

Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

EFFECTO DE *Trichoderma* spp. PARA EL CONTROL DE LA MARCHITEZ (*Fusarium* spp.) DEL *Agave potatorum* Zucc.
TESIS QUE PRESENTA:

Alejandra Guadalupe Caravantes Pérez

Como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN PRODUCTIVIDAD EN AGROECOSISTEMAS

DIRECTOR:

Dr. Ernesto Castañeda Hidalgo

CODIRECTOR:

M. C. Verónica del Carmen Martínez Gallegos



Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

EFFECTO DE *Trichoderma* spp. PARA EL CONTROL DE LA MARCHITEZ (*Fusarium* spp.) DEL *Agave potatorum* Zucc.
TESIS QUE PRESENTA:

Alejandra Guadalupe Caravantes Pérez

Como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN PRODUCTIVIDAD EN AGROECOSISTEMAS

DIRECTOR:

Dr. Ernesto Castañeda Hidalgo

CODIRECTOR:

M. C. Verónica del Carmen Martínez Gallegos

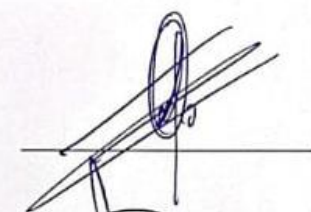


La presente tesis titulada: "**EFFECTO DE *Trichoderma* spp. PARA EL CONTROL DE LA MARCHITEZ (*Fusarium* spp.) DEL *Agave potatorum* Zucc.**", fue realizada bajo la dirección del consejo particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN PRODUCTIVIDAD EN AGROECOSISTEMAS

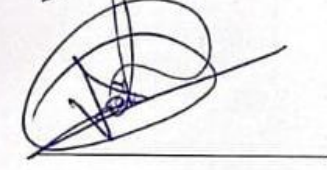
DIRECTOR:

Dr. ERNESTO CASTAÑEDA HIDALGO



CODIRECTORA:

M. C. VERÓNICA DEL CARMEN MARTÍNEZ GALLEGOS



ASESOR:

Ph. D. SALVADOR LOZANO TREJO



ASESOR:

Dr. CELERINO ROBLES PÉREZ



ASESOR:

Dr. MISAEL MARTÍNEZ BOLAÑOS



Ex-Hacienda de Nazareno, Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca.
Agosto de 2024.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Tecnológico de Oaxaca perteneciente al Tecnológico Nacional de México, por el apoyo para realizar la presente tesis.

Al Campo Experimental Rosario Izapa del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, el que hasta ahora he considerado mi segundo hogar, por cobijarme por tantos años y durante el desarrollo de esta investigación

Al Centro de Investigación Interdisciplinario para el Desarrollo Integral Regional del Instituto Politécnico Nacional y en específico al Laboratorio de Suelos por la asesoría y el espacio brindado para realizar la parte técnica de la investigación.

Al Instituto de Biociencias de la Universidad Autónoma de Chiapas, y en especial al equipo de trabajo del Laboratorio de Genética de Poblaciones.

A mi director de tesis el Dr. Ernesto Castañeda Hidalgo por su comprensión y apoyo incondicional durante mi transcurso en la maestría.

A quienes fungieron como mis asesores Dr. Misael Martínez Bolaños, Dr. Celerino Robles Pérez, M. C. Verónica Martínez Gallegos y Dr. Salvador Lozano Trejo por su guía y acompañamiento.

Al Dr. Leobardo Iracheta Donjuan y al M. C. Simitrio Ortiz Curiel por creer en mí.

A mis padres y hermanos por el apoyo, la comprensión y los consejos.

A mi hijo Ariel Zaid por la entereza y compañía, por ser mi cómplice de aventuras, gracias.

| | | |
|---|--|--------------------------|
|  | Nombre de la Información Documentada: | Código: ITVO-AC-PR-08-02 |
| | Formato Autorización del comité para entrega de tesis. | Revisión: 1 |
| | Referencia a la Norma ISO 9001:2015 8.2.1, 8.2.2, 8.2.3, 8.5.2 | Página 1 de 1 |

EXPEDIENTE: 20DIT0009G
 No. DE OFICIO: DEPI/0584/2024
 Nazareno, Xoxocotlán, Oaxaca: 13/Junio/2024
 ASUNTO: Autorización del comité para entrega de Tesis.

C. ALEJANDRA GUADALUPE CARAVANTES PÉREZ
ESTUDIANTE DEL PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS
EN PRODUCTIVIDAD EN AGROECOSISTEMAS
P R E S E N T E

Los que suscriben, miembros de su Comité Tutorial, le comunicamos que hemos revisado el contenido de su tesis "Efecto de *Trichoderma* spp. al control de la marchitez (*Fusarium* spp.) del *Agave potatorum* Zucc.". Por lo que con base en los lineamientos para la Operación de Estudios de Posgrado en el Tecnológico Nacional de México se le otorga la **AUTORIZACIÓN** para que proceda a la entrega del documento final de la misma en formato digital (PDF); para continuar con su trámite y asignarle la fecha de su examen de grado.

Sin más por el momento nos permitimos reconocer su esfuerzo y felicitarle por el logro de su documento de tesis.

ATENTAMENTE

*Excelencia en Educación Tecnológica
 Ciencia y Tecnología para el Campo*


ERNESTO CASTANEDA HIDALGO
DIRECTOR DE TESIS


VERÓNICA DEL CARMEN MARTÍNEZ
CO-DIRECTORA


SALVADOR LOZANO TREJO
ASESOR


CELERINO ROBLES PÉREZ
ASESOR


MISAEI MARTÍNEZ BOLAÑOS
ASESOR


YURI VILLEGAS APARICIO
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN



INSTITUTO TECNOLÓGICO DEL VALLE DE OAXACA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
 POSGRADO E INVESTIGACIÓN

C.p. Comité Tutorial.
 Expediente.
 YVA/mglh

ITVO-AC-PR-08-02

Toda copia en PAPEL es un "Documento No Controlado" a excepción del original

REV.1

| | | |
|---|--|---------------------------------|
|  | Nombre de la Información Documentada: Formato Autorización de DEPI para entrega de Tesis. | Código: ITVO-AC-PR-08-03 |
| | Referencia a la Norma ISO 9001:2015 8.2.1, 8.2.2, 8.2.3, 8.5.2 | Revisión: 1 |
| | | Página 1 de 1 |

EXPEDIENTE: 20DIT0009G
No. DE OFICIO: DEPI/0629/2024
Nazareno, Xoxocotlán, Oaxaca: 18/Junio/2024
ASUNTO: Autorización de entrega de Tesis.

C. ALEJANDRA GUADALUPE CARAVANTES PÉREZ
ESTUDIANTE DEL PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS
EN PRODUCTIVIDAD EN AGROECOSISTEMAS
P R E S E N T E

Con base en los Lineamientos para la Operación de Estudios de Posgrado en el Tecnológico Nacional de México, respecto a la presentación del examen de grado, me es muy grato comunicarle que esta División de Estudios de Posgrado e Investigación a mi cargo, **AUTORIZA** la entrega del documento final de su tesis en formato digital (PDF) titulada: "**Efecto de *Trichoderma* spp. al control de la marchitez (*Fusarium* spp.) del *Agave potatorum* Zucc.**".

Cuyo contenido ha sido revisado y aprobado por su Comité Tutorial y cumple en lo general con el formato establecido para este documento, como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias en Productividad de Agroecosistemas.

Sin más por el momento le felicito cordialmente por el logro de esta meta y le reitero el respaldo institucional de su Alma Mater.

ATENTAMENTE
Excelencia en Educación Tecnológica®
Ciencia y Tecnología para el Campo

DR. YURI VILLEGAS APARICIO
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN

 **EDUCACIÓN**
Superior de Oaxaca
INSTITUTO TECNOLÓGICO DEL VALLE DE OAXACA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN

C.p. Expediente.
 Alumno interesado.
 YVA/mglh

ITVO-AC-PR-08-03

Toda copia en PAPEL es un "Documento No Controlado" a excepción del original

REV.1

El presente trabajo se llevó a cabo con el apoyo del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT), a través del número de becario (1240438), con el tema de investigación: **EFECTO DE *Trichoderma* spp. PARA EL CONTROL DE LA MARCHITEZ (*Fusarium* spp.) DEL *Agave potatorum* Zucc.**

DEDICATORIA

Todo el esfuerzo y dedicación a esta tesis esta dedicada a las personas más importantes de mi vida:

A mi pequeño Alonzo Khalel, eres el pensamiento que mueve todo mi sentir. Este es un logro más que tu memoria inspiró.

A mi hijo Ariel Zahid, la inspiración de cada logro. Sin tú presencia nada de esto sería posible, impulsaste cada emoción que le dio sentido a tanto esfuerzo. En sentido de que algún día leas todo lo que tu existencia ha propiciado, esta tesis esta dedicada a ti.

A mi Momy, quien me ha acompañado desde mi primer respiro en este mundo y lo sigue haciendo. Otro logro más en el que participas de manera incondicional, nuevamente puedo decirte que ha valido la pena el esfuerzo y los sacrificios.

A mi hermanito, el primer impulsor para crecer. Es un placer compartir contigo cada idea y hacerte participe de este logro en el que has contribuido tanto.

A Martínez, tu acompañamiento y comprensión para lograr esta meta son intensamente valorados, tu amor me hace sentir que puedo tenerlo todo.

Amor mío: te quiero, te quiero...

ÍNDICE GENERAL

| | Página |
|--|------------|
| ÍNDICE DE CUADROS | iv |
| ÍNDICE DE FIGURAS | v |
| ÍNDICE DE ANEXOS | vii |
| RESUMEN | ix |
| ABSTRACT | x |
| | |
| CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 Objetivo general..... | 5 |
| 1.2 Objetivos específicos..... | 5 |
| | |
| CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO | 6 |
| 2.1 Descripción del género <i>Agave</i> | 6 |
| 2.1.1 Reproducción de los agaves..... | 7 |
| 2.1.2 <i>Agave potatorum</i> Zucc..... | 7 |
| 2.2 Enfermedades en el agave..... | 8 |
| 2.2.1 Infección por <i>Fusarium</i> en agaves..... | 9 |
| 2.2.2 Actividad de enzimas pectinasa durante la patogénesis..... | 10 |
| 2.3 Métodos de control de enfermedades del agave..... | 11 |
| 2.4 Control biológico con hongos del género <i>Trichoderma</i> | 11 |

| | |
|--|-----------|
| CAPÍTULO III. ETIOLOGÍA DE LA MARCHITEZ DEL MAGUEY TOBALÁ (<i>Agave potatorum</i> Zucc.) EN OAXACA, MÉXICO..... | 14 |
| Resumen..... | 15 |
| Abstract..... | 15 |
| 3.1 Introducción..... | 16 |
| 3.2 Materiales y métodos..... | 18 |
| 3.2.1 Sitio de muestreo..... | 18 |
| 3.2.2 Selección y colecta del material vegetal..... | 19 |
| 3.2.3 Desinfección de tejidos vegetales y establecimiento <i>in vitro</i> | 20 |
| 3.2.4 Caracterización morfológica y taxonómica de <i>Fusarium</i> spp..... | 20 |
| 3.2.5 Pruebas de patogenicidad de los aislamientos..... | 21 |
| 3.2.6 Producción de pectinasas en aislamientos de <i>Fusarium</i> spp..... | 23 |
| 3.2.7 Identificación molecular de aislamientos de <i>Fusarium</i> spp..... | 24 |
| 3.3 Resultados..... | 25 |
| 3.3.1 Caracterización morfológica y taxonómica de <i>Fusarium</i> spp..... | 26 |
| 3.3.2 Prueba de patogenicidad de los aislamientos..... | 28 |
| 3.3.3 Producción de pectinasas en aislamientos de <i>Fusarium</i> spp..... | 30 |
| 3.3.4 Identificación molecular de aislamientos de <i>Fusarium</i> sp..... | 30 |
| 3.4 Discusión..... | 31 |
| 3.5 Conclusiones..... | 34 |
| 3.6 Referencias..... | 34 |
| | |
| CAPÍTULO IV. <i>Trichoderma</i> NATIVA DE OAXACA AISLADAS DE MAGUEY TOBALÁ (<i>Agave potatorum</i> Zucc.)..... | 39 |
| Resumen..... | 40 |
| Abstract..... | 40 |
| 4.1 Introducción..... | 40 |
| 4.2 Materiales y métodos..... | 43 |
| 4.2.1 Sitio y método de muestreo..... | 43 |
| 4.2.2 Siembra de suelo y aislamiento de <i>Trichoderma</i> spp..... | 43 |
| 4.2.3 Aislamiento de <i>Trichoderma</i> spp. a partir de tejido..... | 44 |
| 4.2.4 Identificación molecular de <i>Trichoderma</i> spp..... | 45 |
| 4.2.5 Descripción morfométrica de <i>Trichoderma</i> sp..... | 45 |
| 4.2.6 Evaluación del tamaño, producción y germinación de esporas.. | 46 |
| 4.2.7 Caracterización enzimática de cepas de <i>Trichoderma</i> sp. con potencial para control biológico..... | 47 |
| 4.3 Resultados..... | 49 |
| 4.3.1 Identificación molecular de <i>Trichoderma</i> spp..... | 49 |
| 4.3.2 Descripción morfométrica de <i>Trichoderma</i> sp..... | 50 |
| 4.3.3 Evaluación del tamaño, producción y germinación de esporas.. | 53 |
| 4.3.4 Caracterización enzimática de cepas de <i>Trichoderma</i> sp. con potencial para control biológico..... | 53 |
| 4.4 Discusión..... | 54 |
| 4.5 Conclusiones..... | 57 |
| 4.6 Literatura citada..... | 57 |

| | |
|--|---------------|
| CAPÍTULO V. BIOCONTROL <i>in vitro</i> DE <i>Trichoderma</i> NATIVA A LA MARCHITEZ DEL <i>Agave potatorum</i> Zucc..... | 63 |
| Resumen..... | 64 |
| Abstract..... | 64 |
| 5.1 Introducción..... | 64 |
| 5.2 Materiales y métodos..... | 67 |
| 5.2.1 Aislamiento del patógeno..... | 67 |
| 5.2.2 Selección de las cepas antagonistas..... | 68 |
| 5.2.3 Velocidad de invasión y producción de pectinasa por <i>F. solani</i> .. | 68 |
| 5.2.4 Producción de exoglucanasa por cepas de <i>Trichoderma</i> spp... | 69 |
| 5.2.5 Enfrentamientos duales <i>in vitro</i> de cepas de <i>Trichoderma</i> spp. contra <i>F. solani</i> | 69 |
| 5.2.6 Actividad micoparasítica de <i>Trichoderma</i> spp. a <i>F. solani</i> | 70 |
| 5.3 Resultados..... | 70 |
| 5.3.1 Velocidad de invasión y producción de pectinasa por <i>F. solani</i> .. | 70 |
| 5.3.2 Producción de exoglucanasa por cepas de <i>Trichoderma</i> spp... | 71 |
| 5.3.3 Enfrentamientos duales <i>in vitro</i> de cepas de <i>Trichoderma</i> spp. contra <i>F. solani</i> | 71 |
| 5.3.4 Actividad micoparasítica de <i>Trichoderma</i> spp. a <i>F. solani</i> | 73 |
| 5.4 Discusión..... | 74 |
| 5.5 Conclusiones..... | 76 |
| 5.6 Literatura citada..... | 77 |
| CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES GENERALES..... | 83 |
| CAPÍTULO VII RECOMENDACIONES..... | 85 |
| CAPÍTULO VIII. BIBLIOGRAFÍA GENERAL..... | 86 |
| CAPÍTULO IX. ANEXOS..... | 95 |
| 9.1 Anexo 1. Cuadros..... | 95 |

ÍNDICE DE CUADROS

| Cuadro/Tabla | | Página |
|--------------|--|--------|
| 3.1 | Tamaño de conidios de <i>Fusarium</i> sp. aislados de <i>A. potatorum</i> con marchitez. | 27 |
| 3.2 | Identificación molecular de aislamientos de <i>Fusarium</i> causante de marchitez del agave. | 31 |
| 4.1 | Crecimiento radial del micelio de <i>Trichoderma</i> spp. y velocidad de crecimiento. | 53 |
| 4.2 | Tamaño, producción y germinación de esporas de <i>Trichoderma</i> spp. aisladas de agave. | 53 |
| 4.3 | Cantidad de celulasa y quitinasa producida por <i>Trichoderma</i> spp. | 54 |
| 5.1 | Cantidad de exoglucanasa producida por <i>Trichoderma</i> spp. | 71 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| Figura | | Página |
|---------------|---|---------------|
| 3.1 | Características de plantas colectadas de <i>A. potatoorum</i> con síntomas de marchitez en Chichicapam, Oaxaca. A. Planta completa. B. Planta con corte longitudinal. | 19 |
| 3.2 | Hojas de <i>A. potatoorum</i> 126 d después del establecimiento de la prueba de patogenicidad. A. Hoja sin síntomas. B. Hoja con marchitez. | 28 |
| 3.3 | Relación entre el porcentaje de incidencia y el número de hojas marchitas de <i>A. potatoorum</i> inoculadas con <i>Fusarium</i> sp. | 30 |
| 4.1 | Morfología de aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp. de suelo y tejido de maguey tobalá (<i>A. potatoorum</i>). A. <i>T. asperellum</i> . B. <i>T. yunnanense</i> . C. <i>Trichoderma</i> spp. D. <i>T. lentiforme</i> . | 51 |

| | | |
|-----|---|----|
| 4.2 | Micrografías de conidióforos de <i>Trichoderma</i> spp. aislados A. <i>potatorum</i> . A. <i>T. asperellum</i> . B. <i>T. yunnanense</i> . C. <i>Trichoderma</i> spp. D. <i>T. lentiforme</i> . Barra= 20 μ m. | 52 |
| 5.1 | Enfrentamientos duales de <i>Trichoderma</i> spp. y <i>F. solani</i> . A. <i>T. asperellum</i> vs <i>F. solani</i> . B. <i>T. yunnanense</i> vs <i>F. solani</i> . C. <i>Trichoderma</i> sp. vs <i>F. solani</i> . D. <i>T. lentiforme</i> vs <i>F. solani</i> . E. <i>F. solani</i> . | 72 |
| 5.2 | Crecimiento micelial radial del patógeno solo y en presencia del antagonista. Cm= crecimiento micelial, Cml= crecimiento micelial libre, CmixTa= crecimiento micelial influenciado por <i>T. asperellum</i> , CmixTy= crecimiento micelial influenciado por <i>T. yunnanense</i> , CmixTs= crecimiento micelial influenciado por <i>Trichoderma</i> sp., CmixTI= crecimiento micelial influenciado por <i>T. lentiforme</i> . | 73 |
| 5.3 | Micoparasitismo de <i>Trichoderma</i> spp. a <i>F. solani</i> causante de la marchitez de <i>A. potatorum</i> . A. enrollamiento de hifas por <i>T. asperellum</i> . B. Lisis y granulación del citoplasma de <i>F. solani</i> por <i>T. yunnanense</i> . C. Penetración de hifa del patógeno por <i>Trichoderma</i> sp. y D. micoparasitismo por penetración de <i>T. lentiforme</i> a <i>F. solani</i> . | 74 |

ÍNDICE DE ANEXOS

| Cuadro | | Página |
|--------|--|--------|
| 9.1 | Frecuencia observada de la diversidad de aislamientos fúngicos obtenidos a partir de tejidos de <i>A. potato</i> . | 96 |
| 9.2 | Frecuencia de aislamientos con morfología similar a <i>Fusarium</i> en tejido de raíz, piña y hoja de plantas de <i>A. potato</i> con marchitez. | 96 |
| 9.3 | Relación del color y forma del micelio de aislamientos de <i>Fusarium</i> spp. a los 15 días después de la siembra. | 97 |
| 9.4 | Indicadores de la marchitez de <i>A. potato</i> , evaluadas 126 días después de la infección. | 98 |
| 9.5 | Variables morfométricas de plantas de <i>A. potato</i> infectadas con <i>Fusarium</i> spp. a los 126 d. | 99 |

| | | |
|-----|--|-----|
| 9.6 | Biomasa seca de plantas de <i>A. potato</i> infectadas con <i>Fusarium</i> spp. | 100 |
| 9.7 | Correlación de variables evaluadas en las pruebas de patogenicidad de aislamientos de <i>Fusarium</i> spp. en <i>A. potato</i> . | 101 |
| 9.8 | Halo de degradación de la actividad pectinasa de <i>Fusarium</i> spp. aislados de agave tobalá. | 102 |
| 9.9 | Identificación taxonómica de aislamientos de <i>Fusarium</i> spp. | 103 |

RESUMEN

La marchitez del agave es una enfermedad que provoca daños en los tallos. Esta enfermedad inicia en las raíces y es difícil de diagnosticar en etapas tempranas de la infección, lo que representa pérdidas de plantas en etapa inicial. Además, la reproducción de especies que solo se propagan por semillas (*Agave potatorum* Zucc.) y su recalcitrancia dificulta la obtención de nuevos individuos. El uso de hongos del género *Trichoderma* pueden prevenir la infección por *Fusarium* spp; por lo que el objetivo de la investigación fue evaluar aislamientos de *Trichoderma* spp. nativos de las zonas productoras de maguey con potencial para el control de la marchitez ocasionada por *Fusarium* spp. en *A. potatorum*. En diciembre del 2022 se muestrearon plantas con edad de 18 meses y suelo en Chichicapam, Oaxaca. Se obtuvieron 26 aislamientos de *Fusarium* spp. en tejido con marchitez y cuatro de *Trichoderma* spp. de suelo y tejido vegetal. *T. asperellum*, *T. yunnanense*, *T. lentiforme* y *Trichoderma* spp. presentaron capacidad antagonista y micoparasítica contra *Fusarium* sp. Se identificó a *F. fujikoroj*, *F. solani* y *F. falciforme* como los causantes de la marchitez del *A. potatorum*. Esta investigación representa el primer reporte de infección por *F. falciforme* en raíces de agave y la primera vez que se identifica *T. lentiforme* para México.

Palabras clave: Antagonismo, nativo, patógenos, tobalá.

ABSTRACT

Agave wilt is a disease that causes damage to the stems. This disease begins in the roots and the diagnostic is difficult in the early stages of infection, those represents losses of plants in the initial stage. Also, the reproduction of species to propagates by seeds (*Agave potatorum* Zucc.) and their recalcitrance difficult to obtain new individuals. The use of fungi *Trichoderma* genus can prevent infection by *Fusarium* spp.; therefore, the research objective was to evaluate isolates of *Trichoderma* spp. native to maguey producing areas with potential to control wilt disease by *Fusarium* spp. in *A. potatorum*. In December 2022, 18-month-old plants and soil were collected in Chichicapam, Oaxaca. 26 isolates of *Fusarium* spp. were obtained in wilt tissue and four of *Trichoderma* spp. isolates of soil and plant tissue. *T. asperellum*, *T. yunnanense*, *T. lentiforme* and *Trichoderma* spp. presented antagonistic and mycoparasitic capacity against *Fusarium* sp. *F. fujikoroii*, *F. solani* and *F. falciforme* were the causal agent of *A. potatorum* wilt. This research presents the first report of *F. falciforme* infection in agave roots and the first time that *T. lentiforme* has been identified for Mexico.

Index words: Antagonism, native, pathogens, tobalá.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

En el Estado de Oaxaca, las especies de agave se localizan en 29 distritos con ecosistemas tipo selvas bajas caducifolias y bosque de pino-encino. Su importancia se debe a la abundancia de compuestos esteroidales en sus hojas y las altas concentraciones de fructosa en sus tallos maduros; que se utilizan para la extracción de fibras, como fuente de alimento, para forraje y en la construcción. Además, son materia prima para la obtención de aguamiel, tepache, pulque y mezcal (Palma, 1991).

En 2017, de acuerdo con la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), el agave incrementó su valor comercial en el período del 2012 a 2017, debido al interés por la producción del mezcal. Esta bebida se obtiene del destilado de diferentes especies de agave, siendo los más importantes el espadín (*Agave angustifolia* Haw.), tobalá (*Agave potatorum* Zucc.) y cuishe (*Agave karwinskii* Zucc.).

México posee la denominación de origen del mezcal y abarca los estados de Oaxaca, Durango, Guanajuato, Guerrero, San Luis Potosí, Zacatecas, Tamaulipas, Michoacán y Puebla. Para el 2023, según el Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal (COMERCAM), el volumen de producción anual incrementó 13.60% (12.24 M de L) con respecto al año anterior, siendo el Estado de Oaxaca el primer productor con 90.51% del volumen total. Más del 80% de la producción se obtiene de agave espadín y el segundo con mayor demanda es el tobalá (2.42%).

El agave tobalá (*A. potatorum*) crece en suelos arenosos planos o de poca pendiente, en un rango altitudinal de 1,300 a 2,400 m. El clima que les favorece es el árido y semiárido. Se distribuye desde el Valle de Tehuacán (Puebla) a Cuicatlán, la Sierra Mixteca y montañas de los Valles Centrales de Oaxaca (García-Mendoza, 2010). Su creciente demanda para la elaboración de mezcal se debe a sus propiedades organolépticas suaves.

La proliferación de individuos de *A. potatorum* se encuentra amenazada por la extracción de plantas de poblaciones naturales para elaborar mezcal; además de la baja capacidad de adaptación de nuevos individuos a las condiciones climáticas y la supervivencia a depredadores (Torres-García et al., 2013). Esta especie presenta semillas recalcitrantes (López, Martínez y Caballero, 2016), las cuales al almacenarlas durante largos períodos (29 meses) pierde hasta el 29% de viabilidad, debido al incremento de lípidos (Gutiérrez-Hernández et al., 2020).

La presión social por la demanda de mezcal, aumenta la vulnerabilidad natural de algunas especies de agave con la extracción de plantas silvestres y falta de manejo agronómico (Delgado-Lemus et al., 2014). Esto ha provocado cambios en el uso del suelo que se agravan con la práctica de sistemas de monocultivo y trae como consecuencia la disminución de los recursos naturales, pérdida de germoplasma, transformación del paisaje biocultural, afectación a polinizadores del maguey, etc. (Lucio, 2022). Según López et al. (2016) las especies de agave en estado silvestre que se están perdiendo son *A. potatorum*, *A. karwinski*, *A. americana* L., *A. rhodacantha* Trel. y *A. applanata* K. Koch.

La función de los agaves en los sistemas agroforestales es diversa. Sirven de delimitantes, son ornamentales, retienen suelo y humedad, atraen especies benéficas melíferas y nectarívora; previenen la erosión y contribuyen a la conservación de los agroecosistemas (Torres-García et al., 2019). Por lo que es importante promover su manejo integral con acciones concretas, como el manejo de semilleros, el incremento en la variabilidad genética; uso eficiente del agua, suelo y residuos; conjuntamente con el manejo de plagas y enfermedades por medio de prácticas que aseguren la sustentabilidad de los agroecosistemas (Lucio, 2022).

Con el incremento de la práctica de sistemas en monocultivo y la alteración del medio natural donde se desarrollan los agaves, la incidencia de enfermedades se incrementa. En la etapa inicial de crecimiento, las plantas de agave son susceptibles a la infección por hongos del género *Fusarium* que ocasionan

necrosis en la raíz y causan la marchitez de la piña. Las especies de hongos de los clados *Fusarium oxysporum*, *F. solani* y *F. fujikuroi* son las principales causantes de las enfermedades de marchitez y pudrición seca del cogollo en agave (Ávila-Miranda et al., 2012; Gómez-Ortiz et al., 2011; Trinidad-Cruz et al., 2017).

La fuente de inóculo principal de estos patógenos puede ser el sustrato, el agua de riego o dispersión en el ambiente por una fuente cercana. La infección por estos hongos ocasiona pérdidas de hasta el 30% de plantas en etapa de vivero, especialmente de *A. angustifolia* y *A. atrovirens* (Comisión Nacional Forestal [CONAFOR], 2008). De manera convencional se han aplicado fungicidas del grupo de los benzimidazoles para la prevención de estas enfermedades (Rubio, 2007), fungicidas residuales y tóxicos para el contacto humano.

Por otro lado, el control biológico de *Fusarium* sp. se ha logrado por medio de la aplicación de microorganismos benéficos como los hongos micorrízicos arbusculares y *Trichoderma* sp. (Ghazalibiglar, Kandula y Hampton, 2016; Sánchez et al., 2015; Trinidad-Cruz et al., 2017). Los hongos del género *Trichoderma* pueden encontrarse en diferentes ambientes debido a su rápido crecimiento y capacidad para producir metabolitos (Gams y Bisset, 2002). Además, parasitan las células de hongos patógenos y degradan la pared celular a través de su mecanismo enzimático (Romero-Cortes et al., 2016).

El éxito en el biocontrol ejercido por *Trichoderma* es dependiente del aislamiento y del estudio de la especificidad hacia el hospedante (Sánchez et al., 2018). Aplicar hongos *Trichoderma* durante la propagación de plantas en vivero, promueve el crecimiento y activa el sistema de resistencia que dificulta el ingreso de patógenos (Vinale et al., 2012), lo que hace a este género altamente competente para ser un controlador natural de enfermedades.

1.1 Objetivo general

Evaluar aislamientos de *Trichoderma* spp. nativos de las zonas productoras de maguey con potencial para el control de la marchitez ocasionada por *Fusarium* spp. en *A. potatorum*.

1.2 Objetivos específicos

1. Determinar la etiología de la marchitez en plantas de *A. potatorum* en Oaxaca, México.
2. Caracterizar la morfología, taxonomía y bioquímica enzimática de especies de *Trichoderma* sp. nativa de suelo y tejido de agave tobalá (*A. potatorum*).
3. Identificar el potencial de *Trichoderma* nativa para el biocontrol *in vitro* de la marchitez (*Fusarium* spp.) del *A. potatorum*.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Descripción del género *Agave*

Los agaves son originarios del Continente Americano, la distribución de ellos abarca del sur de Estados Unidos hasta Colombia y Venezuela, incluidas las islas del Caribe. Los países con mayor número de taxas en su territorio son México, Estados Unidos, Cuba y Guatemala (García-Mendoza, 2002).

Se describen como plantas angiospermas, monocotiledóneas y con metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM). Sus rosetas perennes están formadas por la estratégica disposición de las hojas, arreglo radial que les permite capturar el agua de la lluvia y transportarla directo a la parte basal del tallo. Su crecimiento y acumulación de reservas puede durar entre 8 a 30 años dependiendo de la especie (Palma, 1991). Los tallos de los agaves almacenan agua y posee gran cantidad de carbohidratos.

La evolución de estas plantas las ha llevado a especializar su mecanismo de defensa a la sequía, reduciendo la evapotranspiración, al reducir el tamaño de sus tallos hasta el nivel del suelo. Además, las espinas en la punta terminal y margen de la hoja, le confiere protección contra depredadores (Gentry, 1982).

2.1.1 Reproducción de los agaves

Las plantas de agave pueden ser monocárpicas o policárpicas. Las monocárpicas emiten el eje floral a partir del ápice de la roseta; mientras que, las especies policárpicas presentan sus escapos axilares a partir de hojas periféricas. Se propagan vía asexual o sexual. De la forma asexual se reproducen a partir del rizoma de la planta o por la formación de hijuelo a partir de las yemas axilares del escapo floral (Palma, 1991).

No todas las especies son capaces de reproducirse de manera clonal, por ejemplo, *A. potatorum* y *A. seemanniana*, especies que dependen de la reproducción sexual o por semilla, lo que incrementa la variabilidad genética de las poblaciones de agave (García-Mendoza et al., 2019). La relación entre el tipo de reproducción de los agaves y el nivel de ploidía que presentan no ha sido estudiado (Eguiarte, Souza y Silva-Montellano, 2000).

2.1.2 *Agave potatorum* Zucc.

A. potatorum fue descrito por Zuccarini en 1832. Pertenece al grupo *Hemiflorae* del subgénero *Agave* de la familia *Asparagaceae*. Esta especie se desarrolla mejor en sitios con poca pendiente con suelos arenosos y en climas de áridos a

semiáridos. Se encuentran entre la parte oriental de la cuenca del río Balsas pasando por el Valle de Tehuacán-Cuicatlán hasta pie de montaña de la sierra Mixteca y los Valles Centrales de Oaxaca. Su tamaño varía de 30-50 cm y 40-60 cm de diámetro. Esta especie de agave puede llegar a tener entre 30 a 60 hojas, florece a finales de agosto hasta noviembre y produce frutos en los meses de noviembre a marzo (García-Mendoza, 2010).

Se reproduce por vía sexual, lo cual genera alta variabilidad genética que se expresa en el tamaño, peso y capacidad germinativa de sus semillas (Ortiz-Hernández et al., 2018). Estas semillas no deben almacenarse por largos períodos debido a que son recalcitrantes (Gutiérrez-Hernández et al., 2020). Durante el proceso del mezcal, *A. potatorum* produce menor cantidad de ácido acético y etanol en piña cocida, lo que influye en el sabor del producto terminado (Vera, Santiago y López, 2009).

2.2 Enfermedades en el agave

Las enfermedades en el agave pueden ser provocadas por agente patógenos fúngicos o bacterianos. Las ocasionadas por hongos suelen presentarse en follaje, tallos y raíz a manera de pudriciones secas e inoloras. Mientras que, las enfermedades bacterianas generan pudriciones húmedas en cogollo y follaje (Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Guanajuato A.C. [CESAVEG], 2007).

En plantas de vivero se presenta la enfermedad conocida como *Damping-off* causada por los hongos del género *Pythium*, *Rhizoctonia* y *Fusarium*. El síntoma

es que la planta se dobla en la base poco después de la germinación o incluso no llega a emerger. La hifa de estos hongos penetra la raíz cuando apenas se está formando y destruye las paredes celulares (Beccari, Hao y Liu, 2022).

Los hongos del género *Fusarium* son los más dañinos y con mayor presencia en campo. Es posible encontrarlo en diferentes hospederos (Beccari et al., 2020; Sierra-Moya et al., 2022; Velarde-Félix et al., 2022). Se ha observado en *A. tequilana*, *A. atrovirens* y *A. angustifolia*. Las plantas se ven afectadas por diferentes especies de este hongo y causa más del 30% de pérdidas de plantas en etapa de vivero. La enfermedad es de rápida dispersión. Se favorece en suelos pesados, con poco drenaje, saturados de humedad y temperaturas altas (Comisión Nacional Forestal [CONAFOR], 2008).

2.2.1 Infección por *Fusarium* sp. en agaves

Se ha encontrado *Fusarium* en suelo y tallos de *A. tequilana* (Ávila-Miranda et al., 2012; Ramírez-Ramírez et al., 2017; Vega-Ramos, Uvalle-Bueno y Gómez-Leyva, 2013). La sintomatología descrita durante el proceso de infección abarca necrosis en raíces, enrollamiento de hojas, clorosis, necrosis de hojas y achaparramiento de plantas (Flores et al., 2016; Trinidad-Cruz et al., 2017).

Los síntomas de la marchitez del agave son causados por diferentes especies de *Fusarium* debido a la alta capacidad parasítica de este patógeno, se han identificado especies de los complejos *F. oxysporum*, *F. solani* y *F. fujikuroi*

(López-Bautista et al., 2020). La dificultad para reconocer plantas jóvenes infectadas es debido al avance lento de la sintomatología.

En el maguey mezcalero, *F. oxysporum* infecta a *A. cupreata* y *A. americana* e induce marchitez de la planta (Reyes-Zambrano et al., 2020; Trinidad-Cruz et al., 2017). Las raíces son penetradas por las hifas del hongo a los 15 d después de la inoculación y a los 30 d logra la ramificación del micelio e inicia la producción de microconidios los cuales contribuyen al taponamiento de los haces vasculares.

2.2.2 Actividad de enzimas pectinolíticas durante la patogénesis

El ingreso de *Fusarium* a la planta es mediado por mecanismos de reconocimiento, donde se liberan enzimas pectinolíticas que degradan compuestos de la pared vegetal (Kubicek, Starr y Glass, 2014). Las liasas han sido identificadas en medios de cultivo con pH alcalinos y las poligalacturonasas en pH ácidos.

La secreción de estos metabolitos por microorganismos se ve favorecido con altos niveles de fosfato, adición de extracto de levadura y una fuente de pectina (Hankin, Zucker y Sands, 1971). Para *Aspergillus niger* la producción de enzimas pectinasas fue optimizada al utilizar extracto de levadura como fuente de nitrógeno en comparación con urea, nitrato de amonio o peptona (Islam et al., 2013). Por otro lado, ya ha sido reportada la expresión de pectato liasa por *F. sacchari*, al igual que su participación en la degradación de pectina y virulencia (Huang et al., 2022).

2.3 Métodos de control de enfermedades del agave

Para el control de enfermedades del agave, se aplican métodos químicos y biológico. Los métodos químicos (benzimidazoles) resultan ser más eficientes para el control de enfermedades, pero generan consecuencias en el ambiente y ocasionan daños a la salud humana (Guzmán-Plazola et al., 2016; Hernández-Antonio y Hansen, 2011). Por su parte, el control biológico causa efectos menos dañinos al agroecosistema, comparado al uso de agroquímicos (Lucio, 2022).

El control biológico de *Fusarium* spp. se ha logrado mediante la aplicación de microorganismos benéficos como los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y *Trichoderma* sp. (García-Martínez, Sánchez-Mendoza y Bautista-Cruz, 2020; Ghazalibiglar et al., 2016; Sánchez et al., 2015). El uso de HMA en plantas de agave disminuye la severidad de la marchitez causada por *F. oxysporum* y promueve el crecimiento (Quiñones-Aguilar et al., 2023; Trinidad-Cruz et al., 2017).

Además, aplicar *Trichoderma* spp. y *Bacillus subtilis* como preventivo durante la propagación de *A. tequilana*, favorece la adaptación de las plantas en campo y mantiene bajas las poblaciones de *Fusarium* sp. en el sustrato (Tlapal et al., 2014).

2.4 Control biológico con hongos del género *Trichoderma*

Trichoderma es un hongo filamentoso de crecimiento micelar acelerado, produce esporas resistentes y crece mejor en suelos ácidos y a más de 17 °C. Este hongo

explora con sus hifas a las raíces de las plantas y las penetra, lo que activa el sistema de defensa de la planta y promueve el crecimiento aéreo y radicular. Al propiciar la elongación de raíces, *Trichoderma* facilita la asimilación de nutrientes. Por lo tanto, puede actuar como regulador del crecimiento vegetal o como elicitador para la resistencia a enfermedades (Vinale et al., 2012). Además, incrementa los porcentajes de germinación (Castillo et al., 2022) y es antagonista de varios hongos fitopatógenos como *F. oxysporum*, *F. solani*, *Rizhotocnia solani*, *Alternaria alternata* y *Colletotrichum gloeosporioides* (Savin-Molina et al., 2021).

Algunas cepas producen compuestos especializados llamados sideróforos que se une al hierro y lo hace inaccesible para hongos entomopatógenos; además, puede ejercer dos mecanismos de biocontrol contra patógenos: micoparasitismo y antibiosis (Kubicek y Harman, 2002). El tipo de metabolitos secundarios que producen, dependen de la cepa y pueden ser antibióticos volátiles, solubles en agua u oligopéptidos (Khan et al., 2020).

Trichoderma tienen la capacidad de producir enzimas degradadoras de pared celular como quitinasas y glucanasas (Michel-Aceves et al., 2005). Las quitinasas rompen enlaces glicosídicos, pertenecen al grupo de las hidrolasas. La mayoría de las hidrolasas actúan fuera de la célula. Dentro de esta clasificación se encuentra el subgrupo de las glicosidasas donde entran las glucanasas y proteasas (Dixon y Webb, 1979).

La producción de enzimas líticas depende de la fuente de carbono y caracteriza el potencial de biocontrol que posee cada especie de *Trichoderma*. Además, estudios en *T. reesei* demostraron que las condiciones fisicoquímicas y nutrimentales de crecimiento son fundamentales para la biosíntesis de celulasas (Kalsoom et al., 2019).

La adición de pared celular de *R. solani* incrementa la excreción de glucanasas por *T. asperellum* (Vargas-Hoyos y Gilchrist-Ramelli, 2015) y está demostrado que las celulasas producidas por *T. viride* tienen capacidad antibacteriana ante patógenos (Jatav et al., 2018).

CAPÍTULO III

ETIOLOGÍA DE LA MARCHITEZ DEL MAGUEY TOBALÁ (*Agave potatorum* Zucc.) EN OAXACA, MÉXICO

RESUMEN

El incremento en la demanda del mezcal ha provocado la domesticación de diversas especies silvestres de *Agave*, caso especial del maguey tobalá (*A. potatorum* Zucc.), con sus limitantes en el establecimiento de plantaciones comerciales en relación a la producción de plántulas y la presencia de enfermedades. Una de las principales enfermedades del agave es la marchitez que afecta principalmente raíces y tallo. *Fusarium* sp. se reporta como el principal agente causal de la marchitez en plantas de *A. tequilana*, *A. cupreata* y *A. americana*, pero no se conocen para *A. potatorum*, por lo que el objetivo de la investigación fue determinar la etiología de la marchitez en plantas de *A. potatorum*. Para efectuar la investigación se realizó un muestreo, en 2023, en Chichicapam, Oaxaca, de donde se obtuvieron 80 aislamientos fúngicos de plantas con síntomas de marchitez, de los cuales 26 correspondían a la morfología de *Fusarium* sp. Los aislamientos fueron caracterizados por morfología, taxonomía, patogenicidad y producción de pectinasa e identificados por biología molecular. Los 26 aislamientos fueron capaces de infectar e inducir la sintomatología de la marchitez en condiciones de invernadero al aplicarlos de manera independiente. Se identificaron tres especies: *F. fujikoroj*, *F. falciforme* y *F. solani* como los responsables de la marchitez en *A. potatorum*.

Palabras clave: patogenicidad, taxonomía, tejido vegetal.

ABSTRACT

The increase in demand for mezcal has caused the domestication of various wild species of *Agave*, the tobalá maguey (*A. potatorum* Zucc.) is a special case with limitations in the establishment of commercial plantations by the production of seedlings and diseases presence. The main disease is agave wilt, this affects roots and stem. *Fusarium* sp. is reported as the causal agent of wilt in *A. tequilana*, *A. cupreata* and *A. Americana* plants, but it is not known for *A. potatorum*, therefore, the research objective was to determine the etiology of wilt *A. potatorum* plants. To make the research, was done sampling in 2023 in Chichicapam, Oaxaca, 80 fungal isolates were obtained from plants with wilting symptoms, of which 26 corresponded to *Fusarium* sp. morphology. The isolates were characterized by morphology, taxonomy, pathogenicity and pectinase production and identified by molecular biology. The 26 isolates infected and induced wilt symptoms under greenhouse conditions when applied independently. Three species: *F. fujikoroj*, *F. falciforme* and *F. solani* were identified as responsible for the *A. potatorum* wilt.

Index words: pathogenicity, taxonomy, plant tissue.

3.1 INTRODUCCIÓN

Agave potatorum Zucc. es una planta perenne perteneciente a la familia Asparagaceae con forma de roseta compacta y crecimiento en solitario. Habita en climas áridos y semiáridos en altitud de 1,300 a 2,400 m (García, 2010). Por sus cualidades organolépticas suaves es empleada para elaborar mezcal. El mezcal es un destilado alcohólico, se considera bebida tradicional en México y es obtenida de la destilación del jugo fermentado del tallo de agave por procesos artesanales o tecnificados (Pérez et al., 2016).

Según la COMERCAM (2024), el volumen de producción anual incrementó 13.60% (12.24 M de L), siendo el Estado de Oaxaca el primer productor con 90.51% del volumen total, del cual las especies de agave más utilizadas son *A. angustifolia* Haw (81.08%), *A. durangensis* Gentry (1.17%), *A. salmiana* Otto ex Salm-Dyck (1.27%), y *A. potatorum* (2.42%).

Con el incremento de la demanda del mezcal, se implementó la domesticación de especies silvestres, caso del agave conocido localmente como tobalá (*A. potatorum*). Esta práctica propicia el establecimiento de plantaciones con fines comerciales en condiciones diferentes al estado silvestre; lo que enfrenta limitantes para la obtención de plántulas de esta especie debido a la baja frecuencia de reproducción asexual por hijuelos, la alta diversidad genética que presenta la progenie y la recalcitrancia en semillas por alto contenido lipídico (Aguirre DX y Eguiarte LE 2013; Ortiz et al., 2018; Gutiérrez et al., 2020).

Además, la presencia de enfermedades, que pone en riesgo la regeneración de plantas de agave en etapa de semilleros hasta su establecimiento en campo.

La marchitez del agave se ha reportado como la enfermedad con mayor incidencia en plantaciones de *A. tequilana* Weber var. Azul (Ávila et al., 2012; Ramírez et al. 2017). Los agentes patógenos causantes de esta enfermedad son hongos del género *Fusarium* y la variabilidad de la especie está relacionada con el origen y tipo de tejido de la planta del que han sido aislados (Vega et al. 2013).

Esta enfermedad toma relevancia en los últimos años debido a la complejidad para ser detectada en etapas iniciales del desarrollo de la planta. Ramírez et al. (2017) reportan que es posible tener plantas infectadas y asintomáticas del área foliar. Sin embargo, las raíces pueden estar colonizadas por el patógeno y dispersarse al resto de los órganos vegetales. Además, el estrés hídrico acentúa los síntomas de la marchitez (Gómez et al., 2011; Flores et al., 2016).

Existen estudios donde se aisló y secuenció el genoma de *Fusarium* sp. como agente patógeno del *A. tequilana* para registrar la diversidad de especies asociadas a este cultivo y la compatibilidad vegetativa que presentan (Ávila et al., 2012; Vega et al., 2013; López et al., 2020). La mayor cantidad de estudios se han dirigido a la presencia del patógeno en *A. tequilana*, pero Reyes et al. (2020) documentaron que *Fusarium* sp. es capaz de inducir marchitez en maguey mezcalero (*A. americana* L.).

Los síntomas de la marchitez en el agave se expresan como pudrición de raíces, clorosis en las hojas, deshidratación, enrollamiento de hojas y muerte de órganos de la planta e incluso de la planta completa. El avance de la enfermedad es lento, distintivo y con aumento gradual (Trinidad et al., 2017). En la fase inicial de la infección, participan enzimas pectinolíticas que actúan en la pared vegetal para facilitar el ingreso del patógeno (Kubicek et al., 2014). La capacidad del microorganismo para producir pectinasas puede ser detectado en medios de cultivo con alto contenido de fosfatos y presencia de extracto de levadura (Islam et al., 2013).

Conocer el ciclo de infección de las especies de *Fusarium* que infectan a las diferentes especies de agaves, permite detectar la enfermedad desde etapas tempranas, aplicar tratamientos preventivos, asegurar material vegetal sano para establecer plantaciones y seleccionar germoplasma tolerante o resistente al patógeno (Ávila et al., 2012). El objetivo de la investigación fue determinar la etiología de la marchitez en plantas de *A. potatorum* establecidas en Oaxaca, México.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Sitio de muestreo

Se seleccionó una plantación de *A. potatorum*, en el municipio de San Baltazar Chichicapam, Estado de Oaxaca; con ubicación geográfica en las coordenadas 96° 49' 88" LO y 16° 74' 94" LN con una altitud de 1525 m. Se seleccionó una

plantación de 18 meses de edad y densidad poblacional de 4,242 plantas ha⁻¹.

3.2.2 Selección y colecta del material vegetal

En la plantación se visualizaron plantas con síntomas de marchitez, estas se distinguieron por presentar coloración rojiza, corrugación en hojas, necrosis en hojas cercanas a la parte basal de la planta, raíces necróticas y en baja cantidad [Figura 3.1]. Se colectaron cinco plantas completas con síntomas de enfermedad por muestreo dirigido.

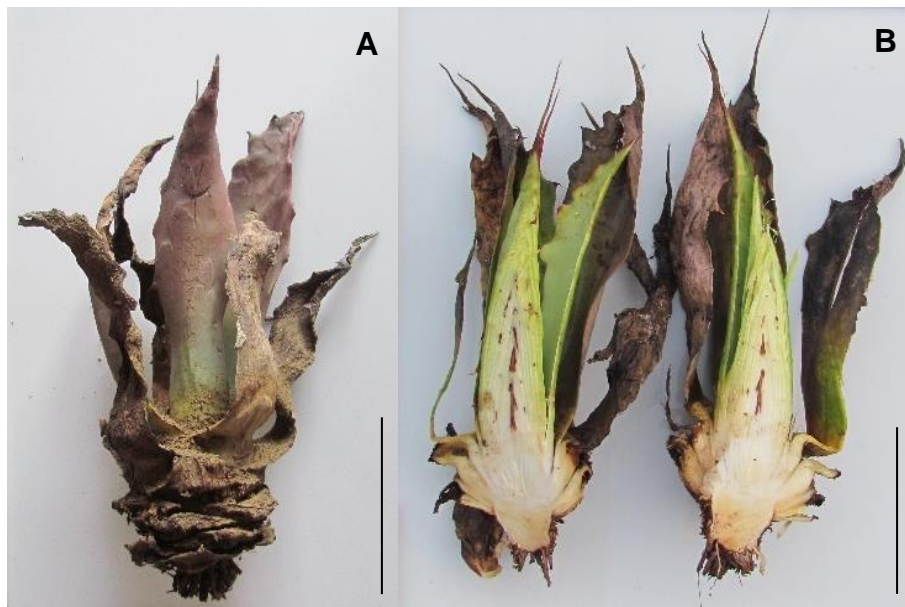


Figura 3.1. Características de plantas colectadas de *A. potatorum* con síntomas de marchitez en Chichicapam, Oaxaca. A. Planta completa. B. Planta con corte longitudinal. Barra = 10 cm.

Las muestras fueron trasladadas al Laboratorio de Fitopatología del Campo Experimental Rosario Izapa del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, donde fueron lavadas y se extrajeron segmentos de hoja, tallo y raíz.

3.2.3 Desinfección de tejidos vegetales y establecimiento *in vitro*

Los segmentos (hoja, tallo y raíz) fueron desinfectados con solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 1% durante 2 min, seguido de alcohol al 70% durante 1 min y se enjuagaron tres veces con agua destilada esterilizada. Después se colocaron en toallas de papel esterilizadas para retirar el exceso de humedad. Los fragmentos de tallo y hoja se redujeron a tamaño de 0.5 cm² y las raíces se cortaron a 0.5 cm de longitud.

Los explantes fueron sembrados en cajas de Petri (90 x 15 mm) con 12 mL de medio de cultivo Agar Dextrosa Papa (PDA Bioxon®) + 200 mg L⁻¹ de estreptomina + 50 mg L⁻¹ de cloranfenicol. En total se incubaron 100 explantes de tallo (0.5 cm² c/u), 100 explantes de hoja (0.5 cm² c/u) y 40 de raíces (0.5 cm longitud c/u). Las cajas se incubaron durante cinco días en condiciones de oscuridad y a 27 °C.

Al término del período de incubación, las colonias de hongos que crecieron se aislaron en medio de cultivo PDA y se seleccionaron aquellos aislamientos con morfología similar a *Fusarium* sp. Posterior a ello se realizó un análisis de frecuencia relativa y absoluta con la prueba de bondad de ajuste χ^2 ($\alpha=0.05$) para el crecimiento de colonias fúngicas en relación al tejido incubado.

3.2.4 Caracterización morfológica y taxonómica de *Fusarium* spp.

Una vez purificados los aislamientos, se procedió a obtener cultivos monospóricos de cada uno de ellos. Para la caracterización macroscópica se

establecieron cultivos monospóricos en medio de cultivo PDA y fueron incubados en oscuridad a temperatura ambiente. A los siete días, se registraron las variables forma del micelio (Fm), color del micelio (Cm) y velocidad de crecimiento (Vc).

La caracterización microscópica consistió en establecer microcultivos en discos de agua agar al 2% y PDA incubados durante quince días. Se evaluaron la forma y longitud de los macro y micro conidios, forma de fiálides y la presencia de clamidosporas.

La clasificación taxonómica de la especie se basó en la descripción propuesta por Leslie JF and Summerell LE (2006). Para todas las variables se verificaron los supuestos de normalidad por Shapiro-Wilk y homogeneidad de varianzas por Bartlett ($\alpha = 0.05$). El análisis de los caracteres morfológicos forma del micelio y color, se realizó con χ^2 ($\alpha = 0.05$) y para las variables velocidad de crecimiento y tamaño de conidios, se hizo por análisis de varianza con comparación de medias Tukey ($p \leq 0.05$) con el paquete estadístico SAS versión 9.4. La variable velocidad de crecimiento se transformó con $\text{Cos } x$.

3.2.5 Pruebas de patogenicidad de los aislamientos

Posterior a la caracterización taxonómica, los aislamientos fueron propagados en medio de cultivo PDA para obtener inóculo necesario y realizar las pruebas de patogenicidad en plántulas de agave en condición de invernadero. Para esto, se necesitaron plántulas de *A. potatorum* de cuatro meses de edad, en bolsas de vivero con sustrato cosmopeat® + Agrolita® (80-20) previamente esterilizado. A

las plántulas se les realizaron tres heridas (5 mm de profundidad) en la raíz y se inocularon con 20 mL de solución de esporas con concentración de 1×10^6 esporas mL^{-1} .

Cinco plántulas de agave fueron infectadas por cada uno de los aislamientos de *Fusarium* sp. En total fueron establecidos 28 tratamientos, de los cuales, 26 correspondieron a los aislamientos de *Fusarium* sp. más un tratamiento control que consistió en inocular un producto biológico comercial formulado con *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis* y el testigo sin inocular.

Se registraron datos cada catorce días durante 126 días. Las variables evaluadas fueron número de hojas (NH, cantidad), número de hojas con marchitez (NHM, cantidad), e incidencia (INC, porcentaje). Para determinar la incidencia se contabilizó el número de plántulas con síntomas de marchitez, tales como: deshidratación de tejido, necrosis u oxidación de las hojas con respecto al total de las plantas inoculadas y se obtuvo el porcentaje. Además, se calculó la tasa de emergencia de hojas (TEH, cantidad por mes), necrosis en raíz (NR, porcentaje), diámetro del tallo (DT, cm), longitud de raíz (LR, cm), biomasa seca del área foliar (BSA, g), biomasa seca del área radicular (BSR, g) y biomasa seca total (BT, g) a los 126 d después de la inoculación del patógeno.

Después de verificar los supuestos de normalidad por Shapiro-Wilk y homogeneidad de varianzas por Bartlett ($\alpha = 0.05$), las variables NHM, INC, TEH,

NR, DT y LR fueron transformadas con $\sqrt{x+1}$ y se procedió al análisis de varianza con comparación de medias por Duncan ($p \leq 0.05$) con el paquete estadístico SAS versión 9.4. Además, se calculó el coeficiente de correlación de Pearson para las variables evaluadas durante esta etapa.

Al término del tiempo de evaluación, segmentos de raíces fueron inoculadas en medio de cultivo PDA para comprobar la presencia del patógeno inoculado.

3.2.6 Producción de pectinasas en aislamientos de *Fusarium* spp.

Se determinó la producción de pectinasas para conocer el potencial que poseen los diferentes aislamientos para degradar compuestos de pared vegetal. La determinación de la enzima se realizó por el método descrito por Hankin et al. (1971) con modificación en el medio de cultivo. Un litro de medio fue formulado con 2 g de extracto de levadura, 10 g de pectina, 30 g de agar, 2 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 4 g de KH_2PO_4 , 6g de Na_2HPO_4 , 0.1 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 mg de CaCl_2 , 10 μg de H_3BO_3 , 70 μg de MnSO_4 , 50 μg de CuSO_4 y 10 μg de Na_2MoO_4 , se ajustó el pH a 7. El medio de cultivo fue esterilizado y vertido en cajas de Petri (90x60 mm).

Posteriormente, se inocularon discos de 5 mm de diámetro con crecimiento micelial (siete días en PDA) de 26 aislamientos fúngicos pertenecientes al género *Fusarium* sp. obtenidos de tejido vegetal de plantas de *A. potatorum*. Se sembraron cinco discos de cada aislamiento por caja de Petri, donde cada disco

correspondía a una repetición y se incubaron en oscuridad durante tres días a temperatura ambiente (26 ± 2 °C).

Cada 24 h se sacrificó una caja de Petri y se añadió solución de Lugol al 10%, se dejó reaccionar durante 5 min, se decantó la solución y se procedió a registrar la dimensión del halo de degradación (Hd, mm) por actividad pectinasa con apoyo de vernier digital. La enzima detectada corresponde a pectato liasa. Se verificaron los supuestos de normalidad por Shapiro-Wilk y homogeneidad de varianzas por Bartlett ($\alpha = 0.05$) y se realizó análisis de varianza con comparación de medias Tukey ($p \leq 0.05$) con el paquete estadístico SAS versión 9.4.

3.2.7 Identificación molecular de aislamientos de *Fusarium* sp.

Se realizó la identificación molecular de cinco aislamientos de *Fusarium* sp. seleccionados en función a los valores más altos de INC y NR. Los aislamientos seleccionados fueron SBCFs2, SBCFs10, SBCFs13, SBCFs18 y SBCFs49. Las muestras de micelio fueron trasladadas al Laboratorio de Biotecnología Ambiental y Agroecológica (LaBTAA) del Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR) Unidad Tapachula para la extracción de ADN con adaptaciones al método de Karthikeyan et al. (2010).

Para la obtención de productos PCR se utilizó 1 μ L de ADN y un volumen de reacción de 20 μ L. La secuencia de los marcadores ITS correspondían a ITS-4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) e ITS-5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) con ciclos de desnaturalización inicial 95 °C/5 min, 40 ciclos (desnaturalización

95 °C/1 min, alineamiento 55 °C/1 min, extensión 72 °C/1 min), seguido de una extensión final a 72 °C/5 min.

Para factor de elongación 1 α , se utilizaron los marcadores EF1-983F (GCYCCYGGHCAYCGTGAYTTYAT) y EF1-1567R (ACHGTRCCRATACCACCRATCTT) con desnaturalización inicial de 94 °C/3 min, a la que siguieron 35 ciclos (desnaturalización de 94 °C/30 s, alineamiento 62 °C/30 s, extensión 72 °C/1 min), finalizando con una extensión a 72 °C/10 min.

Los productos de PCR fueron purificados utilizando el DNA Clean and Concentrator™ Kit (Cat. No. D4033, Zymo Research, Orange, CA) y enviados a secuenciar a la empresa Macrogen Inc. en Corea del Sur. Las secuencias obtenidas se analizaron por algoritmos tipo BLAST de la base de datos del National Center of Biotechnology Information.

3.3 RESULTADOS

Se obtuvieron 80 aislamientos fúngicos provenientes de tejidos de *A. potatoorum* con marchitez; esto correspondió al 27% de segmentos establecidos *in vitro* ($\chi^2=22.78$, $p<0.0001$). De los aislamientos, 33 provenían del tallo, 29 de raíces y 18 de hojas. De los 80 aislados, 26 (32%) presentaron morfología similar al género *Fusarium* ($\chi^2=21.25$, $p<0.0001$). A partir de tejidos de raíz se obtuvieron 18 aislados (22%), 8 (10%) del tallo y en segmentos de hoja no se presentó este hongo.

3.3.1 Caracterización morfológica y taxonómica de *Fusarium* spp.

El 49% de los aislamientos con morfología de *Fusarium* presentaron micelio de color blanco y la forma de micelio que predominó fue ligeramente elevado (35%). El 23% del total de los aislamientos compartían estas características ($\chi^2=38.31$, $p=0.0322$).

La variable V_c presentó diferencia estadística significativa ($p<0.0001$), los aislamientos SBCFs2 y SBCFs13 tuvieron mayor V_c con 0.520 y 0.517 cm d^{-1} , respectivamente; y fueron significativamente distintos a los aislamientos SBCFs45 (0.433 cm d^{-1}), SBCFs49 (0.447 cm d^{-1}) y SBCFs50 (0.427 cm d^{-1}). Por otra parte, la variable longitud de conidios [Tabla 3.1], mostró diferencias significativas entre los aislamientos.

SBCFs4 tuvo los macroconidios de mayor longitud (65.75 μm) y SBCFs15 presentó la mayor longitud de microconidios (25.30 μm). En la caracterización microscópica se observó que los aislamientos SBCFs2 y SBCFs13 fueron los únicos en presentar polifiálides en la estructura del conidióforo; los otros 24 aislamientos presentaron monofiálides. Además, en los aislados SBCFs2, SBCFs7, SBCFs8, SBCFs9, SBCFs10, SBCFs14 y SBCFs46 no fue posible observar clamidosporas.

Tabla 3.1. Tamaño de conidios de *Fusarium* sp. aislados de *A. potatorum* con marchitez.

| <i>Fusarium</i> | Longitud macroconidios (µm) | Diámetro macroconidios (µm) | Longitud microconidios (µm) | Diámetro microconidios (µm) |
|-----------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| SBCFs1 | 56.19 ± 1.39 bcd† | 9.56 ± 0.28 cde | 20.81 ± 0.77 cdefg | 8.08 ± 0.26 abcdef |
| SBCFs2 | 51.72 ± 0.60 d | 8.49 ± 0.31 de | 17.54 ± 0.71 ghi | 6.29 ± 0.27 gh |
| SBCFs3 | 62.23 ± 1.75 ab | 10.21 ± 0.32 bc | 18.64 ± 0.49 efgh | 7.76 ± 0.13 cdefg |
| SBCFs4 | 65.75 ± 2.18 a | 10.22 ± 0.35 bc | 22.07 ± 1.01 abcde | 7.77 ± 0.15 cdefg |
| SBCFs5 | 58.50 ± 2.40 abcd | 10.49 ± 0.37 abc | 20.19 ± 0.57 cdefg | 8.60 ± 0.35 abcd |
| SBCFs6 | 62.26 ± 2.77 ab | 9.43 ± 0.32 cde | 20.57 ± 0.55 cdefg | 8.19 ± 0.25 abcdef |
| SBCFs7 | 64.44 ± 1.45 ab | 10.10 ± 0.24 bc | 22.10 ± 0.75 abcde | 8.26 ± 0.34 abcde |
| SBCFs8 | 63.92 ± 1.08 ab | 10.53 ± 0.36 abc | 21.85 ± 0.73 abcdef | 7.72 ± 0.28 defg |
| SBCFs9 | 56.20 ± 1.74 bcd | 9.40 ± 0.21 cde | 20.49 ± 0.74 cdefg | 7.86 ± 0.25 bcdef |
| SBCFs10 | 59.66 ± 2.52 abcd | 9.81 ± 0.33 cd | 24.08 ± 0.80 abc | 7.47 ± 0.29 defgh |
| SBCFs11 | 60.36 ± 2.18 abcd | 10.07 ± 0.17 bc | 21.75 ± 0.72 abcdef | 8.81 ± 0.43 abcd |
| SBCFs12 | 35.69 ± 0.32 e | 6.93 ± 0.05 e | 15.21 ± 0.82 hi | 6.64 ± 0.26 fgh |
| SBCFs13 | 39.30 ± 2.33 e | 8.41 ± 0.29 de | 14.50 ± 0.52 i | 5.98 ± 0.21 h |
| SBCFs14 | 61.71 ± 2.49 abc | 11.8 ± 0.21 a | 21.14 ± 0.82 bcdefg | 6.77 ± 0.22 efgh |
| SBCFs15 | 51.23 ± 1.79 de | 9.73 ± 0.29 cd | 25.30 ± 1.39 a | 8.62 ± 0.20 abcd |
| SBCFs16 | 55.51 ± 1.23 bcd | 9.80 ± 0.50 cd | 22.67 ± 0.51 abcd | 8.39 ± 0.21 abcde |
| SBCFs17 | 52.87 ± 1.60 cd | 9.76 ± 0.20 cd | 17.97 ± 0.72 fghi | 9.42 ± 0.25 ab |
| SBCFs18 | 61.34 ± 1.71 abc | 11.38 ± 0.29 ab | 18.44 ± 0.60 efghi | 9.32 ± 0.51 abc |
| SBCFs26 | 64.13 ± 0.61 ab | 10.59 ± 0.22 abc | 24.98 ± 0.89 ab | 9.59 ± 0.22 a |
| SBCFs31 | 58.09 ± 1.83 abcd | 10.04 ± 0.45 bc | 19.77 ± 0.69 defg | 8.56 ± 0.49 abcd |
| SBCFs45 | 56.67 ± 0.24 abcd | 9.94 ± 0.13 cd | 20.60 ± 0.49 cdefg | 7.50 ± 0.27 defgh |
| SBCFs46 | 59.59 ± 1.82 abcd | 9.51 ± 0.25 cde | 23.35 ± 1.14 abcd | 7.70 ± 0.40 defg |
| SBCFs47 | 57.09 ± 1.38 abcd | 9.80 ± 0.21 cd | 22.04 ± 0.69 abcde | 8.72 ± 0.31 abcd |
| SBCFs48 | 59.98 ± 1.58 abcd | 9.53 ± 0.26 cde | 15.44 ± 0.56 hi | 7.54 ± 0.24 defg |
| SBCFs49 | 55.33 ± 1.56 bcd | 9.67 ± 0.23 cd | 22.88 ± 0.56 abcd | 9.51 ± 0.27 a |
| SBCFs50 | 57.60 ± 1.62 abcd | 9.24 ± 0.28 cde | 21.73 ± 0.56 abcdef | 8.60 ± 0.33 abcd |
| C.V. | 9.46 | 9.3 | 11.52 | 11.66 |

†Letras diferentes por columna son significativamente distintas (Tukey≤0.05). C.V.= coeficiente de variación. SBCFs= aislamiento de *Fusarium* proveniente de agave de San Baltazar Chichicapam. µm= micrómetros.

3.3.2 Prueba de patogenicidad de los aislamientos

Las plantas de *A. potatorum* expresaron síntomas de la infección por el patógeno después de los 15 días de la inoculación y las formas en que se presentaron fueron las siguientes: necrosis en la hoja a partir de la espina terminal [Figura 3.2]; cambio de color de los dientes y clorosis en la lámina foliar.

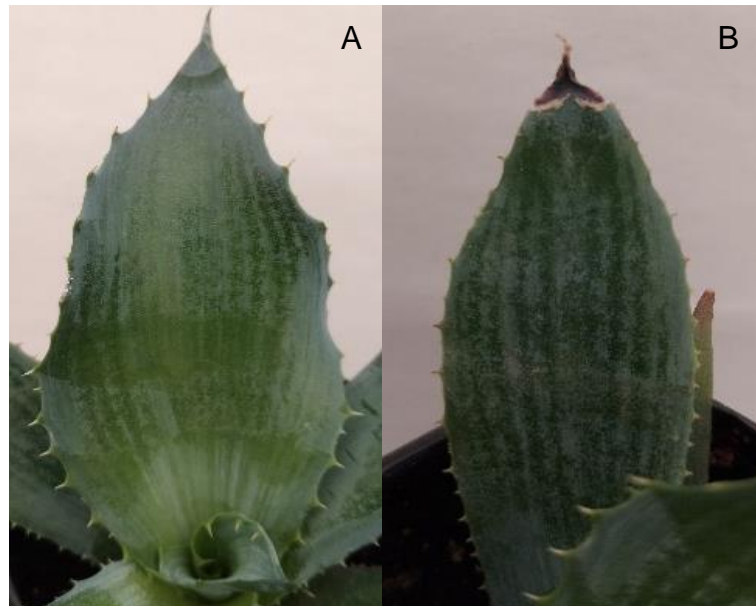


Figura 3.2. Hojas de *A. potatorum* 126 d después del establecimiento de la prueba de patogenicidad. A. Hoja sin síntomas. B. Hoja con marchitez.

A los 126 días después de la infección, las variables de estudio: TEH, NHM, INC, NR, LR, BSA, BSR y BST no presentaron diferencia estadística significativa, mientras que la variable DT sí presentó. La TEH varió de 0.83 a 1.27 hojas por mes, el NHM se presentó en rango de 2.75 a 4.50 hojas por planta y la LR fue variante de 8.13 a 23.76 cm.

Todos los aislamientos presentaron INC mayor al 50%, incluido el control (*T.h+B.s*) con 100% y el testigo sin inocular (75%). Sin embargo, a pesar de tener

el 100% de INC el tratamiento control sufrió menor NR (8.33%) en comparación al testigo (40%). Lo que demuestra efecto de la aplicación del tratamiento control como preventivo.

El valor más alto de NR fue de 50% en el aislamiento SBCFs10. La mayor dimensión de DT lo presentó el aislamiento SCBFs5 con 2.85 cm, contrario al aislamiento SBCFs10 que obtuvo el DT más pequeño con 1.58 cm en comparación con el tratamiento testigo (1.93 cm) y el control (1.72 cm).

La variable BSA presentó correlación positiva y altamente significativa con LRZ (0.38), mientras que BSR se correlacionó con las variables NHM (0.25), DT (0.46), LRS (-0.42) y BSA (-0.31). Por su parte BT está directamente relacionada con NHM (0.30), INC (0.29), BSA (-0.24) y BSR (0.44).

La variable TEH tuvo correlación con el NHM (0.22) y DT (0.27), la correlación más alta fue entre las variables NHM e INC (0.85), dato que establece que, el incremento de hojas marchitas es un buen predictor para la incidencia de la marchitez de *A. potatorum* [Figura 3.3]. Finalmente, se logró reaislar al mismo patógeno inoculado en las pruebas de patogenicidad.

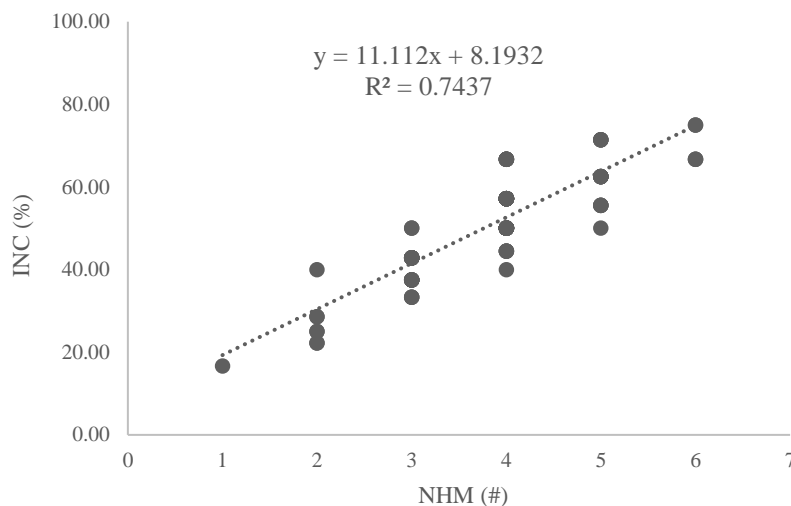


Figura 3.3. Relación entre el porcentaje de incidencia y el número de hojas marchitas de *A. potatorum* inoculadas con *Fusarium* sp.

3.3.3 Producción de pectinasas en aislamientos de *Fusarium* sp.

La actividad pectinasa presentó diferencias significativas entre los aislamientos durante el tiempo de evaluación. En las primeras 24 h el aislamiento SBCFs18 obtuvo mayor dimensión en cuanto al halo de degradación (3.12 mm) y SBCFs31 la dimensión menor (1.26 mm), a las 48 h SBCFs18 continuó siendo superior (7.56 mm) pero a este tiempo, el aislamiento SBCFs6 presentó menos halo de degradación (4.24 mm). A las 72 h el comportamiento fue diferente, donde el aislamiento SBCFs50 obtuvo el halo de degradación de mayor tamaño (10.96 mm) y SBCFs48 el de menor (5.88 mm).

3.3.4 Identificación molecular de aislamientos de *Fusarium* sp.

Se identificaron tres especies de *Fusarium* que inducen la marchitez en *A. potatorum*: *F. fujikoroii*, *F. solani* y *F. falciforme* el número de acceso por tipo de marcador se presenta en la tabla 3.2.

Tabla 3.2. Identificación molecular de aislamientos de *Fusarium* causante de marchitez del agave.

| Aislamiento | Marcador | Especie | No. Acceso GeneBank NCBI | Identidad (%) |
|-------------|---------------|----------------------|--------------------------|---------------|
| SBCFs2 | ITS | <i>F. fujikoroii</i> | NR_111889.1 | 93.26 |
| | EF1- α | <i>F. fujikoroii</i> | CP023094.1 | 97.30 |
| SBCFs10 | ITS | <i>F. solani</i> | NR_163531.1 | 97.77 |
| | EF1- α | <i>F. solani</i> | KU939012.1 | 99.78 |
| SBCFs13 | ITS | <i>F. falciforme</i> | NR_164424.1 | 99.81 |
| | EF1- α | <i>F. falciforme</i> | XM_053149760.1 | 99.57 |
| SBCFs18 | ITS | <i>F. falciforme</i> | NR_164424.1 | 99.81 |
| | EF1- α | <i>F. falciforme</i> | XM_053149760.1 | 99.78 |
| SBCFs49 | ITS | <i>F. solani</i> | NR_163531.1 | 97.90 |
| | EF1- α | <i>F. solani</i> | MH087480.1 | 99.78 |

SBCFs= aislamiento de *Fusarium* proveniente de agave de San Baltazar Chichicapam, Oaxaca, México.

3.4 DISCUSIÓN

Los aislamientos de *Fusarium* sp. obtenidos de tejido de *A. potatorum* presentaron en mayor frecuencia micelio de color blanco. Al respecto, López et al. (2020) mencionan que el color blanco en el micelio es característico de *Fusarium* sp. obtenidos de tejido de raíz en comparación con los aislados de suelo que tienden al color morado en medio de cultivo Komada.

En este estudio, la infección por *Fusarium* en *A. potatorum* se presentó a los 15 días después de la inoculación, lo que concuerda con lo reportado por otros autores. En *A. americana*, Reyes et al. (2020) observaron hifas de *Fusarium* en el interior de las raíces a los 15 días después de la infección y micelio ramificado con producción de microconidios a los 30 días, mediante microscopía electrónica de barrido.

Mientras que, en *A. cupreata*, Trinidad et al. (2017) observaron marchitez de la planta, clorosis, enrollamiento y muerte de puntas de las hojas a partir de los 20 días después de la inoculación de *F. oxysporum*. También reportaron que el avance de los síntomas de la marchitez en hojas de agave bajo condiciones de invernadero, es lenta y diferencial, pero progresiva; lo que coincide con el comportamiento de la infección en esta investigación.

Por su parte, Flores et al. (2016) reportaron que la THE permite clasificar el nivel de riesgo por marchitez en condiciones de campo, donde la zona de riesgo baja requiere más de 100 días para enrollar una hoja; mientras que para la zona alta bastan 10 días. Además, mencionan que hay relación entre la THE y la edad del agave tequilero, donde a partir del cuarto año del cultivo la THE incrementa y alcanza su valor máximo hasta el séptimo año. Los aislamientos encontrados en esta investigación presentaron avance lento de la marchitez en hojas y 126 días posteriores a la infección, no se logró apreciar enrollamiento, pero sí se midió el NHM por planta.

Los 26 aislamientos obtenidos corroboran lo reportado por Ávila et al. (2012) sobre la compatibilidad vegetativa que poseen hongos del género *Fusarium* aislados del tallo de agave, independiente a la capacidad patogénica de cada uno de ellos. Sin embargo, en este estudio, todos los aislamientos obtenidos presentaron capacidad de infección, de manera independiente en plantas de *A. potatorum* con diferente INC, esto permite documentar la diversidad de especies asociadas a la marchitez del agave mezcalero en México.

Por otro lado, el dato mayor para NR fue de 50% en plantas con 126 d de infección; lo que coincide con lo reportado por Ramírez et al. (2017) en *A. tequilana* infectado por *F. solani*, expresando necrosis en el 56% de las raíces, pero en mayor tiempo de evaluación (240 d).

La diferencia en tamaño del halo de degradación de enzimas pectinasa por los diferentes aislamientos de *Fusarium*, representa la heterogeneidad de los aislamientos para excretar esta enzima. A menor cantidad de enzima pectinolítica producida, el hongo presenta menor virulencia (Kubicek et al., 2014). Islam et al. (2013), reportan en su estudio que la adición de 2 g de pectina al medio de cultivo optimiza la producción de pectinasas en comparación con concentraciones altas. Por su parte, Macías et al. (2016) encontraron mayor velocidad de invasión (0.035 mm h^{-1}) de *F. oxysporum* en medio de cultivo con 0.75 g L^{-1} de pectina. En esta investigación se observó la expresión de pectinasas con 10 g de pectina y la adición de extracto de levadura al medio de cultivo.

López et al. (2020) concluyen que *F. oxysporum* es la especie con mayor presencia parasítica en suelo y raíz de *A. tequilana*. De igual manera, mencionan a *F. falciforme* en suelos cultivados con este agave. El presente estudio reporta por primera vez el aislamiento de *F. falciforme* a partir de tejido de raíz en *A. potatorum* establecido en Valles Centrales Oaxaca, México.

3.5 CONCLUSIÓN

Se identificaron a *F. fujikoroii*, *F. solani* y *F. falciforme* como los agentes causales de la marchitez en *A. potatorum*. El género *Fusarium* representó el 32% de los aislamientos fúngicos totales con mayor proporción en raíces que en tallos y no se encontró en tejido de hojas. *F. fujikoroii* y *F. falciforme* presentaron los valores más altos de Vc. Además, se demostró la independencia de la infección por cada especie. Los síntomas de la marchitez en *A. potatorum* inician 15 días después de la infección y progresan de manera lenta. La significancia de DT está relacionada con BSR durante la infección por *Fusarium* y los aislamientos presentaron significancia en la producción de pectinasas. La aplicación del preventivo *T.h+B.s* disminuye NR pero no INC. Esta investigación reporta por primera vez la infección por *F. falciforme* en raíces de agave.

Agradecimientos al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca otorgada con No. de CVU 1240438.

3.6 REFERENCIAS

Aguirre DX and Eguiarte LE. 2013. Genetic diversity, conservation and sustainable use of wild *Agave cupreata* and *Agave potatorum* extracted for mezcal production in Mexico. Journal of Arid Environments. 90: 36-44.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaridenv.2012.10.018>

- Ávila MME, León CC, Peña CJJ, Rodríguez MMA, Mancilla MNA, González PF y Arias CC. 2012. Diversidad génica y grupos de compatibilidad vegetativa en *Fusarium oxysporum* causante de marchitez en agave (*Agave tequilana* Weber var. Azul). *Gayana Botánica*. 69: 40-48.
- COMERCAM. 2024. Informe estadístico 2023. https://comercam-dom.org.mx/wp-content/uploads/2024/04/PUBLICO_INFORME_2024.pdf.
- Flores LHE, Chávez DAA, Ruíz CJA, de la Mora OC y Rodríguez MVM. 2016. Efecto del cambio climático sobre las zonas de riesgo por marchitez en el *Agave tequilana* Weber variedad Azul en Jalisco. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 13: 2497-2510.
- García MAJ. 2010. Revisión taxonómica del complejo de *Agave potatorum* Zucc. (Agavaceae): nuevos taxa y neotipificación. *Acta Botánica Mexicana*. 91: 71-93. <https://doi.org/10.21829/abm91.2010.292>
- Gomez OP, Sánchez AA, Virgen CG, Carvajal CCR y Padrón CE. 2011. Incidencia y severidad de la marchitez del *Agave tequilana* Weber Var. Azul en la zona sur del Estado de Nayarit, México. *Revista Agraria Nueva Época*. 8(2): 21-25.
- Gutiérrez HGF, Ortiz HYD, Corzo RLJ y Aquino BT. 2020. Composición química y germinación de semillas de Tobalá (*Agave potatorum*). *Interciencia*. 45(5): 223-228. Disponible en línea: https://www.researchgate.net/publication/341883200_COMPOSICION_QUIMICA_Y_GERMINACION_DE_SEMILLAS_DE_TOBALA_Agave_potatorum.

- Hankin L, Zucker M and Sands DC. 1971. Improved solid médium for the detection and enumeration of pectolytic bacteria. *Applied microbiology*. pp. 205-209.
- Islam S, Feroza B, Alam AKMR and Begum S. 2013. Pectinase production by *Aspergillus niger* isolated from decomposed apple skin. *Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research*. 48: 25-32.
- Karthikeyan V, Patharajan S, Palani P, Spadaro D, Gullino ML and Garibaldi A. 2010. Modified simple protocol for efficient fungal DNA extraction highly suitable for PCR based molecular methods. *Global Journal of Molecular Sciences*. 5: 37-42.
- Kubicek CP, Starr TL and Glass TL. 2014. Plant cell wall-degrading enzymes and their secretion in plant-pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*. 52: 427-451. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-102313-045831>
- Leslie JF and Summerell BA. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. First edition. Blackwell Publishing. Iowa, USA. 388 pp. <https://doi.org/10.1002/9780470278376.fmatter>
- López BV, Mora AG, Gutiérrez EMA, Mendoza RC, Martínez BVI, Coria CJJ, Acevedo SG y Santana PB. 2020. Caracterización morfológica y molecular de *Fusarium* spp. asociados a la ocurrencia regional de marchitez y pudrición seca del cogollo en *Agave tequilana*. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 38. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1911-4>

- Macías CG, Veana F, Contreras EJC, Aguilar CN y Rodríguez HR. 2016. Cinética de crecimiento de *Fusarium oxysporum* cultivado en diferentes niveles de glucosa y pectina. *Investigación y Ciencia*. 67: 33-37.
- Ortiz HYD, Gutiérrez HGF, Corzo RLJ, García RE and Martínez TSH. 2018. Varietal and germinative characterization of *Agave potatorum* (Asparagaceae) seeds with different origins. *Botanical Sciences*. 96(4): 628-639. <https://doi.org/10.17129/botsci.1914>
- Pérez HE, Chávez PMC y González HJC. 2016. Revisión del agave y el mezcal. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 8: 148-164. <http://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v18n1.49552>
- Ramírez RMJ, Mancilla MNA, Meza AL, Turincio TR, Guzmán DPD y Ávila MME. 2017. Epidemiology of *Fusarium* agave wilt. *Plant Protection Science*. 53 (3): 144-152.
- Reyes ZSJ, Lecona GCA, Gutiérrez MFA, Santana BN, Islas FI, Tzec SM, Barredo PFA, Ruiz LN, Ávila MME. 2020. Microscopía electrónica de barrido y análisis enzimático en *Agave americana* durante la infección con *Fusarium oxysporum*. *Revista Mexicana de Fitopatología*. Publicación en línea. pp. 408-419.
- Trinidad CJR, Quiñones AEE, Rincón EG, López PL y Hernández CLV. 2017. Micorrización de *Agave cupreata*: biocontrol de *Fusarium oxysporum* y promoción del crecimiento vegetal. *Revista Mexicana de Fitopatología*. Publicación en línea. 19 p.
- Vega RKL, Uvalle BJX and Gómez LJF. 2013. Molecular variability among isolates of *Fusarium oxysporum* associated with root rot disease of *Agave*

tequilana. Biochemical Genetics. 51: 243-255.

<https://doi.org/10.1007/s10528-012-9559-4>

CAPÍTULO IV

***Trichoderma* NATIVA DE OAXACA AISLADAS DE MAGUEY TOBALÁ
(*Agave potatorum* Zucc.)**

RESUMEN

Los hongos del género *Trichoderma* se encuentran en diferentes hábitats. El interés de su estudio es por el potencial que presentan como agentes de control biológico y promotores del crecimiento vegetal. Aunque las condiciones favorables para su crecimiento son en áreas con humedad relativa superior al 70%, el hallazgo de estos hongos en zonas áridas demuestra la plasticidad de algunas especies nativas para adaptarse y la oportunidad de conocer los mecanismos de acción que desempeñan. El objetivo de la investigación fue caracterizar la morfología, taxonomía y bioquímica enzimática de especies de *Trichoderma* nativas de suelo y tejido de agave tobalá (*A. potatorum*). En el año 2023, se colectó suelo y plantas de *A. potatorum* en Chichicapam, Oaxaca. A partir de ello, se obtuvieron cuatro cepas de *Trichoderma*, las cuales fueron caracterizadas por morfología, taxonomía y producción de exoglucanasas y quitinasas. Las cepas presentaron significancia en los caracteres morfométricos, taxonómicos y enzimáticos. Se identificó a *T. asperellum*, *T. yunnanense* y *T. lentiforme* como hongos nativos que habitan el suelo y tejido de *A. potatorum*.

Palabras clave: Enzimas hidrolíticas, espora, morfología, suelo, tejido vegetal.

ABSTRACT

Fungi of genus *Trichoderma* are found in different habitats. The interest in their study is for potential as biological control agents and plant growth promoters that they presents. Although the favorable conditions for their growth are in relative humidity greater than 70%, the discovery of these fungi in arid zones exposes the plasticity of native species to adapt and the opportunity to learn about their mechanisms of action. The research objective was to characterize the morphology, taxonomy and enzymatic biochemistry of *Trichoderma* species native from soil and tissue of agave tobalá (*A. potatorum*). In 2023, soil and plants of *A. potatorum* were collected in Chichicapam, Oaxaca. From this, four *Trichoderma* strains were obtained and characterized by morphology, taxonomy and production of exoglucanases and chitinases. The strains presented significance in morphometric, taxonomic and enzymatic characters. *T. asperellum*, *T. yunnanense* and *T. lentiforme* were identified as native fungi of *A. potatorum* soil and tissue.

Index words: hidrolityc enzyme, espore, morphology, soil, plant tissue.

4.1 INTRODUCCIÓN

Los hongos del género *Trichoderma* se encuentran en suelos, madera y material vegetal en descomposición. Son de hábitat variable debido a la capacidad metabólica y competitiva que poseen sus especies (Gams y Bisset 2002).

Establecen relación simbiótica con las plantas, dicha interacción está directamente influenciada por la microbiota nativa, la especificidad y factores abióticos (Alfiky y Weisskopf 2021). Son de interés en la industria biotecnológica y en la agricultura por los diversos metabolitos que producen y por la adaptación a diferentes condiciones ambientales (Martínez *et al.* 2013).

La distinción de especies en razón a la morfología se le atribuye a Rifai (1969). Sin embargo, fue hasta Samuels (1996) que se tuvo visión completa de la biología de *Trichoderma* y el uso potencial de las enzimas que producen. Estas enzimas participan en el proceso de micoparasitismo y regulan el ingreso del antagonista al hospedante. Además, los metabolitos que sintetizan estos hongos pueden actuar como elicitores para promover el crecimiento vegetal e inducir resistencia sistémica (Khan *et al.* 2020). Su biosíntesis depende de la especie y se ve afectada por el pH, la presencia de micotoxinas o ácidos grasos que regulan la expresión de genes (Chóez-Guaranda *et al.* 2023).

Para identificar la diversidad de especies de *Trichoderma* se realiza caracterización morfológica y microscópica de aislamientos (Arrazate-Argueta *et al.* 2019). La morfología de este género es variable y el proceso de diferenciar las especies consiste en evaluar la textura del micelio, el color, la formación del halo central, el número de anillos concéntricos, el tipo de esporulación y la tasa de crecimiento. Además, se consideran estructuras microscópicas como clamidosporas, fiálides, disposición del conidióforo, forma y tamaño de esporas (Allende-Molar *et al.* 2022).

La capacidad de *Trichoderma* para promover el crecimiento vegetal se expresa en el incremento de la altura de planta, longitud de radícula y biomasa foliar (Gamboa-Villa *et al.* 2020; Sabando-Ávila *et al.* 2017). A su vez la aplicación preventiva de este hongo antagonista disminuye la presencia de enfermedades en los cultivos. Las enzimas que participan durante el antagonismo son celulasas y quitinasas. Modificar las condiciones del medio de cultivo como la temperatura y pH provoca diferencias significativas en la cantidad de quitinasa producida por *Trichoderma* (Mohiddin *et al.* 2021), y la cantidad de celulasa que produce *T. harzianum* varía dependiendo de la procedencia del aislamiento (Chaparro y Castillo, 2019).

Las condiciones para el establecimiento de *Trichoderma* son de los 25 a 30 °C con humedad superior al 70%, esto no ha sido limitante para encontrar alta diversidad genética en zonas áridas. La presencia de estos hongos en condiciones de poca humedad y temperaturas altas comprueba la plasticidad de algunas especies para colonizar suelos y raíces de diferentes especies vegetales (Savín-Molina *et al.* 2021, Cabral-Miramontes *et al.* 2022). Esto demuestra la capacidad de hacer cambios metabólicos y fisiológicos de origen evolutivo en nichos ecológicos específicos.

El estudio de *Trichoderma* nativa enfocado a la distinción de características deseables permite conocer la potencialidad de las cepas, su especificidad y pueden ser indicadores de salud ambiental (Sánchez-Hernández *et al.* 2018). Obtener aislamientos nativos incrementa la probabilidad de éxito para el

establecimiento de *Trichoderma* en el agroecosistema. Por tal motivo, el objetivo de la investigación fue caracterizar la morfología, taxonomía y bioquímica enzimática de especies de *Trichoderma* nativas de suelo y tejido de agave tobalá (*A. potatorum*).

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 Sitio y método de muestreo

Se seleccionó una plantación de *A. potatorum*, de 18 meses de edad, en la localidad de San Baltazar Chichicapam en la Región Valles Centrales de Oaxaca con ubicación geográfica en las coordenadas 96° 49' 88" LO y 16° 74' 94" LN con 1 525 m de altitud. Se muestreó suelo rizosférico y plantas con metodología cinco de oros propuesto por Moreira *et al.* (2012). Se colectaron submuestras de 10 g de suelo rizosférico para obtener una muestra compuesta con 50 g y plantas completas. Las muestras fueron trasladadas al Laboratorio de Fitopatología del Campo Experimental Rosario Izapa del INIFAP para ser procesadas. Se registraron algunos parámetros fisicoquímicos del suelo.

4.2.2 Siembra de suelo por método de diluciones y aislamiento de *Trichoderma* spp.

Una vez en condición de laboratorio la muestra de suelo compuesta se homogenizó y se tomaron 10 g de suelo rizosférico disuelto en 100 mL de agua destilada esterilizada. Se colocó en agitación durante un minuto. Posteriormente, se tomó una alícuota de 1 mL y se diluyó en 9 mL de agua destilada esterilizada,

se agitó durante 1 min. Este procedimiento se repitió cuatro veces para obtener diferentes diluciones.

Se inocularon 200 μL de la dilución 10^{-3} y 10^{-4} en cajas de Petri con 12 mL de medio de cultivo agar dextrosa papa (PDA) + 200 mg L^{-1} de estreptomicina + 50 mg L^{-1} de cloranfenicol y se incubaron durante cuatro días para la expresión de microorganismos. En seguida, se aislaron y purificaron en PDA las colonias de hongos con características del género *Trichoderma*: cepas con micelio de rápido crecimiento, blanco, esporulación verde (diferente tonalidad), formación de anillos y bordes regular.

4.2.3 Aislamiento de *Trichoderma* spp. a partir de tejido de *A. potatorum*

Se colectaron cinco plantas completas de agave tobalá (*A. potatorum*). Las muestras fueron lavadas y se extrajeron segmentos de tallo y raíz. Se realizó la desinfección de los tejidos con solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 1% durante dos minutos, seguido de alcohol al 70% durante un minuto y se enjuagaron tres veces con agua destilada esterilizada. Los fragmentos de tallo se redujeron a 0.5 cm^2 y las raíces se cortaron a 0.5 cm de longitud.

Los explantes fueron sembrados en caja de Petri (90 x 15 mm) con 12 mL de medio de cultivo (PDA) + 200 mg L^{-1} de estreptomicina + 50 mg L^{-1} de cloranfenicol. Las cajas se incubaron durante cinco días en condiciones de oscuridad y a 27°C . Las colonias de hongos con morfología similar *Trichoderma* spp. se aislaron y purificaron en medio de cultivo PDA.

4.2.4 Identificación molecular de *Trichoderma* spp.

Se realizó la identificación molecular de las cepas de *Trichoderma* spp. en el Laboratorio de Genética de Poblaciones en el Instituto de Biociencias de la Universidad Autónoma de Chiapas. La extracción de ADN se realizó con modificaciones al protocolo de Huanca *et al.* (2014).

La amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) consistió en un ciclo inicial de desnaturalización a 94 °C por 3 min, seguido de 30 ciclos (94 °C por 45 s, 56 °C por 30 s, 72 °C por 90 s) y extensión final a 72 °C durante 10 min. La purificación de los productos PCR se realizó con modificaciones al protocolo de Rochelle *et al.* (1995). La secuenciación de los productos se hizo en el Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Una vez obtenidas las secuencias se procedió al análisis por Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) en la base de datos del National Center of Biotechnology Information.

4.2.5 Descripción morfométrica de *Trichoderma* sp.

Para la caracterización morfológica de las cepas de *Trichoderma* spp. se evaluaron la textura del micelio (Tm, algodonoso o plano o filamentoso), el color de micelio (Cm, color), el color de micelio al reverso de la caja de Petri (Cr, color), número de anillos concéntricos (Nac, #) y color de las esporas (Ce, verde oscuro o verde esmeralda o verde limón).

Para las características microscópicas se establecieron microcultivos en discos con diámetro de 8 mm en medio de cultivo PDA y agua agar al 2 %; los cuales se incubaron por siete días en condiciones de oscuridad y temperatura ambiente. Después fueron observados al microscopio para apreciar estructuras de la hifa, conidióforos, clamidosporas y fiálides.

Para calcular la velocidad de crecimiento (V_c , cm d^{-1}) se sembraron discos con crecimiento micelial, con diámetro de 5 mm, en medio de cultivo PDA. Los discos fueron colocados al centro de la caja de Petri y se registró el crecimiento micelial radial (C_m , cm) cada 24 h hasta el llenado de la caja. La incubación fue en condiciones de oscuridad a temperatura ambiente ($27\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$).

El análisis de los datos de las variables T_m , N_{ac} , C_m , C_r y C_e fue descriptivo y para V_c se transformó la variable con $\sqrt{x + 1}$ para hacer un análisis de varianza con prueba de medias por Tukey ($\alpha=0.05$) con el paquete estadístico SAS for Windows versión 9.4.

4.2.6 Evaluación del tamaño, producción y germinación de esporas

El tamaño de las esporas fue registrado por micrografías con apoyo del programa Amscope[®], se midieron 20 esporas de cada aislamiento. Para ello se registró el diámetro meridional (D_m , μm), el diámetro ecuatorial (D_e , μm) y se calculó el diámetro promedio (D_p , μm). La producción de esporas (P_e , cel mL^{-1}) fue calculada a partir de una suspensión celular de los aislamientos de *Trichoderma*

sp. con siete días de incubación en medio de cultivo PDA. Se utilizó cámara de Neubauer para calcular el número de células por mL.

Posteriormente, se colocaron 50 μL en medio de cultivo PDA de una suspensión celular con concentración 1×10^6 cel mL^{-1} y se monitoreó la germinación de esporas (Ge, %) a las 24 h, la unidad experimental fueron 100 esporas. El análisis de los datos se realizó con el programa SAS for Windows versión 9.4. Se realizó análisis de varianza con prueba de medias por Tukey ($\alpha=0.01$) para Te y Tukey ($\alpha=0.05$) para Pe y Ge. Las variables Pe y Ge fueron transformadas con $\sqrt{x + 1}$.

4.2.7 Caracterización enzimática de cepas de *Trichoderma* sp. con potencial para control biológico

La determinación bioquímico enzimática se realizó en el Laboratorio de Suelos del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR-IPN) Unidad Oaxaca.

Cuantificación de exoglucanasas. Se utilizó medio de cultivo mínimo basal formulado por 2 g de KH_2PO_4 , 0.3 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 14 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y 2% de carboximetilcelulosa (CMC) por cada litro. Para obtener el extracto enzimático, se realizaron modificaciones a la metodología propuesta por Ng *et al.* (1977) y la determinación de azúcares fue por el método Nelson (1944) y Somoyi (1952), la curva patrón se realizó con diferentes concentraciones de glucosa.

En 10 mL de medio de cultivo se inocularon 100 μ L de suspensión celular de *Trichoderma* sp. con concentración de 1×10^8 cel mL⁻¹. Los tubos de ensaye con rosca (16x150) fueron incubados durante tres días sin agitación a 26°C y tres días más con agitación constante de 140 rpm.

Posterior a la incubación, se centrifugó el sustrato enzimático a 6 000 g por 30 min y se tomó 1 mL para reaccionar con 1 mL de CMC al 0.2%. Los tubos se dejaron reaccionar a 60°C por 30 min y al término del tiempo se tomó 1 mL de la reacción y se le adicionó 1 mL de solución Somoyi, se calentó a 100°C por 15 min. Enseguida, la digestión se detuvo en baño de hielo y se agregó 1 mL de solución Nelson. Los tubos reposaron 3 min y se agregaron 10 mL de agua destilada para proceder a medir la absorbancia en espectrofotómetro UV (Thermo Fisher Scientific type Genesys 20, modelo 4001/4, CA, E.U.A.) a 540 nm. Una unidad de actividad celulasa se definió como la cantidad de enzima que liberó 1 μ mol de glucosa por volumen de reacción por día.

Cuantificación de quitinasa. El sustrato enzimático fue obtenido según lo descrito por Mohiddin *et al.* (2021) con modificaciones. Se utilizó medio de cultivo mínimo basal con 0.1 g KH₂PO₄, 0.01 g MgSO₄·7H₂O, 3.0 g NaCl, 0.7 g (NH₄)₂SO₄, 0.05 g de extracto de levadura y como sustrato quitina al 0.01% (SIGMA-ALDRICH C3020) por cada litro de medio y se ajustó a pH 6. El medio de cultivo se inoculó con 100 μ L de suspensión celular de *Trichoderma* sp. con concentración de 1×10^6 cel mL⁻¹. La incubación se realizó en tubos de ensaye con rosca durante seis días a 26 °C y 140 rpm.

Posterior al tiempo de incubación, la solución enzimática se centrifugó a 6 000 g por 30 min y se tomaron 2 mL de la solución enzimática para reaccionar con 0.5 mL de quitina. La incubación duró 1h a 45 °C, la reacción se detuvo al adicionar 3 mL de ácido 5-dinitrosalicílico y se llevó a 100 °C durante 5 min. El producto se centrifugó a 6 000 g por 15 min y al sobrenadante se le midió la absorbancia en espectrofotómetro UV (Thermo Fisher Scientific type Genesys 20, modelo 4001/4, CA, E.U.A.) a 540 nm. La curva de calibración se realizó con N-acetilglucosamina (0 a 50 mM). Una unidad de actividad quitinasa se definió como la cantidad de enzima que liberó 1 mmol de N-acetilglucosamina/min.

4.3 RESULTADOS

Se obtuvieron cuatro aislamientos con morfología del género *Trichoderma* a partir de muestras de suelo y tejido de *A. potatoorum* establecido en Oaxaca, México. El suelo se muestreo a 39 °C, su textura era arenosa con pH medianamente alcalino (7.66) y fuertemente salino (0.13 dS).

4.3.1 Identificación molecular de *Trichoderma* spp.

El análisis BLAST del NCBI identificó a *T. lentiforme* en suelo de *A. potatoorum* con número de accesoión NR144868.1 y 99.54% de identidad. El aislamiento de tallo fue identificado como *T. yunnanense* con número de accesoión NR_134419.1 y 98.75% de identidad. Mientras que, en raíz se identificó a *T. asperellum* con

número de accesión NR130668.1 y 100% de identidad. No fue posible asemejar al otro aislamiento de suelo por lo que se identificó como *Trichoderma* sp.

4.3.2 Descripción morfométrica de *Trichoderma* sp.

Los cuatro aislamientos presentaron Cm blanco, con Cr amarillo y Tm algodonoso elevado (Figura 4.1). Se diferenciaron entre sí en el Nac que formaron y en el Ce. En *Trichoderma* sp. y *T. lentiforme* no se observaron anillos, *T. yunnanense* presentó un anillo y *T. asperellum* formó dos. Las esporas observadas eran esféricas. El color de las esporas de *T. asperellum* y *T. yunnanense* era verde oscuro, mientras que, *Trichoderma* sp. presentó esporas de color verde esmeralda y *T. lentiforme* en coloración verde limón. En todos los aislados fue posible observar clamidosporas. La forma del conidióforo y de las fiálides se presentan en la figura 4.2.

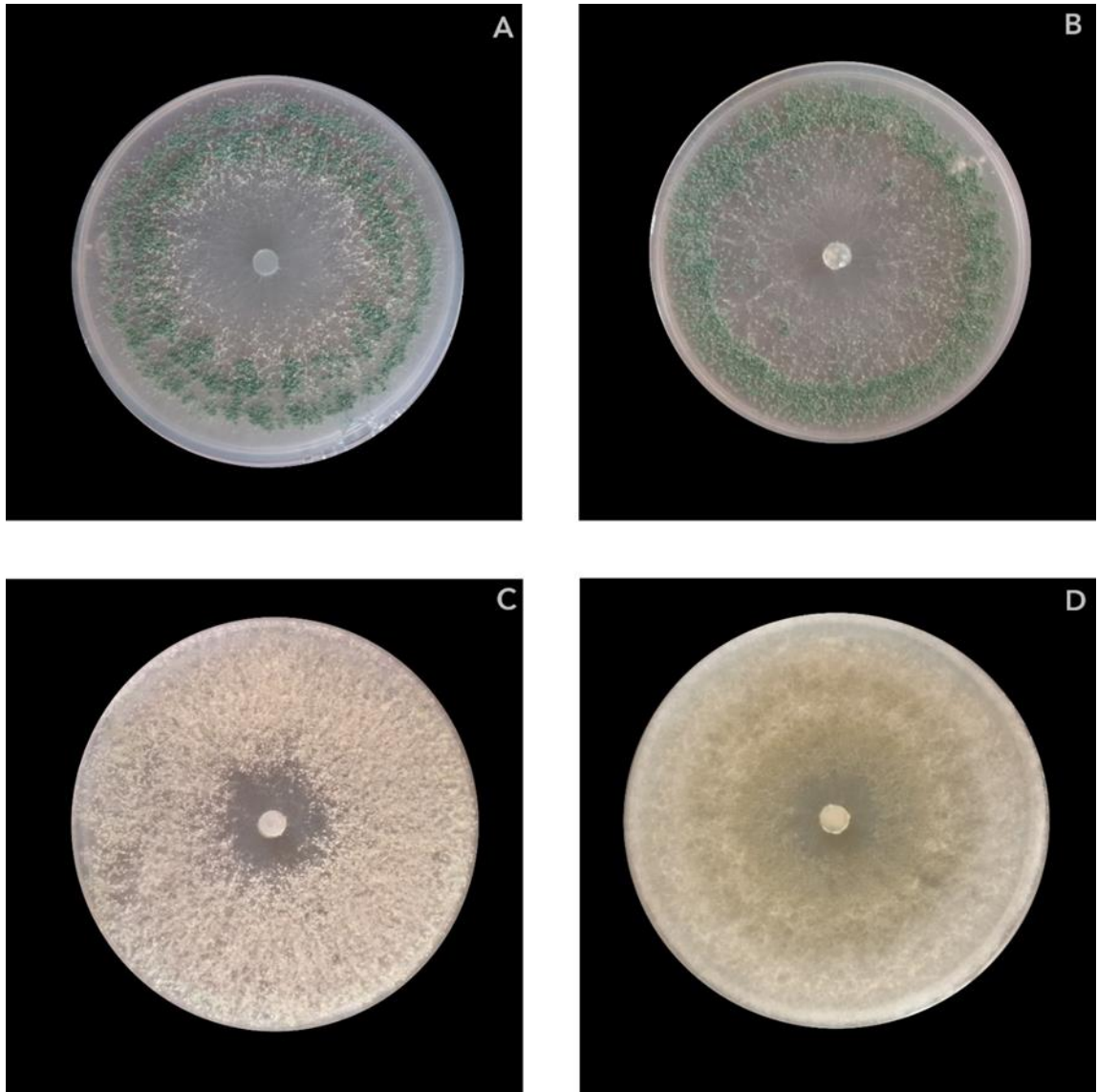


Figura 4.1. Morfología de aislamientos de *Trichoderma* spp. de suelo y tejido de maguey tobalá (*A. potatorum*). A. *T. asperellum*. B. *T. yunnanense*. C. *Trichoderma* spp. D. *T. lentiforme*.

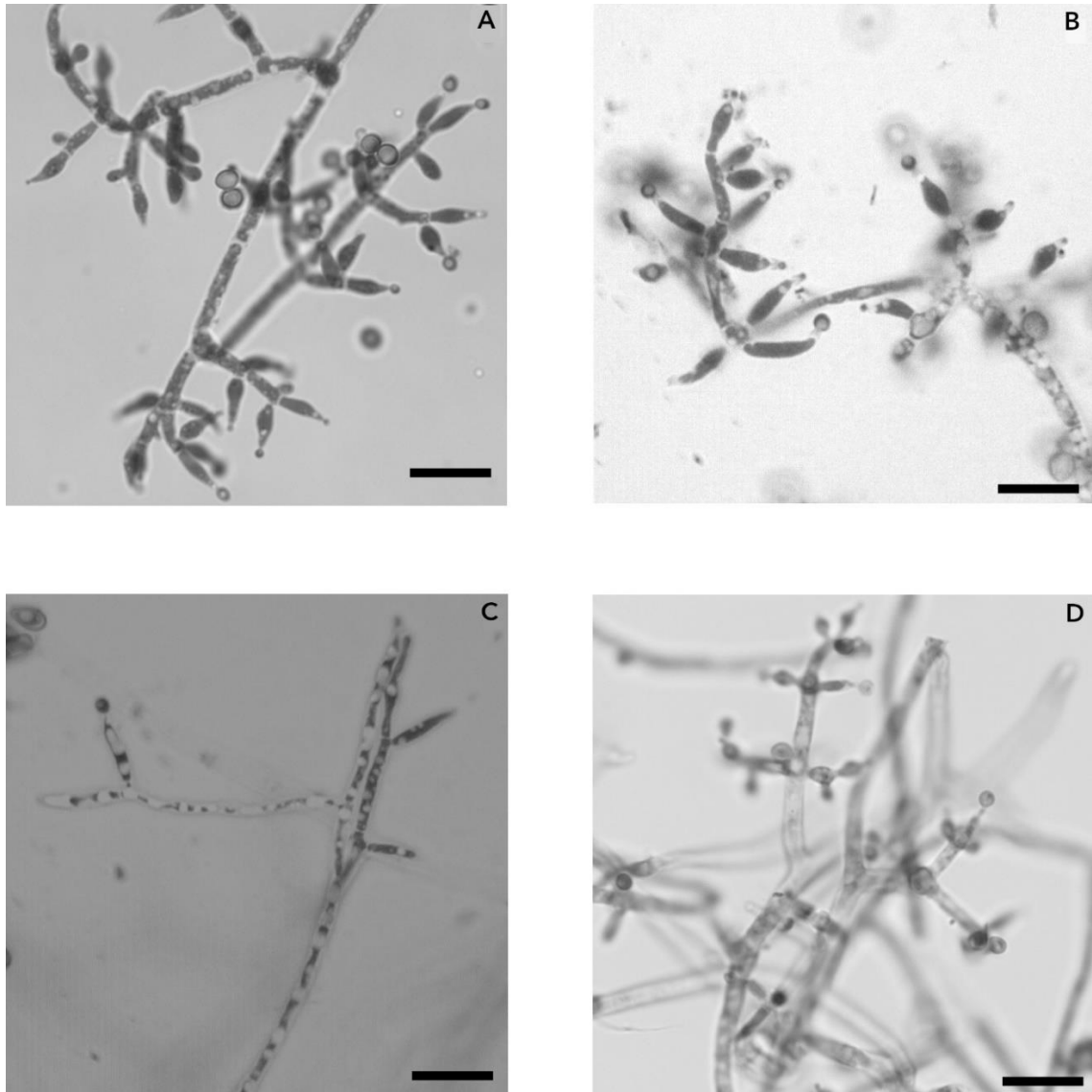


Figura 4.2. Micrografías de conidióforos de *Trichoderma* spp. aislados A. *potatorum*. A. *T. asperellum*, B. *T. yunnanense*, C. *Trichoderma* spp. y D. *T. lentiforme*. Barra= 20 μ m.

La variable Cm presentó diferencias significativas para el día uno y dos; sin embargo, al día tres el crecimiento se homogenizó (Tabla 4.1). La variable Vc presentó diferencia significativa. *Trichoderma* sp. tuvo mayor Vc y fue significativamente distinto de *T. asperellum* y *T. yunnanense*. La etapa exponencial del crecimiento fue durante las primeras 24 h.

Tabla 4.1. Crecimiento radial del micelio de *Trichoderma* spp. y velocidad de crecimiento.

| Especie | Cm 24 h (cm) | Cm 48 h (cm) | Cm 78 h (cm) | Vc (cm d ⁻¹) ‡ |
|------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------------------|
| <i>T. asperellum</i> | 1.95 ± 0.02 ab | 3.10 ± 0.02 bc | 3.68 ± 0.03 a | 1.22 ± 0.01 b |
| <i>T. yunnanense</i> | 1.56 ± 0.03 b | 2.76 ± 0.02 c | 3.65 ± 0.02 a | 1.22 ± 0.01 b |
| <i>Trichoderma</i> sp. | 2.13 ± 0.08 a | 3.64 ± 0.03 a | 3.64 ± 0.03 a | 1.81 ± 0.02 a |
| <i>T. lentiforme</i> | 1.83 ± 0.11 ab | 3.45 ± 0.12 ab | 3.60 ± 0.03 a | 1.59 ± 0.19 ab |
| c.v. | 6.93 | 3.96 | 1.38 | 2.99 |

Letras diferentes por columna son estadísticamente distintas (Tukey≤0.01). ‡Datos transformados con la ecuación $\sqrt{x + 1}$. Cm= crecimiento micelial radial, Vc= velocidad de crecimiento, cm= centímetros.

4.3.3 Evaluación del tamaño, producción y germinación de esporas

Se muestra diferencias estadísticas significativas para las variables Dm, De y Dp (Tabla 4.2). *T. lentiforme* presentó las esporas de menor tamaño y *Trichoderma* sp. las de mayor diámetro.

Las variables Pe y Ge fueron significativas. En ambas, *T. yunnanense* fue significativamente distinta de *T. asperellum*.

Tabla 4.2. Tamaño, producción y germinación de esporas de *Trichoderma* spp. aisladas de agave.

| Especie | Dm (µm)† | De (µm)† | Dp (µm)† | Pe (10 ⁶ cel mL ⁻¹)†† | Ge (%)†† |
|------------------------|---------------|----------------|---------------|---|-----------------|
| <i>T. asperellum</i> | 6.56 ± 0.08 a | 5.55 ± 0.04 a | 6.06 ± 0.05 a | 19.40 ± 1.80 b‡ | 96.25 ± 0.62 b |
| <i>T. yunnanense</i> | 6.58 ± 0.07 a | 5.55 ± 0.04 a | 6.07 ± 0.04 a | 35.40 ± 4.68 a | 99.50 ± 0.28 a |
| <i>Trichoderma</i> sp. | 6.91 ± 0.10 a | 5.49 ± 0.07 ab | 6.20 ± 0.07 a | 22.80 ± 2.58 ab | 98.25 ± 0.25 ab |
| <i>T. lentiforme</i> | 5.67 ± 0.05 b | 5.26 ± 0.05 b | 5.46 ± 0.04 b | 22.80 ± 4.76 ab | 97.00 ± 0.91 b |
| c.v. | 8.99 | 6.81 | 6.71 | 13.76 | 1.10 |

†Letras diferentes por columna son estadísticamente distintas (Tukey≤0.01). ††Letras diferentes por columna son estadísticamente distintas (Tukey≤0.05). Dm= diámetro meridional, De= diámetro ecuatorial, Dp= diámetro promedio, Pe= producción de esporas, Ge= germinación de esporas, c.v.= coeficiente de variación.

4.3.4 Caracterización enzimática de cepas de *Trichoderma* sp. con potencial para control biológico

La producción de exoglucanasas fue significativa entre las especies. *T. asperellum* liberó la mayor cantidad de glucosa y para *Trichoderma* sp. fue menor

(Tabla 4.3). Con respecto a la actividad quitinasa, solo *T. asperellum* y *T. yunnanense* sintetizaron esta enzima en 6 d de incubación sin diferencia entre ellas.

Tabla 4.3. Cantidad de celulasa y quitinasa producida por *Trichoderma* spp.

| Aislamiento | μM glucosa $\text{mL}^{-1} \text{d}^{-1}$ | mM n-acetilglucosamina $\text{mL}^{-1} \text{d}^{-1}$ |
|-------------------------|--|--|
| <i>T. asperellum</i> | $0.55 \pm 0.01\text{a}$ | $1.67 \pm 0.17\text{a}$ |
| <i>T. yunnanense</i> | $0.51 \pm 0.01\text{ab}$ | $1.49 \pm 0.08\text{ab}$ |
| <i>Trichoderma</i> spp. | $0.50 \pm 0.01\text{b}$ | $0.00 \pm 0.00\text{b}$ |
| <i>T. lentiforme</i> | $0.51 \pm 0.01\text{ab}$ | $0.00 \pm 0.00\text{b}$ |
| c.v. | 2.99 | 16.85 |

Letras diferentes por columna son estadísticamente distintas (Tukey \leq 0.05).

4.4 DISCUSIÓN

Para México solo se ha reportado *T. asperellum* en suelos semiáridos. *T. yunnanense* y *T. lentiforme* se reportan por primera vez como especies que colonizan suelo y tejido de agave en condiciones áridas. *T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. viride* y *T. longibrachiatum* son las especies documentadas para suelos semiáridos del noroeste del país. Las poblaciones de estos hongos en suelos de este tipo están sujetas a la escasa vegetación en el sitio de muestreo, la textura arenosa del suelo y la plasticidad de las especies para adaptarse a condiciones extremas mediante la producción de metabolitos (Savín-Molina *et al.* 2021).

Además, Cabral-Miramontes *et al.* (2022) reportaron hongos del clado *T. asperoloides* y *T. harzianum* aislados de plantas y suelo árido-alcalino de

México. *T. harzianum* mostró su capacidad para neutralizar pH ácidos y alcalinos durante su crecimiento *in vitro*, esta posible adaptación al nicho de origen, representa su capacidad para sintetizar metabolitos involucrados en la colonización e inhibición de patógenos.

El tipo de metabolitos secundarios o compuestos antifúngicos que produce *Trichoderma* depende de la especie, estos pueden ser alcaloides, lactonas, quinonas, triterpenos, esteroides, azúcares reductores o flavonoides (Chóez-Guaranda *et al.* 2023). La síntesis de los metabolitos secundarios depende de la expresión génica, la cual es señalizada por cambios en el pH, presencia de proteínas y la interacción con organismos (Khan *et al.* 2020). Este tipo de sustancias le confiere a *Trichoderma* la acción de antagonista al inhibir el establecimiento de patógenos cerca de la raíz. Tal es el caso de *T. lixii*, cepa que colonizó el 81% del micelio de *Paecilomyces maximus* y *Alternaria tenuissima*, hongos lignívoros del cedro (Chauiyakh *et al.* 2024) y *T. longibrachiatum* especie con antagonismo ante *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus tamarisii* (Sobowale *et al.* 2022).

Dentro de las bondades que brinda el hongo *Trichoderma* a las plantas esta la alteración a la homeostasis hormonal que mejora el desempeño fisiológico ante estrés abiótico (Alfiky y Weisskopf, 2021). La selección de cepas nativas de *Trichoderma* que provienen de zonas semiáridas incrementa la adaptación a ambientes extremos y su uso como agentes de biocontrol contra patógenos que producen enfermedades agrícolas (Savín-Molina *et al.* 2021). El aislamiento de

cepas nativas de *Trichoderma* se ha reportado en suelo y raíz de aguacate para inhibir a *Colletotrichum gloeosporioides* y *Diaporthe* sp. (López-López *et al.* 2023).

En esta investigación, las especies aisladas de suelo tuvieron mejor Vc en comparación con las obtenidas de raíz y tallo de *A. potato*. A mayor Vc *Trichoderma* posee potencial para establecerse en la rizosfera convirtiéndose en competidor natural por espacio y nutrientes ante la presencia de otros hongos (Khan *et al.* 2020). Además, una mayor producción de esporas favorece refleja la agresividad del antagonista para establecerse y permite que el porcentaje de germinación de las esporas se incremente asegurando la supervivencia de *Trichoderma*.

La cantidad de quitinasa producida por *T. asperellum* y *T. yunnanense* en medio mínimo basal adicionado con quitina azure, fue similar a lo reportado por Mohiddin *et al.* (2021) quienes mencionan que *T. harzianum* tiene la capacidad de producir desde 1.13 hasta 3.38 U mL⁻¹ de quitinasa. Mientras que la cantidad de celulasa fue menor para los cuatro aislamientos en comparación a lo encontrado por Kalsoom *et al.* (2019) quienes reportan que *T. reesei* produce hasta 0.275 U mL⁻¹ min⁻¹ de enzima en 120 h en condiciones de 70% de humedad.

Las especies más reportadas para México son *T. asperellum*, *T. harzianum* y *T. lentiforme* encontrada en esta investigación, no ha sido reportada para el país (Ahedo-Quero *et al.* 2024; Allende-Molar *et al.* 2022).

4.5 CONCLUSIÓN

Se identificó a *T. asperellum* y *T. yunnanense* como hongos nativos que habitan en tejido de *A. potatozum*. Se reporta por primera vez para México *T. lentiforme* en suelo de agave. Las características morfológicas de los aislamientos fueron micelio color blanco con textura algodonosa y coloración de esporas verde en diferente tonalidad. Los aislados de suelo no presentaron Nac durante la esporulación. *Trichoderma* sp. presentó mayor Vc y Dp. Sin embargo, *T. yunnanense* fue mejor para Pe y Ge. *T. asperellum* liberó más glucosa por la acción de exoglucanasas y solamente *T. asperellum* y *T. yunnanense* produjeron quitinasa.

Agradecimientos al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca otorgada con No. de CVU 1240438.

4.6 LITERATURA CITADA

Allende-Molar R, Báez-Parra KM, Salazar-Villa E, Rojo-Báez I (2022). Biodiversidad de *Trichoderma* spp. en México y su potencial de utilización

- en la agricultura. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 25.
<https://doi.org/10.56369/tsaes.4297>
- Alfiky A, Weisskopf L (2021). Deciphering *Trichoderma*-plant-pathogen interactions for better development of biocontrol applications. *Journal of Fungi* 7, 61. <https://doi.org/10.3390/jof7010061>
- Arrazate-Argueta VC, Martínez-Bolaños M, Ayala-Escobar V, Avendaño-Arrazate CH, Hernández-Morales J (2019). Diversidad morfológica y fisiológica de cepas nativas de *Trichoderma* spp. en suelos cacaoteros de México. *Agroproductividad* 12(12): 3-10. <https://doi.org/10.32854/agrop.vi0.1529>
- Cabral-Miramontes JP, Olmedo-Monfil V, Lara-Banda M, Zuñiga-Romo ER, Aréchiga-Carvajal ET (2022). Promotion of plant growth in arid zones by selected *Trichoderma* spp. strains with adaptation plasticity to alkaline pH. *Biology* 11, 15. <https://doi.org/10.3390/biology11081206>
- Chaparro Aguilar E, Castillo Cotrina D (2019). Especies de *Trichoderma* productoras de β -galactosidasa en suelos de cultivo de Tacna, Perú. *Revista Ciencia y Tecnología para el Desarrollo-UJCM* 5(9): 27-37. <http://dx.doi.org/10.37260/rctd.v5i9.139>
- Chauiyakh O, El Fahime E, Aarabi S, Ninich O, El Aammouri S, Bikri S, Chaouch A, Ettahir A (2024). *In vitro* antagonist activity of cedar *Trichoderma* species against three cedarwood lignivorous fungi. *Scientific African* 24, e02174. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2024.e02174>
- Chóez-Guaranda I, Espinoza-Lozano F, Reyes-Araujo D, Romero C, Manzano P, Galarza L, Sosa D (2023). Characterization of *Trichoderma* spp. extracts

with antifungal activity against cocoa pathogens. *Molecules* 28, 3208.
<https://doi.org/10.3390/molecules28073208>

Gamboa-Villa LC, Martínez-Fernández E, Martínez-Jaimes P, Suárez-Rodríguez R, Ramírez-Trujillo JA (2020). Biocontrol de *Trichoderma* spp. hacia patógenos de la raíz de caña de azúcar. *Agrociencia* 54(7): 955-966.
<https://doi.org/10.47163/agrociencia.v54i7.2245>

Gams W, Bissett J (2002) Morphology and identification of *Trichoderma*. In: Kubicek CP, Harman GE (eds). *Trichoderma* y *Gliocladium*: basic biology, taxonomy and genetics. Taylor y Francis, Ltd. pp. 3-34.
<https://doi.org/10.1201/9781482295320>

Huanca-Mamani W, Salvatierra MR, Sepúlveda-Chavera G (2014). A fast and efficient method for total DNA extraction from soil filamentous fungi. *Idesia* (Arica), 32(2): 75-78. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-34292014000200010>

Kalsoom R, Ahmed S, Nadeem M, Chochan S, Abid M (2019). Biosynthesis and extraction of cellulase produced by *Trichoderma* on agro-wastes. *International Journal of Environmental Science and Technology* 16: 921-928. <https://doi.org/10.1007/s13762-018-1717-8>

Khan RAA, Najeeb S, Hussain S, Xie B, Li Y (2020). Bioactive secondary metabolites from *Trichoderma* spp. against Phytopathogenic Fungi. *Microorganisms* 8(6):817.

López-López ME, Del-Toro-Sánchez CL, Ochoa-Ascencio S, Aguilar-López JA, Martínez-Cruz O, Madrigal-Pulido JA, Robles-García MA, Bernal-Mercado AT, Ávila-Novoa MG, Guerrero-Medina PJ, Gutiérrez-Lomelí M (2023).

- Antagonismo de cepas de *Trichoderma* aisladas de Tanaxuri, Michoacán, México contra patógenos postcosecha del fruto de aguacate (*Persea americana* Mill). Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud 25: 24-33. <http://doi.org/10.18633/biotecnia.v25i1.1726>
- Martínez B, Infante D, Reyes Y (2013). *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. Revista Protección Vegetal 28. <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v28n1/rpv01113.pdf>.
- Mohiddin FA, Padder SA, Bhat AH, Ahanger MA, Shikari AB, Wani SH, Bhat FA, Nabi SU, Hamid A, Bhat NA, Sofi NR, Waza SA, Hamid B, Parveen S, Hussain A, Bhat AN, Ali OM, Dar MS, Latef AAHA (2021). Phylogeny and optimization of *Trichoderma harzianum* for chitinase production: evaluation of their antifungal behaviour against the prominent soil borne phytopathogens of temperate India. Microorganisms 9, 1962. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091962>
- Moreira FMS, Huising EJ, Bignell DE (2012). Manual de biología de suelos tropicales: muestreo y caracterización de la biodiversidad bajo suelo. Instituto Nacional de Ecología. México. pp. 149-162. ISBN: 9786077908319.
- Nelson N (1944). A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. Journal of biological. Chemistry 153: 375-380. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)71980-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)71980-7)
- Ng TK, Weimer PJ and Zeikus JG. 1977. Cellulolytic and physiological properties of *Clostridium thermocellum*. Archives of Microbiology 114. 1977. <http://doi.org/10.1007/BF00429622>

- Rifai MA (1969). A revision of the genus *Trichoderma*. Mycological Papers 116.
- Rochelle PA, Will JAK, Fry JC, Jenkins GJS, Parkes RJ, Turley CM, Weightman AJ (1995). Extraction and amplification of 16S rRNA genes from deep marine sediments and seawater to assess bacterial community diversity. In: Trevors JT, Van Elsas JD (eds) Nucleic acids in the environment. Springer. Alemania. https://doi.org/10.1007/978-3-642-79050-8_11
- Sabando-Ávila F, Molina-Atiencia LM, Garcés-Fiallos FR (2017). *Trichoderma harzianum* en pre-transplante aumenta el potencial agronómico del cultivo de piña. Revista Brasileira de Ciencias Agrarias 12(4): 410-414. <http://doi.org/10.5039/agraria.v12i4a5468>
- Samuels GJ (1996). *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. Mycological Research 100: 923–935. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(96\)80043-8](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(96)80043-8)
- Sánchez Hernández L, Arias Mota RM, Rosique Gil JE, Pacheco Figueroa CJ (2018). Diversidad del género *Trichoderma* (Hypocraceae) en un área natural protegida de Tabasco, México. Acta Botánica Mexicana 123: 167-182. <http://dx.doi.org/10.21829/abm123.2018.1269>
- Savín-Molina J, Hernández-Montiel LG, Ceiro-Catasú W, Ávila-Quezada GD, Palacios-Espinosa A, Ruíz-Espinoza FH, Romero-Bastidas M (2021). Caracterización morfológica y potencial de biocontrol de especies de *Trichoderma* aisladas de suelos del semiárido. Revista Mexicana de Fitopatología 39(3). <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2106-7>
- Sobowale AA, Uzoma LC, Aduramigba-Modupe AO, Bamkefa BA (2022). Fungitoxicity of *Trichoderma longibrachiatum* (Rifai) metabolites against

Fusarium oxysporum, *Aspergillus niger* y *Aspergillus tamarii*. American Journal of Plant Sciences 13: 984-993.
<https://doi.org/10.4236/ajps.2022.137065>

Somogyi M (1952). Notes on sugar determinations. Journal of biological Chemistry 195: 19-23. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)50870-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)50870-5)

CAPÍTULO V

BIOCONTROL *in vitro* DE *Trichoderma* NATIVA A LA MARCHITEZ DEL *Agave potatorum*

RESUMEN

La marchitez del agave es ocasionada por *Fusarium* spp. El control biológico de esta enfermedad se ha logrado con la aplicación de hongos del género *Trichoderma* y para su selección se realizan enfrentamientos *in vitro* que muestran el mecanismo de acción ante el patógeno. El objetivo de esta investigación fue identificar el potencial de *Trichoderma* nativa para el biocontrol *in vitro* del hongo que causa la marchitez del *A. potatorum*. Para ello, en el 2023 se enfrentaron cuatro cepas nativas de *Trichoderma* a *F. solani* en condiciones *in vitro*. Se evaluó la cantidad de enzima pectinasa producida por *F. solani*, la actividad exoglucanasa de los antagonistas, el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del patógeno y el tipo de micoparasitismo. *T. asperellum*, *T. yunnanense*, *T. lentiforme* y *Trichoderma* sp. son especies nativas con capacidad para el biocontrol *in vitro* de *F. solani* causante de la marchitez del *A. potatorum*. *T. asperellum* fue mejor para inhibir el crecimiento micelial radial del patógeno. Las cuatro cepas de *Trichoderma* presentaron diferente acción micoparasítica.

Palabras clave: antagonismo, enzimas, inhibición, maguey tobalá.

ABSTRACT

Agave wilt is caused by *Fusarium* spp. The biological control of this disease has been achieved with the fungi application of *Trichoderma* genus and for their *in vitro* selection carried out confrontations that show the action mechanism against the pathogen. The research objective was identified the potential of native *Trichoderma* for *in vitro* biocontrol of fungi cause wilt in *A. potatorum*. For 2023, four native strains of *Trichoderma* were confronted with *F. solani* at *in vitro* conditions. The amount of pectinase enzyme produced by *F. solani*, the exoglucanase activity of the antagonists, the percentage of inhibition of mycelial growth of the pathogen and the type of mycoparasitism were evaluated. *T. asperellum*, *T. yunnanense*, *T. lentiforme* and *Trichoderma* sp. are native species with *in vitro* biocontrol of *F. solani* capacity, which causes *A. potatorum* wilt. *T. asperellum* was best at inhibiting the radial mycelial growth of the pathogen. The four *Trichoderma* strains presented different mycoparasitic action.

Index words: antagonism, enzyme, inhibition, tobalá maguey.

5.1 INTRODUCCIÓN

El *Agave potatorum* es utilizado para la elaboración de mezcal por sus propiedades organolépticas suaves. Crece entre 1300 a 2400 m de altitud, en terrenos pedregosos con suelos arenosos planos o de poca pendiente y rodeado

de vegetación de *Quercus* y cactáceas, les favorece el clima árido y semiárido (García-Mendoza, 2010).

La propagación de *A. potatorum* en condiciones de invernadero y fertirriego es una posibilidad para lograr su crecimiento y desarrollo; además, potencializa el uso de la especie para producción al disminuir su tiempo de cosecha a cinco años (López *et al.*, 2016).

Los agaves durante diferentes etapas de crecimiento están expuestos a la presencia de enfermedades que ponen en riesgo la cosecha de piñas para la producción del mezcal. La marchitez y la pudrición seca del cogollo en el agave, es uno de los padecimientos con mayor importancia, ya que llega a ocasionar la muerte de la planta. López-Bautista *et al.* (2020) detectaron 40 plantaciones de *Agave tequilana* Weber con sintomatología de marchitez (severidad 3-4) y pudrición seca del cogollo con severidad de 3-5 en 13 municipios de los Altos, Jalisco.

Por su parte, Ramírez-Ramírez *et al.* (2017) estudiaron la frecuencia, sintomatología y los patrones de distribución de la marchitez del *A. tequilana*, aseverando que el daño en raíces llega al 56% en condiciones de invernadero.

Diversos estudios han determinado que hongos del género *Fusarium* son el agente causal de la marchitez del agave (Gómez-Ortiz *et al.*, 2011; Ávila-Miranda *et al.*, 2012; Trinidad-Cruz *et al.*, 2017). Combatir estas enfermedades requiere

de métodos de control químico o biológico. Sí bien, los métodos químicos resultan ser más eficientes para el control de enfermedades, genera consecuencias en el ambiente y la salud humana (Hernández-Antonio y Hansen, 2011; Guzmán-Plazola *et al.*, 2016).

Por otro lado, para el manejo de plagas y enfermedades existe la alternativa del control biológico, que causa efectos menos dañinos al agroecosistema, comparado al uso de agroquímicos, lo que asegura la sustentabilidad de los recursos naturales (Lucio, 2022).

El control biológico de *Fusarium* sp. se ha logrado mediante la aplicación de microorganismos benéficos como los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y *Trichoderma* sp. (García-Martínez *et al.*, 2020; Sánchez *et al.*, 2015; Ghazalibiglar *et al.*, 2016). Grupos de plantas de *A. cupreata* inoculadas con hongo micorrízico mostraron menor severidad de la marchitez causada por *F. oxysporum* y tuvieron crecimiento mayor que plantas no inoculadas (Trinidad-Cruz *et al.*, 2017).

Una manera preliminar de determinar la capacidad antagónica de cepas de *Trichoderma* a patógenos es mediante confrontamientos duales en condiciones *in vitro*, donde es posible observar el método de parasitismo que desempeñan (Kubicek and Harman, 2002). Durante el proceso de micoparasitismo participan enzimas quitinasas, glucanasas y proteasas (Michel-Aceves *et al.*, 2005). *Trichoderma* degrada la pared celular de hongos patógenos y parasita las células

(Romero-Cortes *et al.*, 2015). Los metabolitos secundarios que producen, dependen del tipo de cepa y pueden ser antibióticos volátiles, solubles en agua u oligopéptidos (Khan *et al.*, 2020).

Savin-Molina *et al.* (2021) reportaron a *T. koningii* como antagonista *in vitro* para varios hongos fitopatógenos como *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Rizhotocnia solani*, *Alternaria alternata* y *Colletotrichum gloesporioides*. Por su parte, Oliva-Ortiz *et al.* (2017) confirmaron el efecto antagónico de cepas de *Trichoderma* a *F. oxysporum* en condiciones *in vitro*.

Esta reportado que adicionar *Trichoderma* como tratamiento preventivo en plántulas de agave, mantiene bajas las poblaciones de *Fusarium* sp. (Tlalpal *et al.*, 2014). Con base en esto, el objetivo de la presente investigación fue identificar el potencial de *Trichoderma* nativa para el biocontrol *in vitro* del hongo que causa la marchitez (*F. solani*) del *A. potatorum*.

5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1 Aislamiento del patógeno. *F. solani* fue aislado a partir de la raíz de *A. potatorum* con síntomas de marchitez. La sintomatología observada fue hojas necrosadas en la base del tallo, hojas con coloración rojiza en la parte media del tallo y necrosis en raíces. La planta estaba establecida en campo en el municipio de San Baltazar Chichicapam en los Valles Centrales del Estado de Oaxaca, México. Con ubicación geográfica en 96° 49' 88" LO y 16° 74' 94" LN a 1523 m

de altitud. El hongo fue aislado y purificado en medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA) y se identificó en la base de datos del NCBI con número de acceso KU939012.1.

5.2.2 Selección de las cepas antagonistas. Las cepas de *Trichoderma* spp. fueron aisladas de suelo y tejido de plantas de agave tobalá. Las de suelo fueron obtenidas por siembra en diluciones y para las de tejido se sembraron raíces de 0.5 cm de longitud y segmentos de tallo de 0.5 cm². Dos cepas se obtuvieron de suelo (*Trichoderma* sp. y *T. lentiforme*), una de raíz (*T. asperellum*) y una del tallo (*T. yunnanense*). Las cuatro cepas fueron purificadas y caracterizadas en medio de cultivo PDA.

5.2.3 Velocidad de invasión y producción de pectinasa por *F. solani*. Discos de 5 mm de diámetro con crecimiento micelial de *F. solani*, siete días en PDA, fueron inoculados en medio de cultivo basal con pectina. Se utilizó la metodología reportada por Hankin *et al.* (1971) con modificaciones. El medio de cultivo contenía 2 g de (NH₄)₂SO₄, 4 g de KH₂PO₄, 6g de Na₂HPO₄, 0.1 mg de FeSO₄•7H₂O, 1 mg de CaCl₂, 10 µg de H₃BO₃, 70 µg de MnSO₄, 50 µg de CuSO₄ y 10 µg de Na₂MoO₄, 2 g de extracto de levadura, 10 g de pectina y 30 g de agar para 1 L.

Cada 24 h se midió el crecimiento micelial radial para calcular la velocidad de invasión (V_i , mm d⁻¹). Al mismo tiempo se midió el halo de degradación por acción de la pectinasa (H_d , mm), revelado con lugol al 10%, para lo que se utilizó vernier

digital. Se establecieron cinco repeticiones, donde la unidad experimental era un disco de 5 mm y se obtuvo el promedio.

5.2.4 Producción de exoglucanasa por cepas de *Trichoderma* spp. Se realizó la determinación de actividad exoglucanasa (Ag, μM glucosa $\text{mL}^{-1} \text{d}^{-1}$) producida por las cuatro cepas de *Trichoderma*. Para obtener el sustrato enzimático se utilizó el método de Ng *et al.* (1977) con 0.5% de carboximetilcelulosa. El medio de cultivo fue colocado en tubos de ensaye con rosca (16x150) y se inoculó con 100 μL de suspensión de esporas a 1×10^6 cel mL^{-1} . La incubación fue a temperatura ambiente durante 8 d en agitación constante a 140 rpm.

Al término del tiempo de incubación, los tubos se centrifugaron a 6000 g por 30 min y se tomaron 2 mL del extracto para determinar azúcares por Nelson (1944) y Somoyi (1952). La curva patrón se realizó con concentraciones de glucosa y se midió a 540 nm en espectrofotómetro UV. La actividad exoglucanasa se cuantificó en μM de glucosa por mililitro de reacción por día de incubación. Se hizo un análisis de varianza de los datos y prueba de medias por Tukey ($\alpha=0.05$) con el paquete estadístico SAS for Windows versión 9.4.

5.2.5 Enfrentamientos duales *in vitro* de cepas de *Trichoderma* spp. contra *F. solani*. Las cuatro cepas de *Trichoderma* spp. se enfrentaron contra el patógeno *F. solani*. Para ello fue necesario sembrar discos de 5 mm de diámetro con crecimiento micelial en extremos opuestos en cajas de Petri (120x60 mm) con 12 mL de medio de cultivo PDA. Las cajas fueron incubadas en oscuridad a

temperatura ambiente (26 ± 2 °C) y se midió el crecimiento micelial radial del patógeno (Cm, mm).

Se calculó el porcentaje de inhibición micelial (Im, %) con la ecuación:

$$\%IM = \frac{CML - CMI}{CML} * 100, \text{ donde: CML: crecimiento micelial libre y CMI: crecimiento}$$

micelial influenciado por el antagonista. El análisis de los datos se hizo con análisis de varianza y comparación de medias por Tukey ($\alpha=0.05$) con SAS for Windows versión 9.4.

5.2.6 Actividad micoparasítica de *Trichoderma* spp. a *F. solani*. Se realizaron microcultivos en discos de PDA con 8 mm de diámetro sobre portaobjetos; en ellos se colocaron micelio del patógeno y del antagonista en extremos opuestos para observar el tipo de micoparasitismo ejercido por *Trichoderma* al patógeno. La incubación fue en oscuridad y se observó el comportamiento de las hifas después de siete días. La interacción se documentó con micrografías al 100x con el software Amscope.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Velocidad de invasión y producción de pectinasa por *F. solani*. La variable Vi de *F. solani* en medio de cultivo con pectina fue de 2.46 mm d⁻¹ y produjo 1.2 mm de Hd a las 72 h.

5.3.2 Producción de exoglucanasa por cepas de *Trichoderma* spp. Las cuatro cepas de *Trichoderma* presentaron Ag (Cuadro 5.1). *T. lentiforme* presentó el valor más bajo y fue significativamente distinta a las demás.

Cuadro 5.1. Cantidad de exoglucanasa producida por *Trichoderma* spp.

| Cepa de <i>Trichoderma</i> | μM glucosa $\text{mL}^{-1} \text{d}^{-1}$ |
|----------------------------|--|
| <i>T. asperellum</i> | $0.131 \pm 0.005 \text{ a}^\dagger$ |
| <i>T. yunnanense</i> | $0.116 \pm 0.007 \text{ a}$ |
| <i>Trichoderma</i> sp. | $0.113 \pm 0.012 \text{ a}$ |
| <i>T. lentiforme</i> | $0.080 \pm 0.013 \text{ b}$ |
| c.v. | $2.996 \pm$ |

[†]Letras por columna son significativamente distintas (Tukey $\alpha=0.05$).

5.3.3 Enfrentamientos duales *in vitro* de cepas de *Trichoderma* sp. contra *F. solani*. Los enfrentamientos *in vitro* mostraron la capacidad del antagonista para inhibir al patógeno (Figura 5.1). *T. asperellum* presentó el valor más alto de Im (20 %) y *Trichoderma* sp. el más bajo (7 %). A mayor tiempo en interacción con el antagonista, más se veía limitado el crecimiento de *F. solani* (Figura 5.2). La variable Cm del patógeno fue significativa a las 48 y 72 h. La presencia de *T. asperellum* redujo de manera significativa el Cm de *F. solani* en comparación con el crecimiento libre del patógeno.

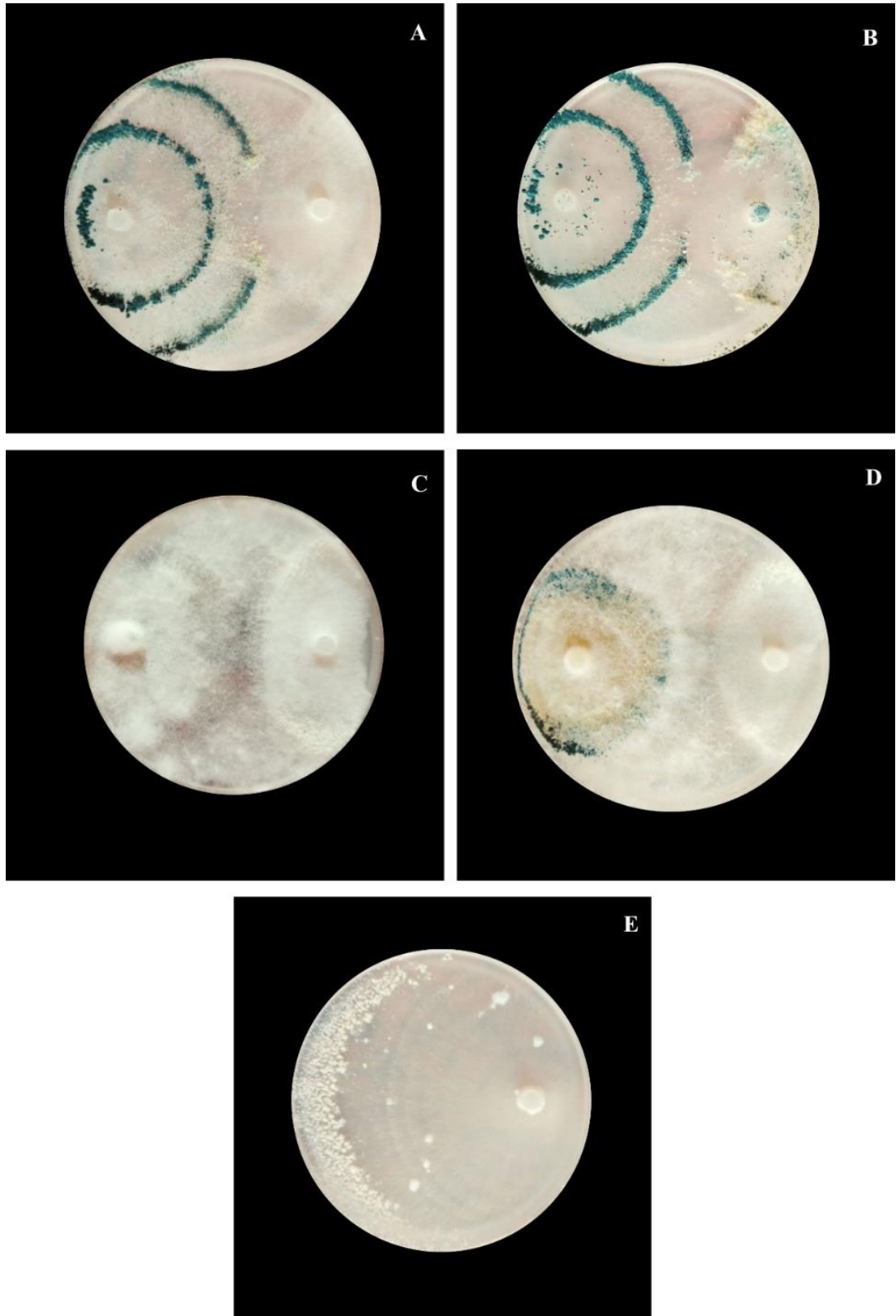


Figura 5.1. Enfrentamientos duales de *Trichoderma* spp. y *F. solani*. A. *T. asperellum* vs *F. solani*. B. *T. yunnanense* vs *F. solani*. C. *Trichoderma* sp. vs *F. solani*. D. *T. lentiforme* vs *F. solani*. E. *F. solani*.

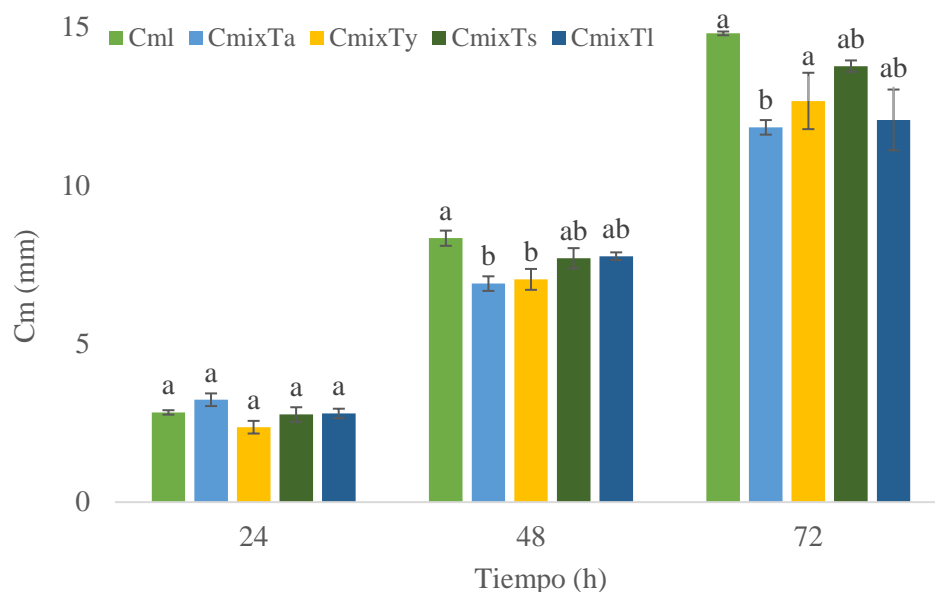


Figura 5.2. Crecimiento micelial radial del patógeno solo y en presencia del antagonista. Cm= crecimiento micelial, Cml= crecimiento micelial libre, CmixTa= crecimiento micelial influenciado por *T. asperellum*, CmixTy= crecimiento micelial influenciado por *T. yunnanense*, CmixTs= crecimiento micelial influenciado por *Trichoderma* sp., CmixTl= crecimiento micelial influenciado por *T. lentiforme*.

5.3.4 Actividad micoparasítica de *Trichoderma* spp. a *F. solani*. Se observaron diferentes tipos de micoparasitismo ejercidos por las cepas de *Trichoderma* (Figura 5.3). *T. asperellum*, *T. yunnanense* y *T. lentiforme* ejercieron enrollamiento a las hifas de *F. solani*. Además, *T. asperellum* y *T. yunnanense* mostraron lisis en la pared celular del patógeno y granulación del citoplasma. *T. lentiforme* y *Trichoderma* sp. penetraron las hifas de *F. solani*.

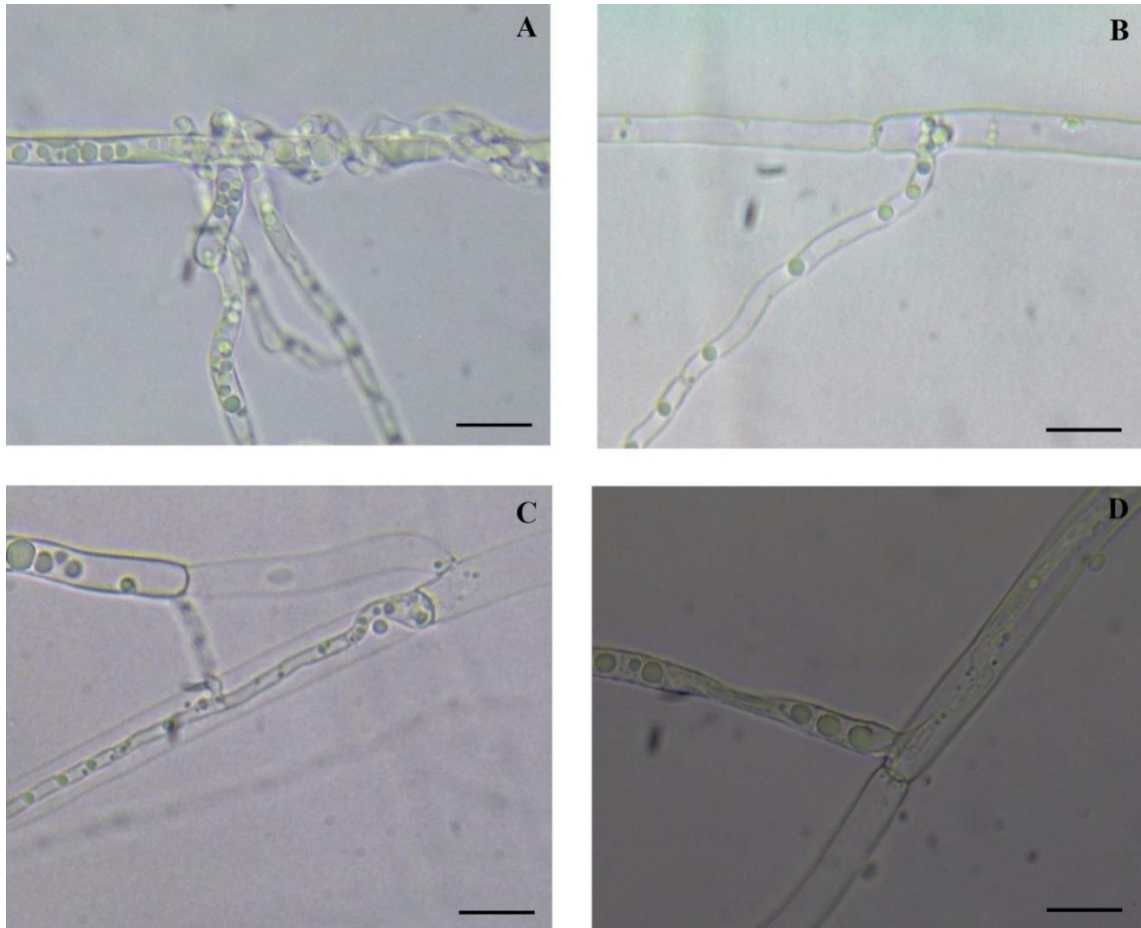


Figura 5.3. Micoparasitismo de *Trichoderma* spp. a *F. solani* causante de la marchitez de *A. potatorum*. A. enrollamiento de hifas por *T. asperellum*. B. Lisis y granulación del citoplasma de *F. solani* por *T. yunnanense*. C. Penetración de hifa del patógeno por *Trichoderma* sp. y D. micoparasitismo por penetración de *T. lentiforme* a *F. solani*.

5.4 DISCUSIÓN

La Vi del patógeno en medios de cultivo con pectina como fuente de carbono, se relaciona con la capacidad para producir enzimas pectinasa. A mayor actividad enzimática mayor patogenicidad (Wang *et al.*, 2023). Sin embargo, en esta investigación la Vi fue mayor en el testigo que en presencia de pectina, pero eso no afectó la producción de pectinasa a partir de las 24 h.

La cepa de *T. asperellum* fue la que tuvo mayor Ag e Im, variables relacionadas con el tipo de micoparasitismo que ejerce ante *F. solani*. Resultados similares fueron reportados por Mulatu *et al.* (2022) quienes mencionan a *T. asperellum* y *T. longibrachiatum* como antagonistas *in vitro* de *F. xyloides*. Y en otros estudios se encontró a *T. atroviride* que inhibe a *F. graminearum* y a *T. asperellum* controlando a *F. equiseti* (Cabrera *et al.*, 2020; Adnani *et al.*, 2024). Por otro lado, *T. lentiforme* tuvo la capacidad de micoparasitar por completo el citoplasma del patógeno, pero produjo la menor cantidad de Ag, esto demuestra que esta especie sintetiza otro tipo de metabolito que favorece la penetración.

La capacidad de las especies de *Trichoderma* para celulasa depende de las condiciones fisicoquímicas y nutrimentales del cultivo (Kalsoom *et al.*, 2019). Además, esta enzima puede actuar como agente antimicrobiano (Jatav *et al.*, 2018).

Aunque en esta investigación el Im de *Trichoderma* spp. a *F. solani* fue bajo, no se afectó la capacidad micoparasítica del antagonista y demostró que las cepas asociadas a la rizosfera y tejido de *A. potatorum* tienen diferentes mecanismos de parasitismo. Estos mecanismos son regulados por el tipo de metabolitos secundarios que sintetice la especie de *Trichoderma* (Khan *et al.*, 2020). Tal fue el caso de *T. lixii*, *T. simmonsii* y *T. viridescens* especies productoras de metabolitos volátiles que inhiben el crecimiento de patógenos lignívoros (Chaiyakh *et al.*, 2024). Mientras que *F. oxysporum* fue controlado por los

metabolitos y enzimas de *T. asperellum*, *T. harzianum*, *T. asperolloides* *T. reesei* y *T. spirale* (Tenório *et al.*, 2022; González *et al.*, 2023).

El porcentaje de inhibición *in vitro* de estas especies varía dependiendo del aislamiento y del patógeno. *T. harzianum* inhibió desde el 40 hasta 63% y *T. asperellum* ha reportado desde 56 a 70% de inhibición para hongos del género *Fusarium*, *Rhizotocnia solani*, *Alternaria alternata* y *Colletotrichum gloeosporioides* (Savín-Molina *et al.*, 2021).

Los aislamientos nativos de *Trichoderma* presentan más capacidad como biocontroladores de patógenos de raíz e influyen en el desarrollo de las plantas (Gamboa-Villa *et al.*, 2020).

5.5 CONCLUSIÓN

Se identificó el potencial de cuatro cepas nativas de *Trichoderma* para el biocontrol *in vitro* de *F. solani*, hongo que ocasiona la marchitez del *A. potatorum*. La cepa *T. asperellum* inhibió en 20% el crecimiento *in vitro* del patógeno y junto con *T. yunnanense* provocan la granulación del citoplasma de *F. solani*. *Trichoderma* sp. y *T. lentiforme* mostraron el tipo de parasitismo más agresivo al depredar por completo las hifas del patógeno a 7 d del enfrentamiento *in vitro*.

Agradecimientos al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca otorgada con No. de CVU 1240438.

5.6 LITERATURA CITADA

- Adnani M, El Hazzat N, Msairi S, El Alaoui MA, Mouden N, Selmaoui K, Benkirane R, Touhami AO and Douira A. 2024. Exploring the efficacy of a *Trichoderma asperellum*-based seed treatment for controlling *Fusarium equiseti* in chickpea. Egyptian Journal of Biological Pest Control 34:7. <https://doi.org/10.1186/s41938-024-00771-x>
- Ávila-Miranda ME, León-Campos C, Peña-Cabriaes JJ, Rodríguez-Mendiola MA, Mancilla-Margalli NA, González-Pérez F and Arias-Castro C. 2012. Diversidad génica y grupos de compatibilidad vegetativa en *Fusarium oxysporum* causante de marchitez en agave (*Agave tequilana* Weber Var. Azul). Gayana Botánica 69:40-48.
- Cabrera M, Garmendia G, Rufo C, Pereyra S and Vero S. 2020. *Trichoderma atroviride* as a biocontrol agent of *Fusarium* head blight by reducing the inoculum of the pathogen in wheat Straw. Terra Latinoamericana 38(3): 629-651. <https://doi.org/10.28940/terra.v38i3.664>
- Gamboa-Villa LC, Martínez-Fernández E, Martínez-Jaimes P, Suárez-Rodríguez R and Ramírez-Trujillo JA. 2020. Biocontrol de *Trichoderma* spp. hacia patógenos de la raíz de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*). Agrociencia 54(7): 955-966. <https://doi.org/10.47163/agrociencia.v54i7.2245>
- Chaiyakh O, El Fahime E, Aarabi S, Ninich O, El Aammouri S, Bikri S, Chaouch A and Ettahir A. 2024. *In vitro* antagonist activity of cedar *Trichoderma*

- species against three cedarwood lignivorous fungi. *Scientific African* 24, e02174. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2024.e02174>
- García-Martínez LI, Sánchez-Mendoza S and Bautista-Cruz A. 2020. Combinación de hongos micorrízicos y fertilización fosforada en el crecimiento de dos agaves silvestres. *Terra Latinoamericana* 38(4): 771-780. <https://doi.org/10.28940/terra.v38i4.702>
- García-Mendoza AJ. 2010. Revisión taxonómica del complejo de *Agave potatorum* Zucc. (Agavaceae): nuevos taxa y neotipificación. *Acta Botánica Mexicana* 91: 71-93.
- Ghazalibiglar H, Kandula DRW and Hampton JG. 2016. Biological control of *Fusarium* wilt of tomato by *Trichoderma* isolates. *New Zealand Plant Protection* 69: 57-63.
- Gomez-Ortiz P, Sánchez-Arizpe A, Virgen-Calleros G, Carvajal-Cazola CR and Padrón-Corral E. 2011. Incidencia y severidad de la marchitez del *Agave tequilana* Weber var. Azul en la zona sur del Estado de Nayarit, México. *Revista Agraria Nueva Epoca* 8(2):21-25.
- González MF, Galarza L, Valdez LL and Quizhpe GM. 2023. Antifungal activity of metabolites from *Trichoderma* spp. against *Fusarium oxysporum*. *Revista Bionatura* 8(2). <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.02.7>
- Guzmán-Plazola P, Guevara-Gutiérrez RD, Olgún-López JL and Mancilla-Villa OR. 2016. Perspectiva campesina, intoxicaciones por plaguicidas y uso de agroquímicos. *IDESIA* 34(3):69-80.

- Hankin L, Zucker M and Sands D. C. 1971. Improved solid médium for the detection and enumeration of pectolytic bacteria. *Applied Microbiology* 22(2): 205-209. <http://doi.org/10.1128/am.22.2.205-209.1971>
- Hernández-Antonio A and Hansen AM. 2011. Uso de plaguicidas en dos zonas agrícolas de México y evaluación de la contaminación de agua y sedimentos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 27(2):115-127.
- Kalsoom R., Ahmed, S., Nadeem, M., Chochan, S. and Abid, M. 2019. Biosynthesis and extraction of cellulase produced by *Trichoderma* on agro-wastes. *International Journal of Environmental Science and Technology* 16: 921-928. <https://doi.org/10.1007/s13762-018-1717-8>
- Khan RAA, Najeeb S, Hussain S, Xie B and Li Y. 2020. Bioactive secondary metabolites from *Trichoderma* spp. against Phytopathogenic Fungi. *Microorganisms* 8(6):817. <http://doi.org/10.3390/microorganisms8030401>
- Kubicek CP and Harman GE. 2002. *Trichoderma* and *Gliocladium*. Basic biology, taxonomy and genetics. Taylor and Francis Ltd. 1. 278 p.
- López-Bautista V, Mora-Aguilera G, Gutiérrez-Espinosa MA, Mendoza-Ramos C, Martínez-Bustamante VI, Coria-Contreras JJ, Acevedo-Sánchez G and Santana-Peñaloza B. 2020. Caracterización morfológica y molecular de *Fusarium* spp. asociados a la ocurrencia regional de marchitez y pudrición seca del cogollo en *Agave tequilana*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 38. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1911-4>
- López Cruz JY, Martínez Gutiérrez GA and Caballero García A. 2016. Diagnóstico de la situación del agave-mezcal y opciones de desarrollo

local en comunidades indígenas de Oaxaca. En *El desarrollo regional frente al cambio ambiental global y la transición hacia la sustentabilidad*.

21° Encuentro Nacional sobre Desarrollo Regional en México. Asociación Mexicana de Ciencias para el Desarrollo Regional.

Lucio López CF. 2022. Los destilados de agave en México: una exploración desde la economía ecológica radial. *Revista Iberoamericana de Economía Ecológica* 35(3), 21-38. <https://redibec.org/ojs>

Michel-Aceves AC, Otero-Sánchez MA, Rebolledo-Domínguez O, Lezama-Gutiérrez R and Ochoa-Moreno ME. 2005. Producción y efecto antagónico de quitinasas y glucanasas por *Trichoderma* spp. en la inhibición de *Fusarium subglutinans* y *Fusarium oxysporum* *in vitro*. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 11(2): 273-278.

Mulatu A, Megersa N, Teferi D, Alemu T and Vetukuri RR. 2022. Biological management of coffee wilt disease (*Fusarium xylarioides*) using antagonistic *Trichoderma* isolates. *Frontiers in Plant Science* 14. <http://doi.org/10.3389/fpls.2023.1113949>

Nelson N (1944). A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *Journal of biological. Chemistry* 153: 375-380. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)71980-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)71980-7)

Ng TK, Weimer PJ and Zeikus JG. 1977. Cellulolytic and physiological properties of *Clostridium thermocellum*. *Archives of Microbiology* 114. 1977. <http://doi.org/10.1007/BF00429622>

Oliva-Ortiz L del C, Velázquez-Alcaraz T de J, Sosa-Pérez R, Partida-Ruvalcaba L, Díaz-Valdés T, Arciniega-Ramos J and López-Orona CA. 2017. Control

de la fusariosis vascular del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) por microorganismos nativos de Sinaloa, México. *Agrociencia* 51: 683-695. <https://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v51n6/1405-3195-agro-51-06-00683-en.pdf>

Ramírez-Ramírez MJ, Mancilla-Margalli NA, Meza-Álvarez L, Turincio-Tadeo R, Guzmán-de Pena D and Avila-Miranda ME. 2017. Epidemiology of *Fusarium* agave wilt in *Agave tequilana* Weber var. azul. *Plant Protection Science* 53: 144–152. <http://doi.org/10.17221/142/2016-PPS>

Romero-Cortes T, López-Pérez PA, Ramírez-Lepe M and Cuervo-Parra JA. 2016. Modelado cinético del micoparasitismo por *Trichoderma harzianum* contra *Cladosporium cladosporioides* aislado de frutos de cacao (*Theobroma cacao*). *Chilean Journal of Agricultural and Animal Sciences* 31(3):32-45. <http://dx.doi.org/10.4067/S0719-38902016000100004>

Sánchez AD, Barrera V, Reybet GE and Sosa MC. 2015. Biocontrol con *Trichoderma* spp. de *Fusarium oxysporum* causal del “mal de almácigos” en pre y post emergencia en cebolla. *Revista Facultad de Agronomía, La Plata* 114: 61-70. <https://www.researchgate.net/publication/290997780>

Savín-Molina J, Hernández-Montiel LG, Ceiro-Catasú W, Ávila-Quezada GD, Palacios-Espinosa A, Ruíz-Espinoza FH and Romero-Bastidas M. 2021. Caracterización morfológica y potencial de biocontrol de especies de *Trichoderma* aisladas de suelos del semiárido. *Revista Mexicana de Fitopatología* 39(3). <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2106-7>

Somogyi M (1952). Notes on sugar determinations. *Journal of biological Chemistry* 195: 19-23. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)50870-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)50870-5)

- Tenório do Amaral AC, Cavalcanti Maciel M de H, Reis Machado A, Goncalves de Oliveira L, Souza Lima C, Félix da Costa A and Tinti de Oliveira N. 2022. *Trichoderma* as a biological agent of *Fusarium oxysporum* species complex and *Vigna unguiculata* growth promoter. European Journal Plant Pathology 163: 875-890. <https://doi.org/10.1007/s10658-022-02526-6>
- Tlapal Bolaños B, González Hernández H, Zavaleta Mejía E, Sánchez García P, Mora Aguilera G, Nava Díaz C, Del Real Laborde JI and Rubio Cortés R. 2014. Colonización de *Trichoderma* y *Bacillus* en plántulas de *Agave tequilana* Weber, var. Azul y el efecto sobre la fisiología de la planta y densidad de *Fusarium*. Revista Mexicana de Fitopatología 32, 62-74. <https://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v32n1/v32n1a6.pdf>
- Trinidad-Cruz JR, Quiñones-Aguilar EE, Rincón-Enríquez G, López-Pérez L and Hernández-Cuevas LV. 2017. Micorrización de *Agave cupreata*: biocontrol de *Fusarium oxysporum* y promoción del crecimiento vegetal. Revista Mexicana de Fitopatología 35(2). <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1607-5>
- Wang C, Huang Z, Duan Z, Zhu L, Di R, Bao Y, Powell CA, Hu Q, Chen B, Zhang M and Yao W. 2023. Pectate lyase from *Fusarium sacchari* induces plant immune responses and contributes to virulence. Microbiology Spectrum 11(3). <http://doi.org/10.1128/spectrum.00165-23>

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES GENERALES

Se identificó a *F. fujikoroj*, *F. solani* y *F. falciforme* como los hongos que causan la marchitez de *A. potatozum* de manera independiente. Estos hongos colonizan tejido de raíces y tallos, pero no fue posible encontrarlos en hojas. La marchitez de *A. potatozum* inician a los 15 días de la infección y su avance es lento; solo se registró diferencias significativas en DT.

Los hongos del género *Trichoderma* que están asociados al *A. potatozum* son *T. asperellum* y *T. yunnanense* para tejido vegetal y *T. lentiforme* en la rizosfera de esta planta. La especie *T. asperellum* presenta más actividad exoglucanasas y únicamente *T. asperellum* y *T. yunnanense* producen quitinasa.

Las cuatro especies nativas son potenciales para el biocontrol *in vitro* de *F. solani*. *T. asperellum* tiene capacidad para inhibir el 20% del crecimiento *in vitro* del patógeno. Mientras que, *Trichoderma* sp. y *T. lentiforme* son más agresivo al parasitar por completo las hifas de *F. solani*.

Se reportó por primera vez, para México, la presencia de *T. lentiforme* en suelo y *F. falciforme* en raíces de agave.

CAPÍTULO VII

RECOMENDACIONES

Realizar estudios de compatibilidad vegetativa entre las especies que se encontraron como agentes causales de la marchitez del *A. potatoorum*. Además, se recomienda completar la secuenciación de los aislamientos de *Fusarium* para poder hacer análisis de la filogenia.

Hacer el análisis de homología entre *T. asperellum* y *T. yunnanense* encontrados en esta investigación para poder predecir la distancia génica entre especies.

Identificar los metabolitos que producen las cuatro especies de *Trichoderma*.

Continuar a las pruebas *in vivo* del biocontrol de *Trichoderma* nativa a patógenos de la marchitez del *A. potatoorum*.

Ampliar la zona de muestreo a otras comunidades magueyeras para identificar la diversidad de patógenos y antagonistas.

CAPÍTULO VIII

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Ávila-Miranda, M. E., León-Campos, C., Peña-Cabriales, J. J., Rodríguez-Mendiola, M. A., Mancilla-Margalli, N. A., González-Pérez, F. y Arias-Castro, C. (2012). Diversidad génica y grupos de compatibilidad vegetativa en *Fusarium oxysporum* causante de marchitez en agave (*Agave tequilana* Weber var. Azul). *Gayana Botánica*, 69, 40-48.
- Beccari, G., Prodi, A., Senatore, M.T., Balmas, V., Tini, F., Onofri, A., Pedini, L., Sulyok, M., Brocca, L. y Covarelli, L. (2020). Communities and secondary metabolites in italian durum wheat grains. *Toxins*, 12, 32. <https://doi.org/10.3390/toxins12020097>
- Beccari, G., Hao, G. y Liu H. (2022). Editorial: Fusarium pathogenesis: infection mechanisms and disease progression in host plants. *Frontiers in Plant Science*, 13: 1020404. <http://doi.org/10.3389/fpls.2022.1020404>
- Castillo R., F., Castillo Quiroz, D., Sáenz Ceja, J. E., Rueda Sánchez, A. y Sáenz Reyes, J. T. (2022). Efectos del pretratamiento con *Trichoderma* y *Bacillus* en la germinación de semillas de *Agave victoriae-reginae* T. Moore. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 13, 69, 56-72. <https://doi.org/10.29298/rmcf.v13i69.844>

- Comisión Estatal de Sanidad Vegetal Guanajuato A. C. (2007). *Campaña de manejo fitosanitario de Agave*. <http://www.cesaveg.org.mx>.
- Comisión Nacional Forestal. (2008). Enfermedades y plagas en la germinación de planta. En L. Arango Caballero (Ed.). *Manual Identificación y manejo de plagas y enfermedades en viveros forestales*. (pp. 18-75).
- Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal A. C. (2024). Informe estadístico 2024. https://comercam-dom.org.mx/wp-content/uploads/2024/04/PUBLICO_INFORME_2024.pdf.
- Delgado-Lemus, A., Torres, I., Blancas, J. y Casas, A. (2014). Vulnerability and risk management of *Agave* species in the Tehuacán Valley, México. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 10, 53. <http://www.ethnobiomed.com/content/10/1/53>.
- Dixon, M. y Webb, E.C. (1964). *Enzymes*. (2ª ed, pp. 207-323). Academic Press, New York.
- Eguiarte, L. E., Souza, V. y Silva-Montellano, A. (2000). Evolución de la familia Agavaceae: filogenia, biología reproductiva y genética de poblaciones. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 66, 131-151. <http://doi.org/10.17129/botsci.1618>
- Flores L., H. E., Chávez Durán, A. A., Ruíz Corral, J. A., de la Mora Orozco, C. y Rodríguez Moreno, V.M. (2016). Efecto del cambio climático sobre las zonas de riesgo por marchitez en el *Agave tequilana* Weber variedad Azul en Jalisco. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 13, 2497-2510.
- Gams, W. y Bissett, J. (2002) Morphology and identification of *Trichoderma*. En C. P. Kubicek, y G. E. Harman (Eds). *Trichoderma y Gliocladium: basic biology, taxonomy*

and genetics (pp. 3-34). Taylor y Francis, Ltd.
<https://doi.org/10.1201/9781482295320>

García-Martínez, L. I., Sánchez-Mendoza, S. y Bautista-Cruz, A. (2020). Combinación de hongos micorrízicos y fertilización fosforada en el crecimiento de dos agaves silvestres. *Terra Latinoamericana*, 38(4), 771-780.
<https://doi.org/10.28940/terra.v38i4.702>

García-Mendoza, A. J. (2002). Distribution of *Agave* (Agavaceae) in México. *Cactus and Succulent Journal*, 74 (4), 177-187.

García-Mendoza, A. J. (2010). Revisión taxonómica del complejo de *Agave potatorum* Zucc. (Agavaceae): nuevos taxa y neotipificación. *Acta Botánica Mexicana*, 91, 71-93. <https://doi.org/10.21829/abm91.2010.292>

García-Mendoza, A. J., Franco Martínez, I. S. y Sandoval Gutiérrez, D. (2019). Cuatro especies nuevas de *Agave* (Asparagaceae, Agavoideae) del sur de México. *Acta Botánica Mexicana*, 126, e1461. <http://doi.org/10.21829/abm126.2019.1461>

Gentry, H. S. (1982). *Agaves of Continental North America*. The University of Arizona Press.

Ghazalibiglar, H., Kandula, D.R.W. y Hampton, J.G. (2016). Biological control of *Fusarium* wilt of tomato by *Trichoderma* isolates. *Microbial control*, 69, 57-63.
http://www.nzpps.org/terms_of_use.html.

Gómez-Ortiz, P., Sánchez-Arizpe, A., Virgen-Calleros, G., Carvajal-Cazola, C. R. y Padrón-Corral, E. (2011). Incidencia y severidad de la marchitez del *Agave tequilana* Weber Var. Azul en la zona sur del Estado de Nayarit, México. *Revista Agraria Nueva Epoca*, 8(2), 21-25.

- Gutiérrez-Hernández, G. F., Ortiz-Hernández, Y. D., Corzo-Ríos, L. J. y Aquino-Bolaños, T. (2020). Composición química y germinación de semillas de Tobalá (*Agave potatorum*) *Interciencia*, 45(5), 223-228. https://www.researchgate.net/publication/341883200_COMPOSICION_QUIMICA_Y_GERMINACION_DE_SEMILLAS_DE_TOBALA_Agave_potatorum.
- Guzmán-Plazola, P., Guevara-Gutiérrez, R. D., Olgún-López, J. L. y Mancilla-Villa, O. R. (2016). Perspectiva campesina, intoxicaciones por plaguicidas y uso de agroquímicos. *IDESIA*, 34(3), 69-80.
- Hankin, L., Zucker, M. y Sands, D. C. (1971). Improved solid médium for the detection and enumeration of pectolytic bacteria. *Applied microbiology*, 205-209. <https://journals.asm.org/journal/am>.
- Hernández-Antonio, A. y Hansen, A. M. (2011). Uso de plaguicidas en dos zonas agrícolas de México y evaluación de la contaminación de agua y sedimentos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 27(2), 115-127.
- Huang, Z., Li, H., Zhou, Y., Bao, Y., Duan, Z., Wang, C., Powell, C. A., Chen, B., Zhang, M. y Yao, W. (2022). Predication of the effector proteins secreted by *Fusarium sacchari* using genomic análisis an heterogenous expresión. *Journal of Fungi*, 8, 59. <https://doi.org/10.3390/jof8010059>
- Islam, S., Feroza, B., Alam, A. K. M. R. y Begum, S. (2013). Pectinase production by *Aspergillus niger* isolated from decomposed apple skin. *Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research*, 48: 25-32. <http://doi.org/10.3329/bjsir.v48i1.15410>
- Kalsoom, R., Ahmed, S., Nadeem, M., Chochan, S. y Abid, M. (2019). Biosynthesis and extraction of cellulase produced by *Trichoderma* on agro-wastes. *International*

- Journal of Environmental Science and Technology*, 16, 921-928.
<https://doi.org/10.1007/s13762-018-1717-8>
- Khan, R. A. A., Najeeb, S., Hussain, S., Xie, B. y Li, Y. (2020). Bioactive secondary metabolites from *Trichoderma* spp. against Phytopathogenic Fungi. *Microorganisms*. 8(6), 817. <http://doi.org/10.3390/microorganisms8060817>
- Kubicek, C. P. y Harman, G. E. (2002). *Trichoderma* and *Gliocladium*: Basic biology, taxonomy and genetics. Taylor and Francis Ltd.
- Kubicek, C.P., Starr, T.L. y Glass, T.L. (2014). Plant cell wall-degrading enzymes and their secretion in plant-pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 52, 427-451. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-102313-045831>
- Jatav, P., Singh, S, Gupta, A., Kushwaha, K. y Jatav, S. (2018). Antagonistic activity of cellulase enzyme produced by *Trichoderma viride* against *Xanthomonas Citri*. *Indian Journal Agricultural Research*, 52(5), 497-504. <http://doi.org/10.18805/IJARE.A-4999>
- López-Bautista, V., Mora-Aguilera, G., Gutiérrez-Espinosa, M. A., Mendoza-Ramos, C., Martínez-Bustamante, V. I., Coria-Contreras, J. J., Acevedo-Sánchez, G. y Santana-Peñaloza, B. (2020). Caracterización morfológica y molecular de *Fusarium* spp. asociados a la ocurrencia regional de marchitez y pudrición seca del cogollo en *Agave tequilana*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 38. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1911-4>
- López C., J. Y., Martínez G., G. A. y Caballero G., A. (2016). Diagnóstico de la situación del agave-mezcal y opciones de desarrollo local en comunidades indígenas de Oaxaca. En *El desarrollo regional frente al cambio ambiental global y la transición*

hacia la sustentabilidad. 21° Encuentro Nacional sobre Desarrollo Regional en México. Asociación Mexicana de Ciencias para el Desarrollo Regional.

Lucio L., C. F. (2022). Los destilados de agave en México: una exploración desde la economía ecológica radial. *Revista Iberoamericana de Economía Ecológica*, 35(3), 21-38. <https://redibec.org/ojs>.

Ortiz-Hernández, Y. D., Gutiérrez-Hernández, G.F., Corzo-Ríos, L. J., García-Ramírez, E. y Martínez-Tomás, S. H. (2018). Varietal and germinative characterization of *Agave potatorum* (Asparagaceae) seeds with different origins. *Physiology*, 96(4), 628-639. <http://doi.org/10.17129/botsci.1914>

Palma C., F. J. (1991). El género *Agave* y su distribución en el Estado de Oaxaca. Universidad Nacional Autónoma de México. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala. <https://www.researchgate.net/publication/279516532>.

Quiñones-Aguilar, E.E., Montoya-Martínez, A. C., Rincón-Enríquez, G. y López-Pérez, L. (2023). Inoculación de bulbilos de *Agave tequilana* con hongos micorrízicos arbusculares: efecto en el crecimiento y biocontrol contra *Fusarium oxysporum*. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 24, e3043. https://doi.org/10.21930/rcta.vol24_num1_art:3043

Ramírez-Ramírez, M. J., Mancilla-Margalli, N.A., Meza-Álvarez, L., Turincio-Tadeo, R., Guzmán-de Peña, D. y Avila-Miranda, M.E. (2017). Epidemiology of *Fusarium* agave wilt in *Agave tequilana* Weber var. Azul. *Plant Protection Science*, 53, 144–152. <http://doi.org/10.17221/142/2016-PPS>

Reyes-Zambrano, S. J., Lecona-Guzmán, C. A., Gutiérrez-Miceli, F. A., Santana-Buzzy, N., Islas-Flores, I., Tzec-Simá, M., Barredo-Pool, F. A., Ruiz-Lau, N. y Ávila-Miranda, M.E. (2020). Microscopía electrónica de barrido y análisis enzimático en

- Agave americana* durante la infección con *Fusarium oxysporum*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 38(3), 408-419. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2005-3>
- Romero-Cortes, T., López-Pérez, P. A., Ramírez-Lepe, M. y Cuervo-Parra, J. A. (2016). Modelado cinético del micoparasitismo por *Trichoderma harzianum* contra *Cladosporium cladosporioides* aislado de frutos de cacao (*Theobroma cacao*). *Chilean Journal of Agricultural and Animal Sciences*, 31(3), 32-45. <http://dx.doi.org/10.4067/S0719-38902016000100004>
- Rubio C., R. (2007). Enfermedades del cultivo de agave. En: F. O. Rulfo Vilchis, J. F. Pérez Domínguez, J. I. Real Laborde, y K. F. Byerly Murphy. (Eds.), Conocimiento y prácticas agronómicas para la producción de *Agave tequilana* Weber en la zona de denominación de origen del tequila. (pp. 169-195). Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Pacífico Centro.
- Sánchez, A. D., Barrera, V., Reybet, G. E. y Sosa, M. C. (2015). Biocontrol con *Trichoderma* spp. de *Fusarium oxysporum* causal del “mal de almácigos” en pre y post emergencia en cebolla. *Revista Facultad de Agronomía, La Plata*, 114, 61-70. <https://www.researchgate.net/publication/290997780>.
- Sánchez H., L., Arias M., R. M., Rosique G., J. E. y Pacheco F., C. J. (2018). Diversidad del género *Trichoderma* (Hypocraceae) en un área natural protegida de Tabasco, México. *Acta Botánica Mexicana*, 123, 167-182. <http://dx.doi.org/10.21829/abm123.2018.1269>
- Savín-Molina, J., Hernández-Montiel, L. G., Ceiro-Catasú, W., Ávila-Quezada, G. D., Palacios-Espinosa, A., Ruíz-Espinoza, F. H. y Romero-Bastidas, M. (2021). Caracterización morfológica y potencial de biocontrol de especies de *Trichoderma*

aisladas de suelos del semiárido. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 39(3).
<https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2106-7>

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (2017).
Agave tequilero y mezcalero mexicano. Planeación agrícola nacional 2017-2030.
www.gob.mx/agricultura.

Sierra-Moya, J.A., Espinoza, C., Guzmán-López, O., Trigos, A. y Salinas-Castro, A.
(2022). Characterization of *Fusarium* species that affect the asparagus crops
cultivation in Veracruz, México. *Scientia Agropecuaria*, 13(4), 343-349.
<https://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2022.031>

Tlapal B., B., González H., H., Zavaleta M., E., Sánchez G., P., Mora A., G., Nava D., C.,
Del Real L., J. I. y Rubio C., R. (2014). Colonización de *Trichoderma* y *Bacillus* en
plántulas de *Agave tequilana* Weber, var. Azul y el efecto sobre la fisiología de la
planta y densidad de *Fusarium*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 32, 62-74.
<https://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v32n1/v32n1a6.pdf>.

Torres-García, I., Casas, A., Delgado-Lemus, A. y Rangel-Landa, S. (2013).
Aprovechamiento, demografía y establecimiento de *Agave potatorum* en el Valle
de Tehuacán, México: aportes ecológicos y etnobiológicos para su manejo
sustentable. *Zonas áridas*, 15, 92-109.
https://www.researchgate.net/publication/266855067_Aprovechamiento_demografia_y_establecimiento_de_Agave_potatorum_en_el_Valle_de_Tehuacan_Mexico_Aportes_ecologicos_y_etnobiologicos_para_su_manejo_sustentable.

Torres-García, I., Rendón-Sandoval, F. J., Blancas, J., Casas, A. y Moreno-Calles, A. I.
(2019). The genus *Agave* in agroforestry systems of Mexico. *Botanical Sciences*,
97(3), 263-290. <http://doi.org/10.17129/botsci.2202>

- Trinidad-Cruz, J. R., Quiñones-Aguilar, E. E., Rincón-Enríquez, G., López-Pérez, L. y Hernández-Cuevas, L. V. (2017). Micorrización de *Agave cupreata*: biocontrol de *Fusarium oxysporum* y promoción del crecimiento vegetal. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 35(2). <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1607-5>
- Vargas-Hoyos, H. A. y Gilchrist-Ramelli, E. (2015). Producción de enzimas hidrolíticas y actividad antagónica de *Trichoderma asperellum* sobre dos cepas de *Fusarium* asiladas de cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*). *Revista Mexicana de Micología*, 42, 9-16. <https://www.scielo.org.mx/pdf/rmm/v42/v42a3.pdf>.
- Vega-Ramos, K. L., Uvalle-Bueno J. X. y Gómez-Leyva, J.F. (2013). Molecular variability among isolates of *Fusarium oxysporum* associated with root rot disease of *Agave tequilana*. *Biochemical Genetics*, 51, 243-255. <https://doi.org/10.1007/s10528-012-9559-4>
- Velarde-Félix, S., Valenzuela-Herrera, V., Ortega-Murrieta, P. F., Fierros-Leyva, G. A., Rojas-Rojas, P. A., López-Orona, C. A. y Retes-Manjarrez, J. E. (2022). First report of *Fusarium falciforme* (FSSC 3 + 4) causing root rot on chickpea in Mexico. *Plant Disease*, 106, 329. <https://doi.org/10.1094/pdis-05-21-1123-PDN>
- Vera G., A. M., Santiago G., P.A. y López, M. G. (2009). Compuestos volátiles aromáticos generados durante la elaboración de mezcal de *Agave angustifolia* y *Agave potatorum*. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 32(4), 273-279. <http://doi.org/10.35196/rfm.2009.4.273-279>
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Ruocco, M., Woo, S. y Lorito, M. (2012). *Trichoderma* secondary metabolites that affect plant metabolism. *Natural Product Communications*, 7(11), 1545-1550. <https://doi.org/10.1177/1934578X1200701133>

CAPÍTULO IX

ANEXOS

9.1 Anexo 1. Cuadros

Cuadro 9.1. Frecuencia observada de la diversidad de aislamientos fúngicos obtenidos a partir de tejidos de *A. potato*.

| Tejido de la planta | Crecimiento de colonias fúngicas | | Total |
|---------------------|----------------------------------|-----------|-------|
| | Ausencia | Presencia | |
| Raíz | 31 (0.10) | 29 (0.10) | 60 |
| Piña | 87 (0.29) | 33 (0.11) | 120 |
| Hoja | 102 (0.34) | 18(0.06) | 120 |
| Total | 220 (0.73) | 80 (0.27) | |

Valor calculado $\chi^2=22.78^{**}$ ($\alpha=0.05$).

Cuadro 9.2. Frecuencia de aislamientos con morfología similar a *Fusarium* en tejido de raíz, piña y hoja de plantas de *A. potato* con marchitez.

| Tejido | Morfofotipo <i>Fusarium</i> | | Total |
|--------|-----------------------------|-----------|-----------|
| | Ausencia | Presencia | |
| Raíz | 11 (0.14) | 18 (0.22) | 29 (0.36) |
| Piña | 25 (0.31) | 8 (0.10) | 33 (0.41) |
| Hoja | 18 (0.23) | 0 (0.00) | 18 (0.23) |
| Total | 54 (0.68) | 26 (0.32) | |

Valor calculado $\chi^2=21.25^{**}$ ($\alpha=0.05$).

Cuadro 9.3. Relación del color y forma del micelio de aislamientos de *Fusarium* spp. a los 15 días después de la siembra.

| Color | Algodonoso | Algodonoso elevado al centro | Algodonoso no elevado | Forma | | | | Total |
|-------------------|------------|------------------------------|-----------------------|------------------|---------------------|----------|------------------------|-----------|
| | | | | Elevado al borde | Ligeramente elevado | Plano | Plano elevado al borde | |
| Blanco | 0 | 0 | 1 (0.04) | 1 (0.04) | 6 (0.23) | 2 (0.07) | 3 (0.11) | 13 (0.49) |
| Blanco - amarillo | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 (0.04) | 0 | 1 (0.04) | 2 (0.07) |
| Blanco - gris | 0 | 0 | 1 (0.04) | 1 (0.04) | 0 | 0 | 1 (0.04) | 3 (0.12) |
| Blanco - rosa | 0 | 1 (0.04) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 (0.04) |
| Gris | 1 (0.04) | 0 | 0 | 2 (0.07) | 2 (0.07) | 0 | 2 (0.07) | 7 (0.25) |
| Total | 1 (0.04) | 1 (0.04) | 2 (0.07) | 4 (0.16) | 9 (0.35) | 2 (0.08) | 7 (0.27) | |

Valor calculado $\chi^2 = 38.31^*$ ($\alpha=0.05$).

Cuadro 9.4. Indicadores de la marchitez de *A. potatozum*, evaluadas 126 días después de la infección.

| Tratamiento | TEH [‡] (Hojas mes ⁻¹) | NHM [‡] (#) | INC [‡] (%) | NR [‡] (%) |
|---------------------------------|--|--------------------------|-------------------------|---------------------------|
| 1. SBCFs1 | 1.19 ± 0.10 ^a | 3.25 ± 0.48 ^a | 75 ± 0.25 ^a | 43.33 ± 1.14 ^a |
| 2. SBCFs2 | 1.35 ± 0.32 ^a | 3.75 ± 0.63 ^a | 50 ± 0.29 ^a | 37.50 ± 2.99 ^a |
| 3. SBCFs3 | 1.31 ± 0.15 ^a | 4.00 ± 0.41 ^a | 100 ± 0.00 ^a | 30.00 ± 0.53 ^a |
| 4. SBCFs4 | 1.13 ± 0.06 ^a | 3.25 ± 0.85 ^a | 75 ± 0.25 ^a | 25.00 ± 0.72 ^a |
| 5. SBCFs5 | 1.27 ± 0.08 ^a | 4.25 ± 0.48 ^a | 100 ± 0.00 ^a | 32.50 ± 1.57 ^a |
| 6. SBCFs6 | 1.31 ± 0.15 ^a | 2.75 ± 0.48 ^a | 50 ± 0.29 ^a | 28.33 ± 1.38 ^a |
| 7. SBCFs7 | 1.13 ± 0.06 ^a | 3.50 ± 0.29 ^a | 50 ± 0.29 ^a | 40.00 ± 1.96 ^a |
| 8. SBCFs8 | 1.07 ± 0.15 ^a | 3.50 ± 0.29 ^a | 50 ± 0.29 ^a | 28.33 ± 1.10 ^a |
| 9. SBCFs9 | 1.25 ± 0.06 ^a | 4.50 ± 0.50 ^a | 75 ± 0.25 ^a | 30.00 ± 0.80 ^a |
| 10. SBCFs10 | 0.83 ± 0.12 ^a | 4.00 ± 0.41 ^a | 100 ± 0.00 ^a | 50.00 ± 0.92 ^a |
| 11. SBCFs11 | 1.25 ± 0.20 ^a | 3.75 ± 0.25 ^a | 50 ± 0.29 ^a | 21.67 ± 0.37 ^a |
| 12. SBCFs12 | 1.07 ± 0.07 ^a | 3.50 ± 0.29 ^a | 75 ± 0.25 ^a | 16.67 ± 1.39 ^a |
| 13. SBCFs13 | 1.19 ± 0.10 ^a | 4.00 ± 0.00 ^a | 100 ± 0.00 ^a | 31.67 ± 1.64 ^a |
| 14. SBCFs14 | 1.03 ± 0.08 ^a | 4.00 ± 0.41 ^a | 50 ± 0.29 ^a | 21.67 ± 0.94 ^a |
| 15. SBCFs15 | 1.19 ± 0.10 ^a | 3.75 ± 0.85 ^a | 75 ± 0.25 ^a | 15.00 ± 1.44 ^a |
| 16. SBCFs16 | 1.19 ± 0.14 ^a | 3.50 ± 0.29 ^a | 75 ± 0.25 ^a | 20.00 ± 0.32 ^a |
| 17. SBCFs17 | 1.19 ± 0.00 ^a | 4.00 ± 0.00 ^a | 75 ± 0.25 ^a | 40.00 ± 1.39 ^a |
| 18. SBCFs18 | 1.27 ± 0.08 ^a | 3.75 ± 0.48 ^a | 100 ± 0.00 ^a | 32.50 ± 1.57 ^a |
| 19. SBCFs26 | 1.31 ± 0.15 ^a | 4.25 ± 0.63 ^a | 50 ± 0.29 ^a | 13.33 ± 0.78 ^a |
| 20. SBCFs31 | 1.13 ± 0.20 ^a | 4.00 ± 0.41 ^a | 25 ± 0.25 ^a | 31.67 ± 1.60 ^a |
| 21. SBCFs45 | 1.07 ± 0.07 ^a | 3.50 ± 0.50 ^a | 75 ± 0.25 ^a | 40.00 ± 0.93 ^a |
| 22. SBCFs46 | 1.13 ± 0.15 ^a | 3.50 ± 0.64 ^a | 50 ± 0.29 ^a | 11.67 ± 1.11 ^a |
| 23. SBCFs47 | 1.25 ± 0.11 ^a | 4.50 ± 0.50 ^a | 100 ± 0.00 ^a | 24.00 ± 1.04 ^a |
| 24. SBCFs48 | 1.07 ± 0.07 ^a | 4.00 ± 0.00 ^a | 75 ± 0.25 ^a | 38.33 ± 0.60 ^a |
| 25. SBCFs49 | 1.27 ± 0.21 ^a | 5.25 ± 0.48 ^a | 100 ± 0.00 ^a | 17.50 ± 0.29 ^a |
| 26. SBCFs50 | 1.13 ± 0.11 ^a | 3.50 ± 0.29 ^a | 75 ± 0.25 ^a | 31.67 ± 1.18 ^a |
| 27. <i>T. h.</i> + <i>B. s.</i> | 1.25 ± 0.18 ^a | 4.25 ± 0.25 ^a | 100 ± 0.00 ^a | 8.33 ± 0.29 ^a |
| 28. Testigo | 1.25 ± 0.15 ^a | 4.00 ± 0.41 ^a | 75 ± 0.25 ^a | 40.00 ± 2.29 ^a |
| C.V. | 22.14 | 9.83 | 14.63 | 40.14 |

[†]Letras diferentes por columna son significativamente distintas (Duncan ≤ 0.05). [‡]Datos transformados con $\sqrt{x + 1}$. C.V.= coeficiente de variación. TEH= tasa de emergencia de hojas, NHM= número de hojas marchitas, INC= incidencia, NR= porcentaje de necrosis en raíz, SBCFs= aislamiento de *Fusarium* proveniente de agave de San Baltazar Chichicapam.

Cuadro 9.5. Variables morfométricas de plantas de *A. potatorum* infectadas con *Fusarium* spp. a los 126 d.

| Tratamiento | DT [†] (cm) | LR [‡] (cm) |
|---------------------------------|----------------------------|---------------------------|
| 1. SBCFs1 | 1.88 ± 0.04 ^{bcd} | 18.00 ± 0.27 ^a |
| 2. SBCFs2 | 1.97 ± 0.24 ^{bcd} | 8.13 ± 1.03 ^a |
| 3. SBCFs3 | 2.11 ± 0.06 ^{bcd} | 16.93 ± 0.37 ^a |
| 4. SBCFs4 | 1.93 ± 0.14 ^{bcd} | 23.76 ± 0.41 ^a |
| 5. SBCFs5 | 2.85 ± 0.73 ^a | 9.70 ± 1.20 ^a |
| 6. SBCFs6 | 2.31 ± 0.30 ^{ab} | 17.10 ± 0.20 ^a |
| 7. SBCFs7 | 1.70 ± 0.27 ^{cd} | 18.83 ± 0.23 ^a |
| 8. SBCFs8 | 1.96 ± 0.13 ^{bcd} | 17.00 ± 0.34 ^a |
| 9. SBCFs9 | 2.05 ± 0.13 ^{bcd} | 14.83 ± 0.16 ^a |
| 10. SBCFs10 | 1.58 ± 0.19 ^d | 15.00 ± 0.26 ^a |
| 11. SBCFs11 | 1.89 ± 0.13 ^{bcd} | 16.90 ± 0.11 ^a |
| 12. SBCFs12 | 1.72 ± 0.18 ^{cd} | 17.53 ± 0.16 ^a |
| 13. SBCFs13 | 1.88 ± 0.09 ^{bcd} | 17.23 ± 0.24 ^a |
| 14. SBCFs14 | 1.88 ± 0.11 ^{bcd} | 11.67 ± 0.82 ^a |
| 15. SBCFs15 | 1.94 ± 1.16 ^{bcd} | 18.33 ± 0.32 ^a |
| 16. SBCFs16 | 1.81 ± 0.10 ^{bcd} | 16.17 ± 0.05 ^a |
| 17. SBCFs17 | 1.73 ± 0.06 ^{bcd} | 19.43 ± 0.28 ^a |
| 18. SBCFs18 | 1.72 ± 0.03 ^{cd} | 15.50 ± 0.06 ^a |
| 19. SBCFs26 | 1.92 ± 0.14 ^{bcd} | 17.33 ± 0.10 ^a |
| 20. SBCFs31 | 1.88 ± 0.12 ^{bcd} | 19.33 ± 0.10 ^a |
| 21. SBCFs45 | 1.89 ± 0.06 ^{bcd} | 14.90 ± 0.04 ^a |
| 22. SBCFs46 | 1.64 ± 0.15 ^{cd} | 15.00 ± 0.12 ^a |
| 23. SBCFs47 | 2.19 ± 0.03 ^{bc} | 21.51 ± 0.50 ^a |
| 24. SBCFs48 | 1.82 ± 0.03 ^{bcd} | 19.47 ± 0.30 ^a |
| 25. SBCFs49 | 1.65 ± 0.00 ^{cd} | 12.50 ± 0.07 ^a |
| 26. SBCFs50 | 1.78 ± 0.12 ^{bcd} | 21.53 ± 0.43 ^a |
| 27. <i>T. h.</i> + <i>B. s.</i> | 1.72 ± 0.03 ^{cd} | 13.67 ± 0.04 ^a |
| 28. Testigo | 1.93 ± 0.33 ^{bcd} | 15.67 ± 0.18 ^a |
| C.V. | 6.64 | 14.29 |

[†]Letras diferentes por columna son significativamente distintas (Duncan≤0.05). [‡]Datos transformados con $\sqrt{x + 1}$. C.V.= coeficiente de variación. DT= diámetro de roseta, LR= longitud de raíz, SBCFs= aislamiento de *Fusarium* proveniente de agave de San Baltazar Chichicapam.

Cuadro 9.6. Biomasa seca de plantas de *A. potatorum* infectadas con *Fusarium* spp.

| Tratamiento | BSA (g) | BSR (g) | BST |
|---------------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 1. SBCFs1 | 1.81 ± 0.14 ^{a†} | 0.27 ± 0.05 ^a | 2.08 ± 0.17 ^a |
| 2. SBCFs2 | 2.02 ± 0.30 ^a | 0.19 ± 0.05 ^a | 2.22 ± 0.34 ^a |
| 3. SBCFs3 | 2.15 ± 0.30 ^a | 0.23 ± 0.08 ^a | 2.38 ± 0.38 ^a |
| 4. SBCFs4 | 1.45 ± 0.20 ^a | 0.22 ± 0.03 ^a | 1.67 ± 0.24 ^a |
| 5. SBCFs5 | 1.86 ± 0.31 ^a | 0.27 ± 0.07 ^a | 2.13 ± 0.38 ^a |
| 6. SBCFs6 | 1.35 ± 0.28 ^a | 0.13 ± 0.05 ^a | 1.48 ± 0.33 ^a |
| 7. SBCFs7 | 1.83 ± 0.50 ^a | 0.23 ± 0.08 ^a | 2.06 ± 0.58 ^a |
| 8. SBCFs8 | 1.43 ± 0.13 ^a | 0.17 ± 0.02 ^a | 1.60 ± 0.11 ^a |
| 9. SBCFs9 | 1.61 ± 0.25 ^a | 0.17 ± 0.05 ^a | 1.78 ± 0.30 ^a |
| 10. SBCFs10 | 1.29 ± 0.21 ^a | 0.19 ± 0.04 ^a | 1.48 ± 0.22 ^a |
| 11. SBCFs11 | 1.27 ± 0.14 ^a | 0.16 ± 0.01 ^a | 1.43 ± 0.13 ^a |
| 12. SBCFs12 | 1.48 ± 0.33 ^a | 0.24 ± 0.07 ^a | 1.72 ± 0.39 ^a |
| 13. SBCFs13 | 1.48 ± 0.27 ^a | 0.13 ± 0.01 ^a | 1.61 ± 0.27 ^a |
| 14. SBCFs14 | 1.73 ± 0.12 ^a | 0.29 ± 0.11 ^a | 2.02 ± 0.21 ^a |
| 15. SBCFs15 | 1.41 ± 0.27 ^a | 0.18 ± 0.06 ^a | 1.59 ± 0.32 ^a |
| 16. SBCFs16 | 1.34 ± 0.24 ^a | 0.19 ± 0.05 ^a | 1.52 ± 0.28 ^a |
| 17. SBCFs17 | 1.23 ± 0.20 ^a | 0.20 ± 0.04 ^a | 1.43 ± 0.23 ^a |
| 18. SBCFs18 | 1.41 ± 0.24 ^a | 0.20 ± 0.07 ^a | 1.60 ± 0.30 ^a |
| 19. SBCFs26 | 1.50 ± 0.18 ^a | 0.20 ± 0.01 ^a | 1.69 ± 0.19 ^a |
| 20. SBCFs31 | 1.61 ± 0.07 ^a | 0.22 ± 0.05 ^a | 1.83 ± 0.07 ^a |
| 21. SBCFs45 | 1.56 ± 0.13 ^a | 0.17 ± 0.03 ^a | 1.73 ± 0.16 ^a |
| 22. SBCFs46 | 1.15 ± 0.12 ^a | 0.13 ± 0.04 ^a | 1.28 ± 0.09 ^a |
| 23. SBCFs47 | 1.96 ± 0.17 ^a | 0.20 ± 0.05 ^a | 2.16 ± 0.22 ^a |
| 24. SBCFs48 | 1.77 ± 0.12 ^a | 0.21 ± 0.04 ^a | 1.98 ± 0.09 ^a |
| 25. SBCFs49 | 1.25 ± 0.24 ^a | 0.16 ± 0.03 ^a | 1.42 ± 0.27 ^a |
| 26. SBCFs50 | 1.55 ± 0.22 ^a | 0.21 ± 0.03 ^a | 1.76 ± 0.26 ^a |
| 27. <i>T. h.</i> + <i>B. s.</i> | 1.54 ± 0.13 ^a | 0.19 ± 0.01 ^a | 1.73 ± 0.14 ^a |
| 28. Testigo | 1.75 ± 0.44 ^a | 0.21 ± 0.01 ^a | 1.96 ± 0.44 ^a |
| C.V. | 27.05 | 44.76 | 27.62 |

[†]Letras diferentes por columna son significativamente distintas (Duncan≤0.05). C.V.= coeficiente de variación. BSA= biomasa seca del área foliar, BSR= biomasa seca radicular, BST= biomasa seca total, SBCFs= aislamiento de *Fusarium* proveniente de agave de San Baltazar Chichicapam.

Cuadro 9.7. Correlación de variables evaluadas en las pruebas de patogenicidad de aislamientos de *Fusarium* spp. en *A. potato*rum.

| | TEH | NHM | INC | NR | DT | LRZ | BSA | BSR | BT |
|-----|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| TEH | 1.00 ^{ns} | 0.22 [*] | -0.16 ^{ns} | 0.01 ^{ns} | 0.27 [*] | -0.09 ^{ns} | 0.05 ^{ns} | 0.14 ^{ns} | 0.00 ^{ns} |
| NHM | 0.22 [*] | 1.00 ^{ns} | 0.85 ^{**} | 0.15 ^{ns} | 0.17 ^{ns} | -0.10 ^{ns} | 0.03 ^{ns} | 0.25 [*] | 0.30 ^{**} |
| INC | -0.16 ^{ns} | 0.85 ^{**} | 1.00 ^{ns} | 0.18 ^{ns} | 0.01 ^{ns} | -0.09 ^{ns} | 0.04 ^{ns} | 0.13 ^{ns} | 0.29 ^{**} |
| NR | 0.01 ^{ns} | 0.15 ^{ns} | 0.18 ^{ns} | 1.00 ^{ns} | 0.06 ^{ns} | 0.07 ^{ns} | 0.17 ^{ns} | 0.16 ^{ns} | 0.10 ^{ns} |
| DT | 0.27 [*] | 0.17 ^{ns} | 0.01 ^{ns} | 0.06 ^{ns} | 1.00 ^{ns} | -0.01 ^{ns} | 0.21 ^{ns} | 0.46 ^{**} | 0.16 ^{ns} |
| LRZ | -0.09 ^{ns} | -0.10 ^{ns} | -0.09 ^{ns} | 0.07 ^{ns} | -0.01 ^{ns} | 1.00 ^{ns} | 0.38 ^{**} | -0.42 ^{**} | -0.01 ^{ns} |
| BSA | 0.05 ^{ns} | 0.03 ^{ns} | 0.04 ^{ns} | 0.17 ^{ns} | 0.21 ^{ns} | 0.38 ^{**} | 1.00 ^{ns} | -0.31 ^{**} | -0.24 [*] |
| BSR | 0.14 ^{ns} | 0.25 [*] | 0.13 ^{ns} | 0.16 ^{ns} | 0.46 ^{**} | -0.42 ^{**} | -0.31 ^{**} | 1.00 ^{ns} | 0.44 ^{**} |
| BT | 0.00 ^{ns} | 0.30 ^{**} | 0.29 ^{**} | 0.10 ^{ns} | 0.16 ^{ns} | -0.01 ^{ns} | -0.24 [*] | 0.44 ^{**} | 1.00 ^{ns} |

^{ns} = correlación no significativa, ^{*} = significativa, ^{**} = altamente significativa, TEH= tasa de emergencia de hojas, NHM= número de hojas marchitas, INC= incidencia, NR= necrosis en raíz, DT= diámetro del tallo, LRZ= longitud de raíz, BSA= biomasa seca aérea, BSR= biomasa seca radicular, BT= biomasa total.

Cuadro 9.8. Halo de degradación de la actividad pectinasa de *Fusarium* spp. aislados de agave tobalá.

| Aislamiento | 24h (mm) | 48h (mm) | 72h (mm) |
|-------------|---------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| 1. SBCFs1 | 1.64 ± 0.17 ^{fg} | 4.48 ± 0.21 ^f | 7.18 ± 0.42 ^{bcdefg} |
| 2. SBCFs2 | 2.50 ± 0.28 ^{ab} | 6.72 ± 0.26 ^{ab} | 7.74 ± 0.28 ^{bcdef} |
| 3. SBCFs3 | 2.50 ± 0.07 ^{ab} | 5.02 ± 0.35 ^{cdef} | 6.68 ± 0.39 ^{cdefg} |
| 4. SBCFs4 | 2.00 ± 0.11 ^{bcdefg} | 5.80 ± 0.14 ^{bcde} | 6.44 ± 0.27 ^{defg} |
| 5. SBCFs5 | 1.96 ± 0.07 ^{bcdefgh} | 5.04 ± 0.15 ^{cdef} | 6.22 ± 0.39 ^{efg} |
| 6. SBCFs6 | 1.64 ± 0.09 ^{fg} | 4.24 ± 0.31 ^f | 7.34 ± 0.45 ^{bcdefg} |
| 7. SBCFs7 | 1.80 ± 0.10 ^{cdefghi} | 4.64 ± 0.19 ^{ef} | 6.48 ± 0.56 ^{defg} |
| 8. SBCFs8 | 1.78 ± 0.09 ^{defghi} | 5.16 ± 0.16 ^{cdef} | 7.82 ± 0.27 ^{bcdef} |
| 9. SBCFs9 | 2.28 ± 0.14 ^{bcdef} | 5.42 ± 0.26 ^{cdef} | 8.14 ± 0.33 ^{bcd} |
| 10. SBCFs10 | 1.68 ± 0.17 ^{fg} | 4.28 ± 0.40 ^f | 7.38 ± 0.32 ^{bcdefg} |
| 11. SBCFs11 | 1.88 ± 0.06 ^{bcdefghi} | 4.70 ± 0.15 ^{def} | 7.94 ± 0.60 ^{bcde} |
| 12. SBCFs12 | 2.46 ± 0.10 ^{abc} | 6.10 ± 0.26 ^{bc} | 7.94 ± 0.46 ^{bode} |
| 13. SBCFs13 | 1.68 ± 0.07 ^{fg} | 6.08 ± 0.04 ^{bc} | 8.74 ± 0.36 ^b |
| 14. SBCFs14 | 1.60 ± 0.08 ^{gh} | 4.54 ± 0.21 ^f | 7.52 ± 0.32 ^{bcdefg} |
| 15. SBCFs15 | 1.68 ± 0.16 ^{fg} | 6.72 ± 0.21 ^{ab} | 7.82 ± 0.14 ^{bcdef} |
| 16. SBCFs16 | 1.82 ± 0.12 ^{cdefghi} | 5.40 ± 0.14 ^{cdef} | 6.56 ± 0.30 ^{cdefg} |
| 17. SBCFs17 | 1.32 ± 0.14 ^{hi} | 5.32 ± 0.17 ^{cdef} | 6.06 ± 0.23 ^{fg} |
| 18. SBCFs18 | 3.12 ± 0.07 ^a | 7.56 ± 0.45 ^a | 7.24 ± 0.41 ^{bcdefg} |
| 19. SBCFs26 | 1.80 ± 0.14 ^{cdefghi} | 5.84 ± 0.09 ^{bcde} | 7.96 ± 0.31 ^{bode} |
| 20. SBCFs31 | 1.26 ± 0.07 ⁱ | 6.90 ± 0.12 ^{ab} | 8.12 ± 0.25 ^{bcd} |
| 21. SBCFs45 | 1.44 ± 0.07 ^{gh} | 5.86 ± 0.17 ^{bcd} | 6.86 ± 0.29 ^{cdefg} |
| 22. SBCFs46 | 2.42 ± 0.16 ^{bcd} | 6.14 ± 0.14 ^{bc} | 8.34 ± 0.20 ^{bc} |
| 23. SBCFs47 | 2.38 ± 0.16 ^{bcde} | 5.88 ± 0.20 ^{bcd} | 7.34 ± 0.16 ^{bcdefg} |
| 24. SBCFs48 | 1.40 ± 0.08 ^{gh} | 4.96 ± 0.20 ^{cdef} | 5.88 ± 0.26 ^g |
| 25. SBCFs49 | 1.72 ± 0.14 ^{efghi} | 6.66 ± 0.14 ^{ab} | 7.20 ± 0.36 ^{bcdefg} |
| 26. SBCFs50 | 2.02 ± 0.10 ^{bcdefg} | 5.26 ± 0.27 ^{cdef} | 10.96 ± 0.17 ^a |
| C.V. | 14.78 | 9.08 | 10.35 |

†Letras diferentes por columna son significativamente distintas (Tukey≤0.05). C.V.= coeficiente de variación. SBCFs= aislamiento de *Fusarium* proveniente de agave de San Baltazar Chichicapam.

Cuadro 9.9. Identificación taxonómica de aislamientos de *Fusarium* spp.

| Aislamiento | Especie |
|-------------|---------------------------|
| 1 | <i>F. oxysporum</i> |
| 2 | <i>F. subglutinans</i> |
| 3 | <i>F. oxysporum</i> |
| 4 | <i>F. oxysporum</i> |
| 5 | <i>F. oxysporum</i> |
| 6 | <i>F. oxysporum</i> |
| 7 | <i>F. oxysporum</i> |
| 8 | <i>F. oxysporum</i> |
| 9 | <i>F. oxysporum</i> |
| 10 | <i>F. solani</i> |
| 11 | <i>F. oxysporum</i> |
| 12 | <i>F. oxysporum</i> |
| 13 | <i>F. polyphialidicum</i> |
| 14 | <i>F. verticilloides</i> |
| 15 | <i>F. oxysporum</i> |
| 16 | <i>F. oxysporum</i> |
| 17 | <i>F. oxysporum</i> |
| 18 | <i>F. oxysporum</i> |
| 26 | <i>F. oxysporum</i> |
| 31 | <i>F. oxysporum</i> |
| 45 | <i>F. solani</i> |
| 46 | <i>F. oxysporum</i> |
| 47 | <i>F. oxysporum</i> |
| 48 | <i>F. solani</i> |
| 49 | <i>F. solani</i> |
| 50 | <i>F. solani</i> |

SBCFs= aislamiento de *Fusarium* de San Baltazar Chichicapam.