1996). Con el tiempo, la expresión de los genes de defensa se dan a una distancia mayor dando como resultado el efecto sistémico. Esto se da debido a que el reconocimiento del patógeno lleva a un flujo rápido de iones, producción de superóxido, peróxido de hidrógeno y otros intermediarios de especies reactivas de oxígeno (Epple y col., 2003). La inducción de resistencia sistémica puede activar las defensas en toda la planta. La muerte celular en la respuesta hipersensible se localiza en la célula

confrontada y se inicia por el reconocimiento entre los factores del hospedero y el patógeno condicionados por los genes de resistencia y genes de avirulencia, respectivamente (Anderson y col., 2002).

La molécula indispensable para la inducción de SAR es el ácido salicílico, que se ve incrementado en el floema de la planta infectada antes de la expresión de este tipo de resistencia. Aunque tanto el SA como la actividad de la PAL son requeridas para la resistencia mediante genes como respuesta de defensa; el punto clave en la inducción de SAR, es la habilidad de la planta en percibir el SA generado (Summermatter y col., 1996). Además para generar la respuesta sistémica, el SA generado en el punto de infección es translocado a otras partes en el tiempo adecuado para actuar como molécula señal para activación de SAR (Sticher, 1997). Dependiendo de la planta y el elicitador, se requiere un periodo de tiempo para el establecimiento de SAR que corresponde al tiempo requerido para la acumulación coordinada de las proteínas PR y el ácido salicílico a través de la planta (Vallad y Goodman, 2004). El tiempo necesario para el establecimiento de SAR depende tanto de la planta como del tipo de organismo inductor (Sticher, 1997). Para que la resistencia sea efectiva, es esencial la activación del los mecanismos de defensa antes de que la presión del patógeno alcance un punto crítico (Anderson y col., 2002). De este modo, la habilidad de que la planta produzca rápidamente niveles elevados de SA, modula la resistencia a la enfermedad (Ryals y col., 1996). Dicho de otra manera, el tiempo de las respuestas de defensa, es crítico y puede ser la diferencia entre ser capaz de adaptarse o de desistir en la confrontación con un patógeno o parásito (Vallad y Goodman, 2004).

El SA translocado en la planta, induce la codificación de las llamadas proteínas PRs (proteínas relacionadas a la patogénesis), que intervienen en una serie de reacciones de defensa. Estas proteínas han demostrado ser un recurso efectivo de resistencia contra un amplio rango de patógenos (Stintzi y col., 1993; Seidl, 2008). La información genética de estas proteínas está directamente codificada por la planta hospedera, pero su expresión es inducida específicamente en situaciones relacionadas a patogenicidad y no solo se acumulan localmente en el área infectada, sino que también son expresadas

sistémicamente, adquiriendo la planta una resistencia contra futuras infecciones por hongos, bacterias o virus (Van Loon y Van Strien, 1999).

En particular las familias de las proteínas PR-2 ( $\beta$ -1,3 glucanasas), PR-3 (quitinasas), PR-8 (quitinasas), PR-9 (peroxidases) y PR-11 (quitinasas) han sido identificadas por su elevado potencial antifúngico (Mauch y col., 1988; Lawrence y col., 2000). Como los hongos son organismos pluricelulares eucariotas, heterótrofos osmotróficos y con pared celular formada principalmente de quitina y  $\beta$ -1,3-glucanos, las proteínas quitinasas (PR-3, PR-8 y PR-11), presentan poder antifúngico, gracias a la capacidad de hidrolizar el polímero de quitina, que es el componente principal de la pared celular de los hongos (Tsukamoto y col., 1984).

Por otro lado, las  $\beta$ -1,3 glucanasas (PR2) trabajan en la hidrólisis de polímeros de  $\beta$ -1,3 glucanos (Palumbo y col., 2003), que son otros componentes de las paredes celulares de los hongos y actúan de manera sinérgica con las quitinasas en su degradación inhibiendo su crecimiento (Pan y col., 1991).

La inducción de la síntesis de peroxidases (PR9) es una de las etapas más tempranas en las plantas como respuesta a la interacción con un patógeno microbiano (Dzhavakhiya y Shcherbakova, 2007). Las peroxidases son proteínas que intervienen en el reforzamiento de la pared celular al catalizar las deposiciones de lignina y compuestos fenólicos en reacción del ataque microbiano (Bestwick, 1998), reduciendo susceptibilidad a enzimas hidrolíticas de la pared, además de que protegen a la célula del daño causado por las especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas durante la reacción hipersensible (Van Loon y Van Strien, 1999).

La mayoría de las proteínas relacionadas con estrés se ven expresadas de manera temprana en la interacción incompatible, seguido de la expresión de enzimas antioxidantes en tiempos posteriores (Moura y col., 2014). Un papel importante para la formación de lignina, se lleva a cabo por la peroxidasa, de la cual, incrementa su actividad por daños mecánicos e infecciones en los tejidos. Las peroxidases se

encargan de la polimerización del alcohol cinámico en lignina, produce fuertes lazos entre celulosa, pectinas, glicoproteínas de pared celular y la lignina (Dzhavakhiya y Shcherbakova, 2007).

En un estudio realizado por Barbosa y col (2013) se demostró la importancia de la inducción de PRs en la interacción de plantas de tomate resistente con *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol), indicando que la acumulación de estas proteínas es una característica importante en las respuestas de defensa de la planta (Minic, 2008). A pesar de que *F. oxysporum* se comporta de manera hemibiotrófica, existen evidencias de que genera relaciones gen por gen con varios hospederos (Michielse y Rep, 2009; Takken y Rep, 2010).

Las interacciones gen por gen en el sistema tomate-*Fusarium* (Fol) han proporcionado la base para el desarrollo de cultivares de tomate resistentes a la enfermedad de marchitez por *Fusarium*. Al reconocer a *Fol*, las células en contacto con el xilema inducen una respuesta de defensa que involucra deposición de callosa, acumulación de compuestos fenólicos y formación de tilosas (Takken y Rep., 2010) además de la secreción de compuestos antimicrobianos y proteínas PRs (Beckman, 2000; Rep y col., 2002). La mayoría de estos procesos de resistencia, son visibles también en interacciones compatibles; pero las plantas resistentes, deben involucrar una aparición rápida y sincronizada de estos mecanismos de defensa (Beckman, 1987).

Los compuestos fenólicos de la pared celular pueden inducir resistencia al suprimir las actividades de enzimas degradadoras de pared que emite el patógeno (Vidhyasekaran, 2008). En el caso de *F. solani*, existen evidencias en que las proteínas quitinasas y  $\beta$ -1,3-glucanasa trabajan sinérgicamente en la inhibición contra *F. solani* (Ponstein y col., 1994).

Otro mecanismo involucrado en SAR es la lignificación de paredes celulares, se ha observado en muchas especies de plantas, seguida de un intento de infección por organismos patogénicos (Mauch-Mani y Slusarenko, 1996). La lignificación puede

contribuir a la resistencia de muchas maneras; al incorporar lignina en una pared celular, se fortalece mecánicamente y la hace más resistente a la degradación por las enzimas secretadas por el patógeno (Vidhyasekaran, 2004), además puede constituir una barrera que previene el movimiento libre de nutrientes matando de hambre al patógeno. Los precursores de lignina por sí mismos, pueden generar un efecto tóxico en los patógenos al unirse a las paredes celulares de los hongos, haciéndolas más rígidas e impermeables; dificultando, por tanto, su crecimiento y la captación de agua y nutrientes (Sticher y col., 1997). Incluso existen reportes donde se demuestra que la misma pared celular del hongo encontrado en el espacio intercelular de la planta llega a ser lignificada al intentar ingresar a la planta hospedera (Mauch-Mani y Slusarenko, 1996).

La lignina se forma por polimerización deshidrogenerativa aleatoria de precursores producidos en la ruta del fenilpropanoide (Vance y col., 1980). El primer paso en esta ruta es la desaminación de la fenilalanina al ácido cinámico catalizado por la enzima fenilalanina-amonio liasa (PAL). PAL proporciona precursores para lignina y para varios productos involucrados en la resistencia (fitoalexinas, ácido salicílico y PRs, compuestos fenólicos). Los compuestos del fenilpropanoide pueden ser efectivos contribuyendo a la resistencia *in vivo*, pero su acción individual no necesariamente impartirá resistencia a la enfermedad (Dixon y col., 2002).

Por su parte, el papel del peróxido de hidrógeno o súper oxido pueden trabajar solos o juntos con el óxido nítrico para facilitar la muerte de los patógenos así como en disparar la activación transcripcional de genes de defensa de la planta y la respuesta hipersensible (Delledonne y col., 1998). El  $H_2O_2$  tiene un importante papel en las reacciones de resistencia por ser requerido para el entrecruzamiento de los componentes de la pared celular, regulación de expresión de genes asociados con SAR e intensifica directamente la actividad antimicrobiana (Bestwick y col., 1998) y genera un estrés oxidativo local (Campo y col., 2004). Existen estudios que reportan la producción de ROS, como una respuesta temprana a la interacción con microorganismos patogénicos y no patogénicos (Bolwell y Wojtaszek, 1997; Bolwell y col., 2002). En las interacciones patógeno- hospedero incompatibles, se observa un incremento moderado

inicial en la producción de ROS, que usualmente precede a una producción más fuerte de estrés oxidativo; mientras que en una interacción compatible, no se evidencia un incremento en ROS en el tejido del hospedero, que generalmente termina infectado (Able y col., 2000; Unger y col., 2005).

## **V. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 SELECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL**

Dentro de la zona de denominación de origen del tequila (DOT), diversos predios con elevada incidencia en enfermedad de marchitez del agave fueron visitados por personal del Consejo Regulador del Tequila (CRT). Se seleccionaron las plantas que presentaban fenotipia saludable dentro de los mismos terrenos y se obtuvieron sus hijuelos como representantes de esta característica. Los hijuelos se plantaron en el Campo experimental del Centro de Referencia Agave-Tequila (CRAT) en el municipio de Acatic, Jalisco, mismo que también contaba con una elevada cantidad del inóculo causante de la marchitez del agave. Adicionalmente, personal del CRT inoculó una concentración de 40,000 microconidios/m<sup>2</sup> de una cepa de *F. oxysporum* en el terreno para asegurar la presencia del patógeno en todo el terreno. Pasados 3 años de este trasplante, algunos ejemplares conservaron la fenotipia de salud y vigorosidad, mientras que otros mostraron sintomatología evidente de marchitez o incluso, murieron. En la etapa de madurez fisiológica presentada a los 3 años de edad, se eligieron los representantes finales para la investigación propuesta, siendo caracterizadas de la siguiente manera:

Susceptibles (S).- Hijuelos de plantas evidentemente enfermas.

Potencialmente Resistentes (R).- Hijuelos de plantas sanas, cuyos vecinos inmediatos se encontraban enfermos.

Se tomaron un total de 113 ejemplares, de los cuales 39 presentaban características fenotípicas S y 40 con fenotipia R. El resto de hijuelos (34) se consideraron como Intermedios por su apariencia saludable con plantas vecinas también saludables, pero

no fueron incluidos dentro de los análisis. Los representantes se trasladaron a las instalaciones del Instituto Tecnológico de Tlajomulco, Jalisco para su posterior uso en el análisis propuesto.

## **5.2 REPRODUCCIÓN *in vitro* DE PLANTAS DE *Agave tequilana* Weber var. azul**

Los hijuelos de las plantas de agave recolectados en campo, se sometieron a una limpieza superficial con la ayuda de una manguera a alta presión o “Karcher” para eliminar el exceso de residuos sólidos. Una vez realizado este paso, se llevó a cabo una segunda limpieza un poco más profunda, eliminando raíces, hojas y tallo hasta llegar a obtener un fragmento de aproximadamente 5 cm<sup>3</sup>, el cual fue lavado y tallado con agua y detergente comercial y sumergido en una solución al 2% de hipoclorito de sodio durante 30 minutos. A partir de este punto, los fragmentos se comenzaron a manipular dentro de una campana de flujo laminar (Lúmina, Modelo V-120) empleando utensilios y soluciones previamente esterilizadas a 121 °C y 15 psi durante 20 minutos para evitar una contaminación cruzada. Sobre una superficie estéril y con ayuda de pinzas y bisturí, los fragmentos fueron fraccionados por sus periferias hasta llegar a la zona del mismo que contenía el tejido meristemático de aproximadamente 1 cm<sup>3</sup>, eliminando el resto del tejido. El cubo obtenido fue sometido a una última desinfección al sumergirse en una solución estéril al 1% de hipoclorito de sodio durante 15 minutos con agitación ligera. Transcurrido este tiempo, se enjuagó 3 veces con agua destilada estéril y se seccionó verticalmente en sentido transversal y longitudinal en cubos más pequeños hasta obtener de 12 a 16 fragmentos de aproximadamente 9 mm<sup>3</sup>.

Los pequeños fragmentos se depositaron en cajas de Petri con medio MS (Murashige y Skoog, 1962) con algunas modificaciones en las fuentes de Nitrógeno, de acuerdo a lo reportado por Castro en 1990 adicionado con vitaminas L2 (Phillips y Collins, 1979), AIA y BAP como reguladores de crecimiento en las concentraciones sugeridas por Díaz-Martínez y col., (2012) sacarosa y Gel Rite como agente gelificante a un pH final de 5.7 (Cuadro 1). Las cajas se colocaron en una superficie con fondo blanco, humedad relativa de 30%, a 25±2°C, bajo luz LED con una incidencia de 20 μmol/m<sup>2</sup>/s, y un fotoperiodo

de 16 h. En esta primera etapa de establecimiento se mantuvieron durante 4 semanas, para luego ser transferidas a medio para reproducción en vasos de plástico de polietileno de baja densidad y tapas de PET totalmente transparentes conteniendo los mismos nutrientes del medio anterior pero adicionado con Polivinipirrolidona (PVP, 1 g.L<sup>-1</sup>, Sigma, Cat. P2307) y Carbón Activado (CA, 2 g.L<sup>-1</sup>, Sigma-Aldrich, Cat. C9157). En la etapa de reproducción se realizaron resiembras cada 6 semanas.

Una vez generada la raíz (12 semanas aproximadamente), las plantas se transfirieron a sustrato inerte de vermiculita con una solución de las sales inorgánicas del mismo medio en una proporción 1:3 (w:v), sin la adición de ninguna fuente de carbono. La pre-adaptación se fue dando al eliminar los reguladores de crecimiento, con pequeñas aperturas progresivas en la parte superior del recipiente, para permitir el intercambio gaseoso con el exterior. Una vez abierto, se llevó a cabo la adaptación *ex-vitro* al transferir las plantas en macetas que contenían como sustrato una mezcla de vermiculita, perlita y peat-moss (Pro-Mix). En esta etapa, la fertilización y riego de las plantas fueron dirigidas gracias a un medidor digital de humedad, conductividad eléctrica e iluminación incrustado en el sustrato a nivel de raíz y sincronizado con la aplicación Parrot Flower Power ©.

### **5.3 MARCADORES MOLECULARES MEDIANTE AFLP**

#### **5.3.1 EXTRACCIÓN DE DNA**

El tejido foliar restante de la metodología de reproducción *in vitro*, fue desinfectado superficialmente y pequeños trozos se almacenaron a -70 °C en un ultracongelador REVCO (Thermo Scientific, Mod. ULT1386-3-D41) hasta su uso. Previo a la extracción de DNA, los trozos se pulverizaron con nitrógeno líquido en morteros y pistilos (previamente esterilizados y congelados).

La extracción de DNA se llevó a cabo con la ayuda del Kit “Wizard Genomic DNA Purification Kit” de Promega, colocando en un tubo Eppendorf de 1.5 ml, 40 mg del tejido pulverizado, al cual se agregó 600 µl de solución para lisis de núcleo agitando en vórtex durante 3 segundos antes de incubar a 65°C durante 15 min. Pasado este tiempo, se

**Cuadro 1.** Composición de nutrientes para elaborar 1 L de medio MS para el establecimiento de explantes de *agave tequilana* Weber var. azul. \* Adicionado en la etapa de reproducción.

STOCK	COMPUESTO	PESO (g/100 ml)	Volumen de stock (ml)	Peso (g)
Macronutrientes (100X)	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	4	10	NA
	KNO <sub>3</sub>	18.2		
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	3.7		
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.7		
Micronutrientes (200X)	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1.24	5	NA
	MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	4.46		
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1.72		
	KI	0.166		
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.05		
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.005		
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.005		
CaCl <sub>2</sub> (50X)	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	2.2	20	NA
FeEDTA (100X)	Na <sub>2</sub> .EDTA	0.372	10	NA
	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.278		
Vitaminas L2 (200X)	Tiamina HCl	0.04	5	NA
	Piridoxina HCl	0.01		
	Inositol	0.5		
	<b>COMPUESTO</b>	<b>PESO (mg/ml)</b>	<b>Stock (ml)</b>	<b>Peso (g)</b>
Auxinas	AIA	1	0.6	NA
Citoquininas	BAP	1	9	NA
Sacarosa		NA		30
PVP *		NA		2
CA *		NA		3
Gel Rite		NA		2

añadió a la mezcla 3 µl de RNAsa y se mezcló suavemente para luego incubar a 37°C durante 15 min. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se adicionaron 200 µl de Solución para precipitación de proteínas agitando vigorosamente en vórtex durante 20 segundos para luego centrifugar durante 3 min a 13 000 g. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo que contenía 600 µl de isopropanol y se mezcló gentilmente. Una vez

más se centrifugó la muestra a 13 000 g durante 1 min decantando cuidadosamente el sobrenadante para luego realizarle al DNA precipitado un par de lavados con etanol al 70% y volviendo a centrifugar a 13 000 g durante 1 min. Finalmente se decantó el etanol y se dejó secar la muestra durante 15 min para luego agregar 100 µl de Solución de Rehidratación de DNA e incubar a 65 °C por 1 h con agitación suave periódicamente. El DNA extraído se almacenó a -20 °C hasta su uso.

### **5.3.2 AFLP**

Se comenzó con la estandarización en las concentraciones de DNA de las muestras. El DNA obtenido en el proceso de extracción, se cuantificó en un espectrofotómetro NanoDrop 8000 (Thermo Scientific, ND-8000-GL). Con base en las concentraciones obtenidas, todas las muestras fueron estandarizadas a una concentración final de 100 ng/µl.

La evaluación de los polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLPs) incluyó 5 etapas que incluyen; digestión, ligación, pre-amplificación, amplificación selectiva y detección.

Para la DIGESTIÓN se preparó un coctel mezclando Buffer 5X RL (2.5 µl/reacción), Mix enzimático EcoR1/Mse1 (1 µl/reacción) y agua desionizada (4 µl/reacción) y se agregaron 7.5 µl de coctel a un tubo de PCR de 200 µl más 5 µl de DNA y se incubó la mezcla de reacción durante 2 h a 37°C. Transcurrido este periodo de tiempo, se inactivaron las enzimas aplicando 70°C de temperatura durante 15 minutos y se colocaron sobre hielo. El DNA digerido fue sometido a una LIGACIÓN de los adaptadores agregando a cada tubo 12 µl de Mix de adaptadores y 0.5 µl de T4 DNA ligasa incubando la mezcla de reacción a 20 °C durante 2 h. La reacción de los ligados se diluye en una relación 1:10 con agua desionizada. Para poder iniciar con el proceso de PRE-AMPLIFICACIÓN, se realizó un coctel con AFLP Pre-amp Primer Mix para cada reacción, Buffer TaqPCR 10X + KCl, MgCl<sub>2</sub> 25 mM y Taq DNA Polimerasa (20, 2.5, 1.3 y

0.2 µl/reacción respectivamente). En un tubo para PCR nuevo se mezclaron 24 µl del coctel de pre-amplificación y 2.5 del ligado diluido y se sometieron a 20 ciclos del programa en termociclador.

Las condiciones de pre-amplificación se muestran en el cuadro 2:

**Cuadro 2.** Condiciones de Temperatura – Tiempo para la pre-amplificación del producto ligado en la prueba de análisis para AFLPs.

Temperatura	Tiempo
94°C	30 s
56°C	60 s
72°C	60 s

Una vez obtenida la pre-amplificación de los fragmentos generados, se realizó una dilución 1:20 para emplear en la AMPLIFICACIÓN DE PCR DÚPLEX SELECTIVA, en la que los primers empleados corresponden al Mse1+3 bases y EcoR1+3 bases-marcado con fluorescencia (4 marcajes distintos). El volumen final de reacción es de 11 µl por juego de primer-templado, para los que se recomienda emplear pares de primers con una temperatura de fusión similar. Los cocteles para las reacciones de cada par de combinaciones, fueron preparadas de acuerdo a lo establecido en el Cuadro 3.

Es importante hacer mención de la fotosensibilidad que presentan los primers etiquetados, por lo que este procedimiento debe realizarse en condiciones de oscuridad y sobre hielo para evitar la degradación de las moléculas. El programa de amplificación para las mezclas de reacción se muestra en el Cuadro 4.

En una placa de 96 pozos (AXYGEN PCR-96-AB-C, Cat. 321-65-051) se vertieron 2 µl de amplificado (combinaciones 1 y 2), 2 µl de amplificado (combinaciones 3 y 4) y 6 µl de una mezcla marcador Liz:formamida en proporción 1:5 y se enviaron a secuenciar a un secuenciador AB3730xl con un filtro G5 (Dye set, matriz DS-33, Número de Catálogo: 4345833) que permite identificar 5 fluoróforos.

**Cuadro 3.** Cocteles de reacción para la amplificación selectiva duplex de los productos de fragmentos pre-amplificados, con las combinaciones de primers marcados con los fluoróforos correspondientes. a) Coctel que incluye primers marcados con fluoróforos PET y NED. b) Coctel que incluye primers marcados con fluoróforos VIC y FAM.

a)		b)	
Amplificación selectiva (combinaciones 1 y 2)	Volumen	Amplificación selectiva (combinaciones 3 y 4)	Volumen
H <sub>2</sub> O desionizada	4.1 µl	H <sub>2</sub> O desionizada	4.1 µl
Buffer de amplificación 10X + KCl	1.1 µl	Buffer de amplificación 10X + KCl	1.1 µl
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	0.6 µl	MgCl <sub>2</sub> 25 mM	0.6 µl
Taq Polimerasa	0.2 µl	Taq Polimerasa	0.2 µl
Primer <i>Mse1</i> CTT (contiene dNTPs)	2 µl	Primer <i>Mse1</i> CTT (contiene dNTPs)	2 µl
Primer marcado <i>EcoR1</i> ACA PET [10 pmol/µL]	0.5 µl	Primer marcado <i>EcoR1</i> AGA VIC [10 pmol/µL]	0.5 µl
Primer marcado <i>EcoR1</i> ACT NED [10 pmol/µL]	0.5 µl	Primer marcado <i>EcoR1</i> AGC FAM [10 pmol/µL]	0.5 µl
ADN preamplificado y diluido	2 µl	ADN preamplificado y diluido	2 µl
Volumen total	11 µl	Volumen total	11 µl

**Cuadro 4.** Programa “touchdown” para la amplificación selectiva. Las temperaturas de anillamiento en los primeros 12 ciclos son 65, 64.3, 63.6, 62.9, 62.2, 61.5, 60.8, 60.1, 59.4, 58.7, 58 y 57.3 °C. En los siguientes 23 ciclos, la temperatura de anillamiento se mantiene a 56°C.

Pasos	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	
1	94	30	
2	65	30	
3	72	60	
4	94	30	
5	65 (disminuyendo 0.7 °C cada ciclo)		12
6	72	60	ciclos
7	94	30	
8	56	30	23
9	72	60	ciclos
10	4	α	

Por último, se obtuvieron los electroferogramas correspondientes al anclaje de cada uno de los primers marcados en los diferentes tamaños de los fragmentos, mismos que se analizaron mediante el software Geneious® hasta obtener una matriz binaria. Una vez obtenida la matriz, fue posible elaborar los dendogramas correspondientes para las muestras y así determinar la variabilidad empleando el software NTSYSpc 2.2. De los dendogramas obtenidos para cada combinación de primers y su respectivo marcaje, se buscaron representantes de cada característica fenotípica (R o S) que se agruparan repetidamente en los conglomerados.

#### **5.4 INOCULACIÓN DE CONIDIOS DE LOS FITOPATOGENOS CAUSANTES DE LA MARCHITEZ DEL AGAVE**

Las cepas *Fusarium oxysporum* "SR8" y *F. solani* "G", empleadas para la confrontación de las plantas seleccionadas, fueron cepas con comprobada capacidad patogénica a plantas de *Agave tequilana* Weber var. azul, pertenecientes al cepario del laboratorio de Fitopatología del Instituto Tecnológico de Tlajomulco. Dichas cepas se sembraron en medio PDA para su crecimiento durante 7 días a  $28 \pm 1$  °C. Transcurrido este tiempo, se obtuvo una suspensión de microconidas agregando 8 ml de agua destilada estéril y frotar suavemente la superficie con un triángulo esparcidor estéril. La suspensión se recuperó con una pipeta en un matraz Erlenmeyer de 150 ml estéril, todo de manera aséptica dentro de la campana de flujo laminar. La concentración de microconidias se ajustó a una concentración de  $4 \times 10^5$  conidios<sup>-ml</sup> al mezclar con la cantidad indicada de medio sintético (Okon y col., 1973) luego de su conteo con la cámara de Neubauer, para forzar su pre-germinación manteniéndose a 28 °C y 150 rpm durante 12 h.

Con base en características de tamaño, cantidad de raíz y apariencia, se seleccionaron subgrupos de 15 plántulas con fenotipia potencialmente resistente y 15 plántulas con fenotipia susceptible. Se inoculó 1 ml de la suspensión pre-inoculada en 3 puntos equidistantes cercanos a la raíz, en el sustrato de la maceta que sostenía a la planta de agave. Se consideraron 4 repeticiones de cada grupo de plantas con características

fenotípicas R y S para cada cepa patogénica de *Fusarium*. Como primer bioensayo, las plantas se analizaron a las 72 h post-inoculación.

De acuerdo a los resultados generados por el análisis bioquímico de las plantas confrontadas por 72 h, se seleccionó un grupo aún más pequeño para un ensayo con una duración de 30 días de confrontación, en el que se llevó a cabo la misma metodología de inoculación.

## **5.5 EXTRACCIÓN DE ÁCIDO SHIKÍMICO EN RAÍCES**

Se agregaron 100 mg de raíces pulverizadas en tubos Falcon de 15 ml a los que se agregaron 10 ml de una solución de metanol al 50%. Los tubos se colocaron en un baño ultrasónico durante 30 min con una frecuencia de 50 kHz (Gómes y col., 2015). Los tubos se centrifugaron a 4000 g y 20 °C durante 10 min y el sobrenadante se colectó y filtró a través de un filtro PES de 0.45 µm en un tubo nuevo. Se agregó una concentración conocida de estándar de ácido shikímico (SHA) a cada vial cromatográfico, previo al análisis por UHPLC.

## **5.6 EXTRACCIÓN DE ÁCIDO SALICÍLICO Y *trans*-CINÁMICO EN RAÍCES**

La extracción de ácido salicílico (SA) y de ácido *trans*-cinámico (CA) se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Verbene y col., (2002). El sustrato adherido a las raíces se removió cuidadosamente con agua corriente para ser congeladas y trituradas con nitrógeno líquido en un mortero. Se transfirieron 50 mg de raíces pulverizadas en un tubo de microcentrífuga a lo que se añadió 1 ml de una solución al 90% de metanol. La mezcla se sometió a vórtex durante 1 minuto y a sonicación durante 5 minutos para después ser centrifugada a 14,000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se colectó en un tubo de 2 ml mientras que el pellet fue resuspendido en 0.5 ml de metanol absoluto, repitiendo los pasos de vórtex, sonicación y centrifugación mencionados anteriormente. Los sobrenadantes se combinaron y se volvieron a centrifugar para luego evaporar la mezcla metanol:agua. Se agregaron 250 µl de una

solución al 5% de ácido tricloroacético en agua (TCA, Sigma-Aldrich, Cat. T6399) y se mezclaron con vórtex para luego particionarla con 800 µl de etilacetato:ciclohexano (1:1 v/v), lo que generó la separación de dos fases; la superior orgánica con los ácidos libres y la inferior acuosa con su forma glicosilada. La partición se realizó dos veces y las mezclas orgánicas se mezclaron y dejaron evaporar a la sequedad, mientras que la fase acuosa, se hidrolizó al agregar 800 µl de una solución 8 M de HCl y calentando a 80°C durante 1 h. Posterior a este paso, la fase hidrolizada se sometió a la partición previamente descrita y la nueva fase orgánica se mezcló con las previas para su secado.

La recuperación final de SA y CA se disolvió en 1 ml de metanol al 100% y se filtró a través de un filtro de jeringa de poliéter sulfona (PES) de 0.45 µm (Thermo Scientific, Cat. F2500-14) antes del análisis UHPLC. A cada vial cromatográfico, se agregó una cantidad conocida de cada molécula estándar, con la intención de aumentar la señal de detección, de manera que se restó el área correspondiente a la concentración añadida basada en el área emitida en la curva de calibración, para obtener la concentración real de la muestra.

## **5.7 CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS**

Se llevó a cabo una cuantificación individual para el SHA, CA y SA en un sistema UHPLC Dionex ICS-5000 equipado con una automuestreador (AS-AP) y un detector de arreglo de diodos (Ultimate 3000). Los datos se analizaron con el software Chromeleon 7.0. Se determinó la longitud de onda óptima para cada molécula con un escaneo espectral de UV con el que se generó un mapa tridimensional con el punto de absorbancia máxima resultando 210 nm para SHA, 302 nm para SA y 280 nm para CA.

La separación cromatográfica de las moléculas CA y SA se llevó a cabo en una columna C18 (5 µm, 46x150 mm, Thermo Fisher Scientific). La fase móvil empleada consistió en una mezcla de ácido acético acuoso al 3% (eluyente A) con metanol grado HPLC (JT Baker, Cat. 67-56-1) (eluyente B), en una proporción 60:40 para SA y de 40:60 para CA,

con un flujo continuo de 0.6 ml/min. El volumen de inyección fue de 15  $\mu$ l y el tiempo total de corrida correspondió a 20 min.

La separación del SHA se realizó en una columna C18 Luna NH<sub>2</sub> (2.6  $\mu$ m, 4.6X150 mm, Phenomenex) equipada con una guarda de seguridad (Phenomenex, AJO-4301). La fase móvil consistió en una mezcla de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, pH 4.2 (eluyente A) y metanol grado cromatográfico (eluyente B) en una proporción 50:50 a un flujo de 0.6 ml/min durante 20 min.

Los datos obtenidos en la integración del área de los picos, se correlacionaron con las curvas de calibración previamente elaboradas con los estándares analíticos de cada molécula a diferentes concentraciones, con un coeficiente de correlación de 0.999 para comparar el área de los picos con la concentración de las muestras.

## **5.8 ACTIVIDAD FENILALANINA-AMONIO LIASA (PAL)**

El extracto proteico para la determinación de la actividad PAL se obtuvo mediante la metodología propuesta por Matros y col., 2006. Las raíces se maceraron en nitrógeno líquido y el pulverizado se homogenizó con buffer de borato de sodio 100 mM (pH 8.8) con EDTA 5 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 5 mM y PVP al 10%, en una proporción 1:2 (peso:volumen). El homogenado se incubó durante 30 minutos a 5 °C y se sonicó en un limpiador digital ultrasónico (H&B Luxuries, Cat. CD-4820) durante 1 min a 50 kHz, para luego centrifugarlo a 13,000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se usó como extracto enzimático de enzima PAL y la proteína total se cuantificó por el método de Bradford.

La actividad PAL se determinó en cubetas trUView (Bio-Rad<sup>TM</sup>, Cat. 1702510) para la medición de la absorbancia del ácido *trans*-cinámico a 280 nm en un biofotómetro plus (Eppendorf AG, Cat. 22331). Se elaboró una curva de calibración de ácido *trans*-cinámico (Sigma Aldrich, Cat. C80857).

Se mezclaron 100  $\mu$ l del extracto enzimático PAL con 100  $\mu$ l de fenilalanina 100 mM en buffer de borato de sodio 100 mM (pH 8.8) y la mezcla se incubó a 37 °C durante 1 h. Se

detuvo la reacción al añadir 100 µl de HCl 6M. La actividad PAL se expresó como una unidad de ácido *trans*-cinámico producido en un minuto por mg de proteína (Koç and Sütün, 2012).

## **5.9 ACTIVIDAD DE PROTEÍNAS RELACIONADAS A LA PATOGÉNESIS**

### **5.9.1 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES**

Aproximadamente 1 g de tejido foliar de al menos 3 repeticiones para cada tratamiento, se maceró con nitrógeno líquido y se almacenó a -70°C hasta su uso. La proteína total se extrajo de acuerdo a lo propuesto por Zheng y Wozniak (1997) con ligeras modificaciones. El proceso consistió en agregar buffer de acetato de sodio 50 mM (pH 5.5) frío al tejido macerado en una proporción 2:1. Se incubó durante 5 minutos a 4°C manteniendo una agitación de 150 rpm. Las muestras se centrifugaron a 13,500 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante recuperado se empleó como extracto proteico para las determinaciones de actividad específica de proteínas PR. Para determinar la concentración de proteína total de los extractos, se midió la absorbancia a 595 nm en un lector de absorbancia para microplaca iMark (BioRad®, Mod. 1681130) de acuerdo a lo propuesto por Bradford (1976) con ligeras modificaciones para microplaca (Manual de instrucciones, Bio-Rad™). La absorbancia obtenida, se correlacionó con una curva de calibración elaborada con albúmina de suero bovino como estándar, en un rango de concentraciones de 1 a 50 µg/ml. La concentración de proteína total encontrada en cada muestra, fue empleada para los cálculos de actividades de proteínas relacionadas a la patogénesis, mencionadas a continuación.

### **5.9.2 ACTIVIDAD QUITINASA**

Se evaluó la actividad quitinasa de los extractos proteicos de manera colorimétrica, en base a la formación de la N-acetil-glucosamina, al usar quitina de caparazón de cangrejo (Sigma, Cat. C9752) como sustrato, de acuerdo al protocolo propuesto por Reissig y col., en 1995. Se mezclaron 25 µl del extracto proteico con 25 µl de una suspensión de

quitina en buffer McIlvaine (3.8 mg<sup>ml</sup>, pH 5.0) y la mezcla se incubó durante 24 h a 38°C con agitación. Pasado el tiempo de incubación, se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente y 25 µl del sobrenadante obtenido se transfirieron a un microtubo nuevo al que se agregaron 5 µl de buffer de borato 0.8 M (pH 9.2) para luego calentarlo a 100 °C por 3 minutos y detener la reacción enfriándolo a 4°C. Se agregaron 218 µl de reactivo DMAB y se incubó a 37°C durante 20 min. Se determinaron las lecturas de absorbancia a 550 nm en el lector absorbancia para microplacas iMark. La unidad de actividad quitinasa se expresó de manera específica con relación a los mg de proteína total, donde una unidad equivale a 1 mg de quitina hidrolizado por mg de proteína por minuto.

### **5.9.3 ACTIVIDAD PEROXIDASA**

La determinación de actividad peroxidasa se llevó a cabo según lo descrito por Bestwick (1998) con ligeras modificaciones para microplaca y la medición de absorbancia se detectó a 490 nm en un lector de absorbancia para microplacas iMark (Bio-Rad<sup>TM</sup>). Para la reacción, se mezclaron 10 µl del extracto crudo proteico con una solución 10 mM de guaiacol (Sigma-Aldrich, Cat. G10903) en buffer de fosfato de potasio 50 mM (pH 6.0), 10 µl de agua destilada y 20 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35 mM. Las lecturas se realizaron al tiempo cero y 3 minutos después. La actividad peroxidasa se expresó como la absorbancia a 490 nm por minuto, por mg de proteína total.

### **5.9.4 ACTIVIDAD β-1,3-GLUCANASA**

Este procedimiento se basó en la metodología propuesta por Zheng y Wozniak (1997) con modificaciones para microplaca. Se elaboró una curva de calibración con diferentes concentraciones de D-glucosa (Sigma, Cat. D9434) en buffer de citrato 50 mM, pH 4.6. Para iniciar la reacción, en un tubo de 1.5 ml se añadieron 10 µl del extracto proteico, adicionando 10 µl de laminarina (Merck, Cat. 9008-22-4) al 0.4% en buffer de citrato 50 mM, pH 4.6. La mezcla fue incubada durante 20 minutos a 37 °C en un termo baño (FELISA, Modelo FE-371). Transcurrido este tiempo, se detuvo la reacción al colocar los

tubos sobre hielo. Se agregaron 40  $\mu$ l de reactivo de Cu ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  377 mM, glicina 213 mM y  $\text{CuSO}_4$  8mM) y 40  $\mu$ l de reactivo de coloración B (clorato de neocuprina monohidratado 0.5 mM). Se mezclaron perfectamente y se incubaron a 100 °C durante 10 minutos en un termo block (Daigger, Modelo JX2910A).

Transcurrido el lapso de tiempo, se colocaron los tubos nuevamente sobre hielo y se añadieron 100  $\mu$ l de agua destilada fría. Enseguida se colocó el contenido en los pozos de la microplaca y se llevó a cabo la lectura de absorbancia en el lector absorbancia para microplacas iMark a 450 nm. Una unidad de actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa es equivalente a 1  $\mu$ mol de D-glucosa liberado por minuto por miligramo de proteína total.

## **5.10 CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES**

100 mg de tejido radicular macerado en nitrógeno líquido, se mezcló con una solución de metanol (Sigma-Aldrich, Cat. 322415) al 50% y se sonicó durante 30 min. La mezcla se centrifugó durante 10 minutos a 4000 rpm y 4 °C, en una centrífuga con refrigeración (Hermle Z383K). El sobrenadante recolectado se utilizó para la medición de compuestos fenólicos de acuerdo a lo reportado por Stevanato y col., en 2004. Se elaboró una curva de calibración con la medición de absorbancia a 490 nm del catecol (Sigma-Aldrich. Cat. 135011) en un rango de concentraciones de 0.5 a 5 mM, en el lector de microplacas.

## **5.11 INCIDENCIA DE ENFERMEDAD EN RAÍCES CAUSADA POR *Fusarium solani***

Para el diagnóstico del tejido dañado en raíz, se tomó tejido radicular aleatoriamente en diferentes niveles de altura. Las secciones se examinaron bajo un microscopio óptico (Carl Zeiss®, Axiolab) con el objetivo 40X. Se cuantificó el porcentaje de células visiblemente dañadas para el tratamiento inoculado con *F. solani* y su comparación con los controles no inoculados. Los datos de porcentajes obtenidos se transformaron usando la transformación angular. Los datos transformados se analizaron con el software estadístico MiniTab® 17.

## 5.12 CUANTIFICACIÓN DE LA COLONIZACIÓN DE *F. oxysporum* EN LA PIÑA DE AGAVE, MEDIANTE qPCR

Las piñas de las plantas inoculadas con *F. oxysporum* y sus controles, fueron congeladas y con ayuda de un sacabocado estéril, se extrajo un fragmento de la parte basal y central de la misma. Este tejido se utilizó para la extracción de DNA empleando el Kit de Promega mencionado previamente. Todos los fragmentos extraídos tuvieron el mismo peso y fueron tomados a la misma altura de la piña.

El DNA total obtenido, contenía una mezcla de DNA vegetal y fúngico (en los casos en que el hongo hubiere alcanzado colonizar hasta este punto). Se utilizaron los primers selectivos ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG -3') y FoComRew (5'-TTTGGGGAACGCGATTTGACT-3') para la cepa patogénica *F. oxysporum* SR8 diseñados por Ramírez-Ramírez (2017), con lo que la amplificación fue únicamente de material genético de naturaleza fúngica.

La amplificación cuantitativa mediante qPCR, se realizó en un termociclador Applied Biosystems StepOnePlus Real-Time PCR (Mod. 21634). El coctel para un volumen de reacción de 12.5 µl consistió en 1 µl de DNA templado, 6.25 µl del Mix (Máxima SYBR Green/Rox qPCR Master Mix, Thermo Scientific) y 1 µl de cada uno de los primers previamente descritos. Las condiciones para la amplificación se muestran en el cuadro 5. Como control negativo, se sustituyó el DNA por agua destilada estéril y como control positivo, una concentración conocida (59.23 µg/ml) de DNA fúngico de la cepa inoculada.

Se empleó DNA extraído de micelio de SR8 crecido en medio PDA para generar una curva de calibración. Se cuantificó en un Bio-fotómetro plus (Eppendorf AG, Mod. 6132) y se realizaron diluciones que también fueron cuantificadas. Dichas diluciones, se amplificaron bajo las mismas condiciones que las muestras, con lo cual fue posible obtener el área bajo la curva correspondiente a cada concentración.

**Cuadro 5.** Condiciones de amplificación para el par de primers específicos para detectar la cepa patogénica SR8 de *F. oxysporum*. Datos obtenidos de Ramírez-Ramírez y col. (2017).

		Temperatura (°C)	Tiempo (min)
	Desnaturalización inicial	94	2
10 ciclos	Desnaturalización	94	1
	Anillamiento	69	2
	Extensión	72	1
22 ciclos	Desnaturalización	94	1
	Anillamiento	55	2
	Extensión	72	1
	Extensión final	72	6

### 5.13 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La evaluación estadística de los resultados, fue basada en un diseño completamente al azar, con diferentes repeticiones para cada tratamiento en todas las mediciones, con un mínimo de 3 repeticiones por tratamiento, por lo que se empleó un Modelo Linear General (GML). Mediante un sistema de análisis estadístico SAS® versión 8.0 (SAS Institute Inc.) se determinaron las diferencias significativas mediante una prueba de Duncan ( $P < 0.05$ ).

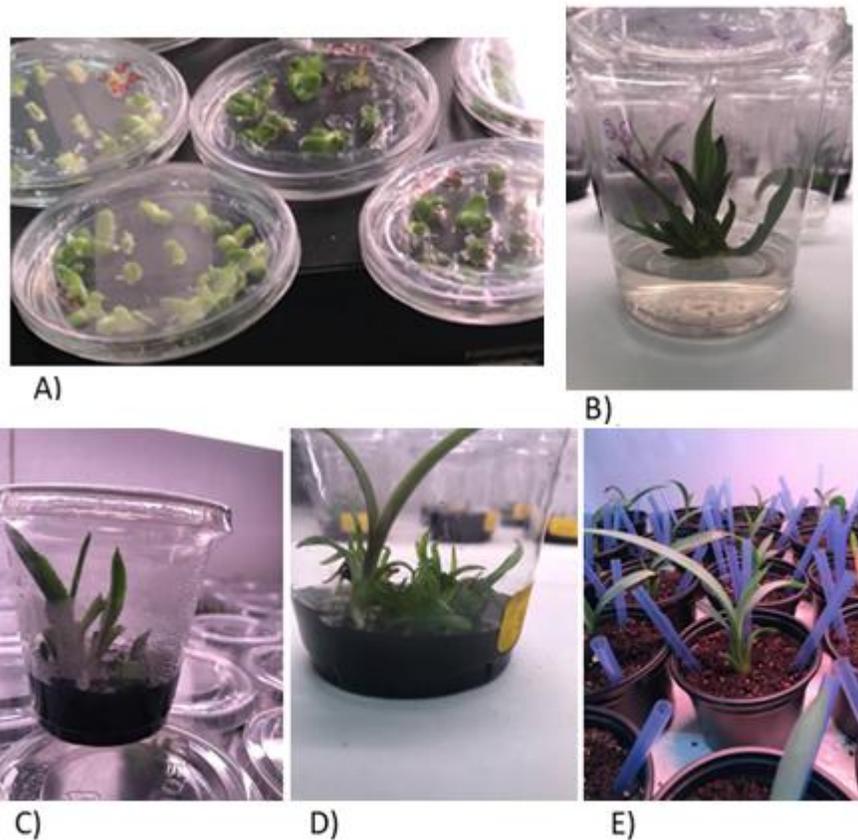
El dendograma de similaridad para AFLPs se elaboró utilizando el software NTSys pc2.2, índice Dice y un método de agrupamiento UPGMA.

Se realizó un análisis de correlación entre la incidencia en enfermedad de raíces causada por *F. solani* o las piñas colonizadas por *F. oxysporum* y los mecanismos relacionados a resistencia expresados evaluados, con la finalidad de identificar los mecanismos candidatos para la defensa contra cada uno de los patógenos.

## VI. RESULTADOS

### 6.1 CULTIVO *in vitro*

La producción de brotes de cada hijuelo mediante cultivo *in vitro* fue muy variable ya que en algunos casos y bajo el mismo tratamiento, un hijuelo produjo hasta 24 brotes mientras que otros no generaron brote alguno. Dichos brotes, produjeron una segunda generación de brotes, al presentar más brotes durante la etapa de reproducción. Incluso, la etapa de adaptación *ex-vitro* mostró presencia de pequeños hijuelos en algunos casos (Figura 1).

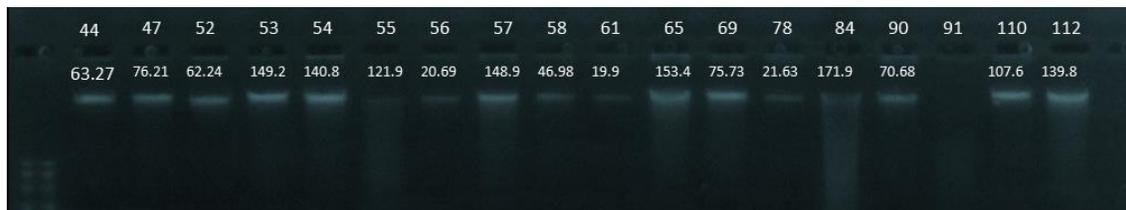


**Figura 1.** Reproducción *in vitro* de plántulas de *Agave tequilana* Weber var. azul. A) Corte de los 16 fragmentos del tejido meristemático y su adyacente cercano. B) Etapa de reproducción. C) y D) Diferencias en la capacidad de formación de brotes por una plántula individual. E) Adaptación *ex-vitro* previo a la inoculación.

## 6.2 ANÁLISIS DE MARCADORES MOLECULARES AFLP

### 6.2.1 EXTRACCIÓN DE DNA

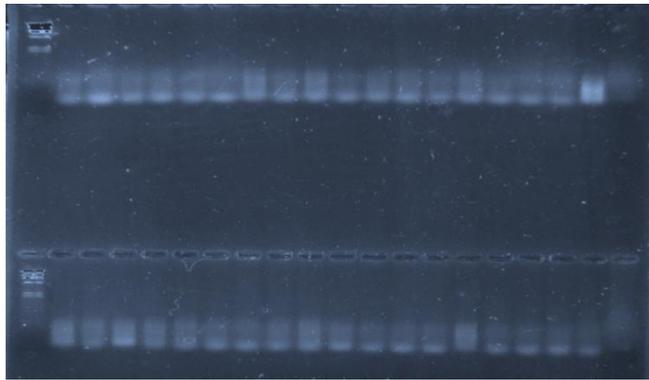
La metodología de extracción de DNA de tejido foliar empleado, generó un total de 65 muestras con buena calidad de DNA, mientras que las restantes 14 presentaron un grado de degradación, por lo que no fueron consideradas para la evaluación de marcadores de AFLPs (Figura 2).



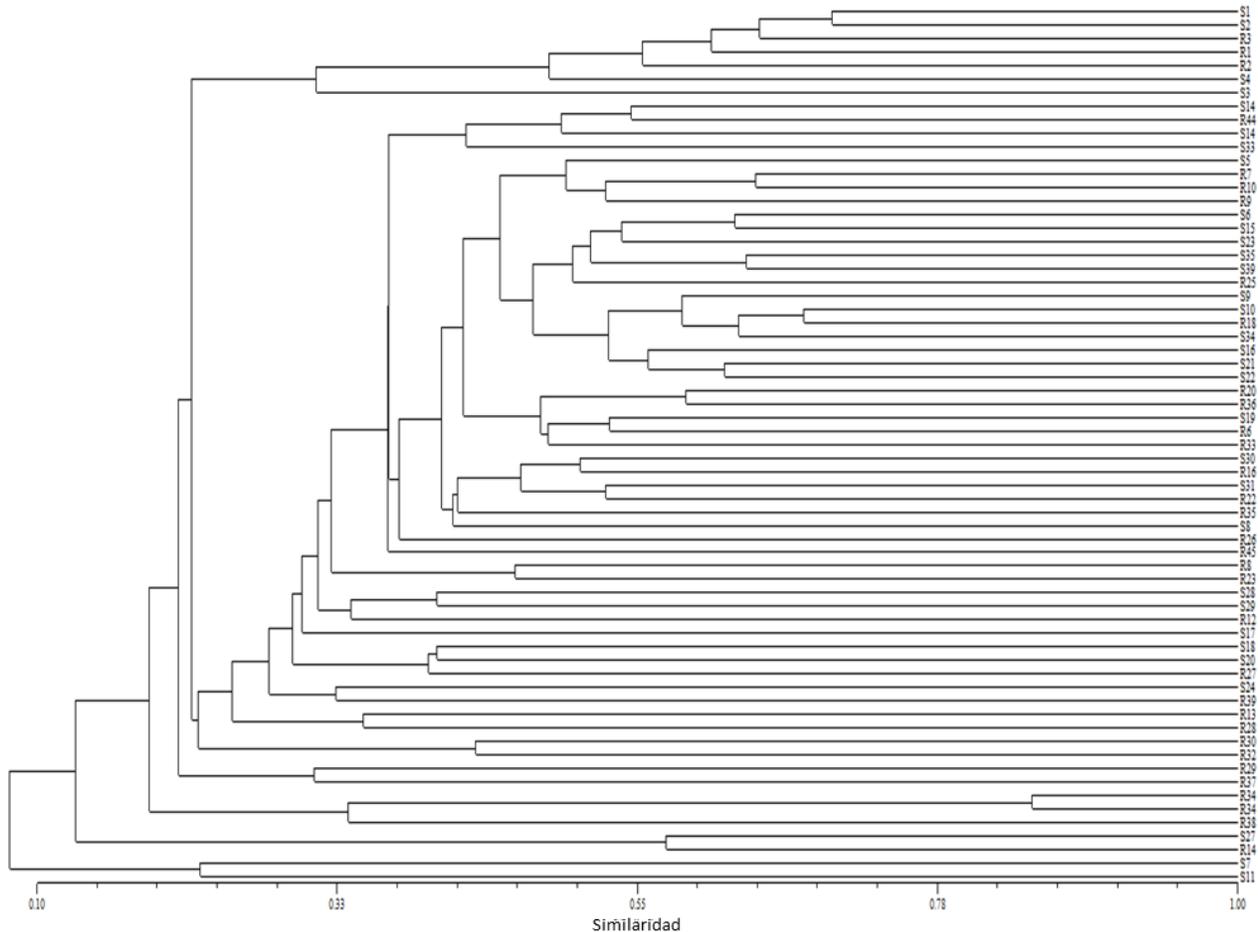
**Figura 2.** Electroforesis en gel de agarosa (1%) para observar la extracción de DNA de tejido foliar de hijuelos de plantas de *Agave tequilana* Weber var. azul a emplear en la amplificación de AFLPs. Los números superiores al pozo de carga corresponden al número de muestra, mientras que los números inferiores corresponden a la concentración de DNA en ng/μl.

Consecutivo a esto, se realizaron el resto de los pasos correspondientes a la técnica de AFLPs previamente mencionados. Se obtuvieron exitosamente los electroferogramas de cada combinación de primers empleada para la amplificación de los fragmentos polimórficos en longitud llevada a cabo. Los amplicones se presentaron en el rango de 60 a 400 pb en la amplificación selectiva en la mayoría de las plantas analizadas. Se elaboraron 4 dendogramas para cada combinación de primers, encontrando en todos ellos variabilidad genética evidente entre especímenes, pero sin una clara asociación de dicha variabilidad con el fenotipo seleccionado como resistente o susceptible (Figura 4).

En la serie de pasos marcados en la metodología de AFLPs, se corroboró el paso de pre-amplificación mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1%, el cual mostró una especie de barrido, indicativo de una correcta pre-amplificación (Figura 3).



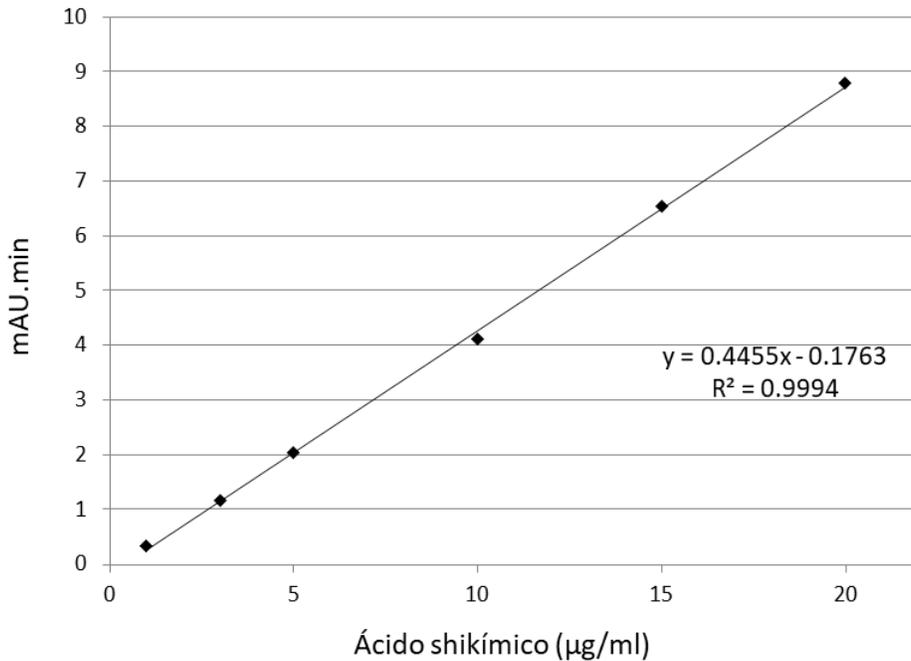
**Figura 3.** Pre-amplificación de muestras DNA foliar de plantas de *Agave tequilana* Weber var. azul mostrada por electroforesis en gel de agarosa (1%) teñido con Sybr® Safe.



**Figura 4.** Dendrograma de similaridad de AFLP en plantas madre de agave (*Agave tequilana* Weber var. azul) con fenotipos de potencialmente resistente (R) o susceptible (S). Los datos presentados en este dendrograma corresponden a los obtenidos de la amplificación con los primers EcoRI + AGC y MseI + CTT primers. El dendrograma se elaboró utilizando el software NTSys pc2.2, índice Dice index y método de agrupamiento UPGMA.

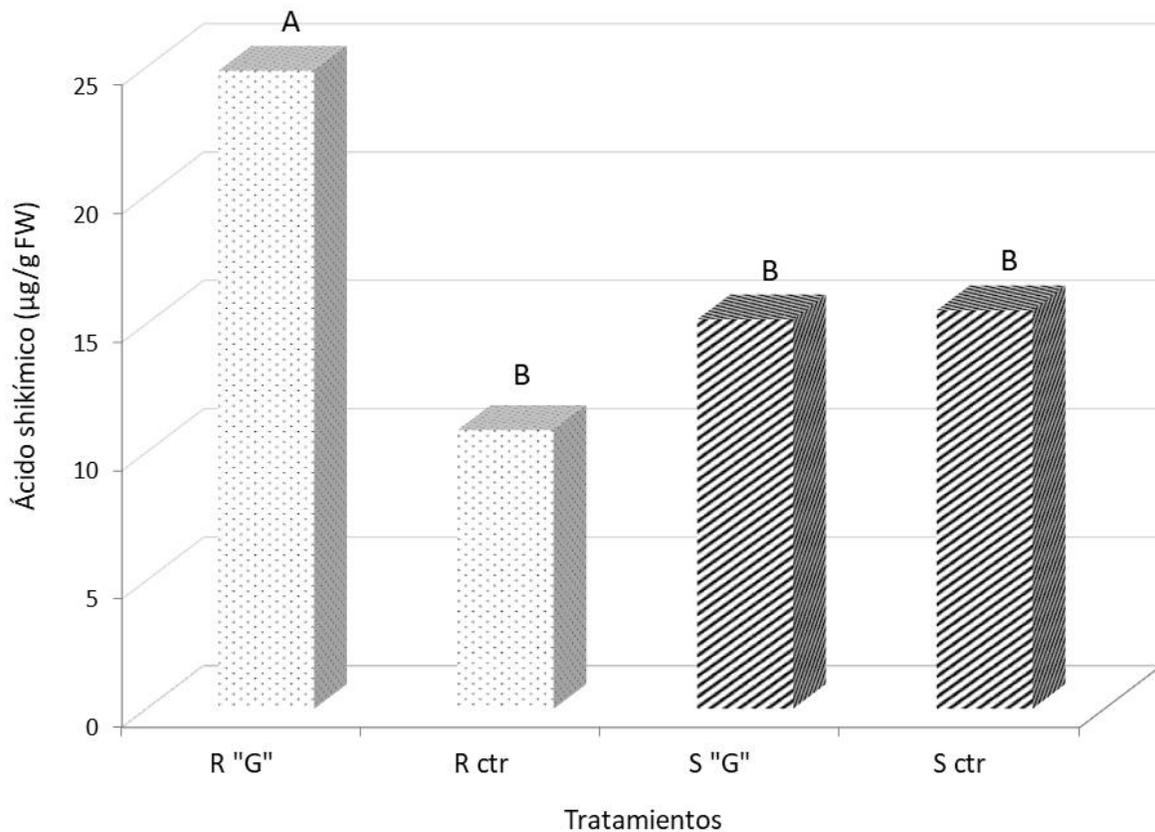
### 6.3 ÁCIDO SHIKÍMICO EN RAÍCES

La curva de calibración empleada para la cuantificación de las concentraciones de ácido shikímico presentes en las extracciones radiculares se muestra en la Figura 5.



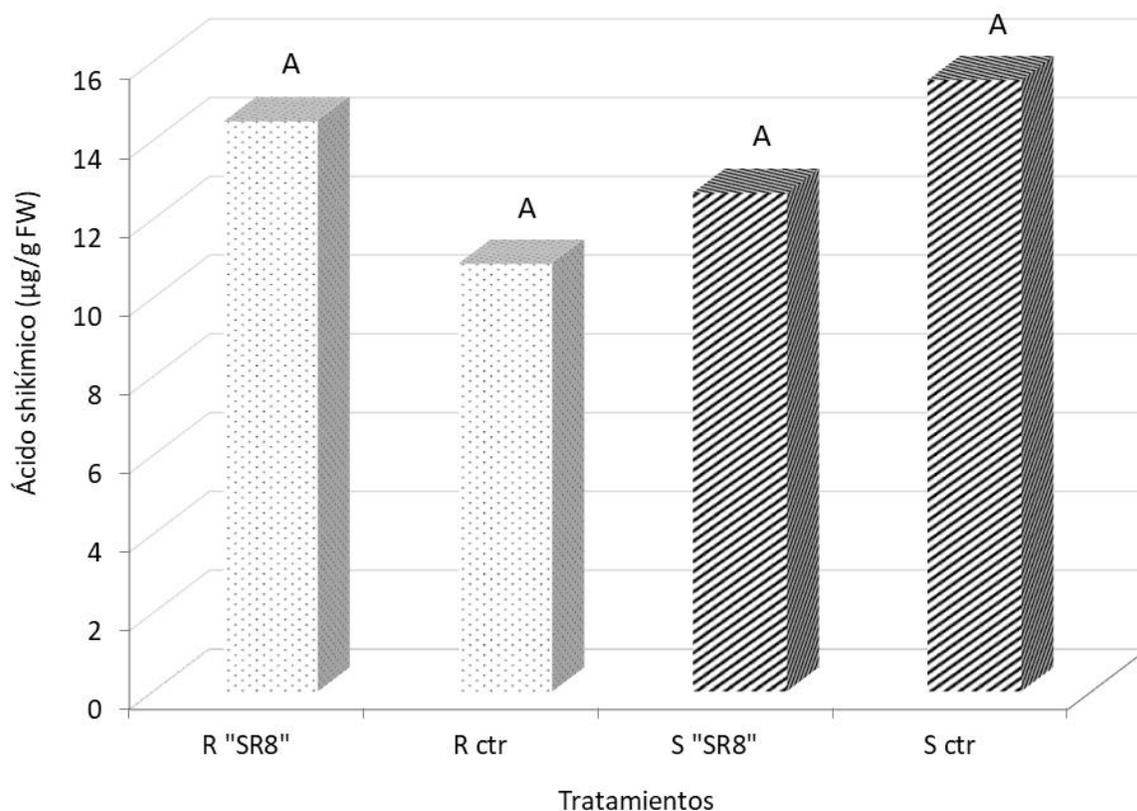
**Figura 5.** Curva de calibración de ácido shikímico y su correlación entre concentraciones de estándar de ácido shikímico y el área bajo la curva obtenida en un sistema UHPLC Dionex ICS-5000 equipado con una automuestreador y un detector de arreglo de diodos a una longitud de 302 nm.

Por su parte, para conocer la influencia de la inoculación de la cepa “G” de *F. solani* en la ruta del ácido shikímico, se encontró que la concentración basal de ácido shikímico en extractos de plantas potencialmente resistentes fue de 10.85  $\mu\text{g/gFW}$ . Esta concentración tuvo un incremento estadísticamente significativo a 24.84  $\mu\text{g/gFW}$  luego de 72 h de confrontación con *F. solani* lo que representa un reconocimiento temprano en este proceso patogénico. Por otra parte, las plántulas S permanecieron estadísticamente en su nivel basal (15.52  $\mu\text{g/gFW}$ ) luego de su inoculación con las conidias pre-germinadas de *F. solani* (Figura 6).



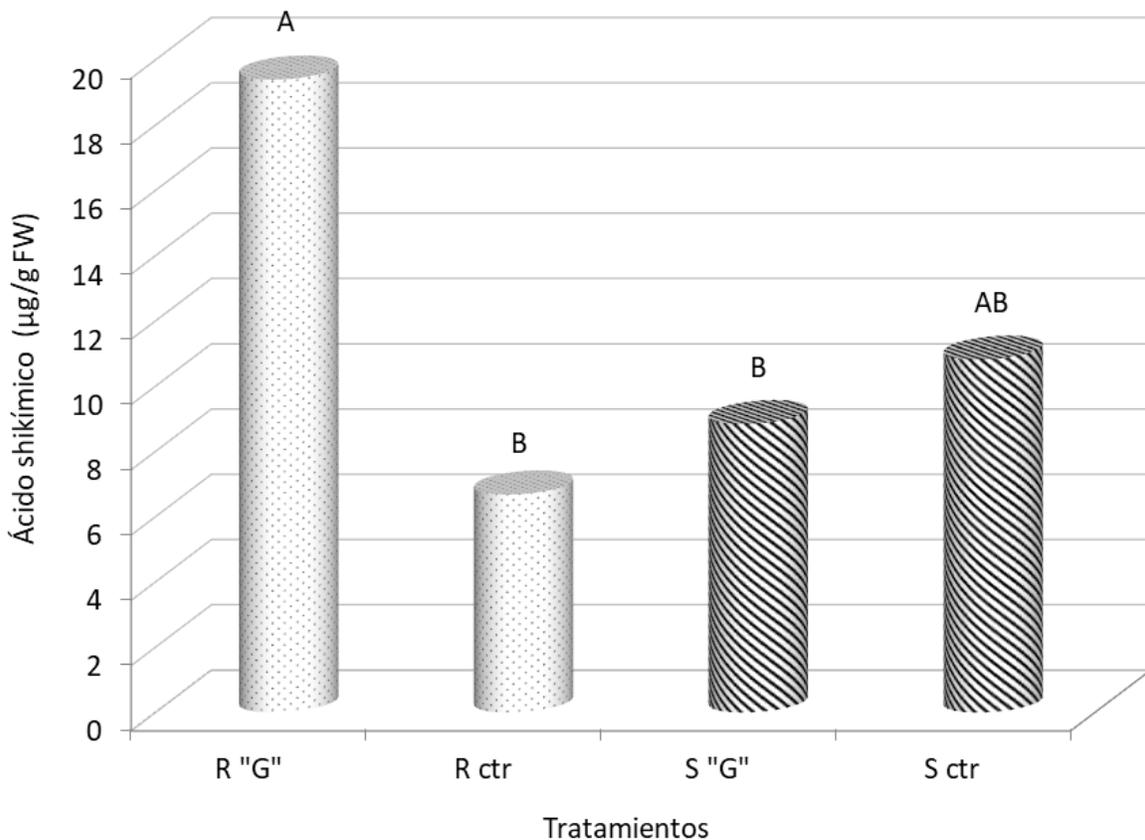
**Figura 6.** Concentraciones de ácido shikímico en extractos de raíz de *Agave tequilana* Weber var. azul inoculadas o no con conidias pre-germinadas de la cepa patogénica "G" de *F. solani*. Las raíces fueron analizadas 72 h después de su inoculación. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas (Duncan  $P < 0.05$ ).

En el caso de la concentración de ácido shikímico en raíces de *Agave tequilana* Weber var. azul que estuvieron en confrontación durante 72 h con la cepa patogénica "SR8" de *Fusarium oxysporum*, no se evidencia diferencia significativa en ninguno de los tratamientos o de los fenotipos seleccionados (Figura 7).



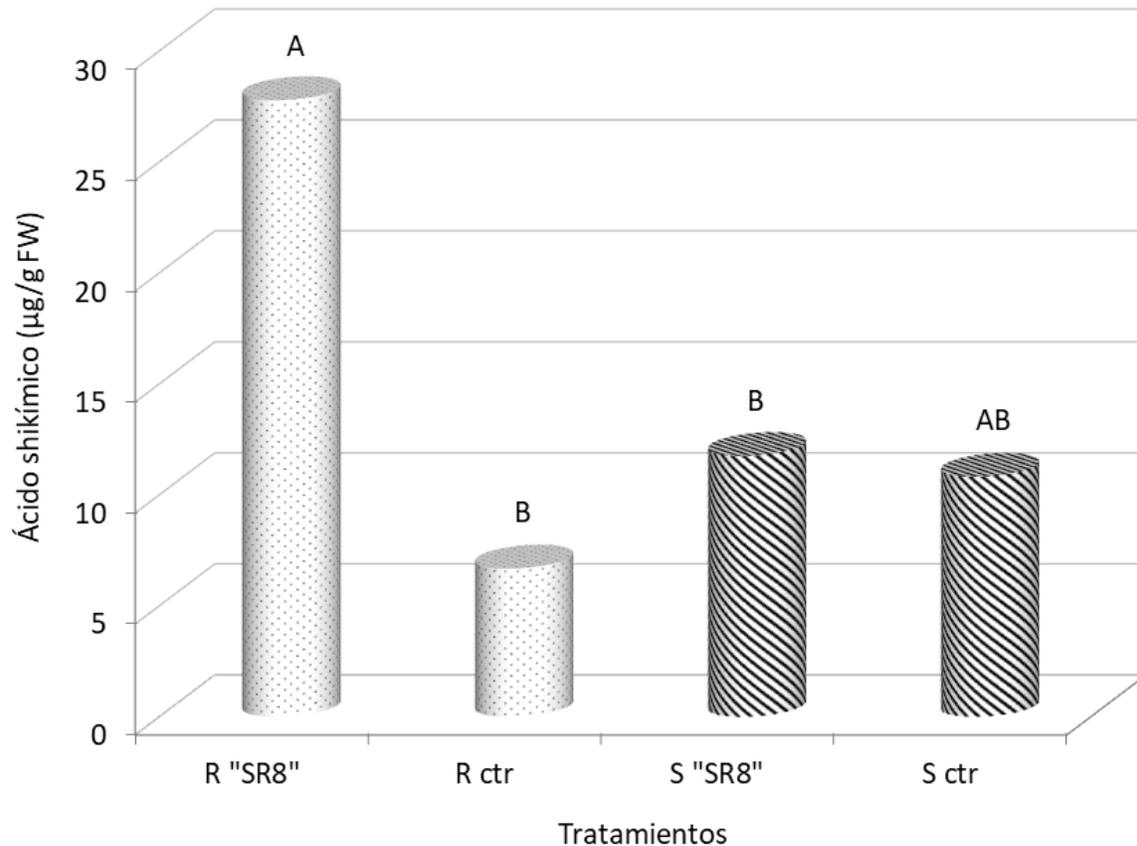
**Figura 7.** Concentraciones de ácido shikímico en extractos de raíz de *Agave tequilana* Weber var. azul inoculadas o no con conidias pre-germinadas de la cepa patogénica "SR8" de *F. oxysporum*. Las raíces fueron analizadas 72 h después de su inoculación. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas (Duncan  $P < 0.05$ ).

Por otra parte, la cuantificación de ácido shikímico en plántulas potencialmente resistentes luego de 30 días de confrontación con la cepa "G" de *F. solani* incrementó significativamente en comparación con sus controles no inoculados; mientras que las plántulas S en sus tratamientos inoculados y no inoculados, se mostraron significativamente igual a la cantidad basal encontrada en las plántulas R (Figura 8).



**Figura 8.** Concentraciones de ácido shikímico en extractos de raíz de *Agave tequilana* Weber var. azul inoculadas o no con conidias pre-germinadas de la cepa patogénica "G" de *F. solani*. Las raíces fueron analizadas 30 días después de su inoculación. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas (Duncan  $P < 0.05$ ).

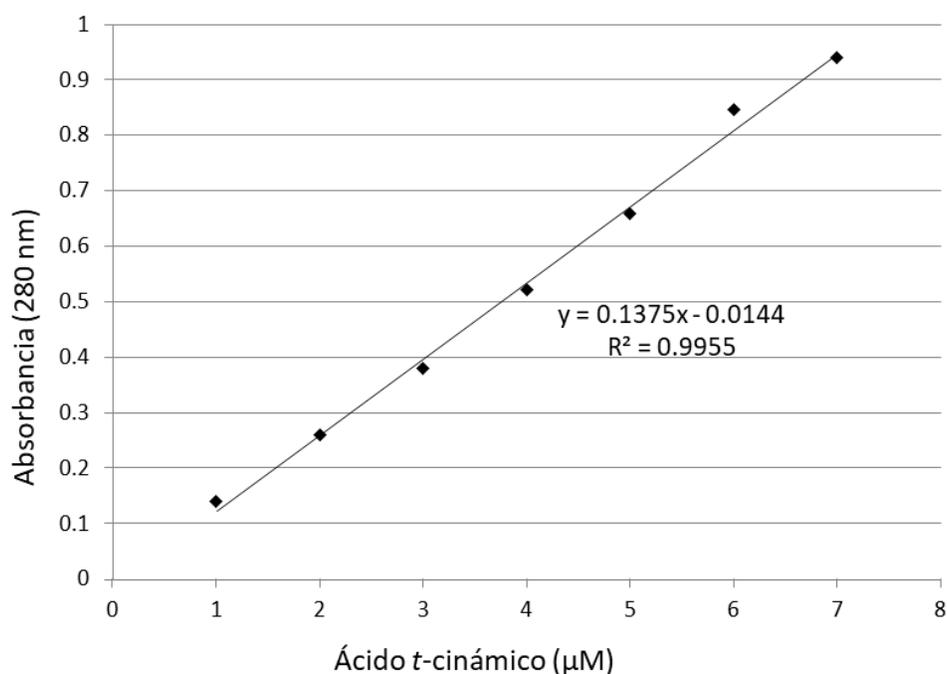
Mientras tanto, el bioensayo de confrontación son "SR8" por 30 días, presenta una comportamiento completamente distinto, donde la concentración basal de ácido shikímico en plantas con fenotipo potencialmente resistente (6.68 µg/gFW), incrementa significativamente a 27.78 µg/gFW. Las plántulas con fenotipo S, se mantienen estadísticamente en su nivel basal (Figura 9).



**Figura 9.** Concentraciones de ácido shikímico en extractos de raíz de *Agave tequilana* Weber var. azul inoculadas o no con conidias pre-germinadas de la cepa patogénica "SR8" de *F. oxysporum*. Las raíces fueron analizadas 30 días después de su inoculación. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas (Duncan  $P < 0.05$ ).

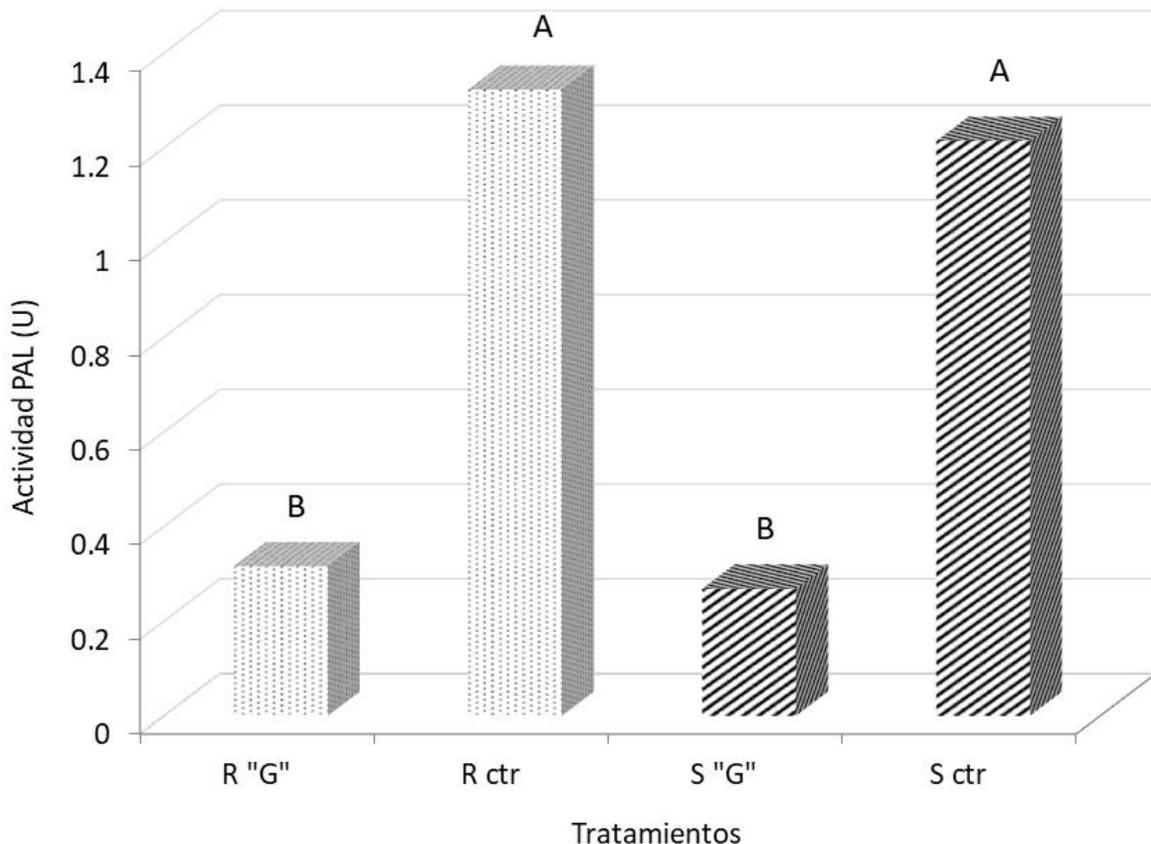
#### 6.4 ACTIVIDAD PAL

La cuantificación de la actividad de la enzima fenilalanina-amonió liasa (PAL) en las muestras evaluadas, se obtuvo empleando una curva de calibración de concentraciones de 1 a 7  $\mu\text{M}$  de ácido *t*-cinámico y su absorbancia a 280 nm (Figura 10).



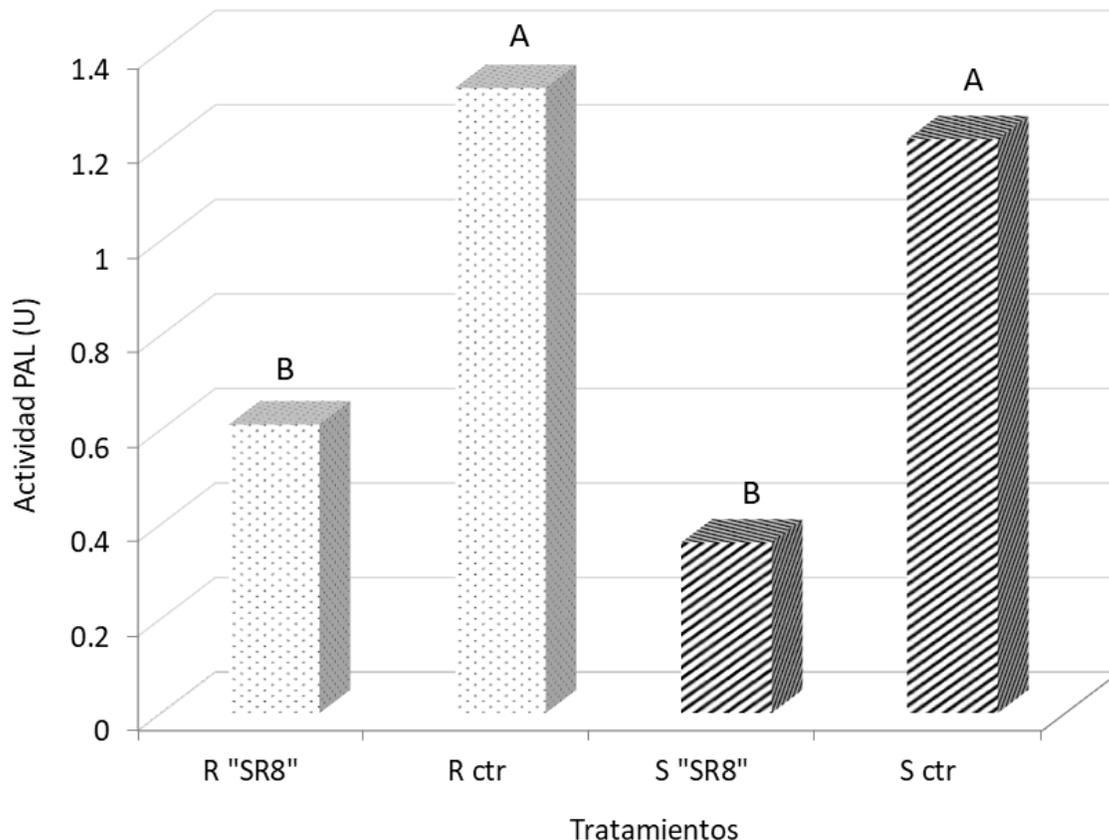
**Figura 10.** Curva de calibración de ácido *t*-cinámico para evaluar la actividad de la enzima fenilalanina-amonio liasa presente en hojas de *Agave tequilana* Weber var. azul.

La actividad basal de la enzima PAL cercana a 1.32 U, presentó una reducción significativa hasta un promedio de 0.31 U después de transcurridas 72 h de confrontación con la cepa “G” de *F. solani* tanto en plantas potencialmente resistentes como en susceptibles. La comparación estadística de las determinaciones de esta actividad se muestran en la Figura 11.



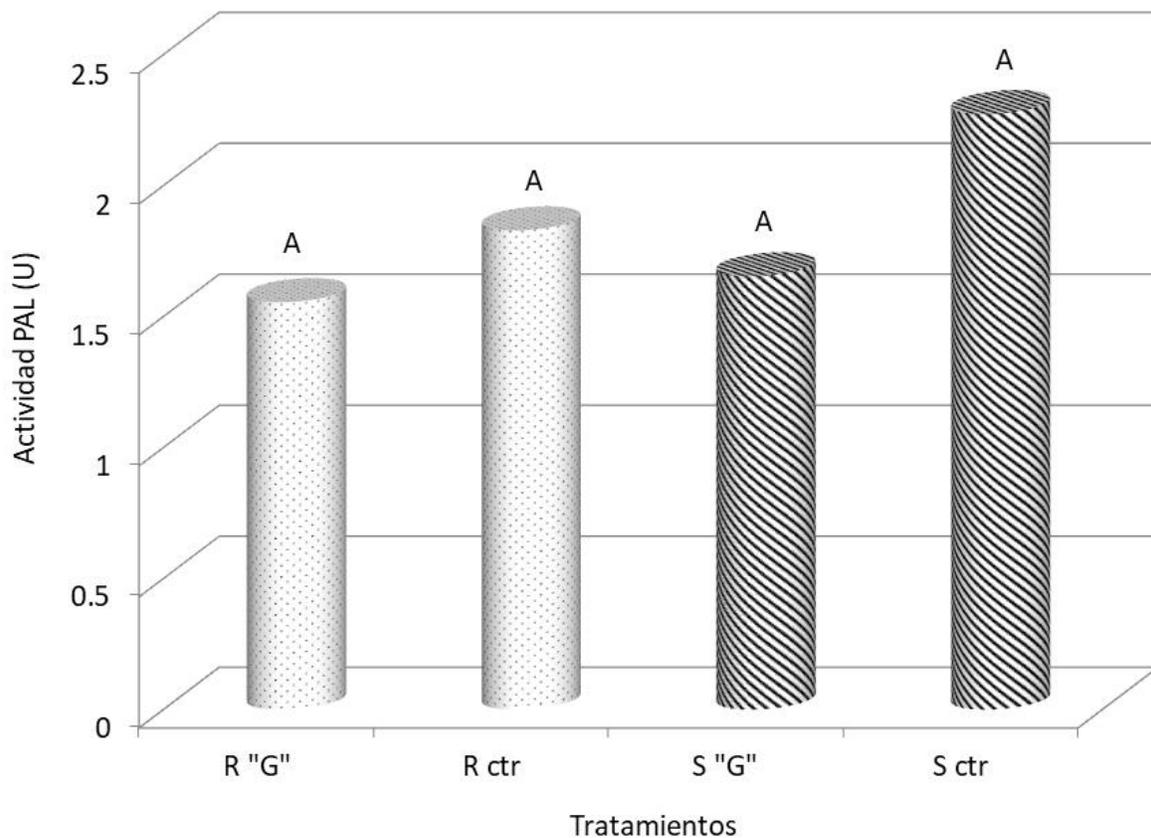
**Figura 11.** Actividad fenilalanina-amonio liasa determinada en hojas de *Agave tequilana* Weber var. azul seleccionadas por sus fenotipos potencialmente resistente (R) o susceptible (S), en una confrontación de 72 h después de ser inoculadas en sus raíces con la cepa "G" de *F. solani*. Una unidad de actividad PAL corresponde a 1  $\mu$ M de ácido *t*-cinámico producido en un minuto por mg de proteína. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas (Duncan  $P < 0.05$ ).

El mismo comportamiento estadístico, aunque con diferentes cantidades de actividad PAL, se presentó en la confrontación con la cepa "SR8" de *F. oxysporum* a las 72 h (Figura 12).



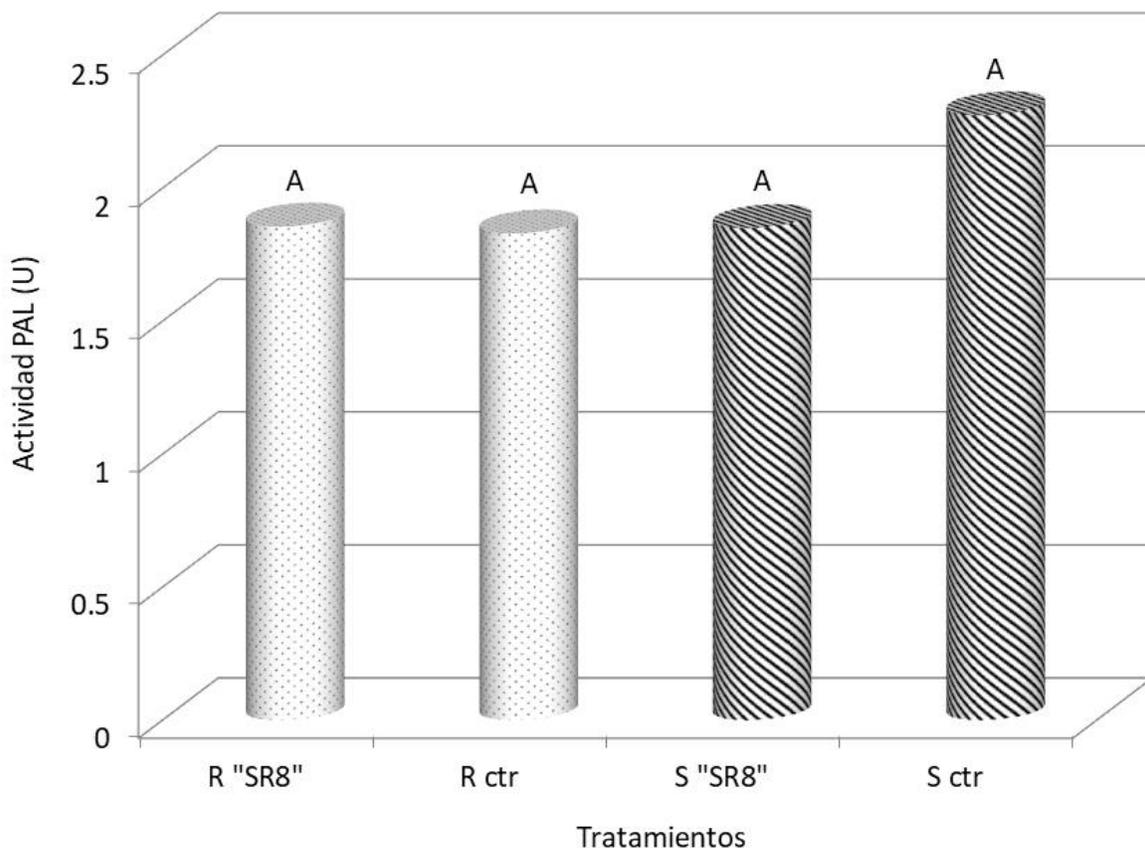
**Figura 12.** Actividad fenilalanina-amonió liasa determinada en hojas de *Agave tequilana* Weber var. azul seleccionadas por sus fenotipos potencialmente resistente (R) o susceptible (S), en una confrontación de 72 h después de ser inoculadas en sus raíces con la cepa "SR8" de *F. oxysporum*. Una unidad de actividad PAL corresponde a 1  $\mu$ M de ácido *t*-cinámico producido en un minuto por mg de proteína. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas (Duncan  $P < 0.05$ ).

En las plantas confrontadas durante 30 días con la cepa patogénica de *F. solani*, la actividad PAL no mostró diferencia significativa entre tratamientos (Figura 13) pero sus niveles fueron ligeramente superiores que los observados en la evaluación de las 72 h.



**Figura 13.** Actividad fenilalanina-amonio liasa determinada en hojas de *Agave tequilana* Weber var. azul seleccionadas por sus fenotipos potencialmente resistente (R) o susceptible (S), en una confrontación de 30 días después de ser inoculadas en sus raíces con la cepa "G" de *F. solani*. Una unidad de actividad PAL corresponde a 1  $\mu$ M de ácido *t*-cinámico producido en un minuto por mg de proteína. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas (Duncan  $P < 0.05$ ).

En el bioensayo de 30 días de confrontación con la cepa "SR8" de *F. oxysporum*, se evidencia exactamente el mismo comportamiento estadístico que en la confrontación con la cepa "G" de *F. solani* al no presentar diferencia significativa en ninguno de los tratamientos (Figura 14).



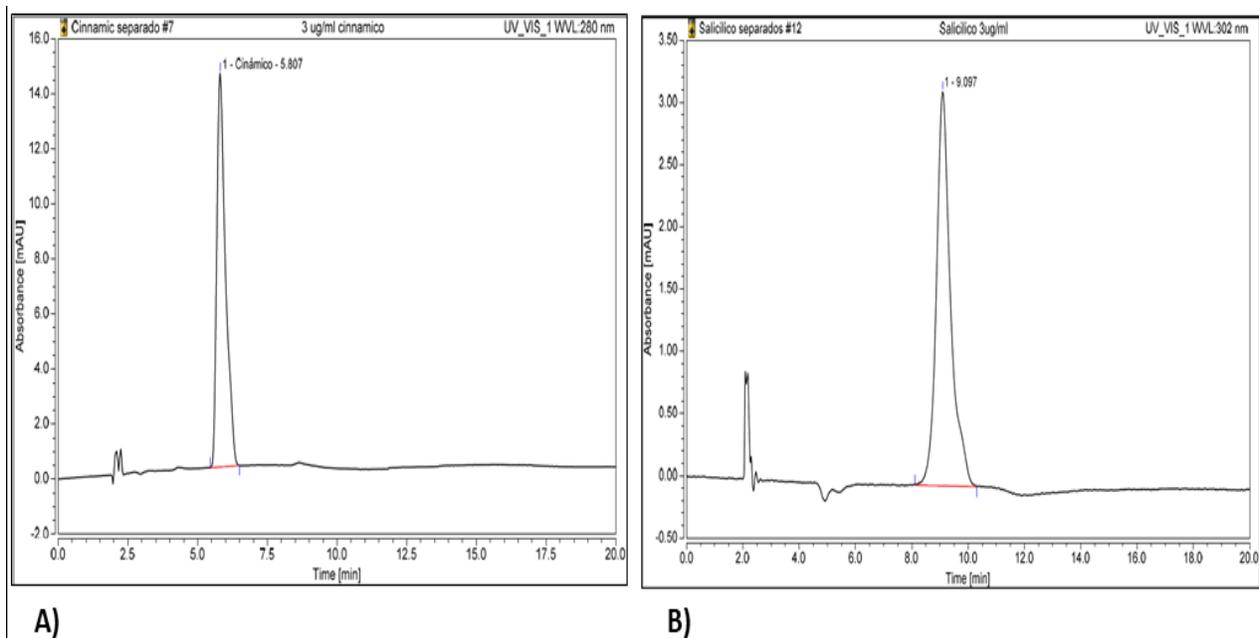
**Figura 14.** Actividad fenilalanina-amonió liasa determinada en hojas de *Agave tequilana* Weber var. azul seleccionadas por sus fenotipos potencialmente resistente (R) o susceptible (S), en una confrontación de 30 días después de ser inoculadas en sus raíces con la cepa "SR8" de *F. oxysporum*. Una unidad de actividad PAL corresponde a 1  $\mu$ M de ácido *t*-cinámico producido en un minuto por mg de proteína. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas (Duncan  $P < 0.05$ ).

### 6.5 ÁCIDO *trans*-CINÁMICO Y ÁCIDO SALICÍLICO EN RAÍCES

Se evaluó la concentración de ácido *t*-cinámico (CA) y ácido salicílico (SA) con la finalidad de conocer la inducción diferencial en el punto inicial de la ruta de los fenilpropanoides, causada por la interacción de las cepas patogénicas inoculadas en plántulas de agave potencialmente resistentes o susceptibles.

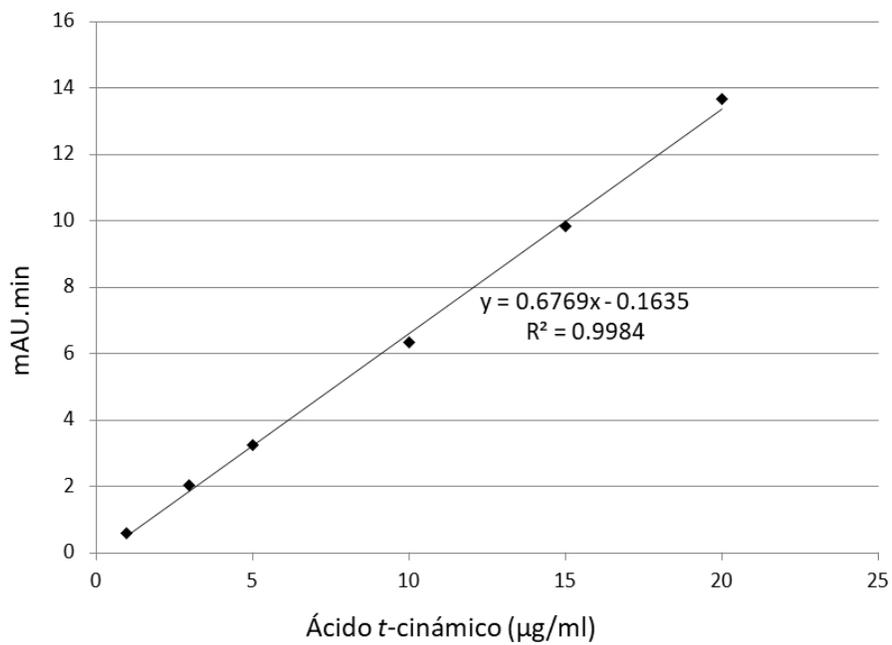
Los compuestos estándares de ácido *t*-cinámico y ácido salicílico, fueron detectados en el sistema UHPLC Dionex ICS-5000, presentando tiempos de retención (RT) de 9 y 5.8 respectivamente detectados con una longitud de onda de 280 nm para el ácido *t*-

cinámico y de 302 nm para el ácido salicílico. El tiempo de elución correspondiente fue de 20 minutos con un sistema isocrático de 40% metanol, 60% agua:ácido acético (97:3) (Figura 15).

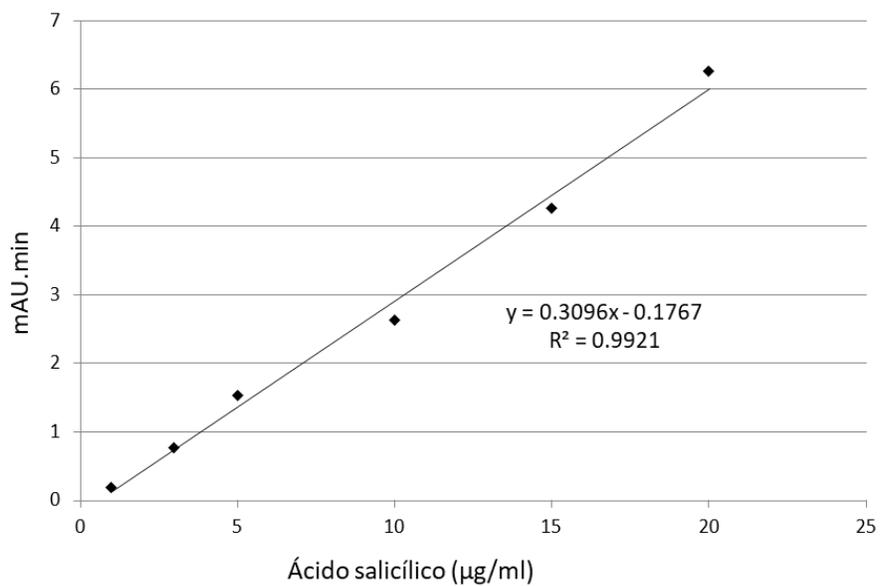


**Figura 15.** Tiempos de retención de estándares de ácido *t*-cinámico (A) y ácido salicílico (B) a una concentración de 3  $\mu\text{g/ml}$ , en un sistema UHPLC Dionex ICS-5000.

Diferentes concentraciones de los estándares de cada compuesto, se corrieron a las condiciones previamente descritas en cada procedimiento. A cada concentración, se le calculó el área bajo la curva del pico encontrado en el RT correspondiente a su compuesto y el valor obtenido se graficó con respecto a su concentración para crear una curva de calibración, misma que sirvió para determinar las concentraciones de las extracciones en las muestras tratadas (Figura 16).



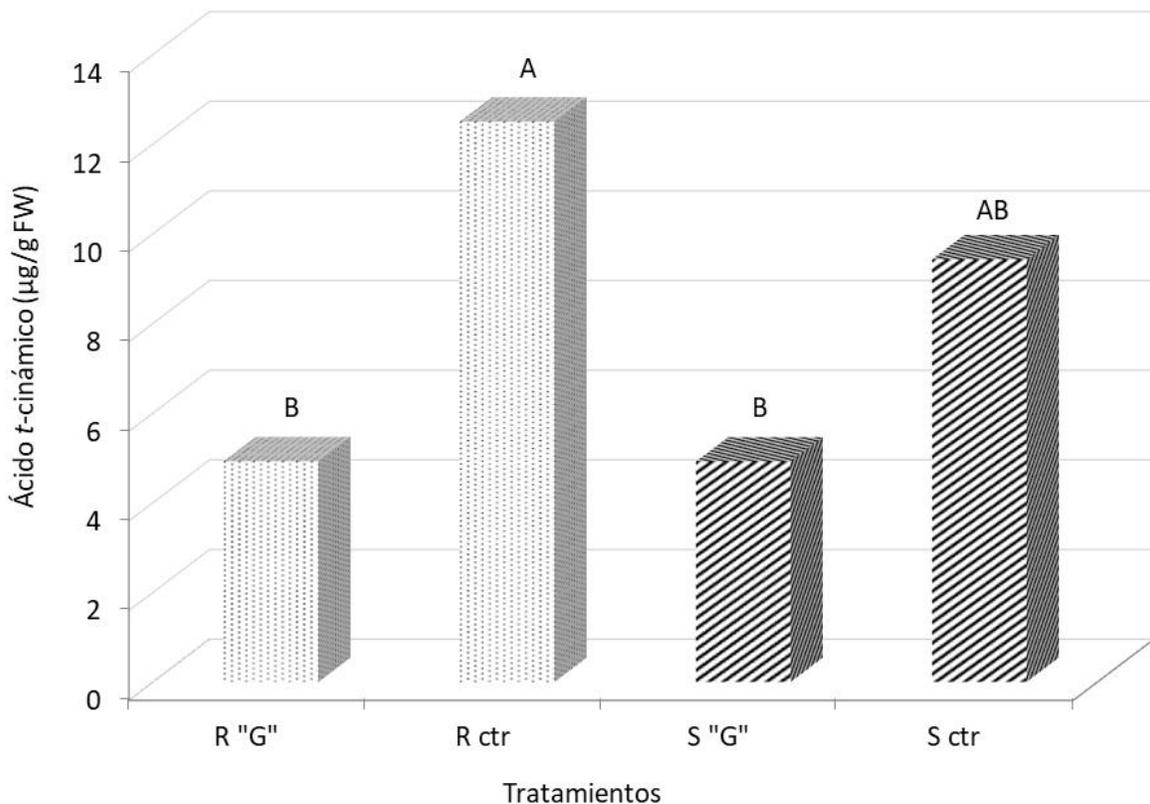
a)



b)

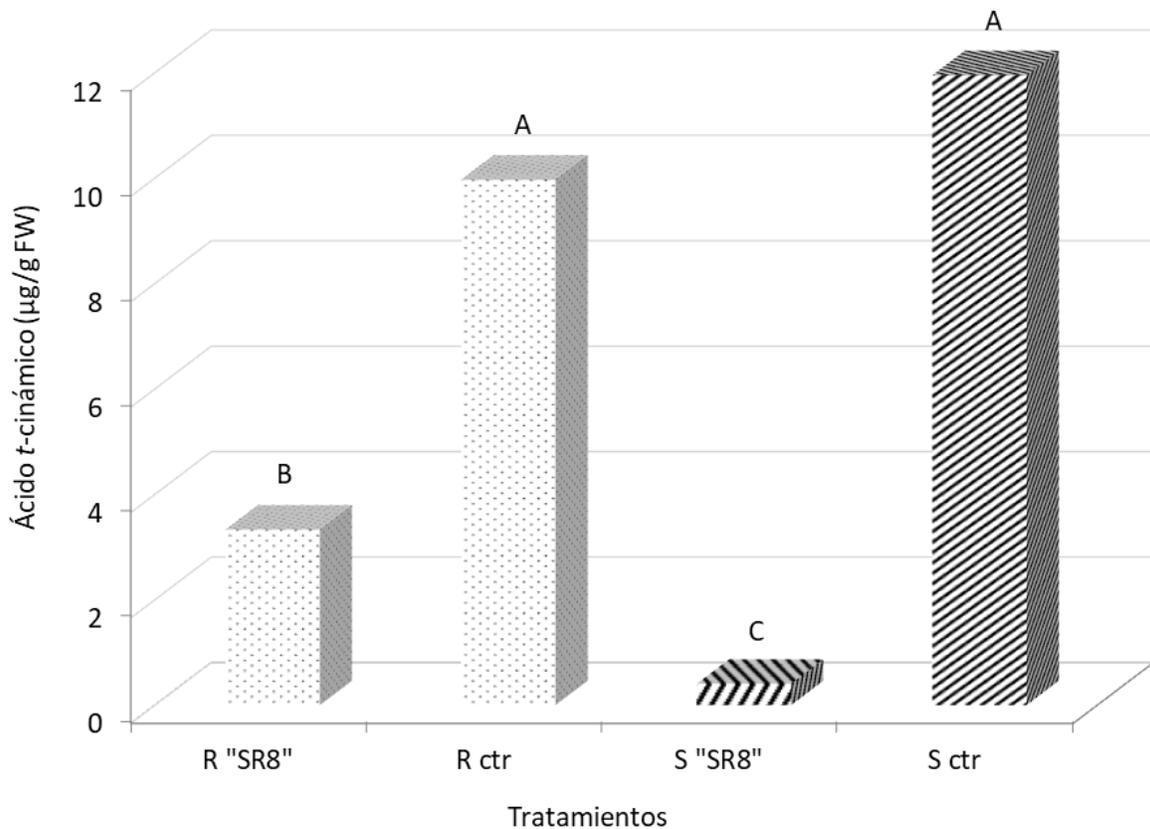
**Figura 16.** Curvas de calibración para la determinación de; a) la concentración de Ácido t-cinámico y b) la concentración de Ácido salicílico, en extractos de raíces de *Agave tequilana* Weber var. azul.

Cuando se analizó la concentración de CA en extractos de raíces, 72 h después de su inoculación con la cepa patogénica “G” de *F. solani*; las plantas R mostraron una reducción significativa en su concentración de 4.64  $\mu\text{g/gFW}$ , en comparación con sus controles no inoculados que registraron 12.5  $\mu\text{g/gFW}$ . En el caso de las plántulas S se presenta una tendencia similar, pero debido a mostrar un nivel basal menor, la diferencia estadística se presenta igual en inoculadas y controles (Figura 17).



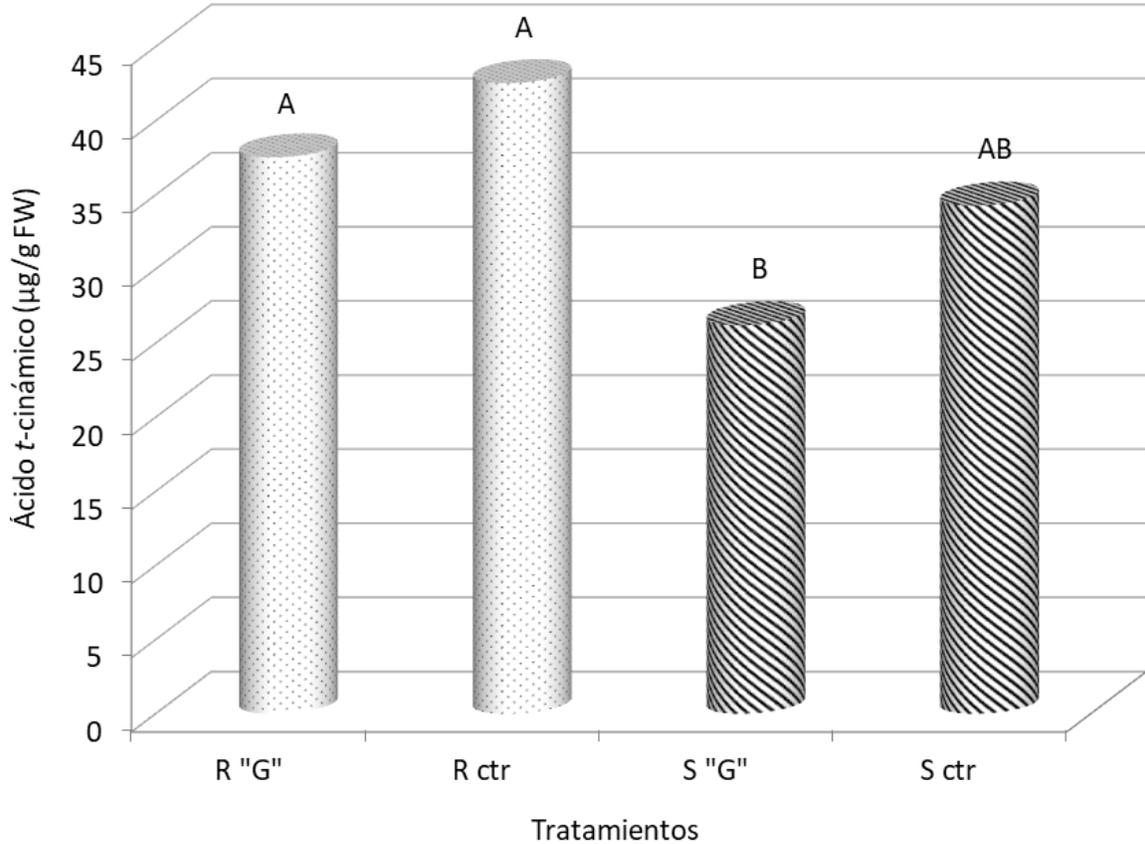
**Figura 17.** Concentraciones de ácido *trans*-cinámico en extractos radiculares de *Agave tequilana* var. azul, inoculados o no con conidias pre-germinadas de la cepa “G” de *F. solani*. Las raíces fueron analizadas 72 h después de su inoculación. Las letras diferentes sobre las barras, indican diferencias significativas (Duncan  $P < 0.05$ ).

En el otro bioensayo, se presenta niveles basales elevados de 11.95 y 9.96  $\mu\text{g/gFW}$  para los fenotipos R y S respectivamente, disminuyendo estadísticamente hasta 3.33  $\mu\text{g/gFW}$  para el fenotipo R luego de la confrontación de 72 h con la cepa patogénica “SR8” de *F. oxysporum*, mientras que el fenotipo S confrontado, a pesar de disminuir, se mantiene estadísticamente igual (Figura 18).



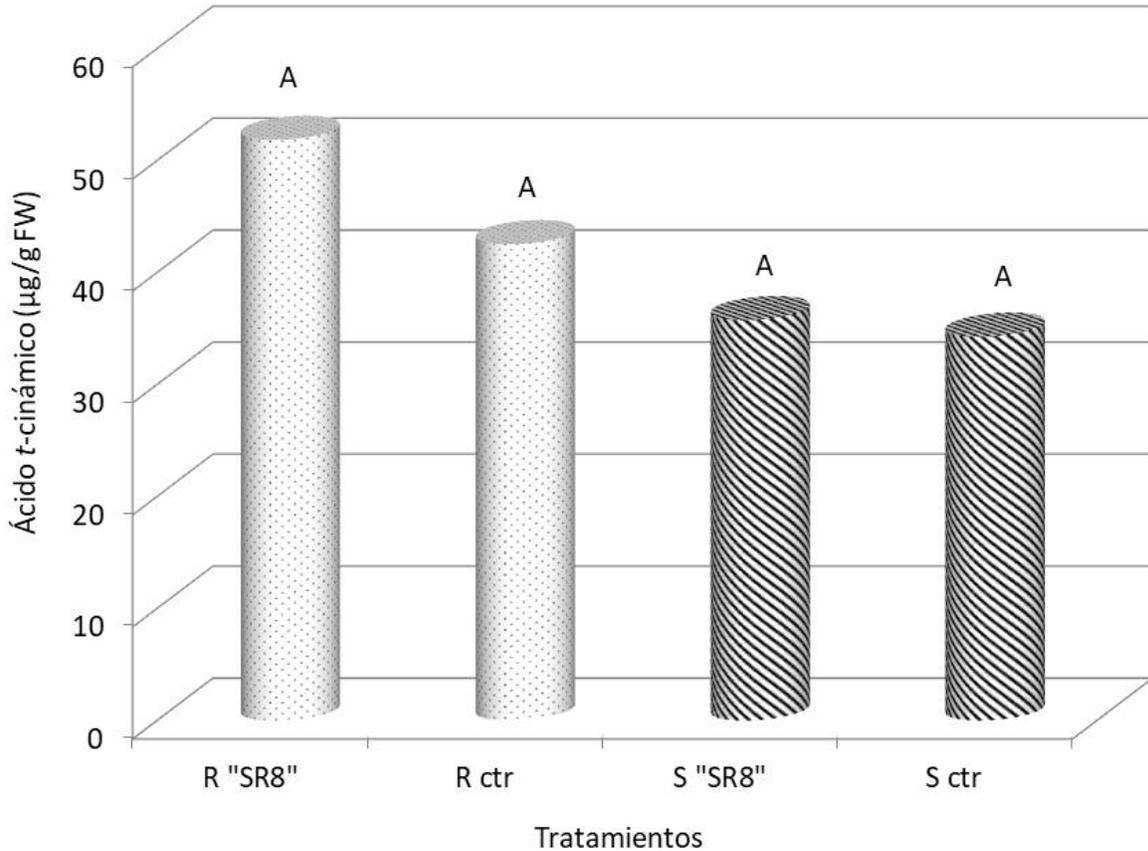
**Figura 18.** Concentraciones de ácido *trans*-cinámico en extractos radiculares de *Agave tequilana* var. azul, inoculados o no con conidias pre-germinadas de la cepa "SR8" de *F. oxysporum*. Las raíces fueron analizadas 72 h después de su inoculación. Las letras diferentes sobre las barras, indican diferencias significativas (Duncan  $P < 0.05$ ).

En el bioensayo de 30 días de confrontación con la cepa "G", el fenotipo de plantas R, mantuvieron una concentración estadísticamente igual de CA, independiente al tratamiento; en cambio, el fenotipo S disminuye dicha concentración en el tratamiento confrontado con respecto a los ejemplares R, pero manteniéndose estadísticamente igual a su control (Figura 19).



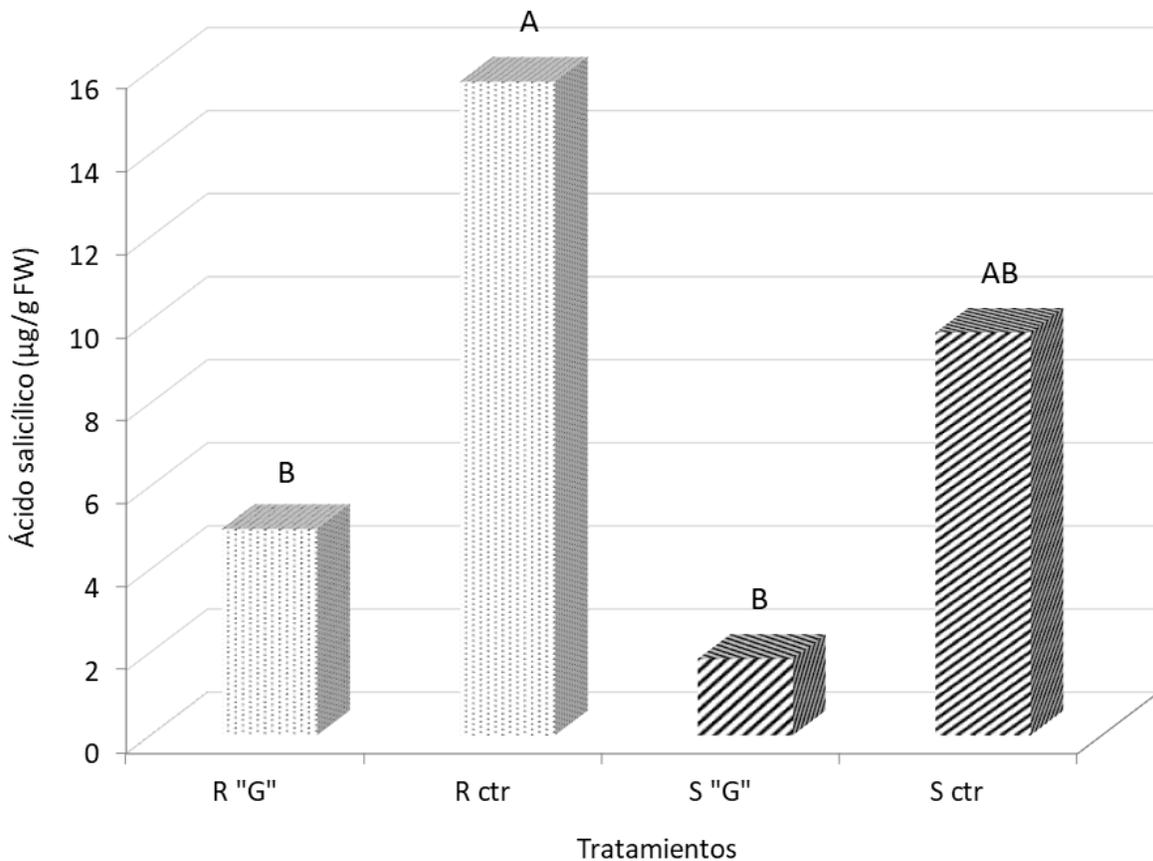
**Figura 19.** Concentraciones de ácido *trans*-cinámico en extractos radiculares de *Agave tequilana* var. azul, inoculados o no con conidias pre-germinadas de la cepa "G" de *F. solani*. Las raíces fueron analizadas 30 días después de su inoculación. Las letras diferentes sobre las barras, indican diferencias significativas (Duncan  $P < 0.05$ ).

Por otro lado, el bioensayo de 30 días de duración en confrontación con *F. oxysporum*, no mostró ninguna diferencia significativa entre fenotipos ni entre tratamientos (Figura 20).



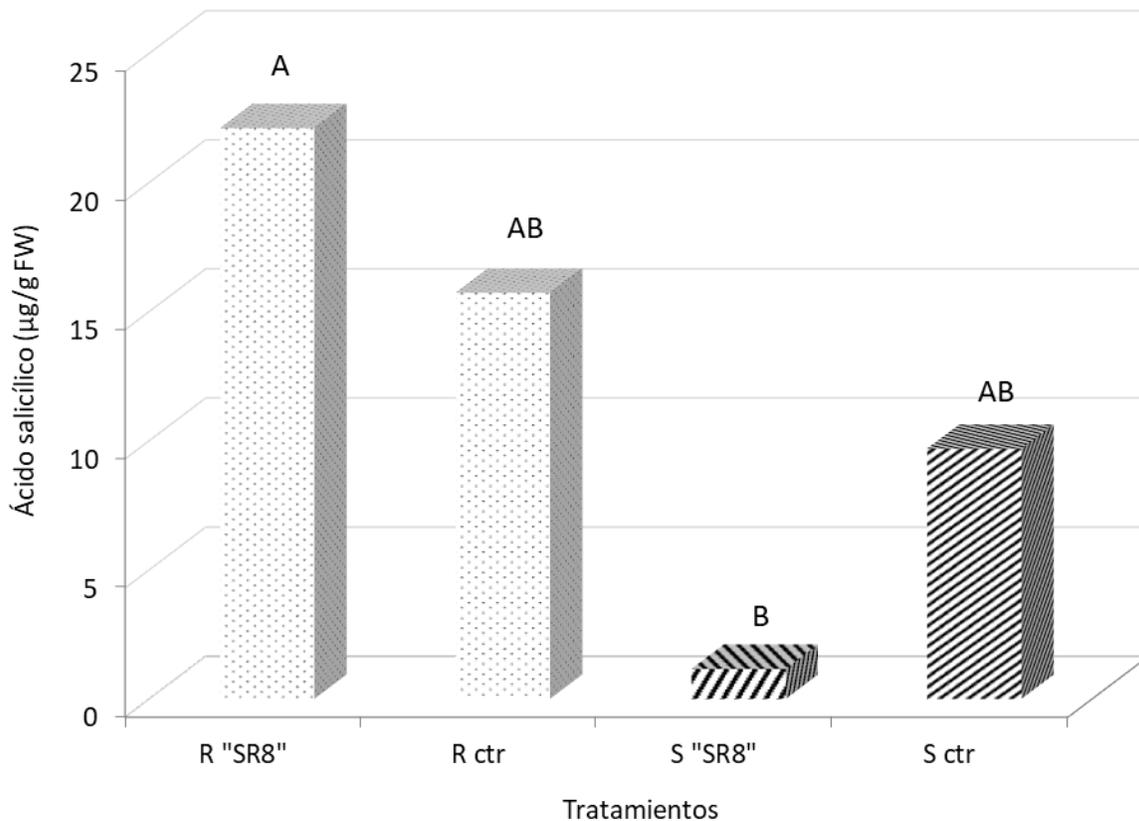
**Figura 20.** Concentraciones de ácido *trans*-cinámico en extractos radiculares de *Agave tequilana* var. azul, inoculados o no con conidias pre-germinadas de la cepa "SR8" de *F. oxysporum*. Las raíces fueron analizadas 30 días después de su inoculación. Las letras diferentes sobre las barras, indican diferencias significativas (Duncan  $P < 0.05$ ).

Respecto al contenido de la molécula señal de SA, las plántulas de agave inoculadas con el patógeno necrotrófico *F. solani*, muestran como resultado una reducción en el contenido de SA en ambos fenotipos, desde un nivel basal de 15.72 µg/gFW para el fenotipo R y de 9.68 µg/gFW para el fenotipo S, hasta un nivel registrado como respuesta temprana después de las 72 h de confrontación de 4.96 µg/gFW para el fenotipo R y de 1.83 µg/gFW para el fenotipo S. Sin embargo, esta reducción fue estadísticamente significativa solamente en plantas potencialmente resistentes (Figura 21).



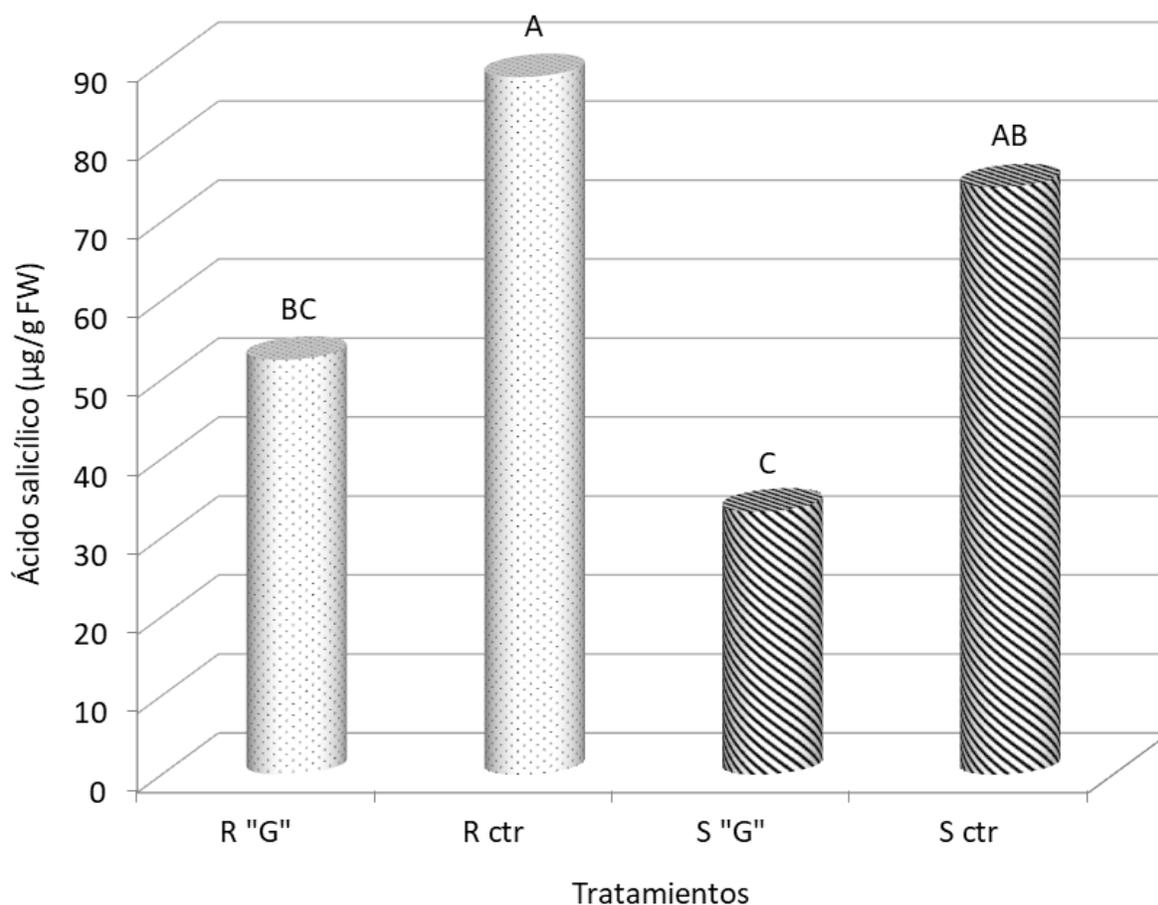
**Figura 21.** Concentración de ácido salicílico en extractos radiculares de plántulas potencialmente resistentes (R) y susceptibles (S) de *Agave tequilana* Weber var. azul, 72 h después de su inoculación o no con conidias pre-germinadas de la cepa "G" de *F. solani*. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas (Duncan  $P < 0.05$ ).

Los resultados de concentración de SA en la confrontación con "SR8" después de 72 h de su inoculación en plántulas de agave, mostraron una diferencia significativa entre fenotipos confrontados, siendo 22.0 µg/gFW para el fenotipo R y 1.16 µg/gFW para el fenotipo S. Sin embargo, los controles no inoculados para cada fenotipo, permanecen estadísticamente igual (Figura 22).



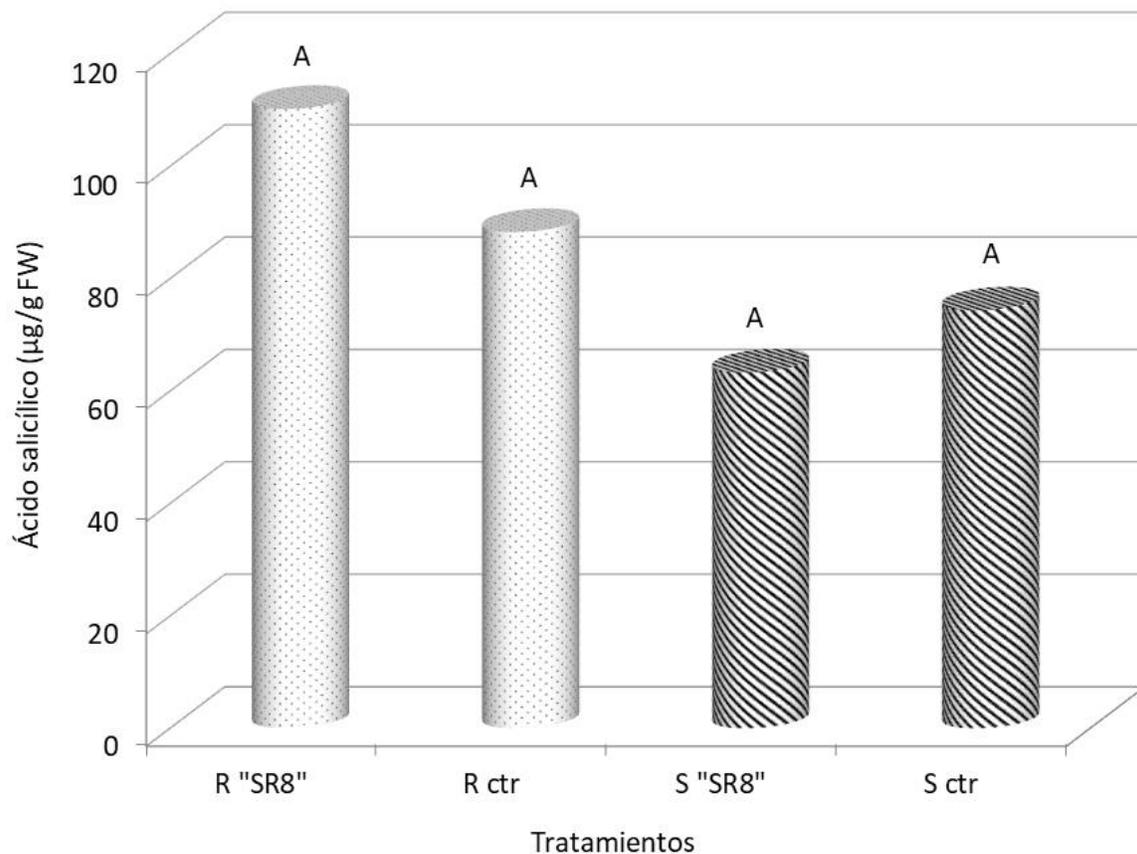
**Figura 22.** Concentración de ácido salicílico en extractos radiculares de plántulas potencialmente resistentes (R) y susceptibles (S) de *Agave tequilana* Weber var. azul, 72 h después de su inoculación o no con conidias pre-germinadas de la cepa "SR8" de *F. oxysporum*. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas (Duncan  $P < 0.05$ ).

Cuando las plántulas fueron confrontadas durante 30 días con *F. solani*, la acumulación de SA en sus raíces fue mayor que la observada a las 72 h. Sin embargo, el comportamiento en ambos fenotipos fue similar ya que los controles no inoculados presentaron una concentración de SA mayor que la presentada en las plantas confrontadas en ambos fenotipos (Figura 23).



**Figura 23.** Concentración de ácido salicílico en extractos radiculares de plántulas potencialmente resistentes (R) y susceptibles (S) de *Agave tequilana* Weber var. azul, 30 días después de su inoculación o no con conidias pregerminadas de la cepa "G" de *F. solani*. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas (Duncan  $P < 0.05$ ).

Al evaluar la concentración de SA en tejido radicular inoculado con la cepa SR8 así como en sus controles no inoculados, se observó una elevación en las concentraciones de esta molécula, pero sin presentar diferencia estadística significativa entre tratamientos o entre fenotipos (Figura 24).

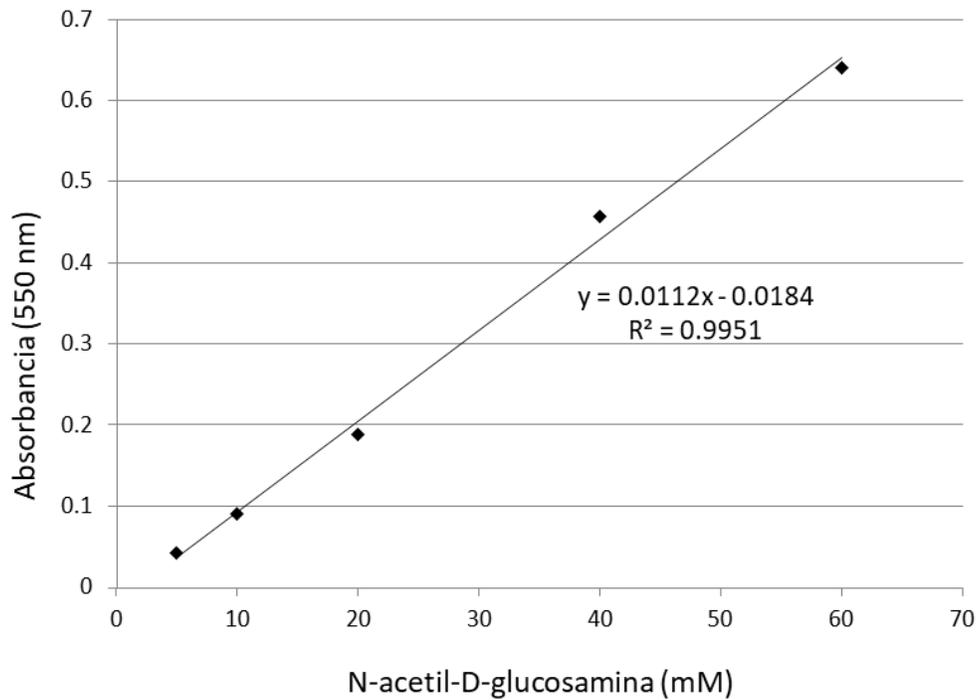


**Figura 24.** Concentración de ácido salicílico en extractos radiculares de plántulas potencialmente resistentes (R) y susceptibles (S) de *Agave tequilana* Weber var. azul, 30 días después de su inoculación o no con conidias pregerminadas de la cepa "SR8" de *F. oxysporum*. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas (Duncan  $P < 0.05$ ).

## 6.6 PROTEÍNAS PR Y COMPUESTOS FENÓLICOS

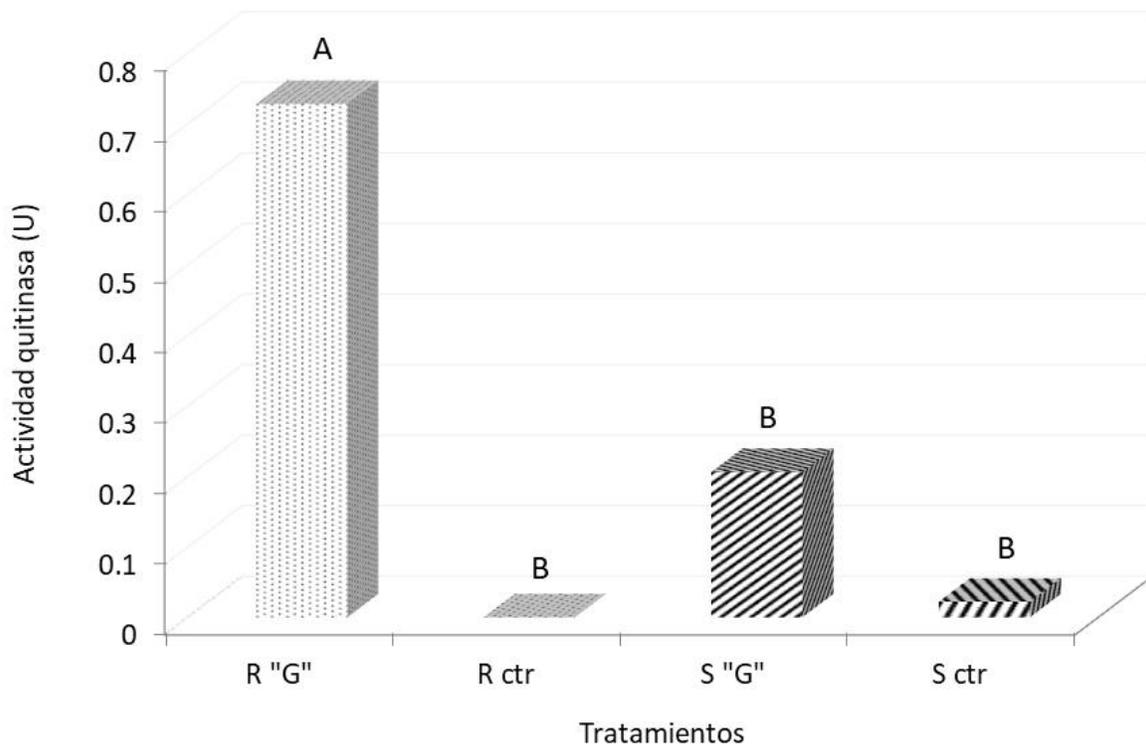
### 6.6.1 ACTIVIDAD QUITINASA

En la figura 25 se presenta la curva de calibración de las concentraciones de N-acetil-D-glucosamina para la determinación de la actividad quitinasa. La curva de respuesta sigue una tendencia lineal con absorbancias desde 0.043 a 0.64 U correspondientes a concentraciones en un rango de 5 a 60 mM.



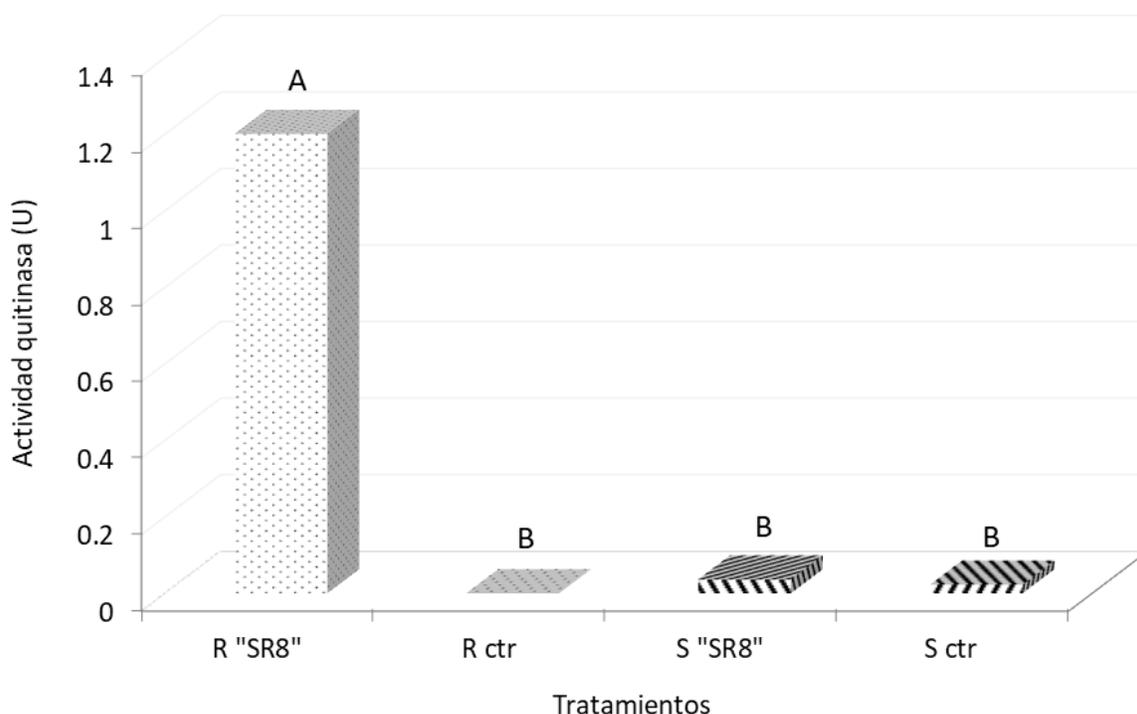
**Figura 25.** Curva de calibración de N-acetil-D-glucosamina utilizada para determinar la expresión de actividad quitinasas.

Cuando se evaluó la expresión sistémica temprana de proteínas PR en hojas, 72 h después de la inoculación radicular con la cepa “G” de *F. solani*, se encontró un nivel medio de actividad quitinasa de 0.73 U en plántulas potencialmente resistentes que fue estadísticamente superior a su nivel basal de 0.0 U registrado en plántulas no confrontadas. Por otra parte, los datos de las plántulas susceptibles mostraron niveles estadísticamente similares entre plántulas no confrontadas y confrontadas con la cepa patogénica “G” de *F. solani* con una media menor a 0.2 U (Figura 26).



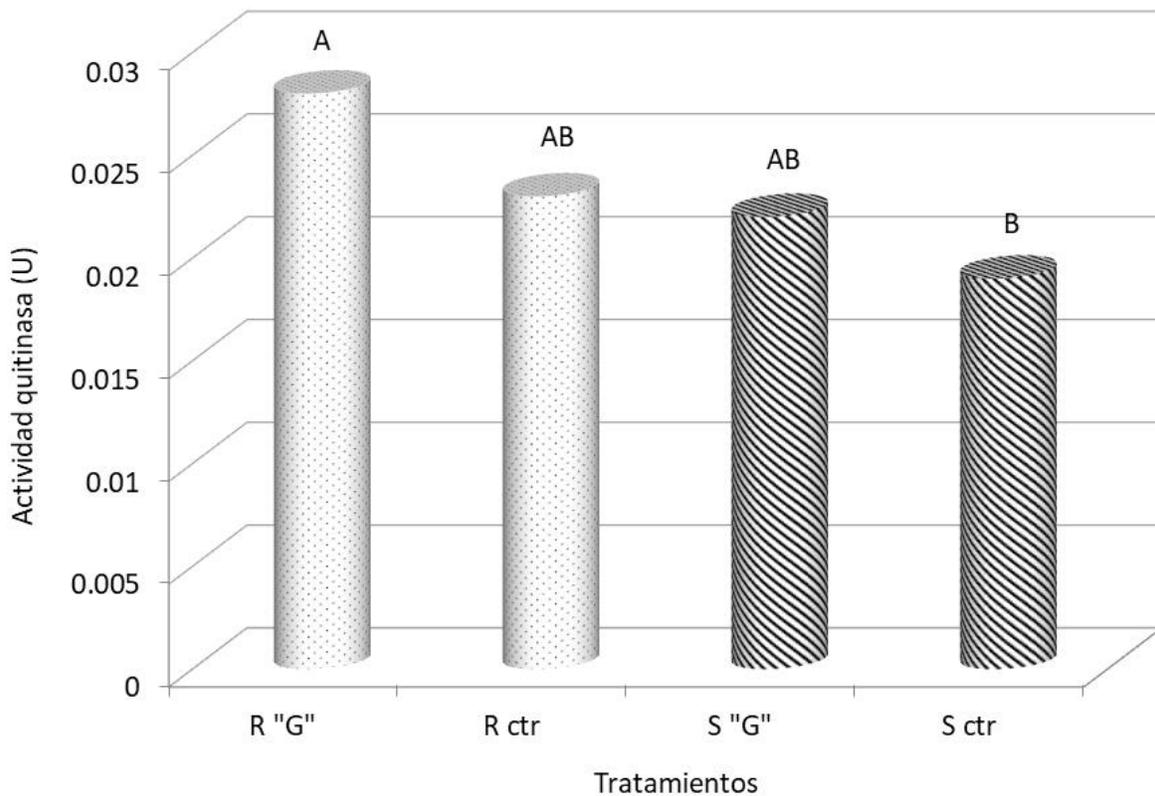
**Figura 26.** Actividad quitinasa en hojas de plántulas de *Agave tequilana* Weber var. azul, seleccionadas por su fenotipia como potencialmente resistentes (R) y susceptibles (S). La determinación se realizó 72 h después de su inoculación en el sistema radicular con una suspensión de conidias pre-germinadas de la cepa patogénica "G" de *F. solani*. Una unidad (U) de actividad quitinasa equivale a 1 mg de quitina de caparazón de cangrejo hidrolizado, por minuto por mg de proteína total. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas (Duncan  $P < 0.05$ ).

El mismo comportamiento estadístico fue evidenciado en la evaluación de las plantas inoculadas con la cepa "SR8" de *F. oxysporum* a las 72 h de confrontación observando un incremento desde 0.0 para el fenotipo potencialmente resistente no inoculado hasta 12.2 en el mismo fenotipo inoculado, mientras que el fenotipo susceptible se mantiene en sus niveles basales incluso después de la confrontación (Figura 27).



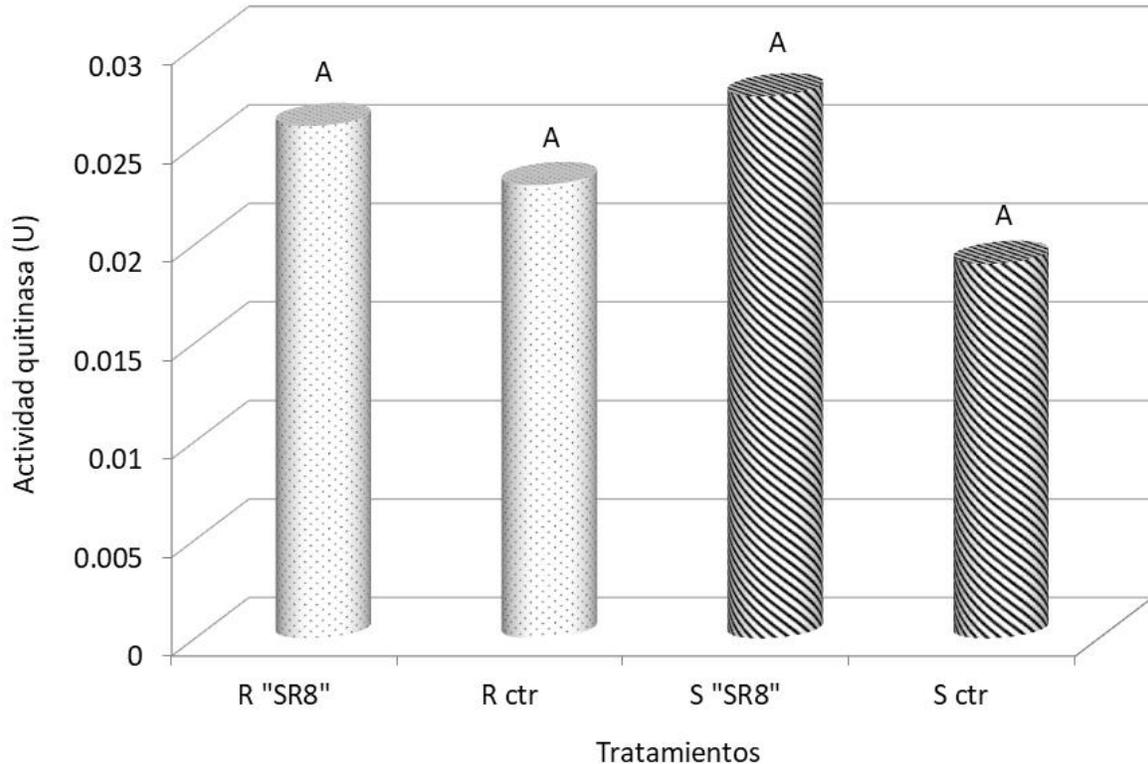
**Figura 27.** Actividad quitinasa en hojas de plántulas de *Agave tequilana* Weber var. azul, seleccionadas por su fenotipia como potencialmente resistentes (R) y susceptibles (S). La determinación se realizó 72 h después de su inoculación en el sistema radicular con una suspensión de conidias pre-germinadas de la cepa patogénica "SR8" de *F. oxysporum*. Una unidad (U) de actividad quitinasa equivale a 1 mg de quitina de caparazón de cangrejo hidrolizado, por minuto por mg de proteína total. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas (Duncan  $P < 0.05$ ).

Cuando la evaluación de esta actividad se realizó pasados los 30 días de confrontación con *F. solani*, no se encontró diferencia estadística significativa entre las plantas de agave inoculadas y sus controles no inoculados en ninguno de los fenotipos (Figura 28).



**Figura 28.** Actividad quitinasa en hojas de plántulas de *Agave tequilana* Weber var. azul, seleccionadas por su fenotipia como potencialmente resistentes (R) y susceptibles (S). La determinación se realizó 30 días después de su inoculación en el sistema radicular con una suspensión de conidias pregerminadas de la cepa patogénica "G" de *F. solani*. Una unidad (U) de actividad quitinasa equivale a 1 mg de quitina de caparazón de cangrejo hidrolizado, por minuto por mg de proteína total. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas (Duncan  $P < 0.05$ ).

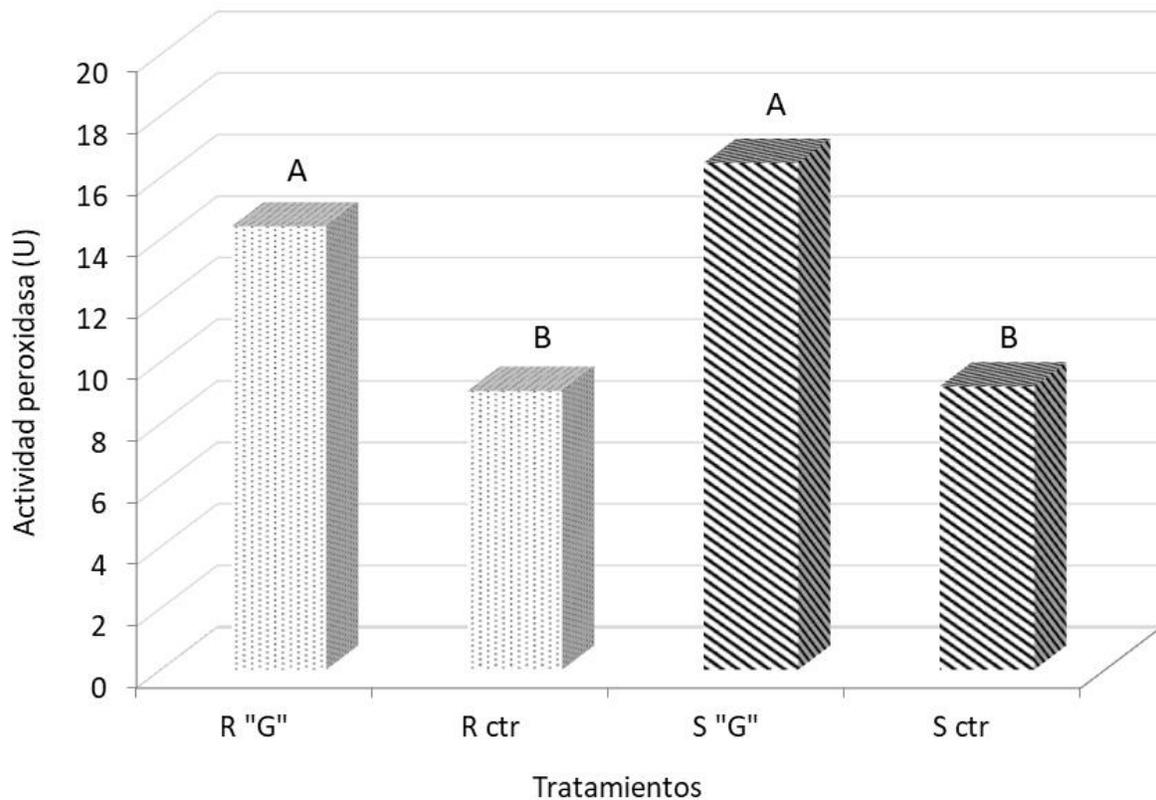
Manteniéndose en los mismos niveles bajos de actividad quitinasa, el bioensayo de 30 días para plantas confrontadas con la cepa "SR8" de *F. oxysporum*, no mostró diferencia significativa alguna entre fenotipos ni entre tratamientos (Figura 29).



**Figura 29.** Actividad quitinasa en hojas de plántulas de *Agave tequilana* Weber var. azul, seleccionadas por su fenotipia como potencialmente resistentes (R) y susceptibles (S). La determinación se realizó 30 días después de su inoculación en el sistema radicular con una suspensión de conidias pregerminadas de la cepa patogénica “SR8” de *F. oxysporum*. Una unidad (U) de actividad quitinasa equivale a 1 mg de quitina de caparazón de cangrejo hidrolizado, por minuto por mg de proteína total. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas (Duncan  $P < 0.05$ ).

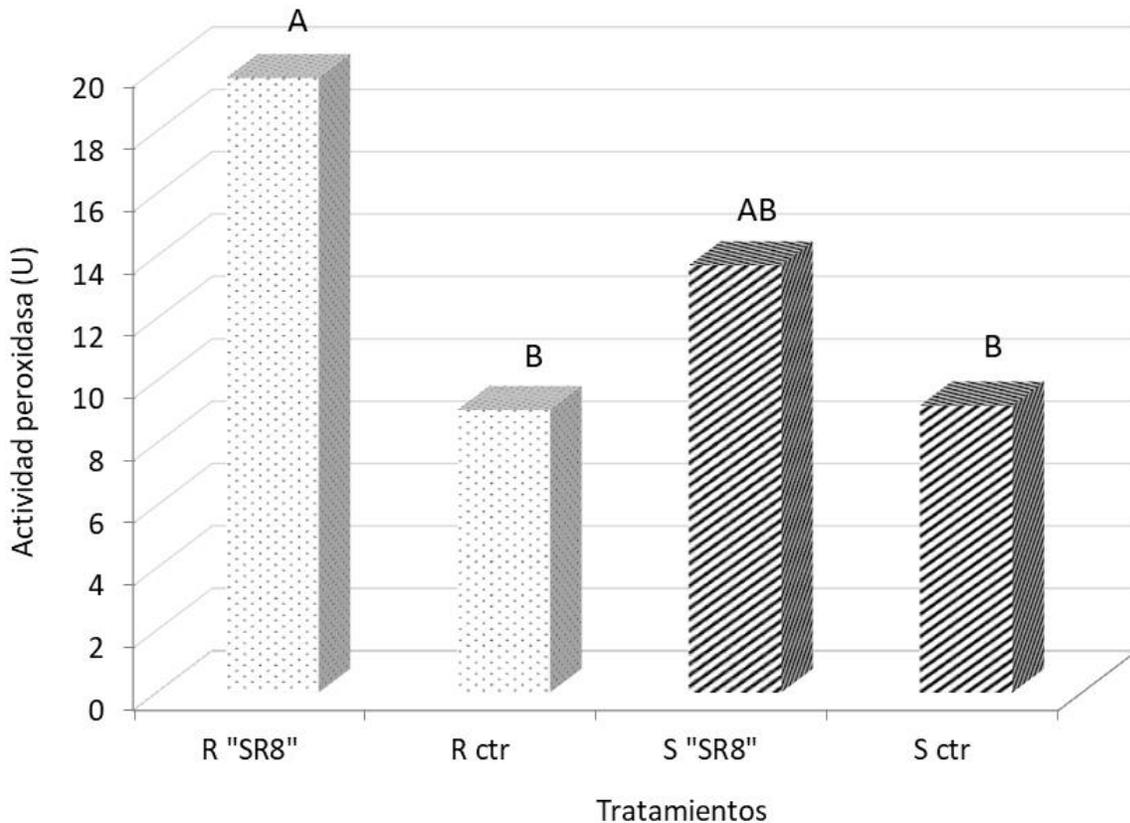
### 6.6.2 ACTIVIDAD PEROXIDASA

Cuando la comparación se realizó en la actividad peroxidasa, tanto las plántulas de agave potencialmente resistentes como las susceptibles, inoculadas con la cepa patogénica “G” de *F. solani*, presentaron una respuesta temprana de 14.4 U y 16.4 U respectivamente, sin diferencia estadística significativa, pero ambas, estadísticamente superiores a sus controles de plántulas no inoculadas (Figura 30).



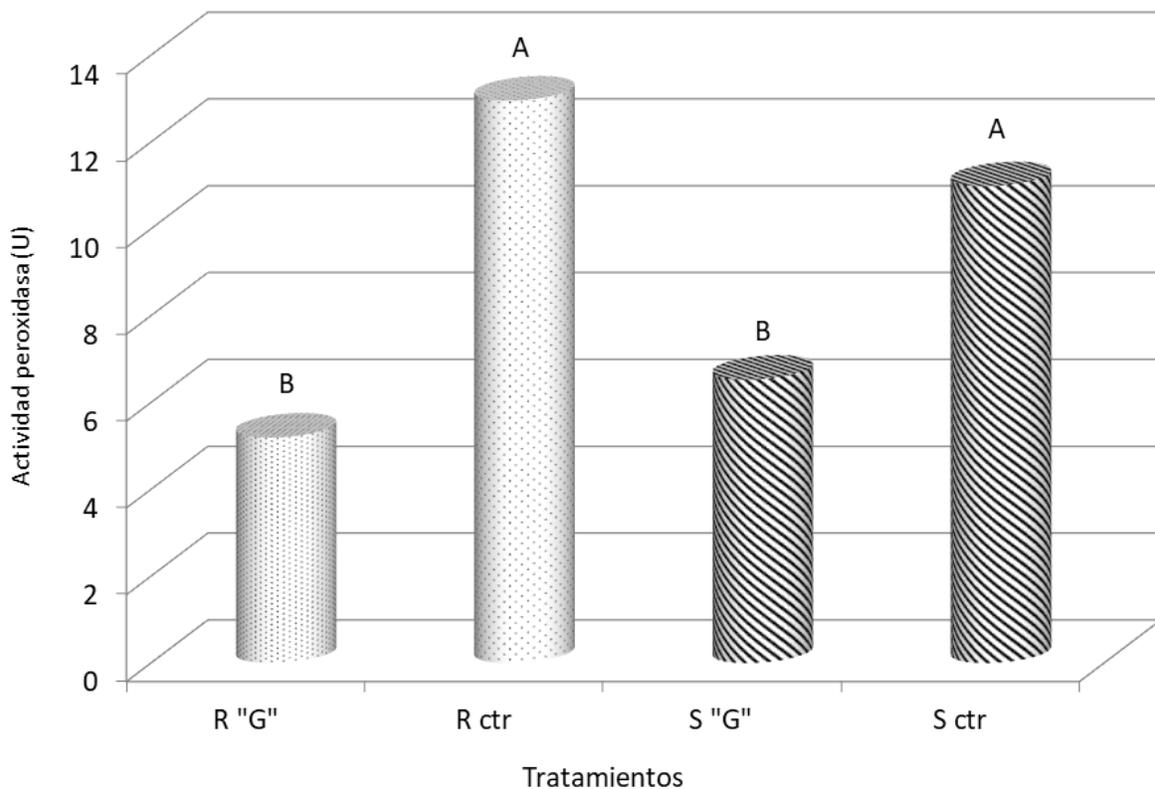
**Figura 30.** Actividad peroxidasa en hojas de *Agave tequilana* Weber var. azul, seleccionadas por su fenotipo como potencialmente resistentes (R) y susceptibles (S). La determinación se realizó 72 h después de su inoculación a nivel radicular con una suspensión de conidias pre-germinadas de la cepa "G" de *F. solani*. Una unidad (U) de actividad peroxidasa fue expresada como la diferencia en absorbancia a 490 nm por minute por mg de proteína total. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas (Duncan  $P < 0.05$ ).

Al cuantificar la actividad peroxidasa sistémica en hojas de *Agave tequilana* Weber var. azul, confrontadas o no con el patógeno *F. oxysporum* durante 72 h, se evidencia un incremento significativo en el fenotipo potencialmente resistente (19.7 U) con respecto a su control no inoculado (9.06 U) pero estadísticamente igual al fenotipo susceptible inoculado (13.7). Por otro lado, el fenotipo susceptible inoculado, se mantiene estadísticamente igual que su control no inoculado (Figura 31).



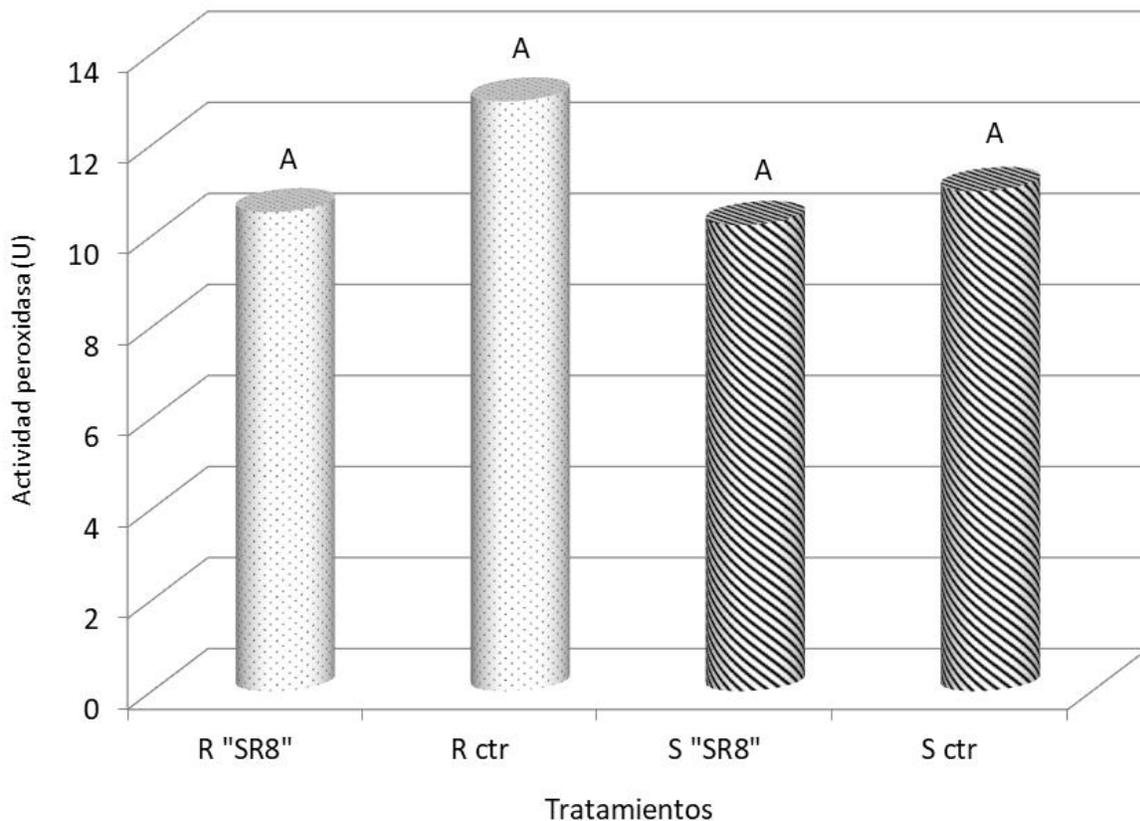
**Figura 31.** Actividad peroxidasa en hojas de *Agave tequilana* Weber var. azul, seleccionadas por su fenotipo como potencialmente resistentes (R) y susceptibles (S). La determinación se realizó 72 h después de su inoculación a nivel radicular con una suspensión de conidias pre-germinadas de la cepa "SR8" de *F. oxysporum*. Una unidad (U) de actividad peroxidasa fue expresada como la diferencia en absorbancia a 490 nm por minute por mg de proteína total. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas (Duncan  $P < 0.05$ ).

Por el contrario, cuando las plántulas fueron confrontadas durante 30 días con la cepa "G" de *F. solani*, la actividad peroxidasa disminuye significativamente en comparación con sus controles no inoculados en ambos fenotipos (Figura 32).



**Figura 32.** Actividad peroxidasa en hojas de *Agave tequilana* Weber var. azul, seleccionadas por su fenotipia como potencialmente resistentes (R) y susceptibles (S). La determinación se realizó 30 días después de su inoculación a nivel radicular con una suspensión de conidias pre-germinadas de la cepa "G" de *F. solani*. Una unidad (U) de actividad peroxidasa fue expresada como la diferencia en absorbancia a 490 nm por minute por mg de proteína total. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas (Duncan  $P < 0.05$ ).

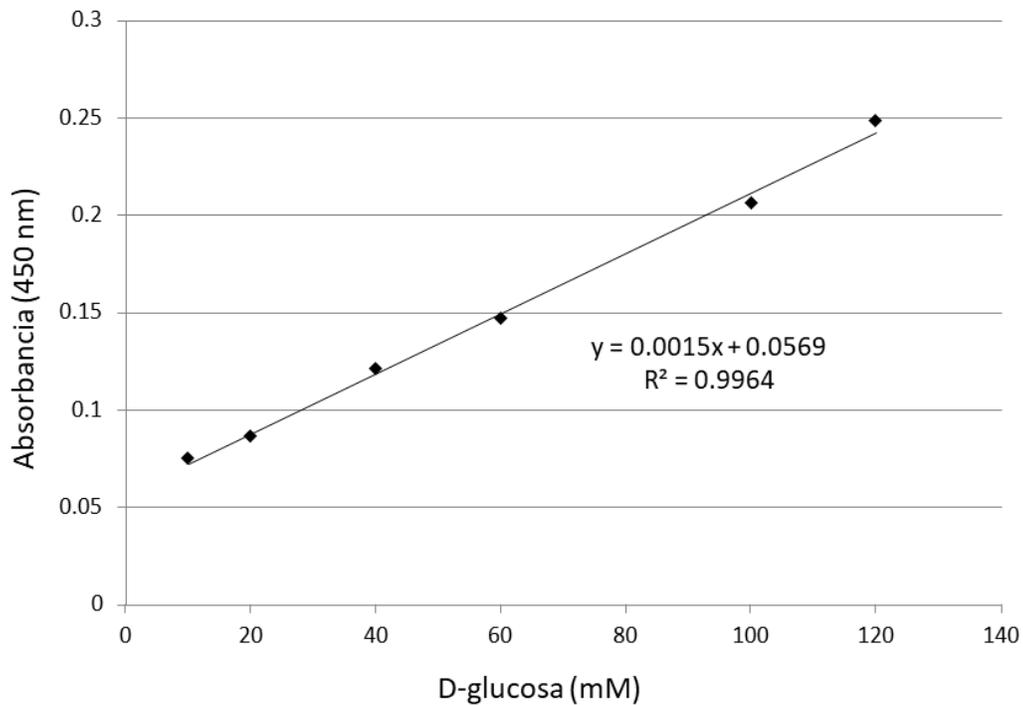
Pasados los 30 días de confrontación con la cepa patogénica "SR8" de *F. oxysporum*, la actividad peroxidasa no presentó diferencia significativa entre ninguno de los tratamientos ni entre los fenotipos seleccionados (Figura 33).



**Figura 33.** Actividad peroxidasa en hojas de *Agave tequilana* Weber var. azul, seleccionadas por su fenotipia como potencialmente resistentes (R) y susceptibles (S). La determinación se realizó 30 días después de su inoculación a nivel radicular con una suspensión de conidias pre-germinadas de la cepa "SR8" de *F. oxysporum*. Una unidad (U) de actividad peroxidasa fue expresada como la diferencia en absorbancia a 490 nm por minute por mg de proteína total. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas (Duncan P < 0.05).

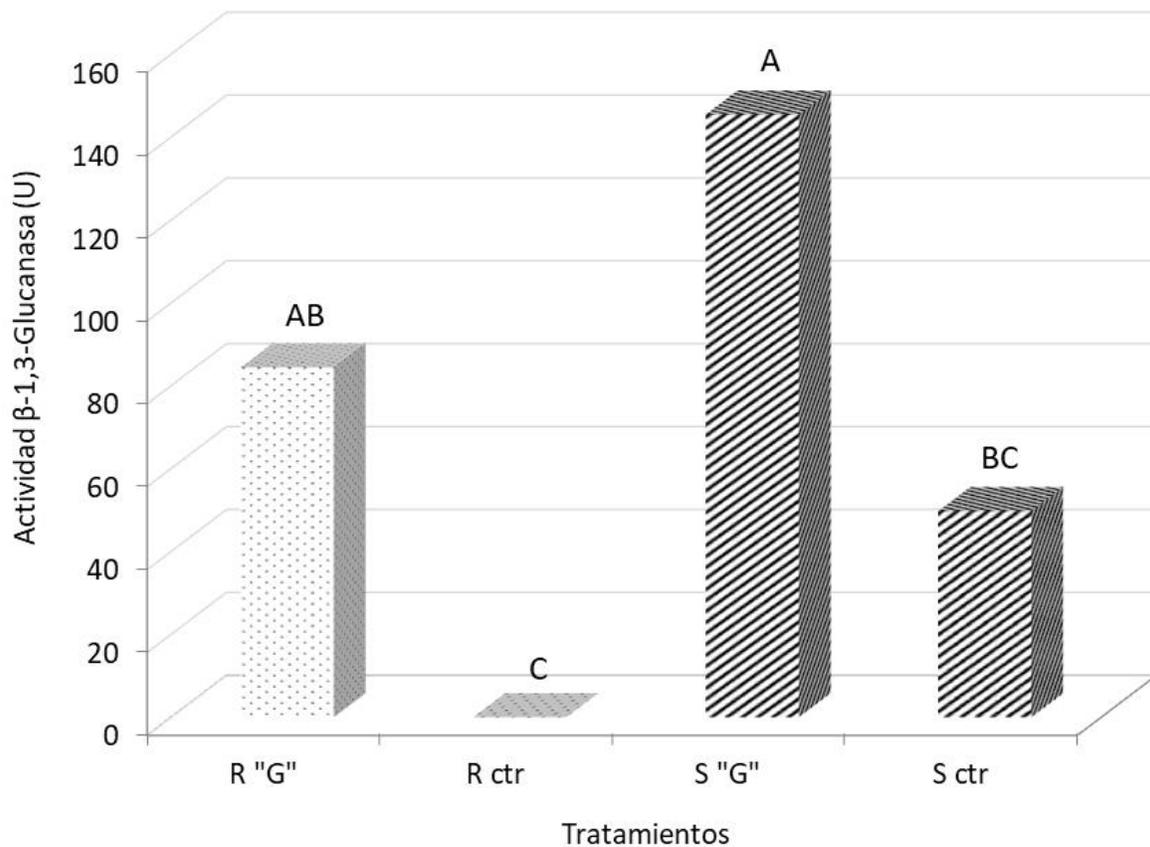
### 6.6.3 ACTIVIDAD $\beta$ -1,3-GLUCANASA

Para la determinación de la actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa, se utilizó una curva de calibración con concentraciones de D-glucosa que fueron desde 10 hasta 120 mM, reportando absorbancias que van desde 0.075 hasta 0.248 U según se muestra en la Figura 34.



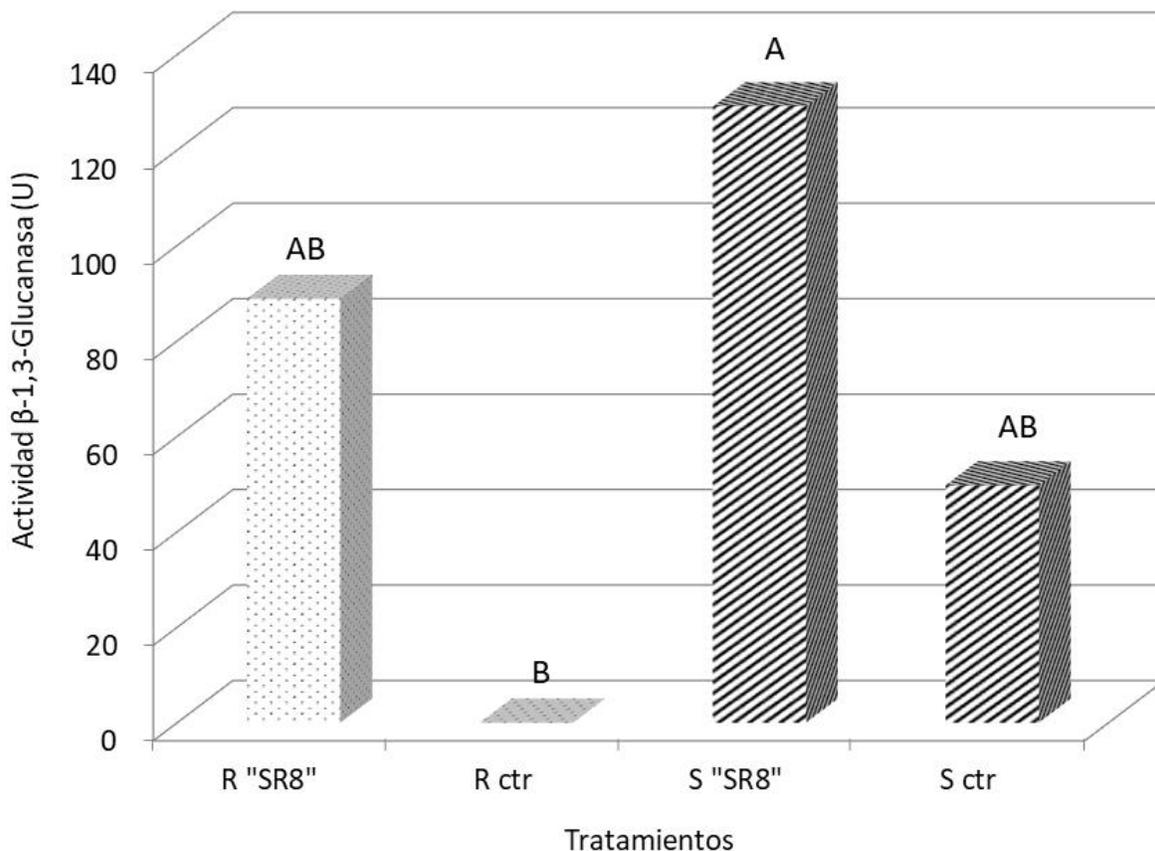
**Figura 34.** Curva de calibración de D-glucosa utilizada para determinar la expresión de actividad de  $\beta$ -1,3-glucanasas.

En la confrontación de 72 h con el patógeno “G” de *F. solani*, el nivel promedio de actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa en plántulas de agave potencialmente resistentes o susceptibles alcanzado fue de 84.4 y 145.43 U respectivamente, sin diferencia significativa entre ellas pero estadísticamente superior a los niveles observados en plántulas no inoculadas (Figura 35).



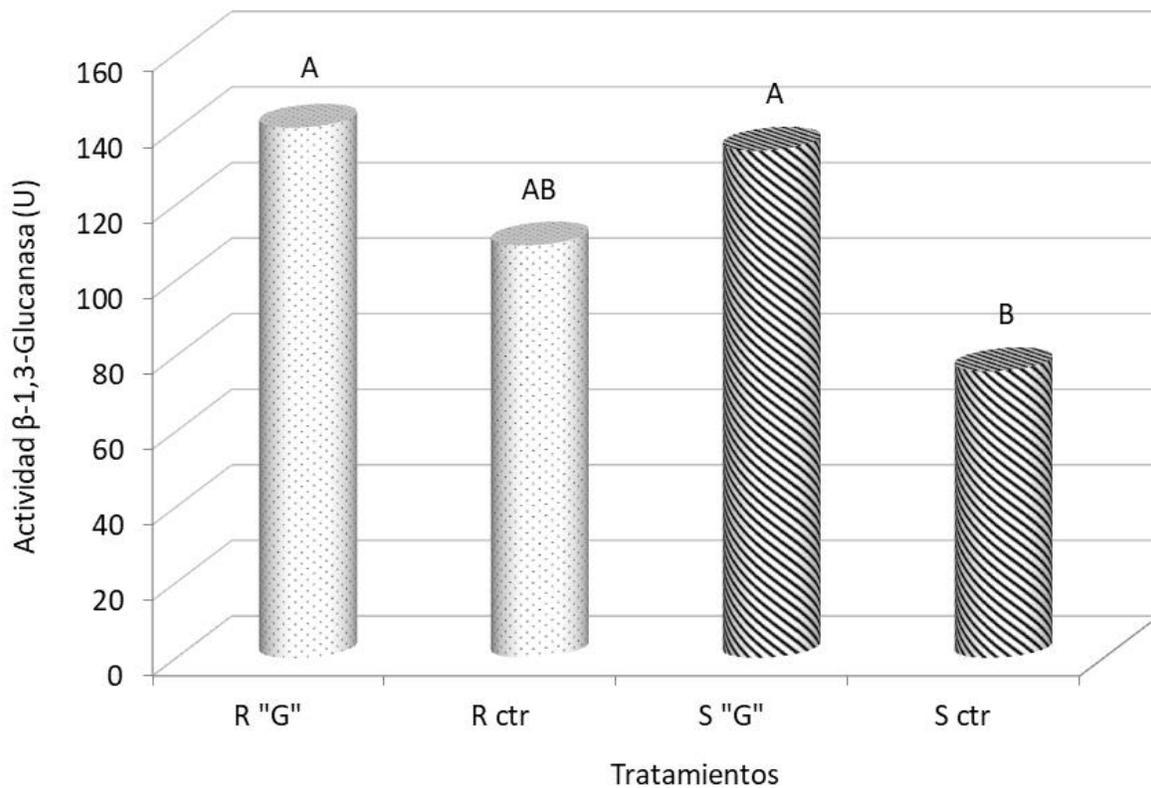
**Figura 35.** Actividad  $\beta$ -1,3-Glucanasa en hojas de *Agave tequilana* Weber var. azul seleccionadas por su fenotipo como potencialmente resistentes (R) y susceptibles (S). La determinación se realizó 72 h después de su inoculación a nivel radicular con una suspensión de conidas pre-germinadas de la cepa patogénica "G" de *F. solani*. Una unidad (U) de actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa equivale a 1 mM de D-glucosa hidrolizado a partir de laminarina, por mg of proteína total por minuto. Letras diferentes sobre las barras, indican diferencias significativas (Duncan  $P < 0.05$ ).

De la misma manera, en la confrontación de 72 h con el patógeno "SR8" de *F. oxysporum*, la actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa se mostró incrementada en ambos fenotipos al ser confrontadas con respecto a sus controles no inoculados, pero únicamente el fenotipo R denotó diferencia significativa en este incremento. Los fenotipos R y S confrontados, se mantienen estadísticamente iguales (Figura 36).



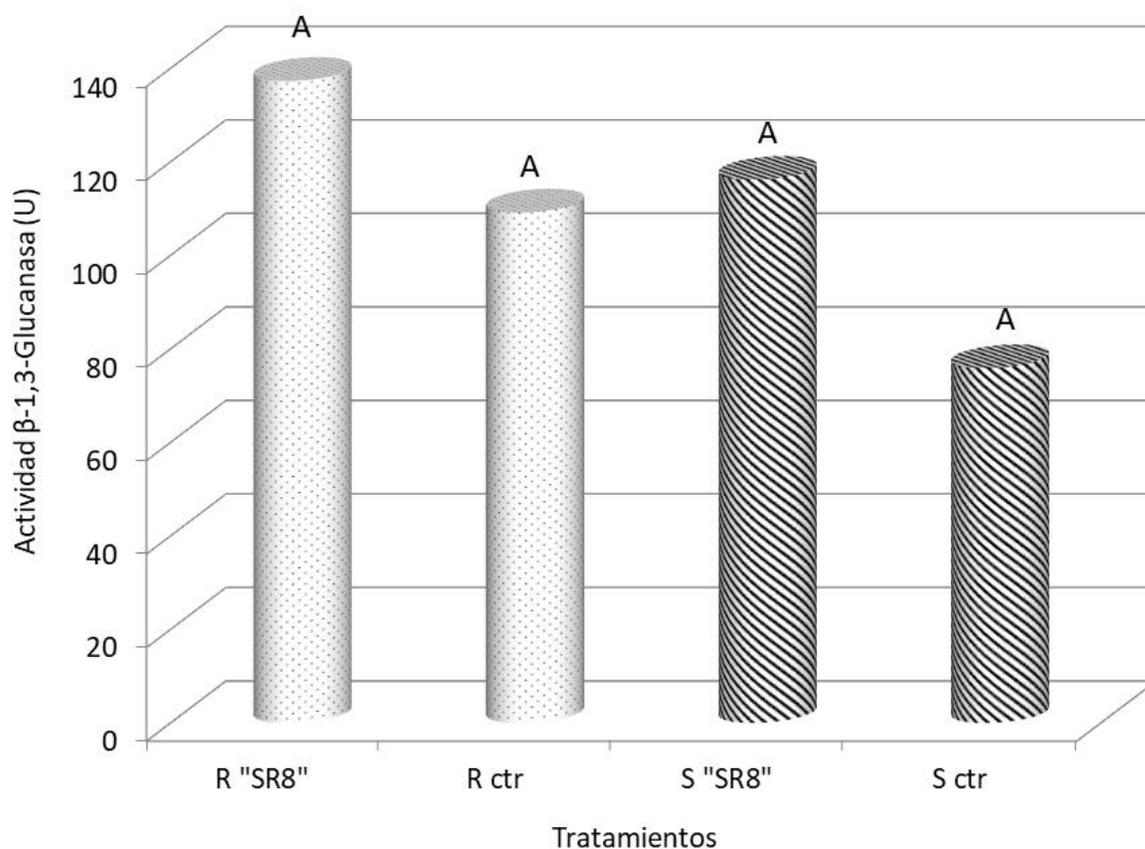
**Figura 36.** Actividad  $\beta$ -1,3-Glucanasa en hojas de *Agave tequilana* Weber var. azul seleccionadas por su fenotipo como potencialmente resistentes (R) y susceptibles (S). La determinación se realizó 72 h después de su inoculación a nivel radicular con una suspensión de conidas pre-germinadas de la cepa patogénica "SR8" de *F. oxysporum*. Una unidad (U) de actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa equivale a 1 mM de D-glucosa hidrolizado a partir de laminarina, por mg of proteína total por minuto. Letras diferentes sobre las barras, indican diferencias significativas (Duncan  $P < 0.05$ ).

En el bioensayo de 30 días de confrontación con *F. solani*, las plántulas con un fenotipo de susceptibilidad, presentan un incremento significativo en la actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa, mientras que el fenotipo resistente mantiene sus niveles estadísticamente iguales a sus controles no inoculados (Figura 37).



**Figura 37.** Actividad  $\beta$ -1,3-Glucanasa en hojas de *Agave tequilana* Weber var. azul seleccionadas por su fenotipia como potencialmente resistentes (R) y susceptibles (S). La determinación se realizó 30 días después de su inoculación a nivel radicular con una suspensión de conidas pre-germinadas de la cepa patogénica "G" de *F. solani*. Una unidad (U) de actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa equivale a 1 mM de D-glucosa hidrolizado a partir de laminarina, por mg of proteína total por minuto. Letras diferentes sobre las barras, indican diferencias significativas (Duncan  $P < 0.05$ ).

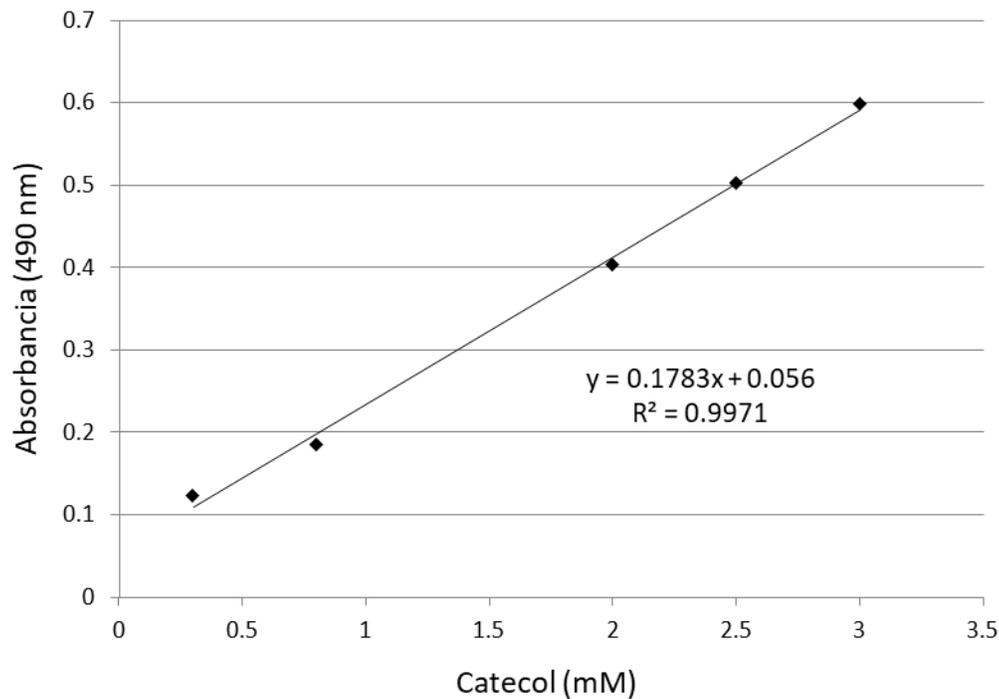
Por su parte, la actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa evaluada en controles no inoculados y en plántulas confrontadas durante 30 días con la cepa patogénica "SR8" de *F. oxysporum*, no mostró diferencias estadísticas significativas en ninguno de los fenotipos o tratamientos (Figura 38).



**Figura 38.** Actividad  $\beta$ -1,3-Glucanasa en hojas de *Agave tequilana* Weber var. azul seleccionadas por su fenotipo como potencialmente resistentes (R) y susceptibles (S). La determinación se realizó 30 días después de su inoculación a nivel radicular con una suspensión de conidas pre-germinadas de la cepa patogénica "SR8" de *F. oxysporum*. Una unidad (U) de actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa equivale a 1 mM de D-glucosa hidrolizado a partir de laminarina, por mg of proteína total por minuto. Letras diferentes sobre las barras, indican diferencias significativas (Duncan  $P < 0.05$ ).

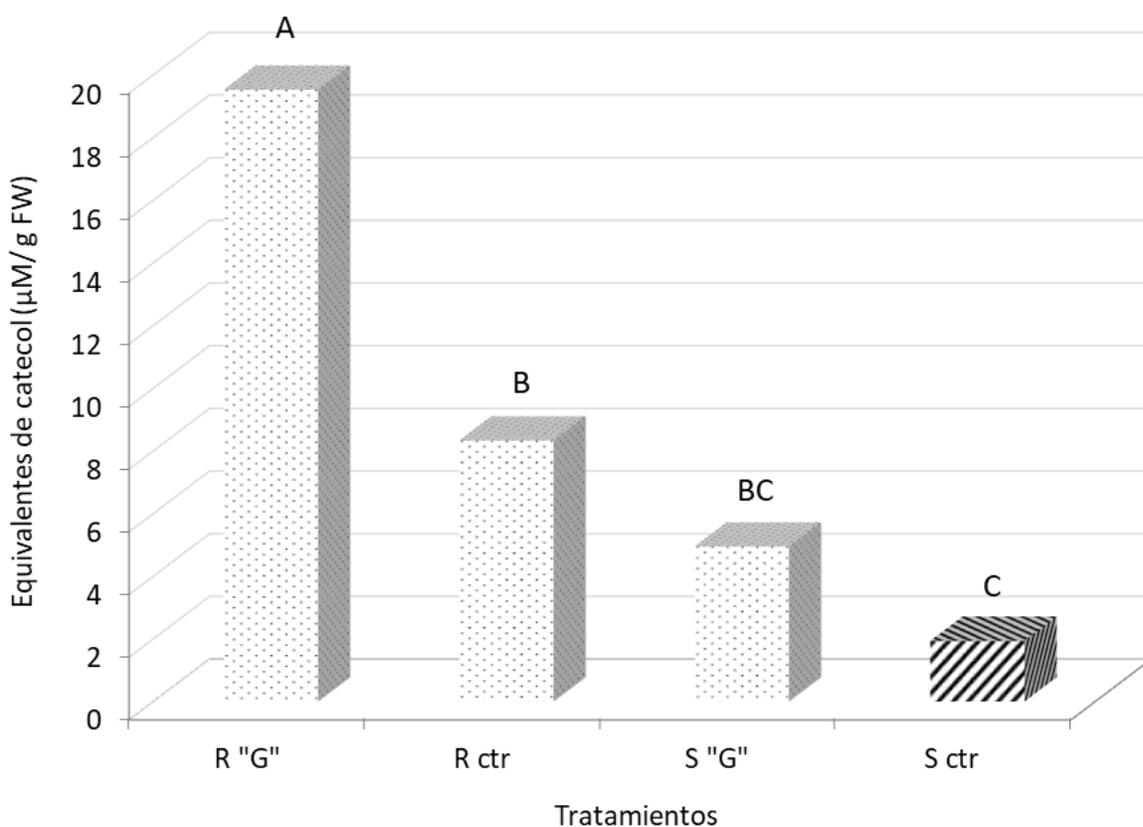
#### 6.6.4 COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES

La concentración de los extractos de compuestos fenólicos totales en raíces de *Agave tequilana* Weber var. azul, fue determinada con base en la curva de calibración previamente elaborada con concentraciones de 0.3 a 3 mM de catecol y sus respectivas absorbancias a 490 nm (Figura 39).



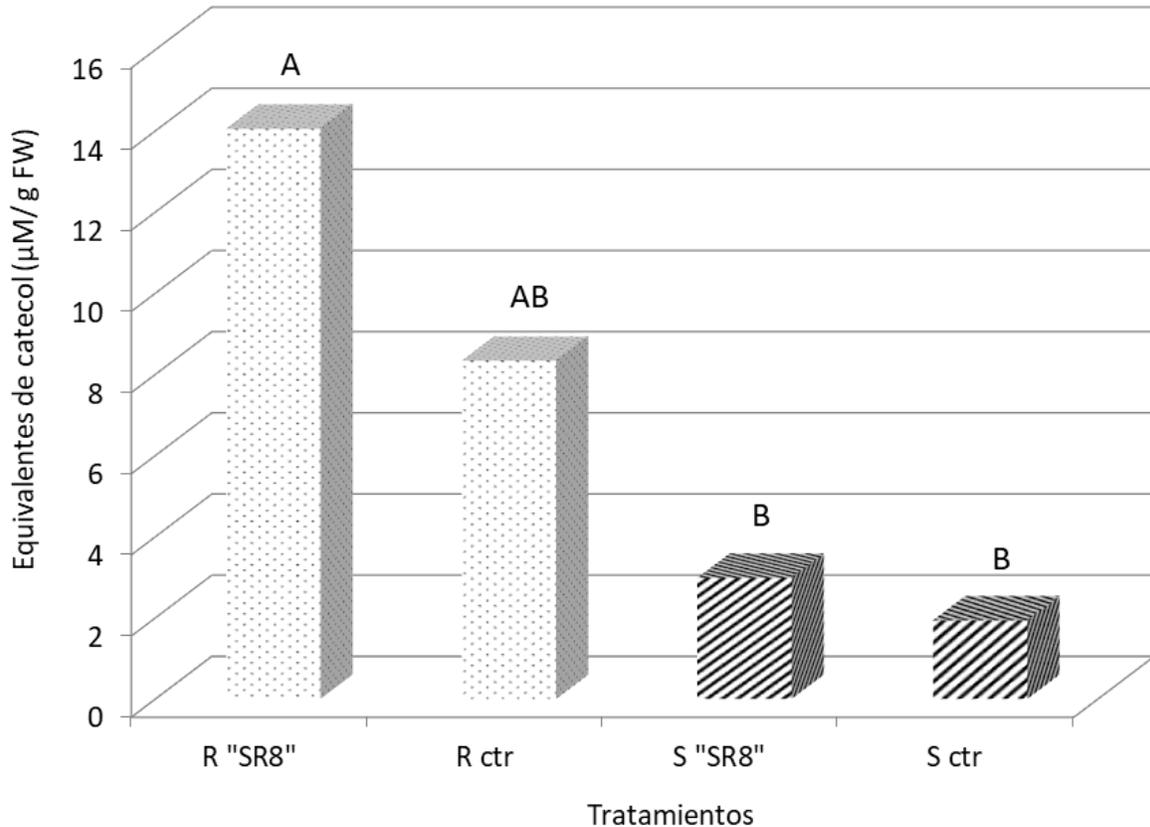
**Figura 39.** Curva de calibración de catecol para la determinación de concentración de compuestos fenólicos totales presentes en los extractos radiculares.

Con respecto a la concentración de compuestos fenólicos totales, el nivel basal de las plántulas no inoculadas de *Agave tequilana* Weber var. azul, fue estadísticamente diferente entre el fenotipo potencialmente resistente y el susceptible, con una media de 8.33 y 1.94 equivalentes de catecol  $\mu\text{M/gFW}$  respectivamente. Luego, en las plántulas confrontadas durante 72 h con *F. solani*, los extractos metanólicos de raíces en plantas resistentes, se mostraron estadísticamente superiores con 19.52 equivalentes de catecol con respecto a las plántulas control no inoculadas así como también con respecto a las susceptibles inoculadas y sus controles (Figura 40)



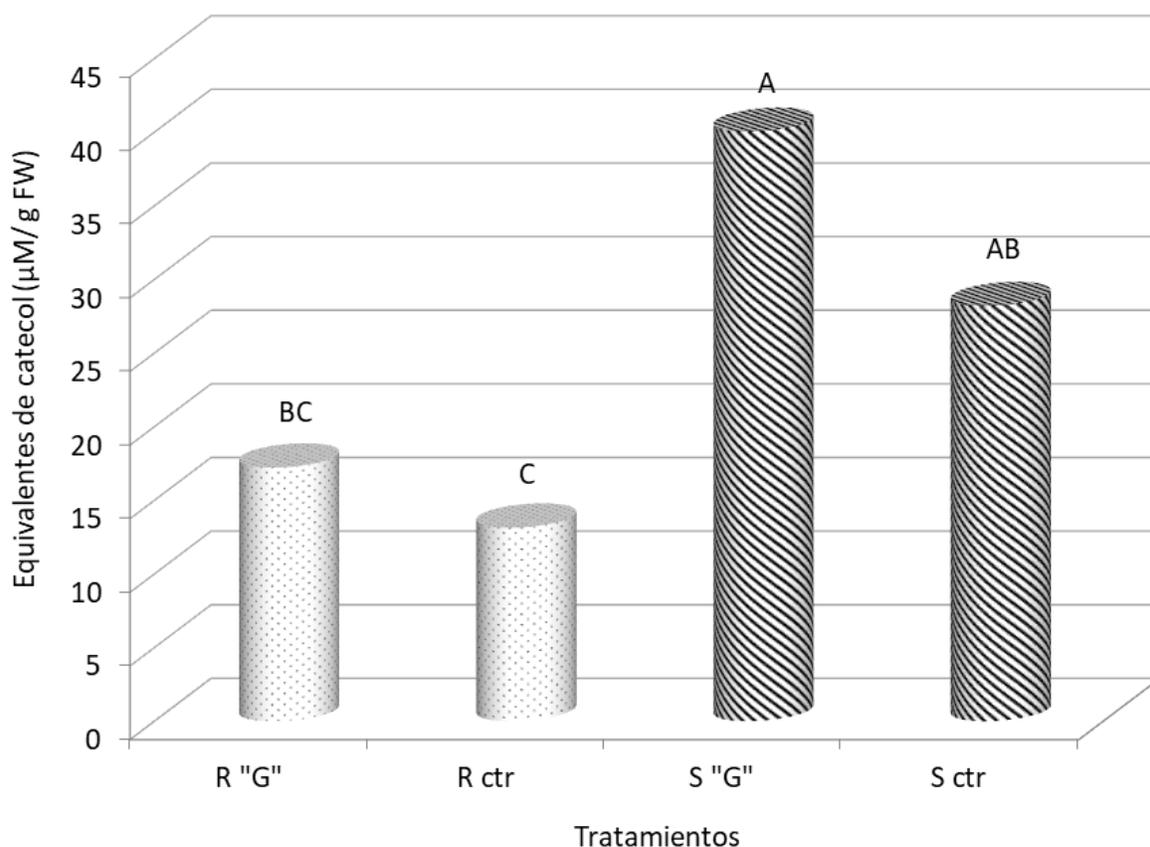
**Figura 40.** Contenido fenólico total expresado como equivalentes de catecol en extractos metanólicos de raíces de agave inoculadas o no, con una suspensión de conidias pre-germinadas de la cepa patogénica "G" de *F. solani*. El tiempo de confrontación después de la inoculación fue de 72 h para este bioensayo. Los valores reportados son las medias de por lo menos tres repeticiones. Las letras sobre las barras indican diferencias significativas (Duncan  $P < 0.05$ ).

De manera más evidente se observó el incremento en la concentración de compuestos fenólicos totales en las plántulas con fenotipo potencialmente resistente inoculadas con *F. oxysporum* y confrontadas durante 72 h con un valor medio de 14.05 µM/gFW, estadísticamente superior a su control no inoculado con valor de 8.33 µM/gFW y a ambos tratamientos del fenotipo susceptible (Figura 41).



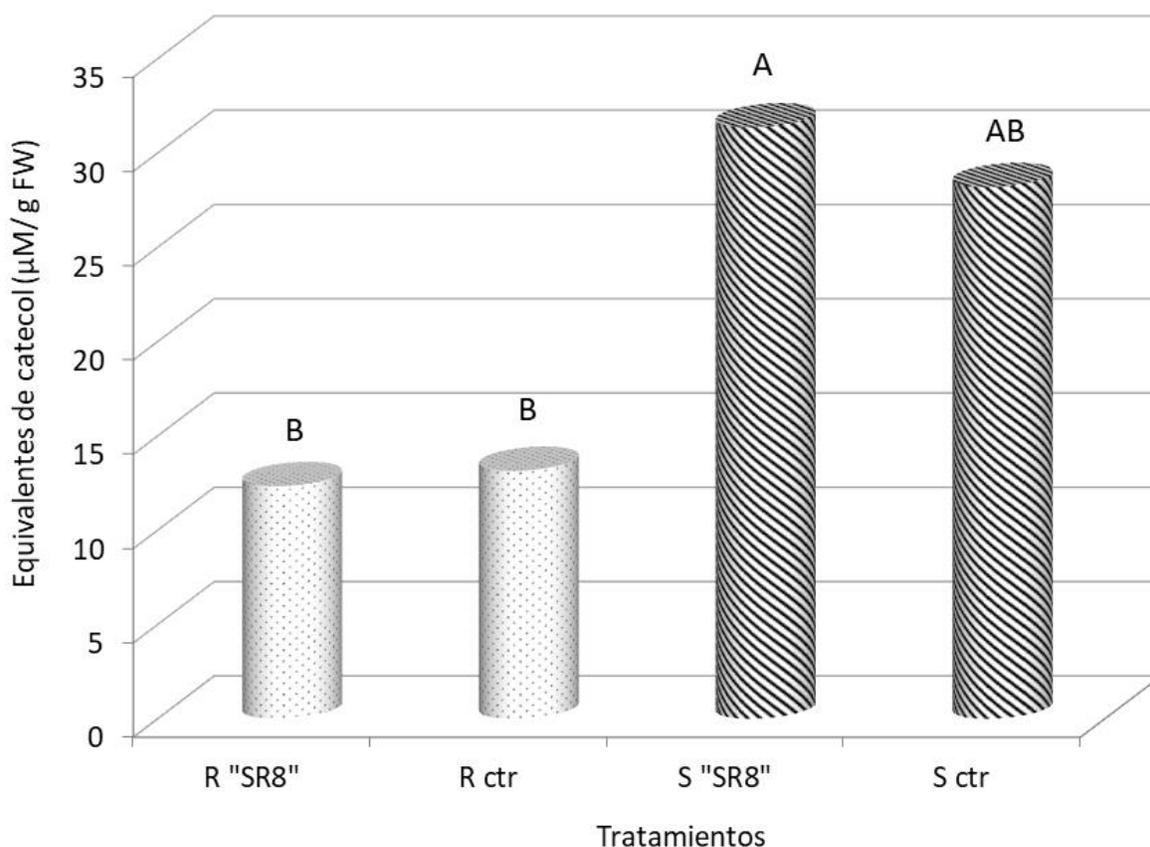
**Figura 41.** Contenido fenólico total expresado como equivalentes de catecol en extractos metanólicos de raíces de agave inoculadas o no, con una suspensión de conidias pre-germinadas de la cepa patogénica "SR8" de *F. oxysporum*. El tiempo de confrontación después de la inoculación fue de 72 h para este bioensayo. Los valores reportados son las medias de por lo menos tres repeticiones. Las letras sobre las barras indican diferencias significativas (Duncan  $P < 0.05$ ).

En el bioensayo de 30 días de confrontación con la cepa "G" de *F. solani*, se mostró un comportamiento muy distinto, ya que las plántulas susceptibles presentan un incremento significativo en comparación con el fenotipo potencialmente resistente (Figura 42).



**Figura 42.** Contenido fenólico total expresado como equivalentes de catecol en extractos metanólicos de raíces de agave inoculadas o no, con una suspensión de conidias pre-germinadas de la cepa patogénica “G” de *F. solani*. El tiempo de confrontación después de la inoculación fue de 30 días para este bioensayo. Los valores reportados son las medias de por lo menos tres repeticiones. Las letras sobre las barras indican diferencias significativas (Duncan  $P < 0.05$ ).

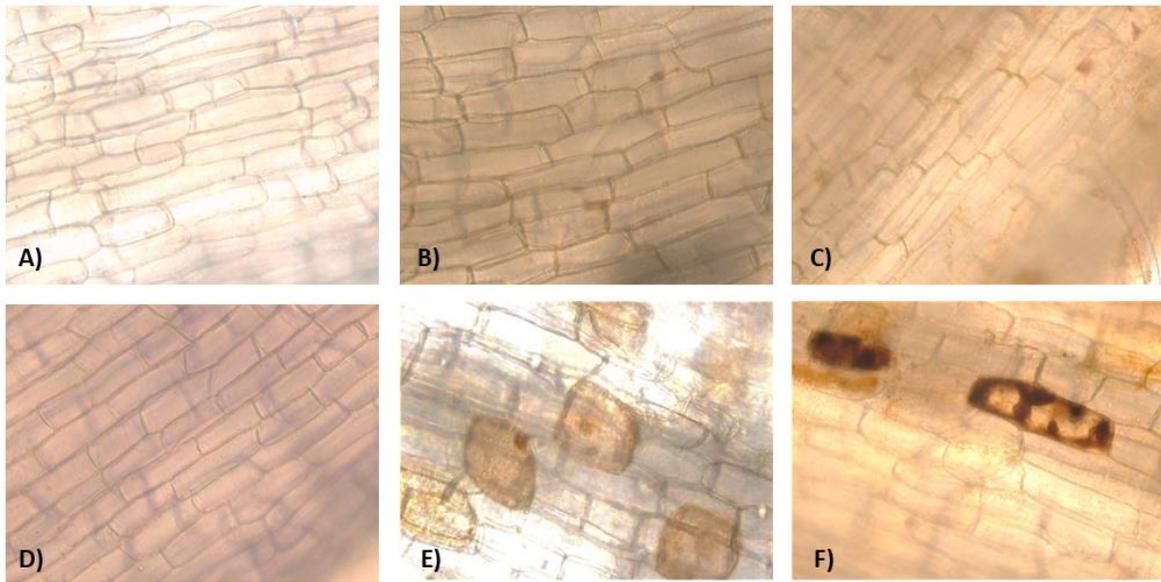
Mismo escenario se observó en el bioensayo evaluado con la confrontación de *F. oxysporum* a los 30 días de inoculado, en donde el fenotipo susceptible, presentó un incremento estadísticamente significativo con respecto a los dos tratamientos en el fenotipo potencialmente resistente (Figura 43).



**Figura 43.** Contenido fenólico total expresado como equivalentes de catecol en extractos metanólicos de raíces de agave inoculadas o no, con una suspensión de conidias pre-germinadas de la cepa patogénica "SR8" de *F. oxysporum*. El tiempo de confrontación después de la inoculación fue de 30 días para este bioensayo. Los valores reportados son las medias de por lo menos tres repeticiones. Las letras sobre las barras indican diferencias significativas (Duncan  $P < 0.05$ ).

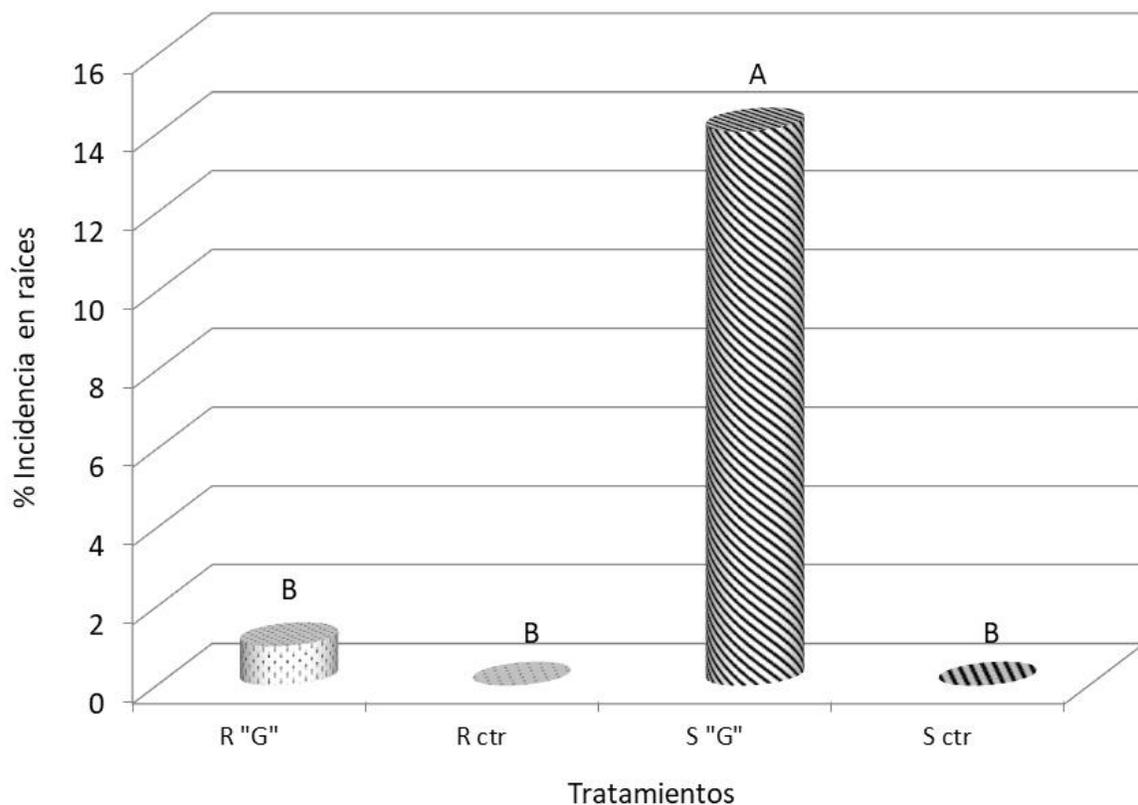
### 6.7 INCIDENCIA DE ENFERMEDAD EN RAÍCES CAUSADA POR *F. solani*

La evidencia de la interacción con 30 días de duración entre el tejido radicular de las plántulas de agave con las conidias de *F. solani* se muestra por la presencia de células de raíz dañadas, especialmente en plántulas con fenotipia susceptible, lo que se considera una evidencia clara del parasitismo necrotrófico de la cepa "G" (Figura 44).



**Figura 44.** Campos ópticos de microscopio que muestran el tejido celular de raíces de agave (*Agave tequilana* Weber var. azul) en el tratamiento de 30 días de confrontación. A-B) controles no inoculados, C-D raíces de plántulas R inoculadas con conidias pre-germinadas de la cepa “G” de *F. solani*, y E-F) Sintomatología en células radiculares asociadas con el patógeno, observada principalmente en plántulas con fenotipo S.

Cuando las células necróticas se cuantificaron como porcentaje de incidencia en campos ópticos del microscopio, se pudo determinar una diferencia significativa en células dañadas entre los tratamientos, encontrando cerca de un 20% de células dañadas en plántulas susceptibles en comparación con un porcentaje menor al 3% en plántulas potencialmente resistentes, las cuales fueron estadísticamente iguales a los controles no inoculados (Figura 45).



**Figura 45.** Porcentaje de incidencia de daño en células radiculares de agave (*Agave tequilana* Weber var. azul) 30 días después de confrontación con la cepa "G" de *F. solani* en plántulas potencialmente resistentes (R) y susceptibles (S), y sus controles no inoculados. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas (Duncan  $P < 0.05$ ).

### 6.8 CORRELACIÓN ENTRE LA INCIDENCIA DE DAÑO Y LA RESPUESTA TEMPRANA DE LOS MECANISMOS DE DEFENSA

Se analizó la correlación del coeficiente de Pearson entre la expresión temprana a las 72 h de los mecanismos de defensa y la incidencia de daño a los 30 días presente en las células de las raíces inoculadas con *F. solani* y sus controles no inoculados. Las correlaciones negativas, indicativas de un aumento en la expresión del mecanismo de defensa cuando hay menor daño celular, se encontraron con el contenido de ácido shikímico (-0.86), ácido salicílico (-0.68), actividad quitinasa (-0.86) y concentración de compuestos fenólicos (-0.74); mientras que los mecanismos que mostraron una correlación positiva fueron las actividades PAL,  $\beta$ -1,3-glucanasa y peroxidasa, indicando

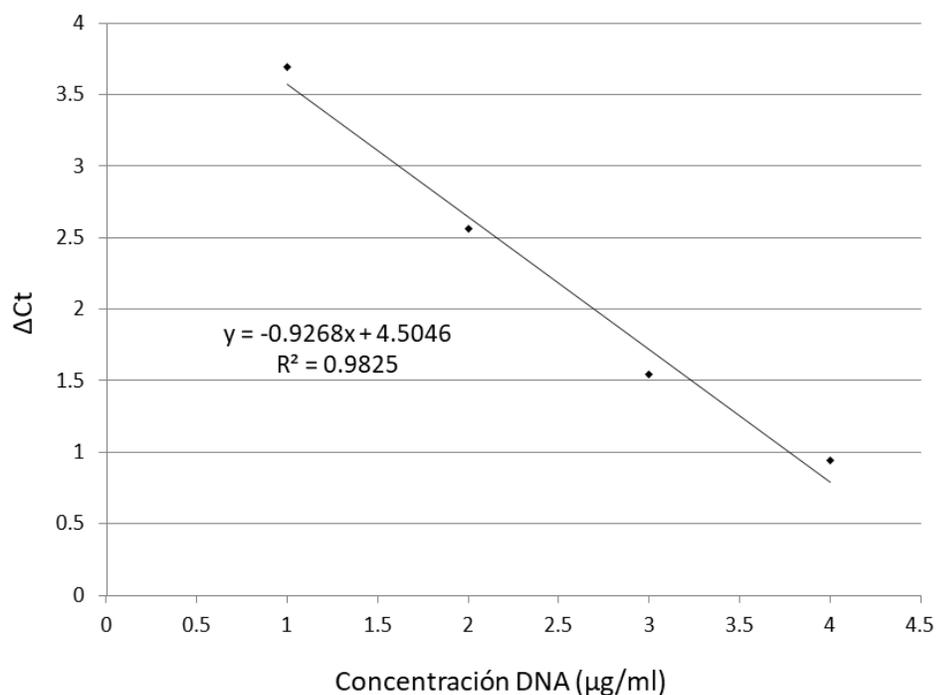
un aumento en el daño celular de raíces a la vez que aumenta la actividad de estos mecanismos de defensa (Cuadro 6).

**Cuadro 6.** Correlación del coeficiente de Pearson entre incidencia de células de raíz dañadas 30 días después de su inoculación con conidias pre-germinadas de la cepa “G” de *F. solani* y la actividad temprana a las 72 h de mecanismos de defensa en grupos de plántulas de la misma línea isogénica.

Sample name	Incidencia (%)	PAL (U)	Shk ( $\mu\text{g/g DW}$ )	CA ( $\mu\text{g/g FW}$ )	Fenoles ( $\mu\text{M/g FW}$ )	Peroxidasa (U)	Quitinasa (U)	$\beta$ -1,3-glucanasa (U)	SA (mg/g FW)
PR inoculado	2.89	0.25	27.62	5.64	17.29	15.03	0.67	81.18	5.87
PR inoculado	0.00	0.41	22.61	2.96	13.15	10.32	0.95	65.02	2.53
PR inoculado	2.00	0.25	21.54	5.34	23.85	10.28	0.39	0.00	6.50
PS inoculado	12.24	0.38	15.90	4.92	4.03	16.68	0.25	134.27	2.03
PS inoculado	17.79	0.70	13.67	3.38	7.70	16.04	0.08	152.87	1.24
Pearson correlation		0.78	<b>-0.86</b>	-0.22	<b>-0.74</b>	0.79	<b>-0.86</b>	0.85	<b>-0.68</b>

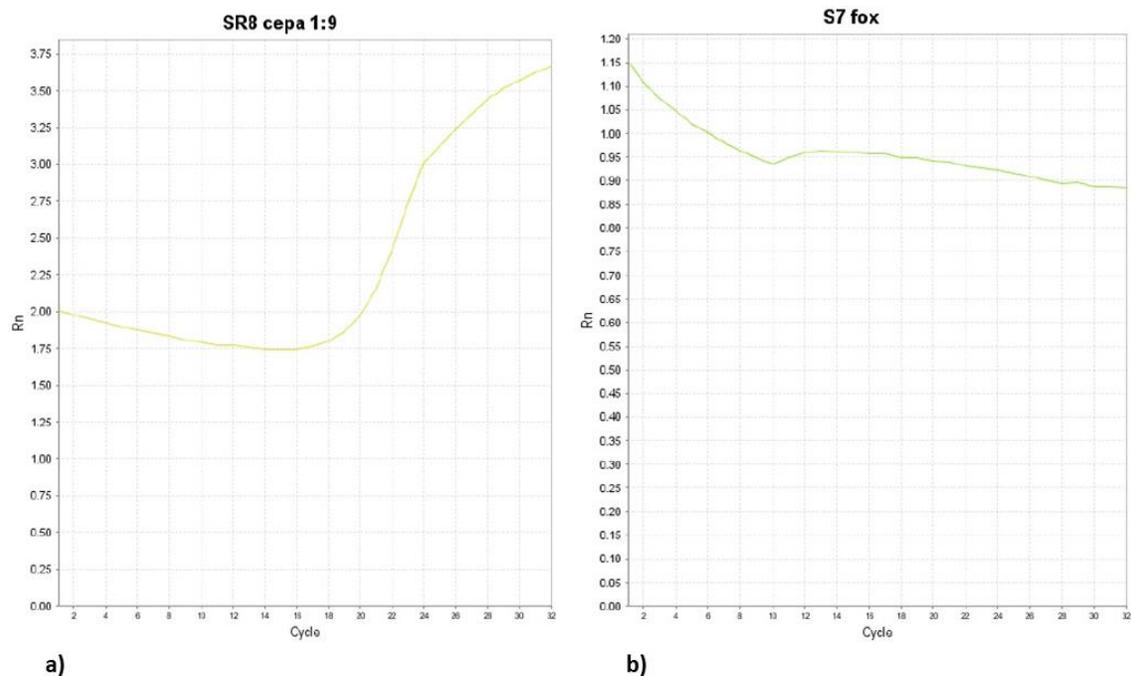
## 6.9 CUANTIFICACIÓN DE COLONIZACIÓN DE *F. oxysporum* EN LA PIÑA DE AGAVE MEDIANTE qPCR

Para la cuantificación de material genético del hongo patógeno *F. oxysporum* “SR8” dentro del tejido de la piña de las plántulas de agave inoculadas después de 30 días, se realizó una curva de calibración con diferentes concentraciones de DNA de la cepa pura del hongo patógeno versus el delta del ciclo umbral (Figura 46).



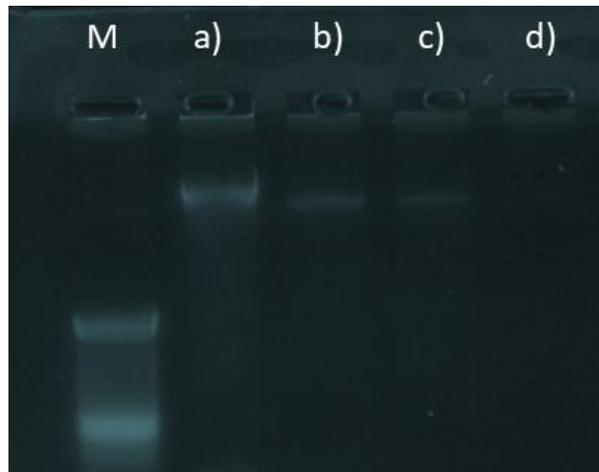
**Figura 46.** Curva de calibración de DNA de la cepa patogénica “SR8” de *F. oxysporum* para la cuantificación mediante qPCR, de la colonización en la piña de las plántulas de *Agave tequilana* Weber vara. azul confrontadas durante 30 días con la misma cepa.

El material genético total (DNA de planta + DNA de *F. oxysporum* “SR8”), extraído de las muestras inoculadas, se sometió a las mismas condiciones de amplificación empleando la concentración total y ciertas diluciones con la intención de evitar que el exceso de DNA inhibiera la reacción. Desafortunadamente, tras varios intentos, no fue posible evidenciar presencia alguna de DNA fúngico en ninguna de las muestras (Figura 47). Debido a esto, los resultados bioquímicos obtenidos de los bioensayos en las confrontaciones con *F. oxysporum* no pueden correlacionarse con la incidencia causada en cada fenotipo, lo que sería la base para determinar las expresiones más determinantes en una posible defensa ante este patógeno.



**Figura 47.** Amplificación cuantitativa de DNA de la cepa patogénica “SR8” de *F. oxysporum* empleando primers diseñados específicamente. La figura 47a) muestra el comportamiento de la curva generada en la amplificación al control positivo, con DNA extraído de una cepa pura del hongo. La figura 47b) muestra la ausencia de amplificación de la muestra extraída de la piña de una plántula susceptible (S7) confrontada durante 30 días con la cepa “SR8”.

Con la finalidad de descartar la posibilidad de una extracción deficiente del material genético, se realizó una electroforesis en gel de agarosa (1%) para observar la banda del DNA total, una de las mezclas de amplificación que no generaron señal y sus controles positivo y negativo, con lo que constatamos que la extracción fue exitosa, y al mismo tiempo sugerir la conclusión de ausencia del DNA fúngico deseado en la extracción (Figura 48).



**Figura 48.** Electroforesis en gel de agarosa. El carril M corresponde al marcador de peso molecular, a) DNA total de una de las extracciones de plántula inoculada con *F. solani*, b-c) producto de amplificación de la misma muestra a diferentes concentraciones, d) control negativo.

## VII. DISCUSIÓN

El objetivo principal de este estudio, fue determinar si la diversidad fenotípica relacionada a resistencia o susceptibilidad observada en campos comerciales de agave (*Agave tequilana* Weber var. azul), podría estar relacionada con la manera en que esta planta responde a la presencia y ataque de sus patógenos. El comparativo se realizó en plántulas de agave obtenidas con técnicas de reproducción de cultivo de tejidos *in vitro*, a las que se inocularon cepas patogénicas de *Fusarium oxysporum* y *F. solani*. En los resultados de este estudio, se demostraron diferencias en respuestas bioquímicas tempranas, evidenciadas 72 h después de la inoculación de los patógenos.

La primer etapa del sistema inmune de las plantas, involucra el reconocimiento del patógeno, que desencadena las respuestas de defensa (Zipfel, 2014; Sánchez-Vallet y col., 2014; Ben Khaled y col., 2015), y como mencionó Vallad y Goodman (2004), el tiempo transcurrido entre el reconocimiento y la expresión de las respuestas de defensa es crítico para determinar el ganador en una confrontación planta-patógeno.

En las plántulas de ageve potencialmente resistentes, se registraron actividades enzimáticas mayores, así como concentraciones más elevadas de metabolitos relacionadas a mecanismos de defensa claves en la defensa de las plantas, aunado a la observación de incidencias significativamente menores de células radiculares dañadas en la confrontación con *F. solani* de 30 días de duración, datos que fueron correlacionados para explicar diferencias. Las plántulas potencialmente resistentes inoculadas con la cepa “G” de *F. solani*, expresaron de manera rápida una acumulación superior de ácido shikímico, lo que pudo ser importante debido a que la ruta metabólica del ácido shikímico, es base para una biosíntesis subsecuente de aminoácidos aromáticos y compuestos fenólicos (Santos-Sánchez y col., 2019) que son fuertemente necesarios para una respuesta de defensa eficiente. Dicho incremento presentó una fuerte correlación negativa con la disminución en la incidencia de daño radicular, lo que corrobora su importancia en la defensa contra este patógeno. El ácido shikímico no tuvo un comportamiento similar ante la inoculación de *F. oxysporum*, ya que no evidencia un incremento que suponga una inducción temprana de sus síntesis. Por su parte, las concentraciones de esta molécula evaluadas a 30 días después de iniciada la confrontación, se muestran similares en las confrontaciones con los dos fitopatógenos, lo que ratifica su importancia en fases tempranas de la patogénesis, en las plantas presumiblemente resistentes inoculadas con *F. solani*.

Al inicio de la ruta metabólica de los fenilpropanoides, los mecanismos predominantes que incrementaron en las plántulas que evidenciaron un menor daño celular a nivel radicular causado por *F. solani*, fue el ácido salicílico, reportado como el principal inductor de SAR (Lim y col., 2020) cuya acumulación promueve la transcripción activa de las proteínas relacionadas a la patogénesis (Glazebrook, 2005; Loake y Grant, 2007). En nuestro estudio, la actividad quitinasa estuvo directamente correlacionada con una disminución en la incidencia de células de raíz dañadas a causa de *F. solani*, lo que sugiere que esta actividad es primordial en la defensa contra este patógeno en esta interacción. Este mismo comportamiento se evidenció en la confrontación de 72 h con *F. oxysporum*, pero la confrontación de solo 30 días con este patógeno, aun no evidenciaba un daño a nivel vascular del xilema, para poder sustentar la importancia de la expresión temprana de actividad quitinasa. Los resultados de actividades quitinasa en las

confrontaciones de ambos patógenos después de 30 días de confrontación, muestran un decremento muy evidente, lo que es coincidente con lo que Nguyen y col., (2013) reportan, al señalar una disminución notoria de dicha actividad a partir de los 7 días de inoculación en pepino con una cepa patogénica de *F. solani*.

Es bien sabido que las quitinasas pueden hidrolizar la quitina presente en las paredes celulares de los hongos (Sierra-Gómez y col., 2019; Hamid y col., 2013). En el año 2013, Barbosa y colaboradores demostraron que el incremento en la actividad quitinasa en cultivares resistentes de tomate, es un factor importante en su defensa contra *F. oxysporum* f. sp. *lycopercisi*, y también aparece sub-expresada en la interacción compatible entre tomate y el hongo necrotrófico *F. oxysporum* f. sp. *radicys-lycopercisi* (Manzo y col., 2016).

Aunque nuestro estudio muestra niveles de actividad peroxidasa elevados como respuesta de defensa en ambos fenotipos (S y R), el contenido fenólico encontrado únicamente en plántulas con menor daño celular a nivel radicular causado por *F. solani*, puede ser la diferencia en la importancia de dicha actividad, ya que como muchos autores lo reportan, el incremento en la actividad peroxidasa en interacciones planta-patógeno incompatibles, está asociada con la incorporación de compuestos fenólicos dentro de las paredes celulares, reduciendo así la susceptibilidad de las plantas a las enzimas degradadoras, ya que embonan monolignoles para formar lignina y actúan como barrera física (Pandey y col., 2017; Anjana y col., 2008; Bestwick y col., 1998; Mäder y Amberg-Fisher, 1982; Dzhevakhviya y Shcherbakova., 2007). La combinación en el incremento de compuestos fenólicos y la actividad peroxidasa, en plantas con evidencia de un daño mínimo o ausencia del mismo en sus células radiculares, sugiere que una de las rutas que pudieran estarse tomando en las plántulas de agave potencialmente resistentes para defenderse contra el patógeno *F. solani*, está mediada por la señalización de ácido salicílico, pero para confirmar esta hipótesis, son necesarios una serie de estudios adicionales. En el caso de la confrontación con la cepa patogénica SR8 de *F. oxysporum*, se muestra una evidente elevación de actividad peroxidasa en el tratamiento inoculado, frente a su control no inoculado en plántulas con potencial

resistencia, a diferencia de las susceptibles que se mantienen estadísticamente iguales que sus controles, sin embargo se mantiene como resultado interesante para contrarrestar con futuros estudios en donde se analice la patogenicidad final alcanzada por el patógeno.

El comportamiento de la actividad enzimática PAL se muestra contrario a lo esperado en las evaluaciones de plántulas confrontadas con ambos patógenos, ya que como se pudo observar, en el tiempo de confrontación de 72 h de duración, los controles no inoculados presentan mayor actividad estadística que sus tratamientos inoculados con cualquier cepa. Esta conducta, cambia en las confrontaciones con duración de 30 días, también para ambos patógenos, ya que todos los tratamientos se mantienen estadísticamente iguales. No existe una explicación clara del porque de la relación entre una actividad elevada de PAL, de actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa y de acumulación de ácido *trans*-cinámico presenciados en la confrontación de 72 h y el incremento en la incidencia del daño celular de las raíces confrontadas durante 30 días con *F. solani*. Sin embargo, aunque la actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa y la actividad PAL son seguidamente reportadas como actividades inducidas en interacciones planta-patógeno incompatibles, también existen varios estudios que demuestran que no siempre es el caso. Por ejemplo, estudios en cultivares susceptibles y resistentes de trigo contra *F. culmorum* (Duba y col., 2019; Motallebi y col., 2016) demostraron niveles menores en la actividad PAL en una línea resistente en comparación con la línea susceptible. En el caso de la confrontación de 30 días, se mantiene una igualdad estadística de actividad enzimática en todos los tratamientos para ambos patógenos. PAL proporciona precursores para lignina y para varios productos involucrados en la resistencia (fitoalexinas, SA, PRs y compuestos fenólicos); sin embargo, de acuerdo a lo expresado por Dixon y col., (2002) la acción individual de estos compuestos no necesariamente impartirá resistencia a la enfermedad.

De igual manera, la actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa puede estar sub-regulada en plantas resistentes (Kim y col., 2020) o se puede encontrar super-regulada en líneas susceptibles en comparación con las líneas resistentes (Mehrabi y col., 2016), por lo que

su acción no necesariamente es indicativo favorable para la resistencia, como lo que observamos en nuestro estudio con la cepa “G” de *F. solani*. Mientras que la confrontación con *F. oxysporum* se muestra estadísticamente igual entre plántulas controles y confrontadas en los dos tiempos de confrontación.

En el caso del ácido *t*-cinámico, al tratarse de una molécula intermediaria en la ruta de los fenilpropanoides, que puede ser convertida en una variedad de compuestos que incluyen al ácido salicílico y varios compuestos fenólicos como fitoalexinas, precursores de lignina y precursores de suberina (Dudareva y col., 2013; Shuab y col., 2016); es razonable considerar una correlación indirecta entre la concentración del ácido *t*-cinámico y la incidencia del daño celular de raíz causado por *F. solani* como lo encontrado en este estudio. Sin embargo, el hecho de encontrar valores más elevados en plantas control, podría explicarse con lo reportado por Guo y col., (2020) en donde demostraron que esta molécula incrementó significativamente la patogenicidad de *Fusarium oxysporum* promoviendo la marchitez en plántulas de haba. El comportamiento observado en las concentraciones de ácido *t*-cinámico en la confrontación con *F. oxysporum* es similar al encontrado con *F. solani*, y ambos patógenos, mantienen concentraciones estadísticamente iguales en plantas de todos los tratamientos y fenotipos después de 30 días de confrontación pero evidentemente superiores a las encontradas a las 72 h.

A pesar de la capacidad que tiene el marcador molecular AFLP para detectar diferencias genéticas entre individuos (Mueller y Wolfenbarger, 1999), como lo demostrado en este estudio sobre *Agave tequilana* Weber var. azul, empleando diferentes combinaciones de primers con 3 bases añadidas en sus extremos 3' para la amplificación selectiva, las 65 plantas madre seleccionadas con base en la evidencia fenotípica de resistencia y susceptibilidad a la marchitez del agave, no mostraron un agregado claro con este marcador dominante. La variabilidad en resistencia o tolerancia de una planta a las enfermedades es un factor difícil de explicar basándonos en la correlación con su distancia genética (Jiang y col., 2007) o por marcadores de punto simple (Jin y col., 1998) obtenidos por AFLP u otros marcadores moleculares, debido a que existen otros

rasgos fenotípicos o genéticos que se incluyen dentro del análisis completo de polimorfismo genético. A pesar de esto, los datos aquí presentados son una evidencia fuerte de que la diversidad genética previamente demostrada en *Agave tequilana* Weber var. azul, está en cierto sentido explicada por las diferencias en la manera en que las plantas de este cultivo responden a los patógenos a los que se enfrentan, y este criterio podría ser usado en futuros programas de mejoramiento para resistencia a enfermedades.

Los resultados de expresión de mecanismos de defensa evaluados en la confrontación con la cepa patogénica “SR8” de *F. oxysporum*, muestran comportamientos distintos con respecto a los evidenciados con *F. solani*.

## VIII. CONCLUSIONES

Empleando técnicas de reproducción de cultivo *in vitro*, fue posible la obtención de plántulas genéticamente iguales a las plantas madre seleccionadas en el campo con base en sus características fenotípicas de resistencia y susceptibilidad a la enfermedad de marchitez del agave.

A pesar de la opinión generalizada de la homogeneidad genética en el cultivo de *Agave tequilana* Weber var. azul asociada a una cotidiana reproducción asexual mediante hijuelos, se demuestra una vez más una clara variabilidad genética, evidenciada mediante el marcador molecular AFLP.

El marcador molecular AFLP, a pesar de ser eficaz en diferenciar genéticamente entre individuos, sin embargo, en este estudio no fue útil para asociar la diversidad genética encontrada en los grupos de plantas seleccionadas con su fenotipia de resistencia y susceptibilidad a la marchitez del agave en campo.

La diversidad genética evidenciada en *Agave tequilana* Weber var. azul, explica de manera indirecta, la expresión diferencial de ciertas moléculas y actividades enzimáticas

importantes dentro de los mecanismos de defensa de las plantas al ser confrontadas con sus patógenos.

Existe una fuerte correlación entre la expresión temprana de algunos de los principales mecanismos de defensa reportados en plantas como la acumulación de ácido shikímico, ácido salicílico y compuestos fenólicos totales y la expresión de actividad quitinasa con una disminución en el porcentaje de incidencia de daño celular en raíces de *Agave tequilana* Weber var. azul inoculadas con la cepa patogénica "G" de *Fusarium solani* evaluado en un tiempo de 30 días de confrontación.

A pesar de la importancia de la actividad enzimática fenilalaniamonioliasa en la ruta metabólica de los fenilpropanoides, no es un buen indicativo en la selección de individuos de *Agave tequilana* Weber var. azul con potencial capacidad de defensa ante el ataque de los fitopatógenos causantes de marchitez del agave.

De igual manera, al ser el ácido *trans*-cinámico una molécula intermediaria y no un producto dentro de la ruta de los fenilpropanoides, que sirve para la formación de una gran variedad de metabolitos secundarios, no se debe considerar como una característica viable de identificación de individuos con mejor capacidad de respuesta ante la confrontación con patógenos del agave.

Las pruebas de confrontación en laboratorio, proporcionan evidencias que podrían diferir con el comportamiento en pruebas de campo, pero aportan antecedentes valiosos que puedan servir como base para estudios futuros que contengan todos los elementos asociados a las condiciones naturales del cultivo.

Los patógenos, de acuerdo a sus mecanismos de acción, inducen la expresión de diferentes rutas en las plantas.

## X. LITERATURA CITADA

- Able, A. B., D. Guest, M. Sutherland. 2000. Hydrogen peroxide yields during the incompatible interaction of tobacco suspension cells inoculated with *Phytophthora nicotianae*. *Plant Physiol.* 124: 899-910.
- Anderson, A. J., K. A. Blee, K. Y. Yang. 2002. Commercialization of plant systemic defense activation: Theory, problems and successes. En: *Multigenic and Induced Systemic Resistance in Plants*. Tuzun, S., E. Bent (eds.) pp. 386-414.
- Anjana, G., K. R. Kini, H. S. Shetty, H. S. Prakash. 2008. Changes in peroxidase activity in sunflower during infection by necrotrophic pathogen *Alternaria helianthi*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 41(8): 586-596.
- Arizaga, S., E. Ezcurra. 1995. Insurance against reproductive failure in a semelparous plant: bulbil formation in *Agave macroacantha* flowering stalks. *Oecologia* 101: 329-334.
- Arizaga, S., E. Ezcurra. 2002. Propagation mechanisms in *Agave macroacantha* (Agavaceae), a tropical-arid land succulent rosette. *American Journal of Botany* 89(4): 632-641.
- Ávila-Miranda M. E. 2001. Enfermedades del agave y su manejo. En: *Manual Técnico para el establecimiento de Huertas Madre de Agave Azul*. Rendón, S. L. A., M. E. Ávila-Miranda, B. Rodríguez G., J. I. del Real L. (eds.) Prometeo. pp: 115-126.
- Ávila-Miranda M.E., J. G. López-Zazueta, C. Arias-Castro, M. A. Rodríguez-Mendiola, D. A. Guzmán de Peña, J. A. Vera-Nuñez, J. Peña-Cabriales. 2010 Vascular wilt caused by *Fusarium oxysporum* in agave (*Agave tequilana* Weber var. azul) *J.PACD* 12:166-180.
- Barbosa, M. C., T. Diego S., D. Oliveira J., C. M. Alves de A., M. L. R. B. da Silva, M. T. dos Santos C., M. Vanusa S. 2013. Evaluation of the Resistance and Differential Induction of Chitinases in Tomato in Response to Inoculation with *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. *Plant Pathol.* 1:3.
- Beckman, C. H. 1987. *The Nature of the Wilt Diseases of Plants*. St Paul MN. USA: APS Press.
- Beckman, C. H. 2000. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? *Physiological and Molecular Plant Pathology* 57: 101-110.
- Ben Khaled, S., J. Postma, S. Robotzek. 2015. A Moving view: subcellular trafficking processes in pattern recognition receptor-triggered plant immunity. *Annu Rev Phytopathol* 53:379–402.
- Bestwick, C. S., I. R. Brown, J. W. Mansfield. 1998. Localized changes in peroxidase activity accompany hydrogen peroxide generation during the development of a nonhost hypersensitive reaction in lettuce. *Plant Physiol* 118:1067–1078.

- Bohman, S., J. Staal, B. P. Thomma, M. Wang, C. Dixelius. 2004. Characterisation of an *Arabidopsis-Leptosphaeria maculans* pathosystem: resistance partially requires camalexin biosynthesis and is independent of salicylic acid, ethylene and jasmonic acid signaling. *Plant J.* 37: 9-20.
- Bolwell, P. G., P. Wojtaszek. 1997. Mechanism for the generation of reactive oxygen species in plant defense – a broad perspective. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 51: 347-366.
- Bolwell, P. G., L. V. Bindschedler, K. A. Blee, V. S. Butt, D. R. Davies, S. L. Gardner, C. Gerrish, F. Minibayeva. 2002. The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three component system. *J. Exp. Bot.* 53: 1367-1376.
- Campo, S., M. Carrascal, M. Coca, J. Abián, B. S. Segundo. 2004. The defense response of germinating maize embryos against fungal infection: a proteomics approach. *Proteomics* 4: 383-396.
- Cavallini, A., L. Natali, G. Cionini, I. Castorena-Sánchez. 1996. Cytophometric and biochemical analysis of DNA in pentaploid and diploid *Agave* species. *Genome* 29: 266-271.
- Dangl, J. L., R. A. Dietrich, M. H. Richberg. 1996. Death don't have no mercy: Cell death programs in plant-microbe interactions. *The plant cell* 8: 1793-1807.
- Delledonne, M., Y. Xia, C. Lamb. 1998. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 394: 585-588.
- Díaz-Martínez, M., A. Nava-Cedillo, J. A. Guzmán-López, R. Escobar-Guzmán, J. Simpson. 2012. Polymorphism and methylation patterns in *Agave tequilana* Weber var. 'Azul' plants propagated asexually by three different methods. *Plant Sci.* 185-186:321-330.
- Dixon, R. A., L. Achnine, P. Kota, C. J. Liu, M. S. Srinivasa R., L. Wang. 2002. The phenylpropanoid pathway and plant-defense – a genomics perspective. *Molecular Plant Pathology* 3(5): 371-390.
- Dobson, A., M. Crawley. 1994. Pathogens and the structure of plant communities. *Trends Ecol. Evol.* 9: 393-398.
- Duba, A., K. Goriewa-Duba, U. Wachowska, K. Glowacka, M. Wiwart. 2019. The associations between leaf morphology, phenylalanine ammonia lyase activity, reactive oxygen species, and *Fusarium* resistance in selected species of wheat with different ploidy levels. *Plants* 8: 360.
- Dudareva, N., A. Klempien, J. K. Muhlemann, I. Kaplan. 2013. Biosynthesis, function, and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytol* 198: 16-32.
- Dyakov, Y. T. 2007. Phenomenology of plant-parasite relations. En: *Comprehensive and Molecular Phytopathology*. Eds. Dyakov, Y. T., V. G. Dzhavakhiya, T. K. pp. 117-158.

- Dzhavakhiya, V. G., L. A. Shcherbakova. 2007. Creation of disease-resistant plants by gene engineering. En: Comprehensive and Molecular Phytopathology. Eds. Dyakov, Y. T., V. G. Dzhavakhiya, T. Korpela. pp 455.
- Epple, P., A. A. Mack, V. F. R. Morris, J. I. Dangl. 2003. Antagonistic control of oxidative stress-induced cell death in *Arabidopsis* by two related, plant-specific zinc finger proteins. *Plant Biology* 11: 6831-66836.
- Feys, B. J., J. E. Parker. 2000. Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. *Genes in plant resistance* 16(10): 449-455.
- Fucikovsky, Z. L. 2004. *Agave tequilana* Weber var. azul y sus principales problemas fitosanitarios. En: Avances de la investigación en agave tequilero. CRT A.C. Guadalajara, México. pp: 147-178.
- García-Mendoza, A., V. R. Galván. 1995. Riqueza de las familias Agavaceae y Nolinaceae en México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 56: 7-24.
- Gil-Vega, K., C. M. González, de la V.O. Martínez, J. Simpson, G. Vandermark. 2001. Analysis of genetic diversity in *Agave tequilana* var. Azul using RAPD markers. *Euphytica* 119:335-341.f
- Glazebrook, J. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43: 205-27.
- Gil-Vega, K., C. Díaz, A. Nava-Cedillo, J. Simpson. 2006. AFLP analysis of *Agave tequilana* varieties. *Plant Sci.* 170:904-909.
- Gómes, G. L. G. C., C. A. Carbonari, E. D. Velini, M. L. B. Trindade, J. R. M. Silva. 2015. Extraction and simultaneous determination of glyphosate, AMPA and compounds of the shikimic acid pathway in plants. *Planta Daninha* 33:295–304.
- Guo, Y., J. Lv, Q. Zhao, Y. Dong, K. Dong. 2020. Cinnamic Acid Increased by the Incidence of *Fusarium* Wilt by Increasing the Pathogenicity of *Fusarium oxysporum* and Reducing the Physiological and Biochemical Resistance of Faba Bean, which was Alleviated by Intercropping with Wheat. *Frontiers in Plant Science* doi: 10.3389/fpls.2020.608389.
- Haas, D., G. Défago. 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonas. *Nature Reviews Microbiology* 3: 307-19.
- Hamid, R., M. A. Khan, M. Ahmad, M. M. Ahmad, M. Z. Abdin, J. Musarrat, S. Javed. 2013. Chitinases: An update. *J Pharm Bioall Sci* 5: 21–29.
- Hiers, J. K., J. P. Evans. 1997. Effects of anthracnose on dog-wood mortality and forest composition of the Cumberland Plateau (USA). *Conserv. Biol.* 11: 1430-1435.
- Infante, D., G. González, L. Peraza-Echeverría, M. Keb-Llanes. 2003. Asexual genetic variability in *Agave fourcroydes*. *Plant Sci.* 164:223-230.
- Jin, H., L. L. Domier, F. L. Kolb, C. M. Brown. 1998. Identification of Quantitative Loci for Tolerance to Barley Yellow Dwarf Virus in Oat. *Phytopathology* 88: 410-415.
- Jiang, H., B. Liao, X. Ren, Y. Lei, E. Mace, T. Fu, J. H. Crouch. 2007. Comparative Assessment of Genetic Diversity of Peanut (*Arachis hypogaea* L.) Genotypes with

- Various Levels of Resistance to Bacterial Wilt Through SSR and AFLP Analyses. *J Genet. Genomics* 34: 544-554.
- Kim, S. Y., T. Bengtsson, N. Olsson, V. Hot, L. H. Zhu, I. Åhman. 2020. Mutations in two aphid-regulated  $\beta$ -1,3-glucanase genes by CRISPR/Cas9 do not increase barley resistance to *Rhopalosiphum padi* L. *Front Plant Sci* 11:1043. doi: 10.3389/fpls.2020.01043.
- Kloepper, J. W., C. M. Ryu. 2006. Bacterial Endophytes as Elicitors of Induced Systemic Resistance. En: *Soil Biology*. Schulz, B., C. Boyle, T. N. Sieber (eds.) pp. 33-35.
- Koç, E., A. S. Üstün. 2012. Phenylalanine ammonia lyase activity in stem of pepper (*Capsicum annum* L.) infected with *Phytophthora capsici* L. *GU J Sci* 25:307–312.
- Lawrence, C. B., N. P. Singh, J. S. Qiu, R. G. Gardner, S. Tuzun. 2000. Constitutive hydrolytic enzymes are associated with polygenic resistance of tomato to *Alternaria solani* and may function as an elicitor release mechanism. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 57: 211-20.
- Lim, H., K. Y. Kim, S. Kim. 1991. *Pseudomonas stutzeri* YPL-1 Genetic Transformation and Antifungal Mechanisms against *Fusarium solani*, an Agent of Plant Root Rot. *Applied and Environmental Microbiology* p. 510-516.
- Lim, G., H. Liu, K. Yu, R. Liu, M. B. Shine, J. Fernandez, T. Burch-Smith, J. K. Mobley, N. McLetchie, A. Kachroo, P. Kachroo. 2020. The plant cuticle regulates apoplastic transport of salicylic acid during systemic acquired resistance. *Sci. Adv.* 6:eaaz0478.
- Loake, G., M. Grant. 2007. Salicylic acid in plant defense-the players and protagonists. *Curr Opin Plant Biol* 10:466–472.
- Lugtenberg, B., F. Kamilova. 2009. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 63: 541-56.
- Mäder, M., V. Amberg-Fisher. 1982. Role of Peroxidase in Lignification of Tomato Cells. I. Oxidation of nicotinamide adenine nucleotide and formation of hydrogen peroxide by cell wall peroxidases. *Plant Physiol.* 70: 1128-1131.
- Manzo, D., F. Ferriello, G. Puopolo, A. Zoina, D. D'Esposito, L. Tardella, A. Ferrarini, R. M. Ercolano. 2016. *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* induces distinct transcriptome reprogramming in resistant and susceptible isogenic tomato lines. *BMC Plant Biol* 16:53. doi: 10.1186/s12870-016-0740-5.
- Matros, A., S. Amme, B. Ketting, G. H. Buck-Sorlin, U. Sonnewald, H. P. Mock. 2006. Growth at elevated CO<sub>2</sub> concentrations leads to modified profiles of secondary metabolites in tobacco cv SamsunNN and to increased resistance against infection with potato virus Y. *Plant Cell Environ* 29:126–137.
- Mauch, F., B. Mauch-Mani, T. Boller. 1988. Antifungal hydrolases in pea tissue. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase. *Plant Physiol.* 88: 936-42.

- Mauch-Mani, B., A. J. Slusarenko. 1996. Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica*. *Plant Cell* 8: 203-12.
- May, R. M., R. M. Anderson. 1983. Epidemiology and Genetics in the Coevolution of Parasites and Hosts. *Mathematical Genetics* 219: 281-313.
- McDowell, J. M., J. L. Dangl. 2000. Signal transduction in the plant immune response. *Trends Biochem. Sci.* 25: 79-82.
- Mehrabi, S., I. Åhman, L. M. V. Jonsson. 2016. The constitutive expression and induction of three  $\beta$ -1,3-glucanases by bird cherry-oat aphid in relation to aphid resistance in 15 barley breeding lines. *Arthropod Plant Interact* 10: 101–111.
- Michielse, C. B., M. Rep. 2009. Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Mol. Plant Pathol.* 10: 311-324.
- Minic, Z. 2008. Physiological roles of plant glycoside hydrolases. *Planta* 227: 723-740.
- Motallebi, P., V. Niknam, H. Ebrahimzadeh, M. Hashemi, S. T. Enferadi. 2016. Exogenous methyl jasmonate treatment induces defense response against *Fusarium culmorum* in wheat seedlings. *J Plant Growth Regul* 36: 71–82.
- Moura, H. F. N., I. M. Vasconcelos, C. E. A. Souza, F. D. A. Silva, F. B. M. B. Moreno, M. D. P. Lobo. 2014. Proteomics changes during the incompatible interaction between cowpea and *Colletotrichum gloeosporioides* (Pens.) Penz and Sacc. *Plant Sci.* 217-218: 158-175.
- Mueller, U. G., L. L. Wolfenbarger. 1999. AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends Ecol Evol* 14: 389-394.
- Murashige, T., F. Skoog. 1960. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15:473–497.
- Nguyen, D. M. C., D. J. Seo, H. B. Lee, I. S. Kim, Y. Kim, R. D. Park, W. J. Jung. 2013. Antifungal activity of gallic acid purified from *Terminalia nigrovenulosa* bark against *Fusarium solani*. *Microbial Pathogenesis* 56: 8-15.
- Okon, Y., I. Chet, Y. Henis. 1973. Effects of lactose, ethanol and cycloheximide on the translocation pattern of radioactive compounds and on sclerotium formation in *Sclerotium rolfsii*. *J Gen Microbiol* 74:251–258.
- Osorio, Z., M. A. D. Infante, S. Molina M. 2006. Estudio de la variabilidad genética asexual en *Agave cocui* Trelease mediante el uso de marcadores moleculares. *Bol. Nakari* 17(1):1-7.
- Palumbo, J. D., R. F. Sullivan, D. Y. Kobayashi. 2003. Molecular characterization and expression in *Escherichia coli* of three  $\beta$ -1,3-glucanase genes from *Lysobacter enzymogenes* strain N4-7. *Journal of bacteriology* 185: 4362-4370.
- Pan, S. Q., X. S. Ye, J. Kué. 1991. A technique for detection of chitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase, and protein patterns after a single separation using polyacrylamide gel electrophoresis or isoelectrofocusing. *Phytopathology* 81: 970-974.

- Pandey, V. P., M. Awashti, S. Singh, S. Tiwari, U. N. Dwivedi. 2017. A Comprehensive Review on Function and Application of Plant Peroxidases. *Biochem. Anal. Biochem.* 6: 308. doi: 10.4172/2161-1009.1000308.
- Ponstein, A. S., A. A. Bres-Vloemans, M. B. Sela-Buurlage, B. J. Cornelissen, L. S. Melchers. 1994. The “missing” class I PR-4 protein from tobacco exhibits antifungal activity. *J. Cell Biochem. Suppl.* 18A:90.
- Ramírez-Ramírez, M.J., N. A. Mancilla-Margalli, L. Meza-Álvarez, R. Turincio-Tadeo, D. Guzmán-de Peña, M. E. Ávila-Miranda. 2017. Epidemiology of fusarium agave wilt in *Agave tequilana* Weber var. azul. *Plant Protect Sci* 53: 144–152.
- Rausher, M. D. 1992. Evolutionary Perspectives in Insect Chemical Ecology. Eds. Roitberg, B. D. e Isman M. B. Chapman y Hall, New York. pp: 20-88.
- Rausher, M. D. 2001. Co-evolution and plant resistance to natural enemies. *Nature* 411: 857-864.
- Ravensdale, M., A. Nemri, P. H. Thrall, J. G. Ellis, P. N. Dodds. 2011. Co-evolutionary interactions between host resistance and pathogen effector genes in flax rust disease. *Molecular Plant Pathology* 12(1): 93-102.
- Reissig, J. L., J. L. Storminger, L. F. Leloir. 1955. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. *J Biol Chem* 217:959-966.
- Rep, M., H. L. Dekker, J. H. Vossen, A. D. de Boer, P. M. Houterman, D. Speijer, J. W. Back, C. G. de Koster, B. J. C. Cornelissen. 2002. Mass Spectrometric Identification of Isoforms of PR in Xylem Sap of Fungus-Infected Tomato. *Plant Physiology* 130: 904-917.
- Robert, M. L., J. L. Herrera, J. L. Chan, F. Contreras. 1992. Micropropagation of *Agave* spp. En: Bajaj, Y. P. S., ed. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 19. High-Tech and Micropropagation. Springer.
- Ryals, J. A., U. H. Neuenschwander, M. G. Willits, A. Molina, H. Y. Steiner, M. D. Hunt. 1996. Systemic Acquired Resistance. *The Plant Cell* 8: 1809-1819.
- Sánchez-Vallet, A., J. R. Mesters, B. P. H. J. Thomma. 2014. The battle for chitin recognition in plant-microbe interactions. *FEMS Microbiol* 39:171–183.
- Santos-Sánchez, N. F., R. Salas-Coronado, B. Hernández-Carlos, C. Villanueva-Cañongo. 2019. Shikimic acid pathway in biosynthesis of phenolic compounds. In: Soto-Hernández M et al (eds) *Plant physiological aspects of phenolic compounds*. IntechOpen: London, pp 1–15.
- Seidl, V. 2008. Chitinases of filamentousfungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. *Fungal Biol. Rev.* 22: 36-42.
- Sharma, A. K., U. C. Bhattacharyya. 1962. A cytological study of the factors influencing evolution in *Agave*. *La Cellule* 62: 259-281.
- Sharma, N., K. P. Sharma, R. K. Gaur, V. K. Gupta. 2011. Role of chitinase in Plant Defense. *Asian J. Biochem* 6: 29-37.

- Shuab, R., R. Lone, K. K. Koul. 2016. Cinnamate and cinnamate derivatives in plants. *Acta Physiol Plant* 38:64.
- Sierra-Gómez, Y., A. Rodríguez-Hernández, P. Cano-Sánchez, H. Gómez-Velasco, A. Hernández-Santoyo, D. Siliqi, A. Rodríguez-Romero. 2019. A biophysical and structural study of two chitinases from *Agave tequilana* and their potential role as defense proteins. *FEBS J* 286: 4778–4796.
- Stevanato, R., S. Fabris, F. Momo. 2004. New enzymatic method for the determination of total phenolic content in tea and wine. *J Agric Food Chem* 52:6287–6293.
- Sticher, L., B. Mauch-Mani, J. P. Métraux. 1997. Systemic Acquired Resistance. Annual review of phytopathology 35: 235-70.
- Stintzi, A., T. Heitz, V. Prasad, S. Wiedmann-Merdinoglu, S. Kauffmann, P. Geoffroy, M. Legrand, B. Fritig. 1993. Plant 'pathogenic-related' proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie* 75: 687-706.
- Stukenbrock, E. H., T. Batillon. 2012. A Population Genomics Perspective on the Emergence and Adaptation of New Plant Pathogens in Agro-Ecosystems. *PLOS Pathogens* 8(9): 1-4.
- Summermatter, K., T. Birchier, L. Sticher, B. Mauch-Mani, M. Scheider, J. P. Métraux. 1996. Systemic Acquired Resistance in *Arabidopsis thaliana*. En: *Biology of Plant-Microbe Interactions*, ed. Stacey, G., B. Mollin, P. M. Gresshoff. pp: 27-32. St. Paul, MN: Int. Soc. Mol. Plant-Microbe Interact.
- Takken, F., M. Rep. 2010. The arms race between tomato and *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant Pathology* 11(2): 309-314.
- Ton, J., B. Mauch-Mani. 2004.  $\beta$ -Amino-butyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA-dependent priming for callose. *Plant J.* 38:119–130.
- Torres-Morán, M. I., I. Diógenes. J. J. Sánchez-González, M. M. Morales-Rivera, A. Santerre. 2005. Diversidad genética en *Agave tequilana* Weber var. Azul proveniente de micropropagación. *Bol. Nakari* 16:3.
- Tsukamoto, T., D. Koga, A. Ide, T. Ishibashi, M. Horino-Matsushige, K. Y. Agishita, T. Imoto. 1984. Purification and some properties of chitinases from Yam, *Discorea opposita* Thumb. *Agric. Biol. Chem.* 48(4): 931-939.
- Unger, Ch., S. Kleta, G. Jandi, A. Tiedemann. 2005. Suppression of the defense-related oxidative burst in bean leaf tissue and bean suspension cells by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *J. Phytopathol.* 153: 15-26.
- Valenzuela-Zapata, A. G. 2003. El Agave Tequilero: Cultivo e Industria de México. *Mundi-Prensa* 968—7462-33-7.
- Vallad G.E., R. M. Goodman. 2004. Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. *Crop Sci.* 44:1920-1934.
- Van der Does, H. C., M. Rep. 2007. Virulence genes and the evolution of host specificity in plant-pathogen fungi. *The American Phytopathological Society.* 20: 1175-1182.

- Van der Does, H. C., R. G. E. Duyvesteijn, P. M. Goltstein, C. C. N. van Schie, E. M. Manders, B. J. C. Cornelissen, M. Rep. 2008. Expression of effector gene *SIX1* of *Fusarium oxysporum* requires living in plant cells. *Fungal Genetics and Biology* 45: 1257-1264.
- Van Loon, L. C., E. A. Van Strien. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55: 85-97.
- Vance, C. P., T. K. Kirk, R. T. Sherwood. 1980. Lignification as a mechanism of disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 18: 259-88.
- Vargas, M. 1992. *Fusarium solani*: Agente causal del complejo pudrición del cogollo? *Revista Palmas* 13: 59-67.
- Verbene, M. C., N. Brouwer, F. Delbianco, H. J. M. Linthorst, J. F. Bol, R. Verpoorte. 2002 Method for the extraction of the volatile compound salicylic acid from tobacco leaf material. *Phytochem Anal* 13:45–50.
- Vidhyasekaran, P. 2004. *Concise Encyclopedia of Plant Pathology*. Food Products Press (eds) pp. 205, 275-278.
- Vidhyasekaran, P. 2008. Cell Wall Degradation and Fortification. En: *Fungal Pathogenesis in Plants and Crops*. Ed. CRC Press. pp. 275-320.
- Whittaker, P. H., P. P. Fenny. 1971. Allochemicals: chemical interactions between species. *Science* 171: 757-770.
- Zheng, Y., C. A. Wozniak. 1997. Adaptation of a  $\beta$ -1,3-Glucanase assay to microplate format. *BioTechniques* 22:922–926.
- Zipfel, C. 2014. Plant pattern-recognition receptors. *Trends Immunol* 35:345–351.
- Zvirin, T., R. Herman, Y. Brotman, Y. Denisov, E. Belausov, S. Freeman, R. Perl-Treves. 2010. Differential colonization and defence responses of resistant and susceptible melon lines by *Fusarium oxysporum* races 1.2. *Plant Pathology* 59: 576-585.