

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO PARASITOLOGÍA



Efecto de la Deshidratación Agrícola de Hijuelos Calibre Toronja de *Agave tequilana* var. Azul W. en la Dinámica de la Carga de Inoculo Interna y Externa de *Fusarium* spp. y *Trichoderma* spp.

Por:

ANGEL AGUSTIN CAMPOS CRUCES

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

Saltillo, Coahuila, México.

Junio 2024

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO PARASITOLOGÍA

Efecto de la Deshidratación Agrícola de Hijuelos Calibre Toronja de *Agave tequilana* var. Azul W. en la Dinámica de la Carga de Inoculo Interna y Externa de *Fusarium* spp. y *Trichoderma* spp.

Por:

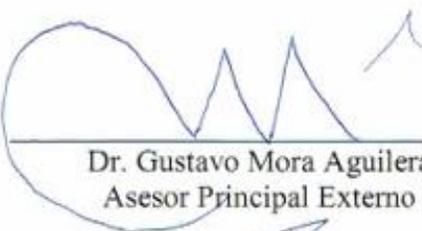
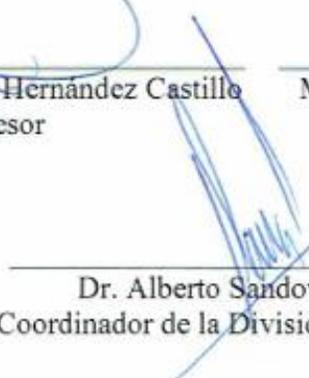
ANGEL AGUSTIN CAMPOS CRUCES

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

Aprobada por el Comité de Asesoría:

 _____ Dr. Gabriel Gallegos Morales Asesor Principal	 _____ Dr. Gustavo Mora Aguilera Asesor Principal Externo
 _____ Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo Coasesor	 _____ M.C. Jesús Eduardo Ramírez Méndez Coasesor
 _____ Dr. Alberto Sandoval Rangel Coordinador de la División de Agronomía	



Saltillo, Coahuila, México.

Junio 2024

DECLARACIÓN DE NO PLAGIO

EL autor quien es el responsable directo, jura bajo protesta de decir verdad que no se incurrió en plagio o conducta académica incorrecta en los siguientes aspectos:

Reproducción de fragmentos o textos sin citar la fuente o autor original (copiar y pegar); reproducir un texto propio publicado anteriormente sin hacer referencia al documento original (autor plagio); comprar, robar o pedir prestados los datos o la tesis para presentarla como propia; omitir referencias bibliográficas o citar textualmente sin usar comillas; utilizar ideas o razonamientos de un autor sin citarlo; utilizar material digital como imágenes, videos, ilustraciones, graficas, mapas o datos sin citar al autor original y/o fuente, así mismo tengo conocimiento de que cualquier uso distinto de estos materiales como el lucro, reproducción, edición o modificación será perseguido y sancionado por las autoridades correspondientes.

Por lo anterior me responsabilizo de las consecuencias de cualquier tipo de plagio en caso de existir y declaro que este trabajo es original

PASANTE:

Angel Agustin

Angel Agustin Campos Cruces

Nombre y Firma

AGRADECIMIENTOS

- A mi alma mater, la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, por su papel formativo en mi vida, no solo en el rubro académico, sino también en el personal. Que mi desarrollo profesional sea la culminación de la retribución a su papel en mi vida.
- Al Dr. Gustavo Mora Aguilera, por haberme dado la oportunidad de mostrarle de lo que soy capaz, brindándome su confianza, mentoría e inspiración de lo que un investigador integral es capaz de hacer con dedicación y disciplina.
- Al Dr. Gabriel Gallegos Morales por el apoyo y comprensión brindado para la culminación de esta tesis.
- Al M.C. Ramon Rubio Cortes por su disposición, apoyo técnico y conocimientos compartidos en el desarrollo de esta investigación.
- A la M.C. Coral Mendoza Ramos por su invaluable apoyo, disposición a la enseñanza de las diferentes metodologías y solidaridad en el desarrollo de esta investigación.
- Al equipo de LANREF: Gerardo y Oscar, por su apoyo técnico científico y solidaridad en el desarrollo de esta investigación. En especial a Erandy y Elizabeth por su apoyo durante la colecta y procesamiento de hijuelos.

DEDICATORIA

- A Dios, por su magnanimidad, las innumerables bendiciones que me ha brindado. A Él le debo todo lo que soy y seré.
- A mi mamá, por su apoyo incondicional y amor inconmensurable, sin la cual no sería quien soy. No podría haber sido bendecido con mayor regalo que tenerte como mamá.
- A mi hermano Agustín, por siempre estar a mi lado, apoyarme e impulsarme a alcanzar nuevas metas. Siempre juntos contra todo.
- A mi tía Blanca, por su apoyo emocional, por siempre haberse preocupado por mi bienestar y darme un abrazo reparador cuando lo necesite.
- A mis abuelitos, Bernardino y Natalia, por su papel crucial en mi crianza y formación como hombre de bien, por siempre apoyarme y amarme.
- A mi amor, Regina, quien llegó a mi vida en el momento adecuado y ha sido un pilar de luz en ella. Gracias por siempre escucharme y amarme.
- A mi yo del pasado, este trabajo es la prueba de tu potencial y de que lo que alguna vez creíste, es cierto.
- A mi yo del futuro, que este trabajo sea tu estándar mínimo de lo que puedes hacer. Constancia y Disciplina.

INDICE DE CONTENIDO

DECLARACIÓN DE NO PLAGIO	III
AGRADECIMIENTOS	IV
DEDICATORIA	V
INDICE DE CONTENIDO.....	VI
INDICE DE CUADROS.....	X
INDICE DE FIGURAS.....	XI
RESUMEN.....	XVI
ABSTRACT	XVIII
1.- INTRODUCCION.....	1
2.- HIPÓTESIS.....	3
3.- OBJETIVO PRINCIPAL.....	3
3.1.- OBJETIVOS SECUNDARIOS	3
4.- REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
4.1 <i>Agave tequilana</i> var. Azul W.: Planta y Cultivo.....	4
4.1.1 Requerimientos agroecológicos de <i>Agave tequilana</i> var. Azul W.	4
4.1.2 Adaptaciones Morfo-fisiológicas de <i>Agave tequilana</i> var. Azul W.	4
4.1.3.- Importancia <i>Agave tequilana</i> var. Azul W.....	6
4.1.4.- Zona de Denominación de Origen del Tequila (DOT).....	7
4.2.- Propagación <i>Agave tequilana</i> var. Azul W.....	8
4.2.1.- Propagación Sexual.....	8
4.2.2.- Propagación Asexual	8
4.2.3.- Arranque de hijuelos de <i>Agave tequilana</i> var. Azul W.....	9
4.2.4.- Manejo de material propagativo: Caso banano (<i>Musa paradisiaca</i>).....	12
4.3.- <i>Fusarium</i> spp.: Hongo-Patógeno	14
4.3.1. Importancia del género <i>Fusarium</i>	14
4.3.2. Ecología y sobrevivencia a la deshidratación de <i>Fusarium</i> spp.	15
4.3.3.- Inductividad <i>Fusarium</i> spp.....	16
4.3.4 Supresividad a <i>Fusarium</i> spp.....	17
4.3.5.- Ciclo de vida de <i>Fusarium</i> spp.....	17
4.3.6.- Técnicas moleculares aplicadas a la taxonomía de <i>Fusarium</i> spp.	19
4.3.7.- Genoma y evolución de <i>Fusarium</i> spp.	20

4.3.8.- Fisiopatías resultantes de la interacción de <i>Agave tequilana</i> Weber var. Azul- <i>Fusarium</i> spp.	21
4.4.- Síndrome de Marchitez y Pudrición del cogollo de <i>Agave tequilana</i> (SMAP) ...	23
4.4.1.- Sintomatología del Síndrome de la Marchitez y Pudrición del cogollo de <i>Agave tequilana</i>	23
4.4.2.- Factores que inciden en el Síndrome de la Marchitez y Pudrición del cogollo de <i>Agave tequilana</i>	23
4.4.3.- Agente causal del Síndrome de Marchitez y Pudrición del cogollo de <i>Agave tequilana</i> : <i>Fusarium</i> spp.	24
4.4.4.- Interacción Evolutiva-Adaptativa-Parasítica entre <i>Fusarium</i> spp.- <i>Agave tequilana</i>	27
4.4.5.- Manejo Integrado del Síndrome de la Marchitez y Pudrición del cogollo de <i>Agave tequilana</i>	28
4.5.- Asociación de <i>Fusarium</i> spp. con hijuelos de <i>Agave tequilana</i>	30
4.5.1.- Método CIFUSAG y Estimación de carga de inóculo de <i>Fusarium</i> spp. en tejido externo fresco de hijuelos <i>Agave tequilana</i>	30
4.5.2.- Carga de Inóculo de <i>Fusarium</i> spp. en Tejido Interno Fresco de Hijuelo	32
4.5.3.- Variabilidad de <i>Fusarium</i> spp. en Tejido Externo e Interno de Hijuelos	33
4.6.- <i>Trichoderma</i> spp.	35
4.6.1.- Mecanismos de Control Biológico de <i>Trichoderma</i> spp.:	35
4.6.2.- Interacciones Bióticas Benéficas de <i>Trichoderma</i> spp.	37
4.6.3.- <i>Trichoderma</i> spp. como endófitos simbioses de plantas	37
4.6.4.- Sobrevivencia a la Deshidratación de <i>Trichoderma</i> spp.....	38
5.- METODOLOGÍA.....	39
5.1.- Criterios de selección y datos de predios colectados	39
5.2.- Muestreo de Suelo: Delimitación Foco y Perifoco.	40
5.3.- Colecta de Hijuelos Calibre Toronja.....	41
5.4.- Obtención muestra de Carga Inóculo Externo (CIE) <i>In situ</i>	43
5.5.- Procesamiento de Hijuelos (Frescos-Deshidratados), Deshidratación y Muestra de CIE <i>Deshidratada</i>	45
5.7.- Macerado de Tejido Interno y obtención de muestra de Carga de Inóculo Interno <i>Deshidratada</i> (CII).....	48
5.8.- Siembra del Sobrenadante del Macerado de Tejido Interno (CII).....	49
5.9.- Siembra de Muestras CIE (<i>In situ</i> - <i>Deshidratada</i>)	49
5.10.- Purificación y conservación de aislamientos putativas a <i>Bacillus</i> spp.....	49

5.11.- Purificación de Organismos Fúngicos por Punta de Hifa.....	50
5.12.- Obtención de cultivos Monosporicos	50
5.13.- Métodos de conservación	50
5.14.- Caracterización Cultural	52
5.15.- Extracción de ADN, PCR y Secuenciación	53
5.16.- Factores y Variables del Análisis Experimental	54
5.17.- Análisis Estadístico	54
6.- RESULTADOS	56
6.1.- Efecto de la deshidratación de 14 días en hijuelos de <i>Agave tequilana</i> Calibre Toronja.....	56
6.2.- Carga de Inoculo Interno (CII) en hijuelos de <i>Agave tequilana</i> post-deshidratación:	59
6.2.1- Presencia de <i>Fusarium</i> spp. y <i>Trichoderma</i> spp. en hijuelos de <i>Agave tequilana</i> post-deshidratación:	61
6.2.2.- Prevalencia de <i>Fusarium</i> spp. y <i>Trichoderma</i> spp. en tejido interno de hijuelos de <i>Agave tequilana</i> post-deshidratación:	66
6.2.3.- Identificación de complejos/especies de <i>Fusarium</i> spp. endófitos sobrevivientes a la deshidratación en hijuelos de <i>Agave tequilana</i> y su patogenicidad en otros cultivos en México:	72
6.2.4.- Reportes previos en <i>Agave tequilana</i> de los complejos/especies de <i>Fusarium</i> spp. endófitos sobrevivientes a la deshidratación.....	77
6.3.- Carga de Inoculo Externo (CIE) <i>In situ</i> -Deshidratado de <i>Fusarium</i> spp. en suelo adherido a hijuelos de <i>Agave tequilana</i> :.....	79
6.3.1.- Carga de Inoculo Externo de <i>Fusarium</i> spp. (<i>In situ</i> /deshidratado): UFC <i>Fusarium</i> spp. e Índice de <i>Fusarium</i> spp.....	81
6.3.2.- Especies más prevalentes de <i>Fusarium</i> spp. en muestras de suelo adherido a hijuelos de <i>Agave tequilana</i> (CIE) en muestras <i>In situ</i> y deshidratadas.....	91
6.3.3.- Inductividad potencial de los aislamientos más prevalentes de <i>Fusarium</i> spp. en muestras de CIE hijuelos de <i>Agave tequilana</i> , con base en los factores experimentales	98
6.3.4.- Identificación de complejos y especies de <i>Fusarium</i> spp. más prevalentes en muestras de CIE <i>In situ</i> y su incidencia en la Rizosfera de otros cultivos en México:	101
6.3.5.- Identificación de complejos y especies de <i>Fusarium</i> spp. más prevalentes en muestras de CIE <i>Deshidratada</i> y su plasticidad adaptativa-saprofítica:.....	106
6.4.- <i>Trichoderma</i> spp. en muestras <i>In situ</i> /Deshidratadas de CIE de hijuelos calibre Toronja de <i>Agave tequilana</i>	111

6.4.1.- Relación de la presencia de <i>Trichoderma</i> spp. y las especies <i>Fusarium</i> spp. más prevalentes en muestras de CIE <i>In situ</i> / Deshidratadas	114
7.-CONCLUSIONES	119
8.- BIBLIOGRAFIA	122
9.-ANEXOS	139
9.1.- Medios de Cultivo empleados:.....	139
9.2.- Organismos monospóricos conservados:.....	140

INDICE DE CUADROS

Cuadro 4.1: Reportes de organismos asociados al Síndrome de la Marchitez y pudrición del cogollo del Agave tequilana (SMAP).	26
Cuadro 5.2.-: Criterios de Selección y Datos de Predios Colectados en la Colecta de Hijuelos Toronja 2021	39
Cuadro 6.3: Reportes en tejido de Agave tequilana de especies de <i>Fusarium</i> spp. sobrevivientes a la deshidratación en tejido interno de hijuelos calibre Toronja.....	77
Cuadro 9.4.- 7 aislamientos monospóricas de <i>Fusarium</i> spp. conservadas a partir de siembras de Muestras de Suelo:	140
Cuadro 9.5.- 8 aislamientos monospóricas de <i>Trichoderma</i> spp. conservadas a partir de siembras de Muestras de Suelo:.....	140
Cuadro 9.6.- 24 aislamientos monospóricas de <i>Fusarium</i> spp. conservadas a partir de siembras de Sobrenadante del Macerado de Tejido Interno:	141
Cuadro 9.7.- 2 aislamientos monospóricas de <i>Trichoderma</i> spp. conservadas a partir de siembras de Sobrenadante del Macerado de Tejido Interno:	142
Cuadro 9.8.- 116 aislamientos monospóricas de <i>Fusarium</i> spp conservadas a partir de siembras de Muestras de CIE:	143
Cuadro 9.9: 11 aislamientos monospóricas de <i>Trichoderma</i> spp conservadas a partir de siembras de Muestras de CIE:	147

INDICE DE FIGURAS

Figura 4.1: Clasificación taxonómica de Agave tequilana var. Azul.	4
Figura 4.2: Ilustración y Descripción botánica de Agave tequilana Weber var. Azul.	5
Figura 4.3: Consumo Anual de Agave tequilana (miles de toneladas) como materia prima para la producción de Tequila y Volumen de Producción Anual de Tequila (millones de litros). Fuente: Datos del CRT, 2024.	6
Figura 4.4: Estados y municipios que comprenden la Zona de Denominación de Origen del Tequila (DOT).	7
Figura 4.5: Órganos de propagación asexual de Agave tequilana: (A) Bulbillos e (B) Hijuelos.	8
Figura 4.6: Superficie de Agave tequilana plantada por año (miles de ha.) y estimación de hijuelos (millones de hijuelos) empleados a nivel nacional para su establecimiento; considerando una densidad de siembra de 3,200 hijuelos/ha. Fuente de sup. plantada: SIAP,2024.	10
Figura 4.7: Parámetros de longitud y tamaño de piña empleados para la clasificación de hijuelos de Agave tequilana por calibres (Vicente y Del Real, 2007).	11
Figura 4.8: Clasificación taxonómica del género Fusarium spp.	14
Figura 4.9: Representación esquemática de la filogenia de 23 complejos especies de Fusarium spp. de importancia económica. Numero entre paréntesis indica las especies filogenéticas agrupadas por complejo (300 total). Se resaltan complejos de especies de Fusarium spp. reportados en Agave tequilana. (Modificado: O'Donnell et al., 2015).	22
Figura 4.10: Complejos y Especies de Fusarium spp. reportadas asociadas a Agave tequilana.	25
Figura 4.11: Complejos y Especies de Fusarium spp. reportadas en suelo adherido a hijuelos de Agave tequilana (Mendoza-Ramos et al., 2020).	31
Figura 4.12: Complejos y Especies de Fusarium spp. reportadas en tejido interno de hijuelos de Agave tequilana (Mendoza-Ramos et al., 2020).	32
Figura 4.13: Ciclo de infección de Fusarium spp. en tejido interno de hijuelo propuesto por Mendoza-Ramos. Fuente: Mendoza-Ramos, 2020	33
Figura 4.14: Clasificación taxonómica del género Trichoderma spp.	35
Figura 5.15: Ubicación geográfica de los 8 predios colectados.	40
Figura 5.16: Delimitación y Muestreo secciones de Foco y Perifoco.	41
Figura 5.17: Metodología de Arranque y Tostoneo de hijuelos Agave tequilana Calibre Toronja. A-B) Arranque de Hijuelo con Barretón, C-D) Tostoneo de Hijuelos con machete, E) Etiquetado de Hijuelos y F) Clasificación de Hijuelos en Grupos con base a la obtención de muestra (In situ-Deshidratada).	42
Figura 5.18: Agrupación de Hijuelos por grupo según la cronología de obtención de Muestra de CIE y Sanidad.	43
Figura 5.19: Metodología para la obtención de muestra de Carga de Inoculo Externo (CIE) en grupos de hijuelos correspondientes a lavado In situ, Método CIFUSAG (Mendoza-Ramos et al., 2021). A) Lavado de Base de hojas con Agua Desmineralizada Estéril y cepillo de plástico, B) Homogenización de la muestra empleando un taladro modificado, C) Filtrado de muestra para eliminación de residuos de tejido, D)	

Sedimentación de Muestra (15 min) para separación de fases, E) Eliminación de Fase Acuosa y recuperación de suelo y F) Tubo Falcon de 50 ml con Muestra de CIE para traslado al laboratorio en hielera con geles refrigerantes.....	44
Figura 5.20: Procesamiento y Deshidratación de Hijuelos. A) Medición de peso y diámetro, B) Hijuelos Frescos, C) Exposición a la intemperie durante 14 días para deshidratación y D) Hijuelos Post-Deshidratación.....	45
Figura 5.21: Obtención de Muestra de Tejido Interno de Hijuelo. A) Eliminación de hojas basales deshidratadas, exposición de cuello, B) Seccionamiento transversal del cuello con un machete, C) Corte de hojas apicales y de cogollo, D) Eliminación de tejido externo restante e inclusiones esclerotizadas por daño, E) Pesado de Tejido Interno, F) Fragmentación de Tejido interno para una des infestación eficiente y G-H) Des infestación de Tejido Interno: Inmersión y lavado con Alcohol 70% (2 min.), Cloro 3 % (2 min.) y 3 enjuagues con agua desmineralizada esteril.....	47
Figura 5.22: Macerado de Tejido Interno de Hijuelo y Obtención de muestra de CII. A-B) Establecimiento de proporción de 1 gr de tejido interno: 2 ml de agua desmineralizada estéril en licuadora Blendtec, modelo TB-621-26, C) Macerado a tres mil revoluciones por 60 s, D-E) Tamizado con malla plástica (0.5x0.5 mm) para eliminar el gabazo, F) Sedimentación de muestra obtenida por 15 min., G-H) Toma de muestra de Sobrenadante del Macerado de tejido Interno y recuperación en tubo falcón 50 ml estéril.....	48
Figura 5.23: Métodos de Conservación Organismos Fúngicos (Cepario CP-LANREF). A) Tubo Inclinado (González, et al., 2006), B) Glicerol al 10% (Barbosa, et al., 2009) y C) Silica Gel (Pires-Cunha, et al., 2015).....	51
Figura 6.24: Mediciones (diámetro y peso) de 160 hijuelos calibre Toronja de Agave tequilana, recién arrancados y post-deshidratación (14 días) emulando practica agrícola convencional para reducir pudriciones bacterianas y promover enraizamiento.....	56
Figura 6.25: Carga de Inoculo Interna (CII) 1/2: Caracterización Cultural (anverso y reverso) en medio de cultivo Saboraud de <i>Fusarium</i> spp. (complejo y especie) aislados del sobrenadante del macerado de tejido interno de hijuelos de Agave tequilana deshidratados durante 14 días colectados en predios con Baja incidencia de SMAP. Identificación molecular por: gen EF-1. Foto a los 10 días después de la siembra.....	59
Figura 6.26: Carga de Inoculo Interna (CII) 2/2: Caracterización Cultural (anverso y reverso) en medio de cultivo Saboraud de <i>Fusarium</i> spp. (complejo y especie) aislados del sobrenadante del macerado de tejido interno de hijuelos de Agave tequilana deshidratados durante 14 días colectados en predios con Alta incidencia de SMAP. Identificación molecular por: gen EF-1. Foto a los 10 días después de la siembra.....	60
Figura 6.27: Modelo relacional de hijuelos de Agave tequilana con presencia de Organismos de Interés Agronómico (<i>Fusarium</i> spp. y <i>Trichoderma</i> spp.) sobrevivientes a la deshidratación de 14 días, colectados en predios con Baja incidencia del síndrome de marchitez y pudrición de cogollo (SMAP); con base al diseño experimental planteado. Caracterización cultural (anverso y reverso) en medio de cultivo Saboraud y V8, respectivamente. Foto: 10 días después de la siembra. Identificación molecular: gen EF-1. Numeración correspondiente a caracterización original (Figura 6.25).....	63

Figura 6.28: Modelo relacional de hijuelos de Agave tequilana con presencia de Organismos de Interés Agronómico (<i>Fusarium</i> spp. y <i>Trichoderma</i> spp.) sobrevivientes a la deshidratación de 14 días, colectados en predios con Alta incidencia del SMAP; con base al diseño experimental planteado. Caracterización cultural (anverso y reverso) en medio de cultivo Saboraud y V8, respectivamente. Foto: 10 días después de la siembra. Identificación molecular: gen EF-1. Numeración correspondiente a caracterización original (Figura 6.26).....	65
Figura 6.29: Modelo relacional de numero de hijuelos de Agave tequilana/UFC Organismos de Interés Agronómico (<i>Fusarium</i> spp. y <i>Trichoderma</i> spp.) /Diversidad de Organismos de Interés Agronómico; sobrevivientes a la deshidratación de 14 días, colectados en predios con Baja incidencia del síndrome de marchitez y pudrición de cogollo (SMAP); con base al diseño experimental planteado. Caracterización cultural (anverso y reverso) en medio de cultivo Saboraud y V8, respectivamente. Foto: 10 días después de la siembra. Identificación molecular: gen EF-1. Numeración correspondiente a caracterización original (Figura 6.25).	68
Figura 6.30: Modelo relacional de numero de hijuelos de Agave tequilana/UFC Organismos de Interés Agronómico (<i>Fusarium</i> spp. y <i>Trichoderma</i> spp.) /Diversidad de Organismos de Interés Agronómico; sobrevivientes a la deshidratación de 14 días, colectados en predios con Alta incidencia del síndrome de marchitez y pudrición de cogollo (SMAP); con base al diseño experimental planteado. Caracterización cultural (anverso y reverso) en medio de cultivo Saboraud y V8, respectivamente. Foto: 10 días después de la siembra. Identificación molecular de <i>Fusarium</i> spp. por: gen EF-1. Numeración correspondiente a caracterización original (Figura 6.26).....	71
Figura 6.31: Agrupación por Complejo/Especie de <i>Fusarium</i> spp. aislados del sobrenadante del macerado de tejido interno de hijuelos Agave tequilana, con base en la sanidad de la planta madre de donde se originaron. Caracterización cultural (anverso y reverso) en medio de cultivo Saboraud. Foto: 10 días después de la siembra. Identificación molecular por: gen EF-1. Numeración correspondiente a caracterización original (Figura 6.25-26).....	72
Figura 6.32: Carga de Inoculo Externa (CIE) 1/2: Caracterización Cultural (anverso y reverso) en medio de cultivo Saboraud de <i>Fusarium</i> spp. (complejo y especie) más prevalentes en el lavado de suelo adherido a hijuelos de Agave tequilana In situ/Deshidratados durante 14 días colectados en predios con Baja incidencia de SMAP. Identificación molecular: gen EF-1. Foto a los 10 días después de la siembra.....	79
Figura 6.33: Carga de Inoculo Externa (CIE) 2/2: Caracterización Cultural (anverso y reverso) en medio de cultivo Saboraud de <i>Fusarium</i> spp. (complejo y especie) más prevalentes en el lavado de suelo adherido a hijuelos de Agave tequilana In situ/Deshidratados durante 14 días colectados en predios con Alta incidencia de SMAP. Identificación molecular por: gen EF-1. Foto a los 10 días después de la siembra.....	80
Figura 6.34: Prueba de T (PROC TTEST) de Rank_UFC <i>Fusarium</i> spp. en Carga de Inoculo Externo (CIE) en medio PDA para predios de Alta Incidencia de Síndrome de marchitez y pudrición de cogollo. A) Clases de pH, B) Sanidad de planta madre y C)	

Momento de toma de muestra. Barras representan error de ½ de la desviación estándar. P-value es el resultado de significancia al 0.05 y 0.10 en C.....	81
Figura 6.35: Análisis de varianza no paramétrico (PROC GLM) de Rank_UFC Fusarium spp. en Carga de Inoculo Externo (CIE) en medio PDA para predios de Baja Incidencia de Síndrome de marchitez y pudrición de cogollo. A) Interacción Momento toma de muestra-Clases de pH., B) Interacción Momento toma de muestra- Sanidad de Planta Madre. Barras representan error de ½ de la desviación estándar. Letras diferentes en barra de error muestran diferencias significativas (Tukey, p<0.05).....	83
Figura 6.36: Análisis de varianza no paramétrico (PROC GLM) de Rank_Indice Fusarium spp. en la interacción de Clases de pH-Sanidad de planta madre , en la Carga de Inoculo Externo (CIE) en medio PDA para predios de Alta Incidencia de Síndrome de marchitez y pudrición de cogollo. Barras representan error de ½ de la desviación estándar. Letras diferentes en barra de error muestran diferencias significativas (Duncan, p<0.05).....	85
Figura 6.37: Análisis de varianza no paramétrico (PROC GLM) de Rank_Indice Fusarium spp. en la interacción de Momento toma de muestra-Clases de pH-Sanidad de planta madre , en la Carga de Inoculo Externo (CIE) en medio PDA para predios de Baja Incidencia de Síndrome de marchitez y pudrición de cogollo. Barras representan error de ½ de la desviación estándar. Letras diferentes en barra de error muestran diferencias significativas (Duncan, p<0.05).....	86
Figura 6.38: Análisis de varianza no paramétrico (PROC GLM) de Rank_UFC Fusarium spp. en la interacción de Momento toma de muestra-Clases de pH-Sanidad de planta madre, en la Carga de Inoculo Externo (CIE) en medio KOMADA para predios de Alta Incidencia de Síndrome de marchitez y pudrición de cogollo. Barras representan error de ½ de la desviación estándar. Letras diferentes en barra de error muestran diferencias significativas (Tukey, p<0.05).....	88
Figura 6.39: Análisis de varianza no paramétrico (PROC GLM) de Rank_UFC Fusarium spp. en la interacción de Momento toma de muestra-Clases de pH-Sanidad de planta madre, en la Carga de Inoculo Externo (CIE) en medio KOMADA para predios de Baja Incidencia de Síndrome de marchitez y pudrición de cogollo. Barras representan error de ½ de la desviación estándar. Letras diferentes en barra de error muestran diferencias significativas (Tukey, p<0.05).....	89
Figura 6.40: Modelo relacional de Complejos/Especies de Fusarium spp. más prevalentes en el lavado In situ/Deshidratado de suelo adherido a hijuelos de Agave tequilana colectados en predios con Baja incidencia de SMAP; con base al diseño experimental planteado. Caracterización cultural (anverso y reverso) en medio de cultivo Saboraud. Foto: 10 días después de la siembra. Identificación molecular: gen EF-1. Numeración correspondiente a caracterización original (Figura 6.36).....	91
Figura 6.41: Modelo relacional de Complejos/Especies de Fusarium spp. más prevalentes en el lavado In situ/Deshidratado de suelo adherido a hijuelos de Agave tequilana colectados en predios con Alta incidencia de SMAP; con base al diseño experimental planteado. Caracterización cultural (anverso y reverso) en medio de cultivo Saboraud.	

Foto: 10 días después de la siembra. Identificación molecular: gen EF-1. Numeración correspondiente a caracterización original (Figura 6.33).....	95
Figura 6.42: Modelo relacional de Complejos/Especies de <i>Fusarium</i> spp. más prevalentes en muestras de CIE de hijuelos de <i>Agave tequilana</i> y su potencial inductivo al SMAP, con base a la incidencia de este a nivel predio y la Sanidad de PM. Caracterización cultural (anverso y reverso) en medio de cultivo Saboraud. Foto: 10 días después de la siembra. Identificación molecular: gen EF-1.	98
Figura 6.43: Agrupación por Complejo/Especie de <i>Fusarium</i> spp. más prevalentes en muestras In situ de suelo adherido a hijuelos <i>Agave tequilana</i> (CIE), con base en el pH del predio y la sanidad de PM de donde se originaron. Caracterización cultural (anverso y reverso) en medio de cultivo Saboraud. Foto: 10 días después de la siembra. Identificación molecular por: gen EF-1. Numeración correspondiente a caracterización original (Figura 6.33-34).....	101
Figura 6.44: Agrupación por Complejo/Especie de <i>Fusarium</i> spp. más prevalentes en muestras Deshidratada de suelo adherido a hijuelos <i>Agave tequilana</i> (CIE), con base en el pH del predio y la sanidad de PM de donde se originaron. Caracterización cultural (anverso y reverso) en medio de cultivo Saboraud. Foto: 10 días después de la siembra. Identificación molecular por: gen EF-1. Numeración correspondiente a caracterización original (Figura 6.33-34).....	106
Figura 6.45: Modelo relacional de UFC <i>Trichoderma</i> spp. contabilizadas en muestras de lavado Insitu/Deshidratado de suelo adherido a hijuelos de <i>Agave tequilana</i> en predios con Alta y Baja incidencia del síndrome de marchitez y pudrición de cogollo (SMAP); con base al diseño experimental planteado. Caracterización cultural (anverso y reverso) en medio de cultivo V8. Foto: 10 días después de la siembra.....	112
Figura 6.46: Modelo relacional de morfotipos (putativas especies) de <i>Trichoderma</i> spp aislados del lavado Insitu/Deshidratado de suelo adherido a hijuelos de <i>Agave tequilana</i> . colectados en predios con Alta incidencia del síndrome de marchitez y pudrición de cogollo (SMAP); con base al diseño experimental planteado. Caracterización cultural (anverso y reverso) en medio de cultivo V8. Foto: 10 días después de la siembra.	114
Figura 6.47: Modelo relacional de morfotipos (putativas especies) de <i>Trichoderma</i> spp aislados del lavado Insitu/Deshidratado de suelo adherido a hijuelos de <i>Agave tequilana</i> . colectados en predios con Baja incidencia del síndrome de marchitez y pudrición de cogollo (SMAP); con base al diseño experimental planteado. Caracterización cultural (anverso y reverso) en medio de cultivo V8. Foto: 10 días después de la siembra.	116

Efecto de la Deshidratación Agrícola de Hijuelos Calibre Toronja de *Agave tequilana* var. Azul W. en la Dinámica de Carga de Inoculo Interna y Externa de *Fusarium* spp. y *Trichoderma* spp.

Angel Agustin Campos Cruces
UAAAN, 2024

RESUMEN

Esta investigación demostró el efecto de la deshidratación agrícola sobre la carga de inoculo interno (CII) y externo (CIE) de *Fusarium* spp. y *Trichoderma* spp. en hijuelos calibre Toronja de *Agave tequilana* W. var. Azul. Se colectaron 160 hijuelos calibre Toronja, clasificándolos según la sanidad de la Planta Madre (PM) de la que se originaron, en 8 plantaciones de entre 3-4 años de edad. Las plantaciones se categorizaron por Alta/Baja incidencia del Síndrome de Marchitez y Pudrición del Cogollo (SMAP) y por rango de pH ($\text{pH} < 5 / \text{pH} > 5$), en 3 municipios de la región de Valles de Jalisco en 2021. De una muestra compuesta por 5 hijuelos de la misma sanidad de PM, se obtuvieron muestras de CIE *In situ*, empleando el método CIFUSAG (Mendoza-Ramos *et al.*, 2020). Los hijuelos se sometieron a deshidratación por solarización durante 14 días, emulando la practica agrícola generalizada, previo a su establecimiento, sembrándolas en PDA y *Komada* (3 rep.). Posterior a los 14 días, se tomó la muestra de CIE *deshidratada* de los 5 hijuelos restantes de la misma sanidad de PM. Para determinar la CII de los hijuelos post-deshidratación, se sembraron 200 μl del sobrenadante del macerado del tejido interno en PDA (3 rep.).

A partir de 192 siembras de muestras de CIE se contabilizaron 16, 583 UFC de *Fusarium* spp., de las cuales se realizaron 115 aislamientos, caracterizándolos culturalmente. Se realizó la secuenciación molecular utilizando el gen *EF-1*, de los aislamientos más prevalentes en las 32 muestras de CIE. Se identificó la presencia de varios complejos de especies de *Fusarium* spp.: FSSC fue el complejo más prevalente, representado por *F. falciforme* y *F. solani*; FOOSC representado por *F. oxysporum*; FFSC representado por *F. verticillioides* y *F. proliferatum*; FIESC representado *F. cf. Incanatum*; coincidiendo con lo reportado por Mendoza-Ramos (2020). Este es el primer reporte de las especies *F. triseptatum* (FOOSC) y *F. bostrycoides* (FFSC) asociadas a hijuelos de *Agave tequilana* W.

var. Azul. En predios con Alta Incidencia de SMAP, se determinó una asociación entre la CIE (UFC *Fusarium* spp.) de hijuelos de *Agave tequilana* y la sanidad de la PM, siendo mayor en hijuelos de PM Enferma. En predios con baja incidencia de SMAP, se observó una diferencia significativa en la carga de inóculo de *Fusarium* spp. en la interacción del momento de toma de muestra y el pH del suelo, posiblemente por la extracción de un ambiente edáfico supresivo. Las muestras de PM enferma presentaron el mayor incremento la carga de inóculo de *Fusarium* spp. post-deshidratación.

Se determinó que la deshidratación agrícola de hijuelos de *Agave tequilana* previo a su establecimiento reduce la CII; sin embargo, no elimina por completo a *Fusarium* spp. del tejido interno, encontrándose el patógeno en 21 de los 160 hijuelos colectados. A partir de 480 siembras, se cuantificaron 42 UFC de *Fusarium* spp., resultando en 24 aislamientos de *Fusarium* spp. presentes en tejido interno de hijuelos *Agave tequilana* sobrevivientes a la deshidratación, que fueron caracterizados e identificados por el gen *EF-1*. FFSC fue el complejo más prevalente, siendo *F. verticillioides* la especie más prevalente, seguida de *F. lactis*, *F. nygamai*, *F. pseudocircinatum* y *F. proliferatum*. El complejo FOOSC fue representado por *F. oxysporum*. FSSC fue el complejo menos prevalente representado por *F. falciforme* y *F. bostrycoides*. No se encontró relación entre la presencia de *Fusarium* spp. en tejido interno de los hijuelos y la sanidad de la planta madre. Este el primer reporte de las especies *F. nygamai* (FFSC) *F. pseudocircinatum* (FFSC), *F. falciforme* (FSSC) y *F. bostrycoides* (FSSC) asociadas a tejidos internos de hijuelos de *Agave tequilana* calibre toronja y sobrevivientes a la deshidratación de estos. Además, se obtuvieron dos aislamientos de *Trichoderma* spp. en el tejido interno de hijuelos de *Agave tequilana*, sometidos a deshidratación agrícola, originados de plantas madre sanas. Abriendo la puerta a investigaciones futuras sobre el potencial de *Trichoderma* spp. endófito para el manejo integrado del SMAP.

Palabras clave: *Agave tequilana*, Marchitez, Hijuelos, Deshidratación, Carga de Inoculo, *Fusarium* spp., *Trichoderma* spp.

Effect of Agricultural Dehydration on Grapefruit-Sized Offsets of *Agave tequilana* W. var. Azul on the Dynamics of Internal and External Inoculum Load of *Fusarium* spp. and *Trichoderma* spp.

Angel Agustin Campos Cruces
UAAAN, 2024

ABSTRACT

This research demonstrated the effect of agricultural dehydration on the internal (IIC) and external (EIC) inoculum load of *Fusarium* spp. and *Trichoderma* spp. in grapefruit-sized offsets of *Agave tequilana* W. var. Azul. A total of 160 grapefruit-sized offsets were collected and classified according to the health of the Mother Plant (MP) from which they originated, collected from 8 plantations of 3-4 years. The plantations were categorized by High/Low incidence of the Wilt and Heart Rot Syndrome (WHRS) and by pH range (pH<5/pH>5), in 3 municipalities of the Valles region of Jalisco in 2021. From a composite sample of 5 offsets of the same MP health status, in situ EIC samples were taken using the CIFUSAG method (Mendoza-Ramos et al., 2020). The offsets underwent dehydration by solarization for 14 days, emulating the widespread agricultural practice before establishment, and were planted in PDA and Komada (3 reps). After 14 days, dehydrated EIC samples were taken from the remaining 5 offsets of the same MP health status. To determine the IIC of the post-dehydration offsets, 200 µl of the supernatant from the macerated internal tissue was plated on PDA (3 reps)

From 192 EIC samples, 16,583 CFU of *Fusarium* spp. were counted, from which 115 isolates were culturally characterized. Molecular sequencing was performed using the EF-1 gene of the most prevalent isolates in the 32 EIC samples. The presence of several *Fusarium* spp. complexes was identified: FSSC was the most prevalent complex, represented by *F. falciforme* and *F. solani*; FOOSC represented by *F. oxysporum*; FFSC represented by *F. verticillioides* and *F. proliferatum*; FIESC represented by *F. cf. Incanatum*; matching the findings reported by Mendoza-Ramos (2020). This is the first report of the species *F. triseptatum* (FOOSC) and *F. bostrycoides* (FFSC) associated with offsets of *Agave tequilana* W. var. Azul. In fields with High WHRS Incidence, an association was determined between the EIC (*Fusarium* spp. CFU) of *Agave tequilana*

offsets and the health of the MP, being higher in offsets from Diseased MP. In fields with low WHRS incidence, a significant difference was observed in the inoculum load of *Fusarium* spp. in the interaction between sampling time and soil pH, possibly due to the extraction from a suppressive edaphic environment. Samples from diseased MP showed the highest increase in *Fusarium* spp. inoculum load post-dehydration.

It was determined that agricultural dehydration of *Agave tequilana* offsets prior to establishment reduces the IIC; however, it does not completely eliminate *Fusarium* spp. from the internal tissue, as the pathogen was found in 21 of the 160 collected offsets. From 480 plantings, 42 CFU of *Fusarium* spp. were quantified, resulting in 24 isolates of *Fusarium* spp. present in the internal tissue of *Agave tequilana* offsets surviving dehydration, which were characterized and identified by the EF-1 gene. FFSC was the most prevalent complex, with *F. verticillioides* being the most prevalent species, followed by *F. lactis*, *F. nygamai*, *F. pseudocircinatum*, and *F. proliferatum*. The FOOSC complex was represented by *F. oxysporum*. FSSC was the least prevalent complex, represented by *F. falciforme* and *F. bostrycoides*. No relationship was found between the presence of *Fusarium* spp. in the internal tissue of the offsets and the health of the mother plants. This is the first report of the species *F. nygamai* (FFSC), *F. pseudocircinatum* (FFSC), *F. faciforme* (FSSC), and *F. bostrycoides* (FSSC) associated with internal tissues of grapefruit-sized *Agave tequilana* offsets surviving dehydration. Additionally, two isolates of *Trichoderma* spp. were obtained from the internal tissue of *Agave tequilana* offsets subjected to agricultural dehydration, originating from healthy mother plants, opening the door to future research on the potential of endophytic *Trichoderma* spp. for integrated WHRS management.

Key words: *Agave tequilana*, Wilt, Offsets, Dehydration, Inoculum load, *Fusarium* spp., *Trichoderma* spp.

1.- INTRODUCCION

La industria tequilera ha adquirido importancia debido a la creciente demanda nacional e internacional. El componente agrícola es el más importante y decisivo para el abastecimiento sostenido y predecible de su materia prima, el agave tequilero (*Agave tequilana* Weber var. Azul). Consecuentemente, el cultivo se ha establecido de forma intensiva, con una tendencia a incrementar su superficie cultivada.

Debido a la longevidad del cultivo del agave (seis a ocho años), se vuelve imperativa la investigación y la progresión del conocimiento con el fin de mejorar su desarrollo y productividad. La tendencia de los mercados internacionales hacia un uso racional de agroquímicos y/o su sustitución por tecnologías amigables con el ambiente demanda la generación de conocimiento agronómico en pos de un manejo orgánico. La mayor problemática son los problemas fitosanitarios del cultivo, dado que alrededor de un tercio de las plantaciones presentan incidencia de pudrición del cogollo, pudrición del tallo, marchitez, enrollamiento y decoloración de la hoja, en algún grado (CRT, 2010).

El síndrome de marchitez y pudrición del cogollo (SMAP) representa la mayor amenaza fitopatológica para la productividad del *Agave tequilana* var. Azul y, por consiguiente, para la industria tequilera. El agente causal de esta enfermedad son organismos del género *Fusarium* spp., que presentan una gran plasticidad ecológica, lo que les permite colonizar diversos nichos ecológicos. La comprensión de la dinámica poblacional de *Fusarium* spp. y los factores que influyen en ella dentro del agroecosistema del *Agave tequilana* es fundamental para desarrollar estrategias efectivas de manejo de la enfermedad, promoviendo la sustentabilidad ecológica y manteniendo la competitividad de esta importante industria agrícola (López-Bautista *et al.*, 2020).

Los tratamientos convencionales con plaguicidas conllevan un deterioro de los recursos hídricos y edafológicos, además de representar un riesgo para la salud humana. Por esta razón, es imperioso buscar soluciones agronómicas eco-responsables, factibles y rentables. Una de las alternativas más prometedoras, es el control biológico o biocontrol, consistiendo en el uso de microorganismos antagonistas (*Trichoderma* spp.) que

interactúan con el patógeno para reducir su efecto o su virulencia, eliminando por completo el perjuicio ambiental (Russell y Wild, 1992).

En este contexto, se llevó a cabo la siguiente investigación con el objetivo de contribuir a la comprensión de los factores que influyen en la dinámica poblacional de *Fusarium* spp. y *Trichoderma* spp. en el agroecosistema de *Agave tequilana*, así como su relación con la incidencia de SMAP. Los hallazgos de esta investigación pueden ser útiles para desarrollar estrategias de manejo integrado de enfermedades en sistemas de producción de *Agave tequilana*.

2.- HIPÓTESIS

- La deshidratación agrícola de hijuelos de *Agave tequilana* var. Azul ejerce un efecto selectivo sobre el ensamble de poblaciones endófitas de *Fusarium* spp. y *Trichoderma* spp. Esta práctica cataliza el dinamismo poblacional de *Fusarium* spp. y *Trichoderma* spp. en la piñosfera de los hijuelos, modificando la carga de inóculo presente al momento del arranque, la cual es determinada por las características edafológicas y la incidencia del Síndrome de Marchitez y Pudrición del Cogollo (SMAP) de la plantación madre.

3.- OBJETIVO PRINCIPAL

- Identificar las especies de *Fusarium* spp. y *Trichoderma* spp. adaptadas a los tejidos internos de hijuelos Calibre Toronja de *Agave tequilana*, sobrevivientes a la deshidratación, en plantaciones de la región Valles, Jalisco.

3.1.- OBJETIVOS SECUNDARIOS

- Evaluar el efecto de la deshidratación agrícola en la carga de inóculo externo de *Fusarium* spp. en la piñosfera de hijuelos de *Agave tequilana* Calibre Toronja.
- Determinar las especies más prevalentes de *Fusarium* spp. en muestras *in situ* y deshidratadas de la piñosfera de hijuelos de *Agave tequilana* Calibre Toronja.
- Obtener especies de *Trichoderma* spp. adaptadas a la deshidratación de tejidos internos de hijuelos de *Agave tequilana*, como potenciales agentes de control biológico.

4.- REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 *Agave tequilana* var. Azul W.: Planta y Cultivo

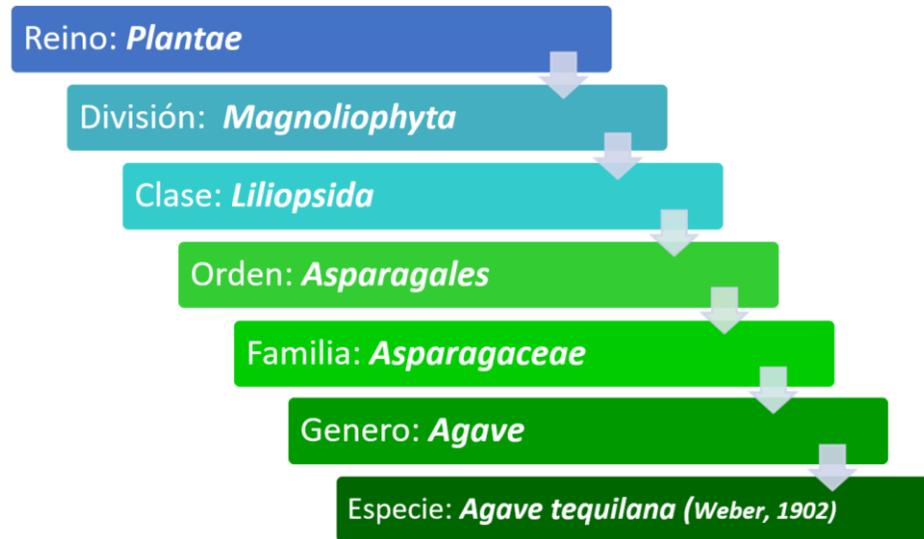


Figura 4.1: Clasificación taxonómica de *Agave tequilana* var. Azul.

4.1.1 Requerimientos agroecológicos de *Agave tequilana* var. Azul W.

Se distribuye en regiones subtropicales semiáridas y subhúmedas, con temperaturas medias entre 5°C y 22°C. Se encuentra óptimamente entre los 1,000 y 2,200 msnm, con precipitaciones anuales de 700-1000 mm. Prefiere suelos de textura media, con un rango de pH de 6.0 a 8.0, y presenta una plasticidad que le permite desarrollarse en terrenos con pendientes pronunciadas (FAO, 1994; Ruiz *et al.*, 1999).

4.1.2 Adaptaciones Morfo-fisiológicas de *Agave tequilana* var. Azul W.

El éxito evolutivo y productivo del *Agave tequilana* se atribuye principalmente a sus adaptaciones fisiológicas y morfológicas, como un sistema radicular fibroso y superficial, hojas suculentas con cutícula gruesa y un metabolismo ácido crasuláceo (CAM), que le permite mantener elevados potenciales hídricos en sus tejidos en ambientes con escasa humedad en el suelo. Los agaves pueden tolerar hasta un 90% de disminución en su contenido tisular de agua antes de mostrar afectaciones en su crecimiento. Sin embargo, al someterse a un estrés hídrico, la producción de biomasa radicular y foliar disminuye (Pimienta-Barrios *et al.*, 2006; Nobel *et al.*, 2011; Ramírez-Tobías *et al.*, 2014).

Agave tequilana var. **Azul** (Weber, 1902)

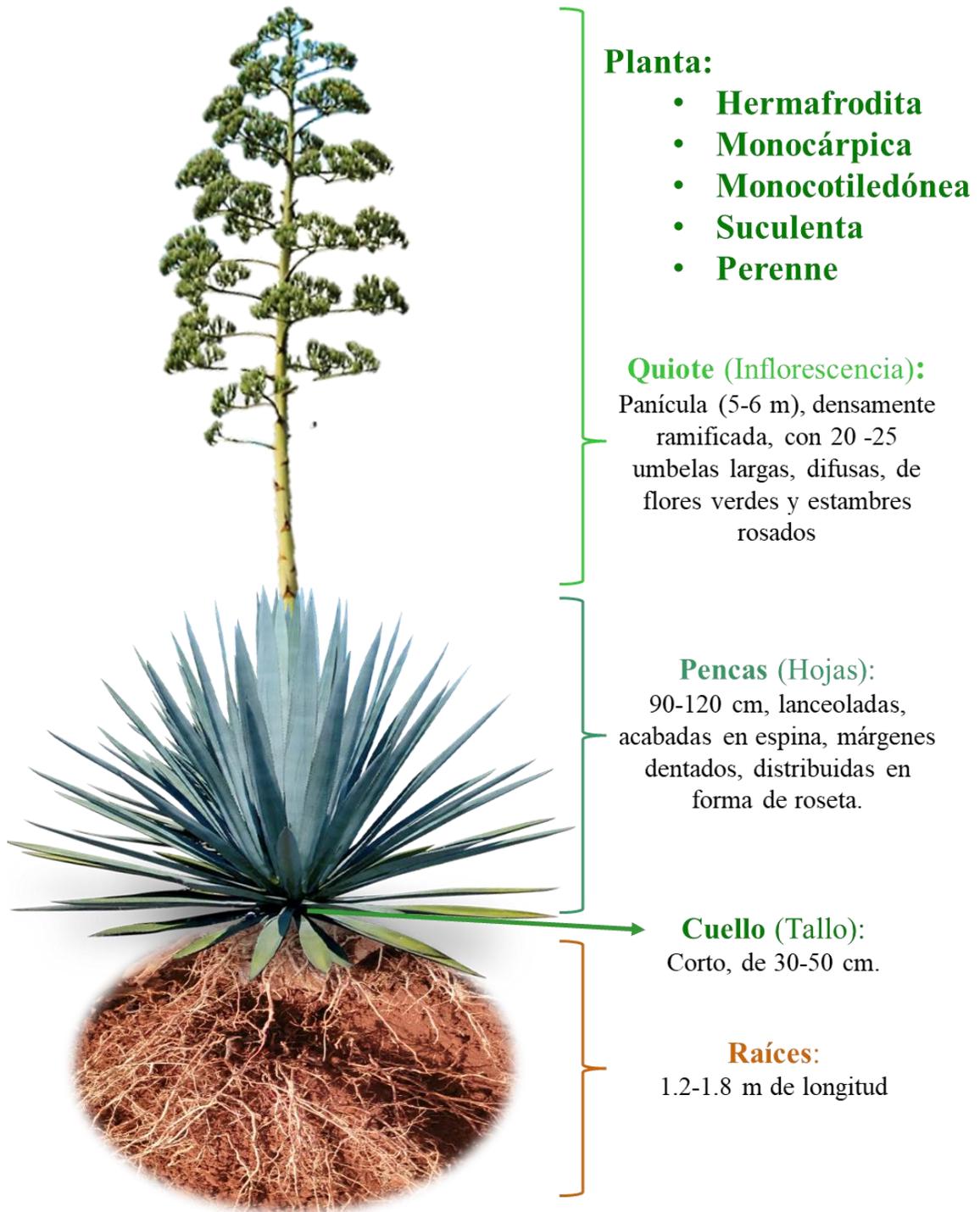


Figura 4.2: Ilustración y Descripción botánica de *Agave tequilana* Weber var. Azul.

4.1.3.- Importancia *Agave tequilana* var. Azul W.

El tequila ha cobrado una importancia económica y cultural debido al aumento de su consumo tanto a nivel nacional como internacional. Según el Consejo Regulador del Tequila (CRT), la producción total de tequila entre 2012 y 2022 fue de 3,708.5 millones de litros. El año más productivo fue 2022, con 651.4 millones de litros, lo que duplicó la producción de 2018 (309.1 millones de litros) y triplicó la producción inicial del periodo (253.2 millones de litros) (Figura 4.3). Se registró un incremento anual promedio del 8.6% en las exportaciones, con 419 millones de litros exportados en el último año, representando el 64.3% de la producción total (CRT, 2023).

La producción de tequila se sustenta en el agave tequilero (*Agave tequilana* Weber var. Azul), único insumo autorizado por la Norma Oficial Mexicana (NOM-006-SCFI-2005). Se ha observado una tendencia creciente en la intensificación y expansión del cultivo para satisfacer la demanda; tan solo en 2018, requirió la cosecha 64,582.76 hectáreas, equivalentes a 206.6 millones de plantas, con el 57% de la producción concentrada en la región de Los Altos, Jalisco (SIAP, 2018).

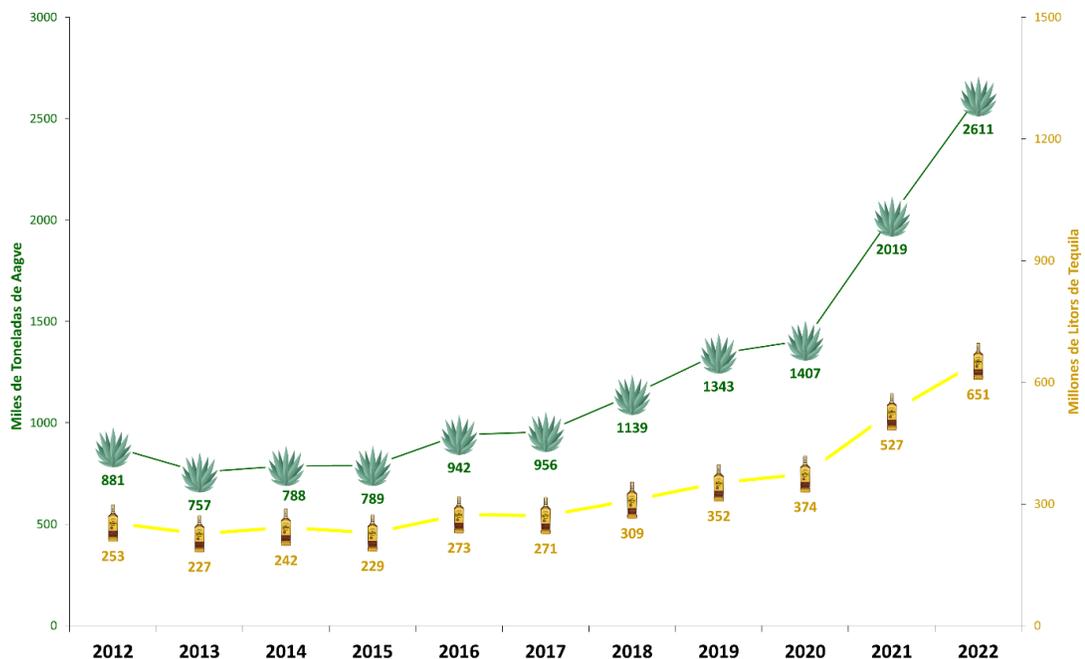


Figura 4.3: Consumo Anual de *Agave tequilana* (miles de toneladas) como materia prima para la producción de Tequila y Volumen de Producción Anual de Tequila (millones de litros). Fuente: Datos del CRT, 2024.

4.1.4.- Zona de Denominación de Origen del Tequila (DOT)

El *Agave tequilana* tiene su posible centro de origen en el estado de Jalisco, con poblaciones silvestres en los municipios de Tequila, Ahualulco, Tehuchitlán y Etzalan. La variedad Azul de *Agave tequilana* Weber es la única aceptada por la normativa NOM-006-SCFI-2005 para la producción de tequila. Se caracteriza por su baja diversidad genética, mayor producción de azúcares y ciclo de crecimiento más corto (Virgen-Calleros *et al.*, 2004; Gil *et al.*, 2005; Aviña-Padilla *et al.*, 2008).

La producción de este cultivo destinado a la industria tequilera está confinada por la misma norma a la Zona de Denominación de Origen del Tequila (DOT), conformada por 181 municipios (Figura 4.4).



Figura 4.4: Estados y municipios que comprenden la Zona de Denominación de Origen del Tequila (DOT).

4.2.- Propagación *Agave tequilana* var. Azul W.

4.2.1.- Propagación Sexual

La propagación sexual del género *Agave* se ha desestimado debido a su escasa producción de semillas (baja viabilidad), variabilidad genética (polinización cruzada) y al prolongado ciclo de crecimiento prefloración (seis a ocho años). Además, la pérdida de azúcares que conlleva la floración; han incentivado su supresión activa ("desquioté"). Sin embargo, se reconoce el valor disruptivo de la reproducción sexual frente al efecto clonal homogeneizante de la propagación asexual (CP-LANREF, 2017).

4.2.2.- Propagación Asexual

- **Bulbillos:** Hijuelos pequeños originados a partir del quiote (Figura 4.5A), poco frecuentes y casi desconocidos, debido al "desquioté" (Valenzuela, 1997).
- **Hijuelos:** Originados a partir de rizomas (Figura 4.5B); son el órgano propagativo más utilizado debido a las ventajas que presenta, tales como la cantidad generada por planta (15-20 hijuelos), la celeridad de crecimiento hasta estándares comerciales (dos años aprox.), homogeneidad genética, alta viabilidad y desarrollo vigoroso. Sin embargo, desde un punto de vista fitosanitario, el movimiento de estos propágulos intra e interregionalmente para el establecimiento de nuevas plantaciones trae como consecuencia la diseminación de inóculo de *Fusarium* spp., presente en el suelo adherido al hijuelo o en sus tejidos internos.



Figura 4.5: Órganos de propagación asexual de *Agave tequilana*: (A) Bulbillos e (B) Hijuelos.

4.2.3.- Arranque de hijuelos de *Agave tequilana* var. Azul W.

El manejo agronómico tradicional para la propagación del agave se fundamenta en un conocimiento empírico aplicado para optimizar la producción de hijuelos. Este manejo consiste en intensos laboreos del suelo para generar una estructura edafológica que favorezca la captación y almacenamiento de humedad, facilitando el crecimiento de rizomas y brotación de hijuelos, suspendiendo los laboreos una vez que estos hayan emergido (Mendoza-Ramos, 2020).

- **Calendarización de Arranque:** El proceso de arranque comercial se realiza entre los meses de marzo y mayo debido a la limitada precipitación pluvial durante estos meses, lo que facilita las labores y reduce las mermas por pudriciones microbiológicas (Vicente y Del Real, 2007).
- **Requisitos plantaciones madre:** En apego a la **NOM-006-SCFI-2012**, el arranque de hijuelos debe realizarse en plantaciones de *Agave tequilana* Var. Azul, dentro de la DOT y registradas ante el CRT.
- **Elección de las plantas madre:** Preferentemente se seleccionarán plantas madre sanas, sin daño ni presencia de insectos nocivos, de tres a cinco años, en pleno desarrollo vegetativo y en condiciones de alimentar a los hijuelos que emane (Vicente y Del Real, 2007).
- **Arranque y “Tostoneo” de hijuelos:** El proceso de arranque comercial se realiza con un "barretón", una herramienta compuesta por un mango de madera (<1.20 m), equipado con una hoja de metal cóncava afilada en uno de sus extremos. Se corta el rizoma que une el hijuelo a la planta madre de un solo golpe, mediante un corte limpio y transversal. Una vez arrancado, se realiza el "tostoneo", eliminando las raíces a nivel del cuello y cortando las hojas abiertas desde la base, evitando dañar el tejido interno; se conservan las hojas del cogollo y algunas adyacentes para su protección, recortando sus puntas. Toda la herramienta utilizada en el arranque debe ser desinfectada con Cloro al 10% después de arrancar 100 hijuelos y/o al cambiar de predio. Si la demanda de hijuelos descende, los productores "desbotan" (deshijan) mecánicamente. La

diferencia fundamental entre el "arranque" y el "desbote" radica en la finalidad de los hijuelos, si estos se van a plantar o a destruir.

En el año 2022, se establecieron un total de 123,441 hectáreas (SIAP, 2024) con una densidad de siembra promedio de 3,200 hijuelos/ha. Esto resultó en un máximo histórico de aproximado de 395 millones de hijuelos arrancados y replantados ese mismo año, continuando la tendencia al alza observada en los últimos años, motivada por los precios elevados del insumo final (Figura 4.6). Este hito destaca la importancia de realizar una investigación exhaustiva de los elementos implicados en esta práctica agrícola.

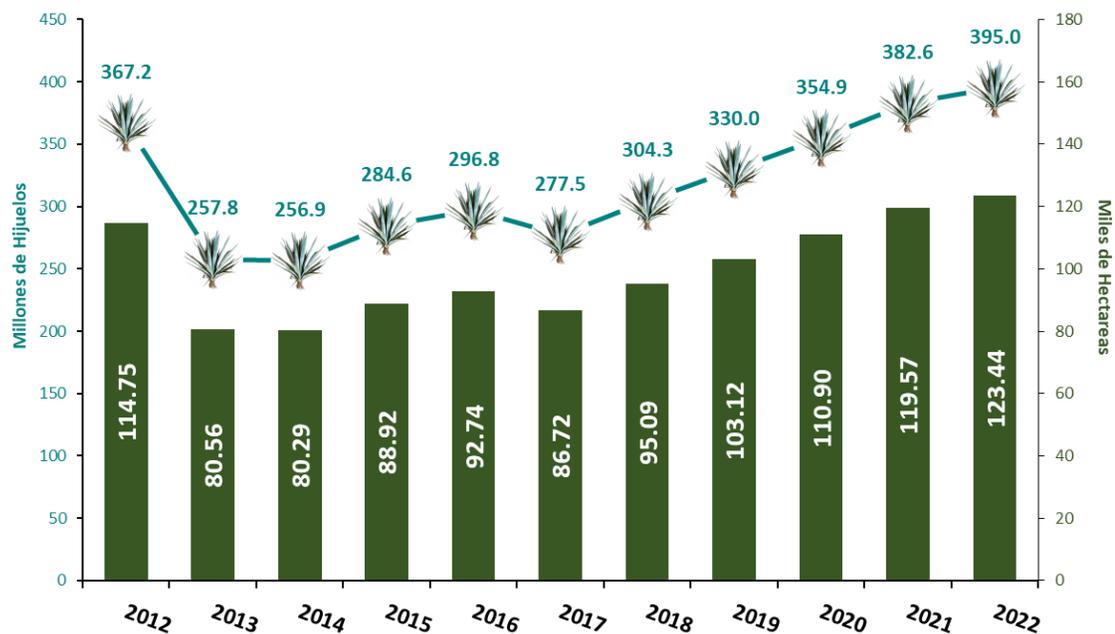


Figura 4.6: Superficie de *Agave tequilana* plantada por año (miles de ha.) y estimación de hijuelos (millones de hijuelos) empleados a nivel nacional para su establecimiento; considerando una densidad de siembra de 3,200 hijuelos/ha. Fuente de sup. plantada: SIAP,2024.

- **Selección y Clasificación de los hijuelos:** Al emerger asincrónicamente, el tamaño de los hijuelos es variable y su calidad depende de las condiciones ambientales, daños físicos-mecánicos, incidencia de insectos y/o enfermedades, y las condiciones de manejo agronómico bajo las cuales hayan crecido. La correcta selección de los hijuelos es determinante para la calidad y

rendimiento de las nuevas plantaciones, por lo que debe ser realizada por un técnico o agricultor capacitado. Los hijuelos deben ser seleccionándolos con base en su vigorosidad, sanidad, color y ausencia de daños.

La clasificación se realiza basándose en el diámetro del hijuelo tostoneado, utilizando como referencia tamaños de frutas: limón, naranja y toronja (Figura 4.7). Esta actividad determina la homogeneidad de nuevas plantaciones al emplear hijuelos del mismo calibre para su establecimiento (Vicente y Del Real, 2007).

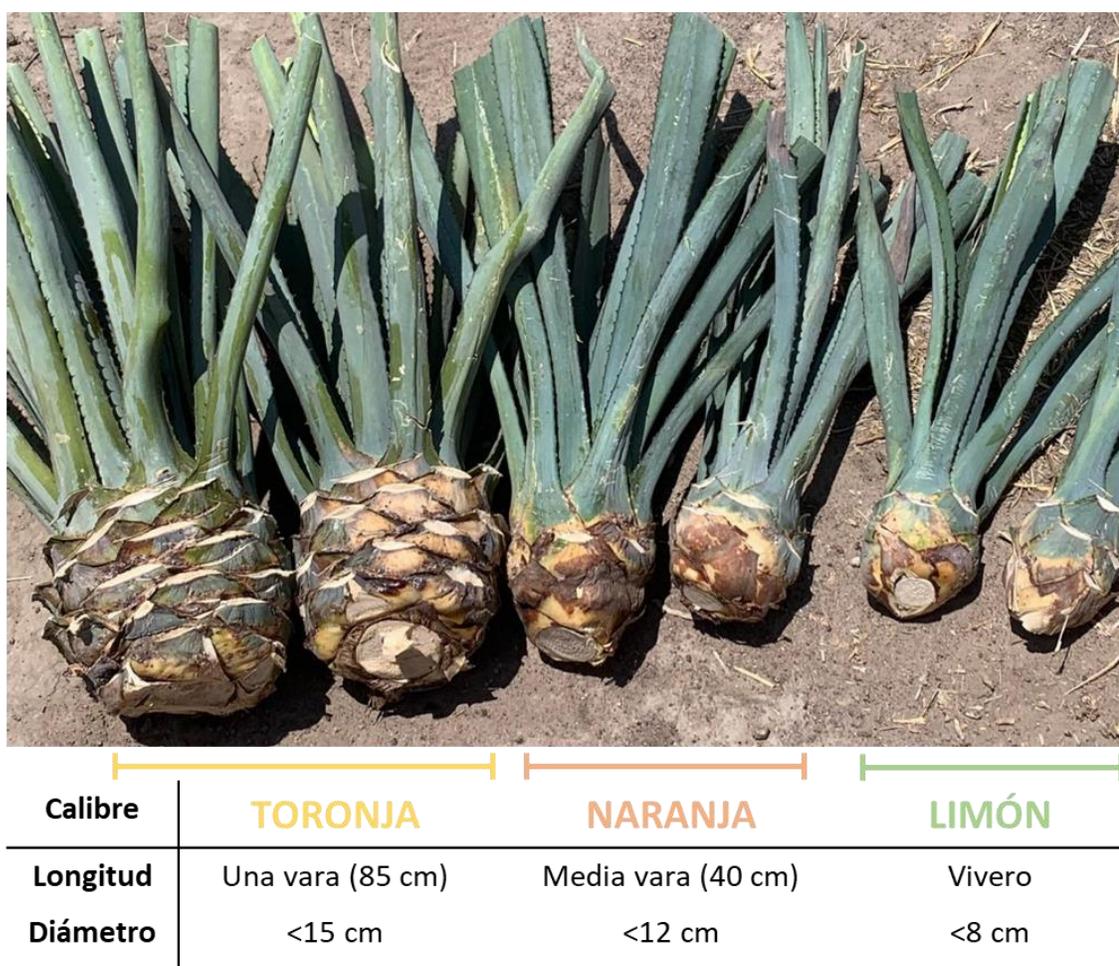


Figura 4.7: Parámetros de longitud y tamaño de piña empleados para la clasificación de hijuelos de *Agave tequilana* por calibres (Vicente y Del Real, 2007).

- **Deshidratación de Hijuelos:** Una vez arrancados y tostoneados, los hijuelos se dejan secar al sol durante 15-20 días para reducir el contenido de agua, con el fin de disminuir la incidencia de pudriciones, promover el enraizamiento de la plántula y facilitar la cicatrización de las heridas del corte (McKenney, 1997; Mendoza-Ramos, 2020).

Figueroa-Montero *et al.* (2018) reportaron la presencia de *Lactobacillus plantarum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhizopus stolonifer*, *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus flavus* y *A. niger* en tejido de *Agave tequilana*, posterior a una deshidratación de cinco días al sol, junto con un aumento en la concentración de azúcares y proteínas en los tejidos.

Generalmente, los hijuelos no reciben un manejo fitosanitario previo a la plantación, lo que puede propiciar la dispersión de los patógenos.

4.2.4.- Manejo de material propagativo: Caso banano (*Musa paradisiaca*)

En cultivos que emplean técnicas análogas para el establecimiento de nuevas plantaciones, utilizando material vegetativo como *Musa paradisiaca* (Banano), *Ananas comosus* (Piña), *Aloe vera* (Sábila), entre otros, se ha reportado la presencia de *Fusarium spp.* en dicho material propagativo (Bermúdez *et al.*, 2014; Avasthi *et al.*, 2018; Valdiviezo *et al.*, 2020).

En el caso de banano, *F. oxysporum* f. sp. *Cubense* raza 4 fue el agente causal de la epifitía que asoló la industria bananera en los años 60, conocida como el "Mal de Panamá". Esta enfermedad es provocada por el bloqueo del flujo xilemático debido a los mecanismos de defensa de la planta (geles y tilosas) en respuesta a la infección de los tejidos conductores por parte del patógeno (Ploetz, 1990). En este cultivo *F. oxysporum* se disemina intrarregionalmente a través del material propagativo infectado (cormos e hijuelos), que a menudo son asintomáticos, dificultando su detección. Debido a esto, el empleo de material vegetal certificado es crucial para garantizar la sanidad de nuevas plantaciones (Sotomayor *et al.*, 2012; Bermúdez *et al.*, 2014).

El Plan de Acción (OIRSA-SAGARPA-SENASICA, 2015) para la prevención de la "Fusariosis del Banano" destaca como principales factores de riesgo de dispersión del patógeno:

- Suelo, plantas o material vegetal propagativo de musáceas e inclusive otras especies vegetales provenientes de suelos infestados.
- Suelo contaminado adherido a componentes de transporte, herramientas de trabajo o a la vestimenta de turistas originarios y/o procedentes de países con presencia de la enfermedad.

La vía de mayor importancia fitosanitaria para la diseminación de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense raza 4 Tropical es el trasiego de material de manera ilegal (Sotomayo *et al.*, 2012; OIRSA-SAGARPA-SENASICA, 2015). Las medidas para el manejo de riesgo contra este patógeno incluyen:

- Prohibir la importación de todo tipo de material vegetal propagativo de musáceas (*Musa* spp.) sustratos y suelo procedentes de países con incidencia, así como de países vecinos.
- Utilizar únicamente material propagativo obtenido a partir de cultivos libres de la enfermedad y proveniente de laboratorios certificados.
- Fortalecer la capacidad de detección de la plaga utilizando metodologías rápidas y estandarizadas.

4.3.- *Fusarium* spp.: Hongo-Patógeno

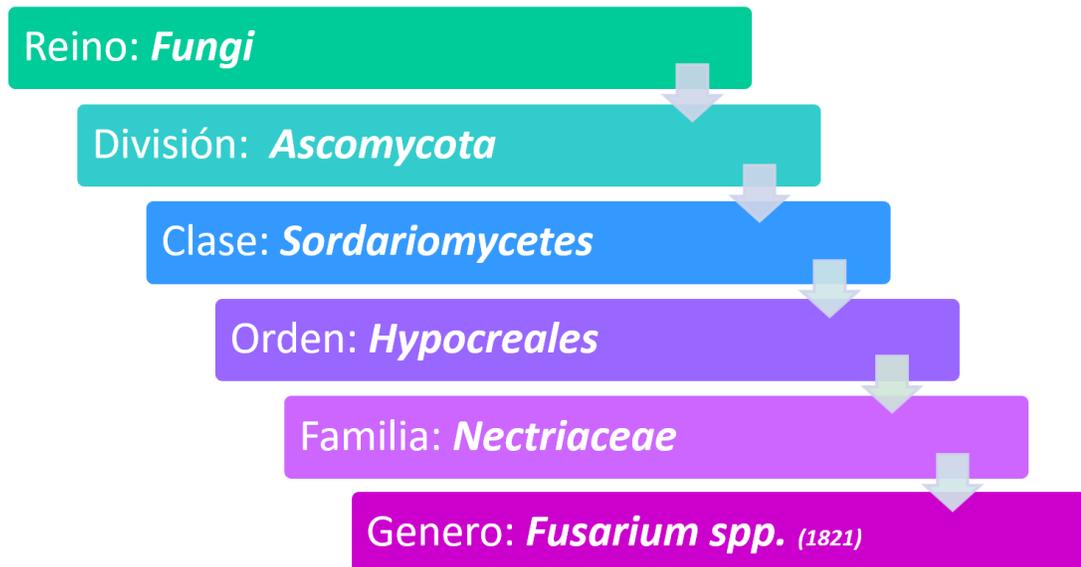


Figura 4.8: Clasificación taxonómica del género *Fusarium* spp.

4.3.1. Importancia del género *Fusarium*

El género *Fusarium* es un complejo de hongos anamórficos, filamentosos, saprófitos y/o patógenos de plantas, animales y humanos, considerados parásitos facultativos o saprobióticos, debido a su alta capacidad adaptativa y de supervivencia. En el caso de los fitopatógenos, estos son capaces de generar fisiopatías como marchitamientos, pudriciones, tizones, canchales y/o necrosis, o ser contaminantes de alimentos por su producción de micotoxinas (O'Donnell y Cigelnick, 1998; Di Pietro *et al.*, 2003).

The American Phytopathological Society reporta al menos una enfermedad asociada a *Fusarium* spp. en 81 de 101 plantas económicamente importantes. Estos hongos también pueden desarrollarse como endófitos en plantas aparentemente sanas o asintomáticas, volviéndose patogénicos bajo condiciones ambientales y de manejo del cultivo muy específicas. Se ha reportado colonización asintomática en malezas de familias *Poaceae*, *Commelinaceae*, *Amaranthaceae*, *Euphorbiaceae* y *Asteraceae* (Hennessy *et al.*, 2005; Leslie y Summerell, 2006; Altinok, 2013).

4.3.2. Ecología y sobrevivencia a la deshidratación de *Fusarium* spp.

Los miembros del género *Fusarium* son habitantes naturales del suelo, persistiendo gracias a la evolución de exitosos mecanismos de adaptación, supervivencia (clamidiosporas) y reproducción. Presentan estructuras anamórficas (mitóticas) como macroconidios y microconidios; y estructuras teleomórficas (meióticas) como ascosporas y peritecios, comúnmente asociadas con alta precipitación, temperatura y periodos de alta humedad relativa (>80%). Sin embargo, menos del 20% de las especies descritas tienen una fase sexual conocida (*Giberella* spp.). En sus diversos hábitats y roles tróficos *Fusarium* predomina como micelio haploide, viable en el suelo durante largo tiempo, con fases diploides que preceden a la meiosis y producción de esporas haploides (Leslie y Summerell, 2006; Ma *et al.*, 2013).

La supervivencia en el suelo depende de cada especie, especialmente de sus mecanismos de adaptación al medio edafológico-saprofítico (producción heterogénea de enzimas y metabolitos). Esta supervivencia es favorecida por la presencia de residuos vegetales de sus hospedantes. Por ejemplo, *F. moniliforme* (FFSC) sobrevive durante 26 meses en residuos de *Oryza sativa* (Arroz); *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* (FOSC), agente causal de la podredumbre de raíces y tallos del *Cucumis sativus* (Pepino), presenta una sobrevivencia de 13 meses; *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* (FOSC), podría sobrevivir en residuos de cosecha enterrados hasta por 72 meses (Haware *et al.*, 1995; Vakalounakis *et al.*, 2004; Sunder *et al.*, 2004).

La abundancia y diversidad de especies de *Fusarium* spp. en el suelo son determinadas por diversos factores, tales como los componentes edáficos (pH, materia orgánica, C.E, etc.), la capacidad de supervivencia y permanencia de las especies a través del tiempo, la presencia y diversidad de especies nativas previas a la disrupción agrícola, la introducción de propágulos mediante factores climáticos (viento, agua, etc.) o antropogénicos (semillas, maquinaria agrícola, etc.), y el establecimiento de cultivos susceptibles que incrementen la población de especies patogénicas. Las epidemias causadas por *Fusarium* spp. requieren el incremento gradual de inóculo en suelo y condiciones de estrés, principalmente productivo, para su ocurrencia con altos niveles de intensidad (Nash *et al.*, 1965).

Las especies de *Fusarium* spp. patogénicas, con capacidad de superar los mecanismos de defensa de las plantas susceptibles, colonizan y se multiplican en los tejidos de la planta hospedante, obteniendo así una ventaja poblacional que favorece su posterior supervivencia en el suelo, frente a los hongos saprofitos que solo son capaces de colonizar los residuos vegetales después de su incorporación al suelo. La virulencia del patógeno está influenciada por su genotipo, las condiciones ambientales (humedad, pH, etc.), la producción de metabolitos secundarios que favorezcan la patogénesis y la susceptibilidad del hospedante. La plasticidad ecológica de los hongos fitopatógenos a adaptarse a diferentes nichos ecológicos depende en gran medida del grado de relación que han desarrollado con las plantas hospedantes es decir, si son parásitos obligados, parásitos facultativos o saprofitos facultativos (Rodríguez-Guzmán, 2001; Hofgaard, 2009; Ma *et al.*, 2013; Jiménez-Díaz *et al.*, 2015).

La cantidad y calidad de la materia orgánica afecta las propiedades físico-químicas y los principales factores bióticos asociados a la microbiología edáfica que incluyen biomasa microbiana, diversidad, estructura de la comunidad y actividades bioquímicas. Los principales mecanismos de orden biológico mediante los cuales la microbiología está relacionada a la supresión de la enfermedad son: incremento en la masa microbiana total, supresión relacionada con organismos específicos o grupos de organismos o una combinación de ambos. Esto crea un microambiente competitivo y en muchos casos inhibitorio para el desarrollo de patógenos (Bonilla *et al.*, 2012; Bonanomi, *et al.*, 2010).

4.3.3.- Inductividad *Fusarium* spp.

Las zonas de inductividad de *Fusarium* spp. son áreas cuyos factores geográficos, climatológicos, edafológicos, biológicos y antropogénicos favorecen el crecimiento, establecimiento y proliferación de especies de *Fusarium* spp. La identificación y parametrización de las diversas interacciones multifactoriales que favorecen la colonización y persistencia del patógeno en el suelo y en cultivos es relevante para entender la epidemiología de *Fusarium* spp. y prevenir la génesis de epifitias (Virgen-Calleros *et al.*, 2000).

Los suelos que presentan un rango de pH entre 5.5 y 7.0, una humedad inferior al 25%, presencia de organismos rizófagos, fertilización nitrogenada y altas densidades de

población del hospedante suelen ser propicios para la proliferación de *Fusarium* spp. La influencia de la presencia o ausencia de microorganismos antagonistas y/o competidores, y su interacción con las poblaciones del patógeno puede ser un factor determinante en el nivel de inductividad (Ma *et al.*, 2013).

4.3.4 Supresividad a *Fusarium* spp.

La supresión edáfica se refiere fundamentalmente a la salud del suelo y a las condiciones ecológicas específicas de la comunidad microbiana, de tal forma que los microorganismos fitopatógenos causantes de enfermedades radicales se mantengan en niveles poblacionales bajos o no logren expresar su potencial patogénico. La presencia de microorganismos antagonistas puede limitar el crecimiento y la proliferación de *Fusarium* spp. a través de varios mecanismos, como la competencia por nutrientes y espacio, la producción de compuestos antimicrobianos, y la inducción de respuestas de defensa en las plantas (Jayaraman *et al.*, 2021).

Los pioneros en control biológico Cook y Baker (1983) definieron los suelos supresivos como aquellos en los cuales los patógenos no se establecen o persisten, y en caso de que el patógeno logre establecerse, no causará enfermedad. Dentro de los principales mecanismos de supresividad se encuentran condiciones edáficas (químicas y físicas, como el pH, materia orgánica, contenido de arcilla) y las interacciones antagónicas (antibiosis, competencia, parasitismo) que hacen que los patógenos reduzcan su número o infectividad. Todos estos factores, tanto abióticos como bióticos, contribuyen a la supresividad de manera directa o indirecta a través de su efecto sobre la microbiología del suelo (Brady y Well, 2017).

4.3.5.- Ciclo de vida de *Fusarium* spp.

El ciclo de vida de *Fusarium* spp. está conformado por la alternancia de etapas de supervivencia, patogénicas y de dispersión. El proceso de patogénesis varía dependiendo de la especie y del hospedante. Okungbowa y Shittu (2012) describen la patogénesis general de *Fusarium* spp.:

- **Etapas Dormancia o Sobrevivencia:** La germinación de los propágulos del patógeno en el suelo puede ser inhibida por la microbiostasis o fungistasis; esta

inhibición puede revertirse por el contacto con exudados radiculares. Estos exudados, que son fuente de carbono (carbohidratos), nitrógeno (aminoácidos) y ácidos orgánicos, estimulan la germinación de los propágulos y no son específicos del hospedante. Pueden provenir tanto de la planta hospedante primaria (cultivo) como de las hospedante alternas (arvenses, malezas) o de residuos vegetales recién incorporados (Nelson, 1991; Huisman, 1982; Steinkellner *et al.*, 2008).

- **Etapa Parasítica-Patogénica:** Comienza cuando los propágulos o tubos germinativos penetran al hospedante a través de la región pilífera, heridas, el ápice de la raíz, pelos radiculares, o hendiduras formadas durante la rizogénesis o por penetración directa (intercelular), asistida por enzimas hidrolíticas secretadas por *Fusarium* spp. Inicialmente, el micelio parasítico coloniza el córtex radicular, penetra la endodermis y finalmente invade los vasos xilématicos. A partir de los cuales coloniza el tallo de manera ascendente, produciendo microconidias que ascienden auxiliadas por el flujo de transpiración. Al germinar en nuevas hifas, estas penetran los tejidos adyacentes para continuar la colonización y aumentar la infección. La efectividad de la colonización está determinada genéticamente tanto por la presencia de genes de patogenicidad en el hongo como por la ausencia de genes de resistencia en el hospedante (Schnathorst, 1981; Rodríguez-Gálvez y Mendgen, 1995; Inoue *et al.*, 2002; Rodríguez-Molina, 2003; Mandeel, 2007; Walter *et al.*, 2009).

En esta etapa, las hifas de *Fusarium* spp. se propagan dentro del apoplasto celular, desencadenando alteraciones citológicas y fisiológicas significativas que culminan en la expresión de síntomas. La obstrucción de los tejidos conductivos surge de una combinación de elementos del patógeno (micelio, esporas, enzimas y toxinas), respuestas defensivas del hospedante (gomas, tilosis) y derivados del proceso infeccioso (protoplastos y componentes celulares lisados), que bloquean el flujo y provocan el colapso del flujo hídrico de la planta. Esto resulta en el síndrome de marchitamiento, eventualmente llevando a la muerte de la planta (VanderMolen *et al.*, 1977; Agrios, 2005; Walter *et al.*, 2009).

Se ha demostrado mediante pruebas de patogenicidad que algunas especies de *Fusarium* presentan especialización patogénica, posiblemente histológica, a

ciertos órganos del huésped (Souza *et al.*, 2018). Liew y colaboradores (2016) reportaron especies de *Fusarium* filogenéticamente distantes, asociadas al mismo síntoma de malformación del mango por lo que propusieron un proceso de evolución convergente, diferentes especies pueden parasitar al mismo tipo de tejido.

- **Etapas Dispersión:** Mientras la planta está enferma, pero aún viva, *Fusarium* spp. permanece estrictamente limitado al tejido del xilema y células adyacentes. Una vez que el hospedante muere, el hongo invade el tejido parenquimatoso y esporula profusamente en la superficie. En las etapas finales de este proceso, la conidiogénesis comienza en tejidos muertos y se producen extensivamente clamidiosporas, las cuales pueden permanecer en latencia en el suelo durante varios años. Los nuevos propágulos generados pueden reintegrarse al suelo cuando la planta se descompone o dispersarse a plantas adyacentes a través del agua y aire. La densidad del inóculo resultante es un factor importante que condiciona la severidad e incidencia de la enfermedad en ciclos posteriores (Di Pietro *et al.*, 2003; Navas-Cortés *et al.*, 2007).

La dispersión de *Fusarium* spp. se realiza principalmente por la diseminación pasiva de propágulos a nivel endémico, a través del viento, riego, movimiento de material vegetal y suelo infestados, labores culturales, y transporte de esporas mediante insectos y animales. Entre países y continentes, la dispersión ocurre principalmente por medio factores antropogénicos (Dita *et al.*, 2018).

4.3.6.- Técnicas moleculares aplicadas a la taxonomía de *Fusarium* spp.

La taxonomía del género *Fusarium*, anteriormente se basaba exclusivamente en caracteres morfológicos. Sin embargo, para una identificación precisa entre especies, es necesario complementar con análisis moleculares. Actualmente, se ha adoptado el uso de secuencias genómicas de uno o varios genes para este propósito. No obstante, este enfoque enfrenta limitaciones como el costo, la disponibilidad de secuencias genómicas de referencia en bases digitales (i.e. GenBank) y el alto porcentaje de especies taxonómicamente erróneas registradas en dichas bases, lo que dificulta la identificación por homología (Leslie y Summerell, 2006; O'Donnell *et al.*, 2015; Summerell *et al.*, 2019).

El enfoque molecular se basa en el diseño de 'primers' adecuados para la amplificación y secuenciación selectiva de la región objetivo, utilizando la técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction), para la amplificación de fragmentos o genes completos. En *Fusarium* spp. se han generado primers genéricos basados en los genes *EF-1a*, *RPB-1*, *RPB-2* seleccionados debido a que cumplen con los siguientes criterios

1. Son aplicables a la diversidad taxonómica y filogenética de *Fusarium* spp.
2. Informativos a nivel intra-especie.
3. Son ortólogos a nivel de género, lo que significa que su variabilidad es específica para la complejidad de especies dentro del género (O'Donnell *et al.*, 1998; O'Donnell *et al.*, 2008; Aoki *et al.*, 2003).

4.3.7.- Genoma y evolución de *Fusarium* spp.

Análisis filogenéticos basados en fragmentos de los genes *RPB-1* y *RPB-2* sugieren que el clado de *Fusarium* spp., que abarca complejos de múltiples especies, divergió hace 91.3 millones de años. Con el paso del tiempo, estas especies han diversificado sus ciclos de vida, nichos ecológicos, patogenicidad y virulencia en una variedad de hospederos, lo que evidencia la plasticidad adaptativa del género. Es probable que tanto las especializaciones convergentes como divergentes se reflejen como firmas genómicas (O'Donnell *et al.*, 2013; Sperschneider *et al.*, 2015).

Estudios en *Solanum lycopersicum* (Tomate) con *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* han demostrado la factibilidad de la transferencia horizontal de genes de patogenicidad, mediante la transformación de un aislado no patogénico a patogénico. Esto explica el posible origen polifilético de algunas especies de *Fusarium* (Ma *et al.*, 2010).

Análisis comparativos han revelado que el genoma de *Fusarium* spp. está compartimentado en dos regiones:

- 1) El genoma central, donde se ubican los genes responsables *RPB-1*, *RPB-2* y *EF-1*, es responsable del metabolismo primario y reproducción, son considerados como genes 'housekeeping'. Estos genes son recomendados para estudios taxonómicos y filogenéticos en *Fusarium* spp. debido a su variabilidad intra e inter-especie, lo que proporciona una caracterización genética efectiva.

2) El genoma adaptativo al cual se asocian genes de virulencia, especialización a un hospedante y posiblemente otras funciones de sobrevivencia (Ma *et al.*, 2013; O'Donnell *et al.*, 2015).

4.3.8.- Fisiopatías resultantes de la interacción de *Agave tequilana* Weber var. Azul-*Fusarium* spp.

La expansión de la superficie cultivada de agave, junto con la voraz necesidad de material propagativo para su establecimiento, sin un correcto manejo fitosanitario, ha generado un incremento en la incidencia de enfermedades causadas por fitopatógenos, en sinergia con las prácticas tradicionales del cultivo y condiciones edafológicas favorables. En esta planta los daños causados por organismos fúngicos se manifiestan como necrosis y/o pudriciones semisecas, inodoras que pueden afectar todos los tejidos; generando infección directa o por daños derivados de las prácticas agrícolas (Virgen-Galleros, 2004; CESAVER, 2008).

Diversos estudios etiológicos y epidemiológicos realizados en el patosistema *Agave tequilana-Fusarium* spp. para determinar los agentes causales de la marchitez y pudrición seca del cogollo (SMAP), han identificado una gran diversidad de especies de *Fusarium* spp. (Figura 4.9). Esta diversidad se debe a la plasticidad adaptativa del género y a la presencia de especies polifiléticas, pertenecientes a los complejos FIESC, FFSC, FOOSC, FRSC y FSSC (López-Bautista *et al.*, 2020; Mendoza-Ramos *et al.*, 2020).

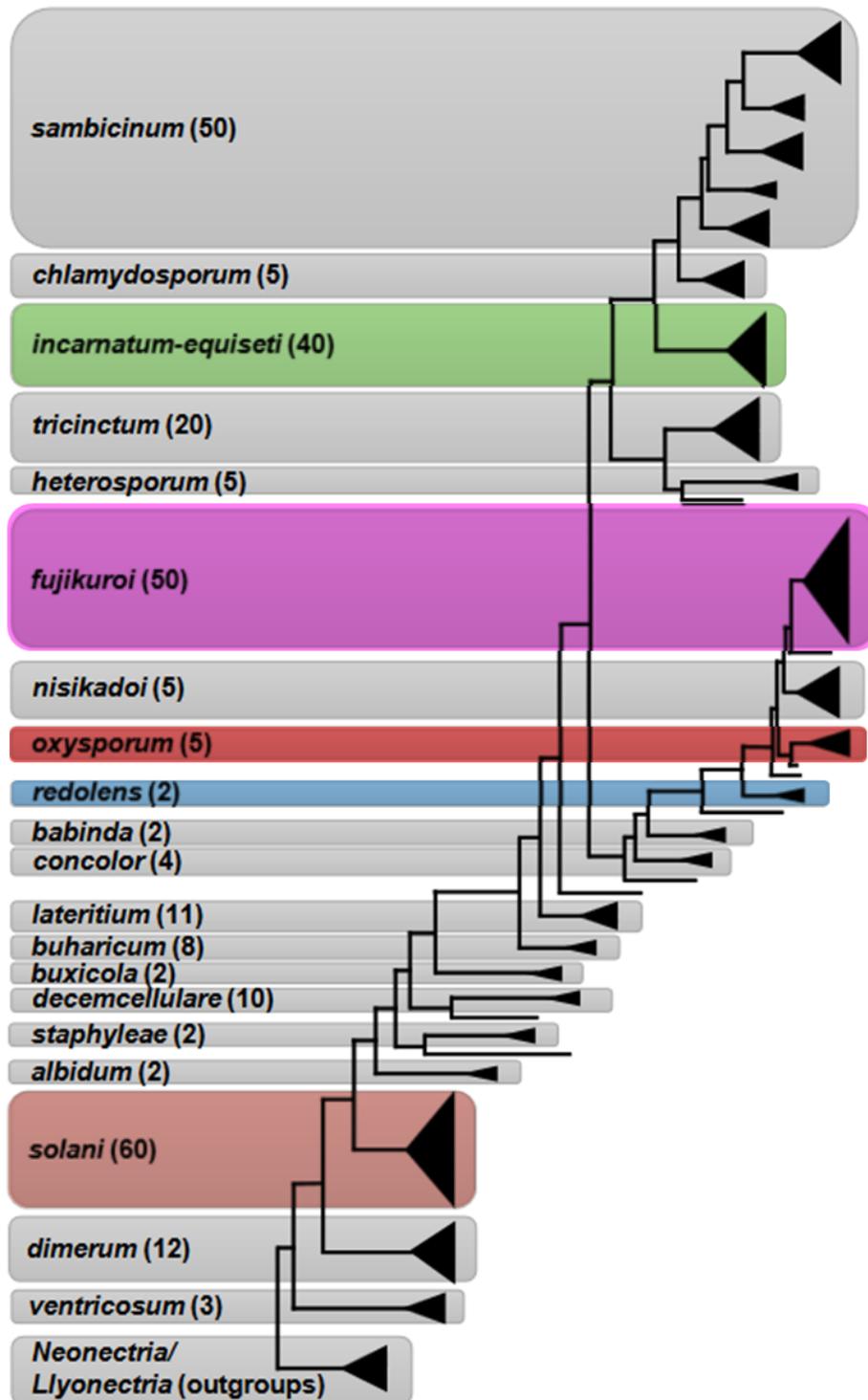


Figura 4.9: Representación esquemática de la filogenia de 23 complejos especies de *Fusarium* spp. de importancia económica. Numero entre paréntesis indica las especies filogenéticas agrupadas por complejo (300 total). Se resaltan complejos de especies de *Fusarium* spp. reportados en *Agave tequilana*. (Modificado: O'Donnell *et al.*, 2015).

4.4.- Síndrome de Marchitez y Pudrición del cogollo de *Agave tequilana* (SMAP)

4.4.1.- Sintomatología del Síndrome de la Marchitez y Pudrición del cogollo de *Agave tequilana*

El síndrome de marchitez y pudrición del cogollo del *Agave tequilana* (SMAP) es una enfermedad recurrente de alto impacto en los inventarios productivos. La sintomatología comienza con decoloración foliar, pérdida de turgencia y vigor. Posteriormente, las pencas sufren desecación, que culmina en un enrollamiento o "encarrujado" descendente a partir del ápice. Este síndrome es resultado de la reducción, taponamiento o destrucción de los haces vasculares y/o del sistema radicular, finalizando con la pérdida del anclaje y muerte de la planta (Virgen-Calleros, 2000).

Su alta prevalencia a nivel regional y alto impacto en los inventarios productivos se debe a la ausencia de programas de manejo-control efectivos, lo que ha implicado al sector productivo optar por la eliminación total de plantas enfermas con la intención de evitar dispersión y contagio intra-predio (Luna-Hernández, 1996).

4.4.2.- Factores que inciden en el Síndrome de la Marchitez y Pudrición del cogollo de *Agave tequilana*

Al tratarse de una enfermedad predominantemente radicular, y debido a la fisiología de la planta que limita la expresión inicial de la enfermedad, una planta sintomática puede haber sido infectada de uno a dos años previos a la presencia del SMAP. Esto merma la productividad de manera importante, aun cuando el daño y la muerte no sean inmediatos. Las condiciones ambientales como el estrés hídrico, encharcamiento, daños por insectos y la aplicación de herbicidas pueden acelerar la expresión de la enfermedad (Martinez *et al.*, 1998; Virgen-Calleros, 2000).

- Estrés hídrico: La reducción en la tasa de producción de biomasa radicular y el debilitamiento de los tejidos de la raíz durante temporadas de sequía aumentan la vulnerabilidad de la planta a la colonización de *Fusarium* spp., cuyo ataque se agrava en suelos con bajo contenido de humedad (Virgen-Calleros, 2000; Leslie y Summerell, 2006).

- Insectos Rizófagos: Los daños generados por insectos rizófagos, generados al alimentarse del tallo y raíces, pueden favorecer la infección o, en casos severos, emular la sintomatología del síndrome al interferir con la translocación de azúcares y agua, en sinergia con infecciones accesorias (Fuscikovsky *et al.*, 2000; CRT, 2005; Rubio *et al.*, 2007; Flores *et al.*, 2010).

A pesar de que esta enfermedad solía manifestarse exclusivamente en plantaciones de más de tres años, ahora también afecta a plantas de un año, sobre todo al final del periodo de lluvias, debido al uso de hijuelos infectados (principal vía de dispersión). Estos hijuelos, en ocasiones, pueden presentar lesiones rojizas esclerotizadas en el tejido interno, denominadas “clavo”, de donde invariablemente se ha aislado *Fusarium* spp. La incidencia de esta enfermedad tiende a agravarse en plantaciones con alta densidad (Aceves, 2003; Rubio, 2007, Mendoza-Ramos, 2020).

4.4.3.- Agente causal del Síndrome de Marchitez y Pudrición del cogollo de *Agave tequilana*: *Fusarium* spp.

El SMAP es un síndrome causado por diferentes especies de *Fusarium* con adaptabilidad parasítica diferencial a nivel intra e interespecie. Estudios etiológicos han reportado diversos organismos asociados a esta enfermedad, pero únicamente se han realizado pruebas de patogenicidad exitosas con *F. oxysporum* y *F. solani*. Sin embargo, otros autores han aislado un alta diversidad de especies pertenecientes a cuatro complejos filogenéticos: FOOSC, FSSC, FFSC y FIESC (Figura 4.9), de plantas de agave con la misma sintomatología. (Cuevas y Dominguez, 2007; Vega-Ramos *et al.*, 2013; Ramírez-Ramírez *et al.*, 2017; López-Bautista *et al.*, 2019, 2020; Ramos-Mendoza *et al.*, 2020) (Figura 4.10 y Cuadro 4.1).

La alta diversidad de especies de *Fusarium* asociados a *Agave tequilana*, a pesar de estar restringido a la DOT, es posiblemente debida a la movilización de material propagativo intra e inter regionalmente; al establecimiento de policultivos asociados a especies de ciclo más corto como *Arachis hypogaea* (Cacahuete), *Phaseolus vulgaris* (Frijol), *Zea mais* (maíz), *Citrullus lanatus* (Sandia) y *Triticum aestivum* (Trigo); así como la poca especificidad de los mecanismos de patogenicidad del género (Mendoza-Ramos,2020).

Complejos y Especies de *Fusarium* spp. reportadas asociadas a *Agave tequilana*

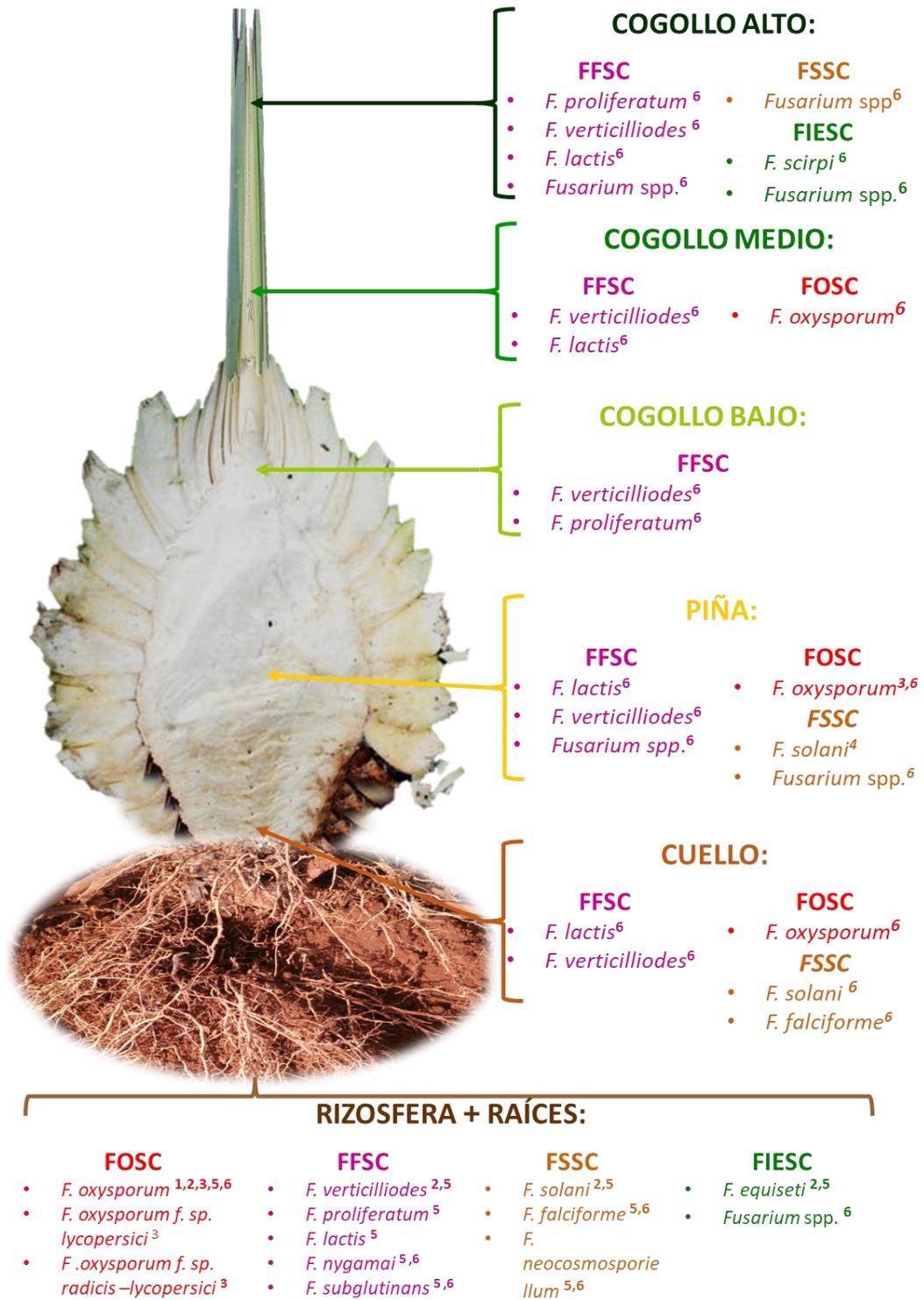


Figura 4.10: Complejos y Especies de *Fusarium* spp. reportadas asociadas a *Agave tequilana*.

Cuadro 4.1: Reportes de organismos asociados al Síndrome de la Marchitez y pudrición del cogollo del *Agave tequilana* (SMAP).

Organismo reportado	Identificación	Localidad	Número de aislados	P. Koch	Autor y Año
<i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Phytophthora sp.</i> y <i>Erwinia sp.</i>	Identificación morfológica	Centro, Altos y Sur de Jalisco.	No se especifica	-	(1) Rodríguez, R. <i>et al.</i> , 2001.
<i>Fusarium oxysporum</i> , <i>F. solani</i> , <i>F. equiseti</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. verticillioides</i>	Identificación molecular: ITS1-ITS4	San Juanito Escobedo y Ameca	127 aislados	-	(2) Cuevas, F. <i>et al.</i> , 2007.
<i>Fusarium oxysporum</i>	Identificación morfológica	Arenal, Teuchitlan, Tala, Acatic, Magdalena, Tepic	27 aislados	+	(3) Ávila-Miranda <i>et al.</i> , 2010.
<i>Fusarium solani</i>	Identificación molecular: ITS1-ITS2	No se indica la localidad de donde se obtuvo el aislamiento	1 aislado	+	(4) Ramírez <i>et al.</i> , 2017
<i>F. oxysporum</i> <i>F. solani</i> <i>F. falciforme</i> <i>F. neocosmosporiellum</i> <i>F. proliferatum</i> <i>F. lactis</i> <i>F. nygamai</i> <i>F. subglutinans</i> + 7 especies filogenéticas de FSSC, FFSC y FIESC y	Morfológica y molecular EF-1a y RPB2	13 municipios de la región Altos, 12 de Sur y 9 de Valles	113 molecular/ 435 aislados (suelo, raíz, cogollo, piña y cuello de planta adulta)	-	(5) López-Bautista <i>et al.</i> , 2019 (6) López-Bautista <i>et al.</i> , 2020

6 especies no
identificadas
del género *Fusarium*.

Fuente Modificada: Mendoza-Ramos, 2020.

4.4.4.-Interacción Evolutiva-Adaptativa-Parasítica entre *Fusarium* spp.-*Agave tequilana*

López-Bautista *et al.* (2020) demostraron, mediante un estudio regional en 86 plantaciones comerciales (3-4 años edad) ubicadas en 35 municipios dentro de la DOT y seleccionadas mediante un enfoque epidemiológico regional, la asociación de un complejo de 16 especies binomiales y filogenéticas, así como seis no identificadas de *Fusarium* spp. con síntomas de SMAP. Estas especies se agruparon en cuatro complejos filogenéticos: FO SC con 26.5% de representatividad regional, FSSC (32.7%), FFSC (34.5%) y FIESC (6.2%).

A través de un análisis de secuencias y filogenia se confirmó la variabilidad intra e interespecífica de *Fusarium* spp., así como la asociación de haplotipos, definidos como variantes de secuencia intraespecíficas basados en los genes *EF-1a* y *RPB-2*, mostrando una correlación con una sintomatología específica. El síntoma de marchitez se asoció con una mayor cantidad de haplotipos específicos pertenecientes a *F. solani*, *F. falciforme* y *F. oxysporum*.

Las redes de haplotipos y mapas filogeográficos sugieren a *F. oxysporum* (FO SC) y *F. verticillioides* (FFSC) como ancestros poblacionales debido a su mayor prevalencia regional y frecuencia de aislados pertenecientes a un haplotipo específico. Sin embargo, la diversidad de especies aisladas por complejo, 1 y 8 respectivamente, sugiere diferentes procesos de evolución/adaptación al patosistema de *Agave tequilana*:

- *F. oxysporum* (FO SC): Principalmente asociado con raíz y suelo de plantaciones con marchitez, fue la especie mayor número de haplotipos. Cuatro de los ocho haplotipos estaban exclusivamente asociados a marchitez, tres a pudrición seca, y uno a plantaciones aparentemente sanas. El haplotipo ancestral se aisló de la mayor diversidad de síntomas y nichos, indicativo de su mayor adaptabilidad. La especialización de haplotipos asociados únicamente con marchitez, pudrición seca

o con la capacidad de causar ambos tipos de síntomas sugiere un proceso de evolución divergente intraespecífica derivado de una adaptación/especialización parasítica. Su presencia en tejido sintomático de pudrición de cogollo, junto con una mayor prevalencia en suelo y raíces asociadas con marchitez, sugiere una continuada coevolución con el cultivo de agave.

- *F. verticillioides* (FFSC): Asociado exclusivamente con tejido aéreo, mostró un menor número de haplotipos diversificados a partir del haplotipo ancestral. Esto sugiere un proceso de adaptación/evolución convergente al cultivo de agave, posiblemente derivado de una fuente exógena, como *Zea maíz*, debido a su alternancia parcelaria dentro de la DOT y su adaptación parasítica a tejidos aéreos en este cultivo. Sin embargo, la presencia de una mayor diversidad de especies del complejo FFSC podría ser el resultado de procesos alternativos de transferencia de genes que confieran la adaptación parasítica a tejidos de Agave.

La viabilidad de estos procesos genéticos poblacionales es posible considerando la continuada y confinada cultivación del agave por más de 200 años dentro de la región DOT, el uso de propagación vegetativa que confiere una homogeneidad genética y la longevidad del cultivo. Estos mecanismos adaptativos se han sugerido en cultivos como *Mangifera indica* (Mango) ante la creciente variabilidad y ocurrencia de nuevas especies de *Fusarium* spp. (Liew *et al.*, 2016).

4.4.5.- Manejo Integrado del Síndrome de la Marchitez y Pudrición del cogollo de *Agave tequilana*

El manejo integrado del SMAP, requiere un profundo entendimiento de la patogénesis, los factores asociados y su relación con la fenología del cultivo. Las estrategias resultantes deben ser multifacéticas, proactivas y eco responsables. El objetivo no es erradicar por completo las poblaciones de *Fusarium* spp. en la filosfera, sino reducir sus cargas de inoculo para prevenir síntomas significativos que impacten la productividad y la mortalidad del cultivo.

En cuanto al control químico, los fungicidas a base de cobre (inhibidores de la rizogénesis) tienen una efectividad limitada en plantaciones establecidas debido a la ubicación del órgano afectado. Aunque experimentos *in vitro* han demostrado la eficacia del sulfato de

cobre pentahidratado contra *Fusarium* spp. Sin embargo, alcanzar concentraciones eficientes en el ambiente rizosférico es difícil. Además, las poblaciones endófitas no se ven afectadas por tratamientos de esta índole (Soltero, 2002).

Dada la escasa efectividad de las alternativas químicas para brindar un tratamiento correctivo una vez que el hospedero ha sido infectado, sin mencionar sus perjuicios al ambiente, es perentorio un enfoque preventivo que reduzca su prevalencia, infectividad y sobrevivencia en el agroecosistema; haciendo hincapié en la supresividad física y biológica que brinda una rizosfera equilibrada.

Algunas prácticas agrícolas derivadas de este enfoque integral incluyen, propuestas por Rubio (2007), son:

- **Selección del terreno:** Evitar suelos compactados y con deficiente drenaje y antecedentes de incidencia de marchitez.
- **Fecha de plantación:** Evitar los meses de mayor humedad (septiembre-octubre) para reducir incidencia de enfermedades.
- **Uso de hijuelos sanos:** Establecer plantaciones únicamente con hijuelo sano, originados de predios con buena sanidad, o bien evitar zonas con síntomas de marchitez, debido a la posibilidad de que la infección en la planta madre, se haya propagado a sus hijuelos por medio del rizoma. Se sugiere desinfectar los hijuelos mediante inmersión en soluciones fungicidas a base de cobre después del tostoneo.
- **Eliminación de plantas enfermas:** Extraer y quemar las plantas con síntomas de marchitez fuera del predio.
- **Aplicación de cal:** *Fusarium* spp. tiende a proliferar en suelos con pH ácido (4.5-5.5), por lo que equilibrar el pH mediante la aplicación de cal reduce las condiciones favorables para el desarrollo de este hongo (Fückikovsky y Velásquez, 2001).
- **Aplicación de Materia Orgánica (MO):** Los beneficios suscitados por la incorporación de MO (abonos, compostas, etc.) derivan del incremento poblacional de microorganismos participes en su descomposición, mismos que pueden antagonizar organismos patogénicos; incluso ocupando nichos ecológicos previamente disponibles únicamente para los fitopatógenos (Fückikovsky, 2000).

Además de regenerar la estructura y propiedades físico-químicas de la rizosfera, mejorando la disponibilidad de nutrientes, drenaje del suelo, entre otros beneficios, que contribuyen a la salud de la planta.

- **Control Biológico (Introducción de Antagonistas):** El empleo de agentes de control biológico como *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. ofrece una alternativa sustentable para reducir las poblaciones patogénicas en la rizosfera; estos agentes suelen aislarse del suelo o de la planta objetivo, por su putativa adaptación al entorno agroecológico. Estos microorganismos inducen la supresividad en el suelo mediante competencia espacial y nutricional, así como la producción de metabolitos y subproductos que benefician las interacciones benéficas entre el hospedante y las poblaciones microbianas nativas. La heterogeneidad y complejidad de sus mecanismos de acción dificulta el desarrollo de resistencia por parte del patógeno hacia ellos (Siddiqui-Zaki, 2006; Steinberg *et al.*, 2007). Sin embargo, su eficacia en campo depende de factores ambientales y su acción no es inmediata (Serrano-Garrean y Galindo-Fentanes, 2007).

4.5.- Asociación de *Fusarium* spp. con hijuelos de *Agave tequilana*

El estudio de Mendoza-Ramos (2020) confirma la asociación entre hijuelos de *Agave tequilana* y *Fusarium* spp., subrayando su rol en la diseminación interregional y parcelaria de inóculo asociado al SMAP en el establecimiento de plantaciones. Este estudio se realizó en 21 municipios de la DOT, con diferentes niveles de inductividad regional y parcelaria (alta, moderada y baja). Se analizaron tejidos externos e internos para determinar la carga total del hijuelo y los potenciales sitios de infección, con el fin de evaluar el riesgo que representa la movilización de hijuelos para el establecimiento de plantaciones, con implicaciones a nivel regional e inductividad.

4.5.1.- Método CIFUSAG y Estimación de carga de inóculo de *Fusarium* spp. en tejido externo fresco de hijuelos *Agave tequilana*

Con el objetivo de cuantificar la carga de inóculo en el suelo adherido a hijuelos, se desarrolló la metodología CIFUSAG (Mendoza-Ramos *et al.*, 2020), que consistía en un lavado del cuello y base de las hojas de una muestra compuesta 15 hijuelos/calibre con 1 L de Agua Desmineralizada Estéril, lo que resultaba en la obtención de la muestra de

Carga de Inoculo Externo (CIE). En suelos arenosos la muestra CIE varió de 5-15 g de suelo, mientras que en predios arcillosos alcanzó 30 g. Conclusivamente la metodología evidencio altos crecimientos de UFC Hongos Totales Totales (\bar{x} =129 UFC) y UFC *Fusarium* spp. (\bar{x} =6 UFC) permitiendo realizar análisis epidemiológico para el manejo y control adecuado de éste u otros organismos patógenos presente en el cultivo. Las UFC Hongos Totales mostraron diferencias significativas entre calibres, siendo el calibre Toronja el que presento el mayor UFC de Hongos Totales (\bar{x} = 107.1 UFC) .

Previo al planteamiento del método CIFUSAG no existían trabajos reportados en agave o cultivos similares que permitieran la cuantificación de *Fusarium* spp. en estructuras propagativas como hijuelos, cormos, bulbos u otros mediante métodos análogos.

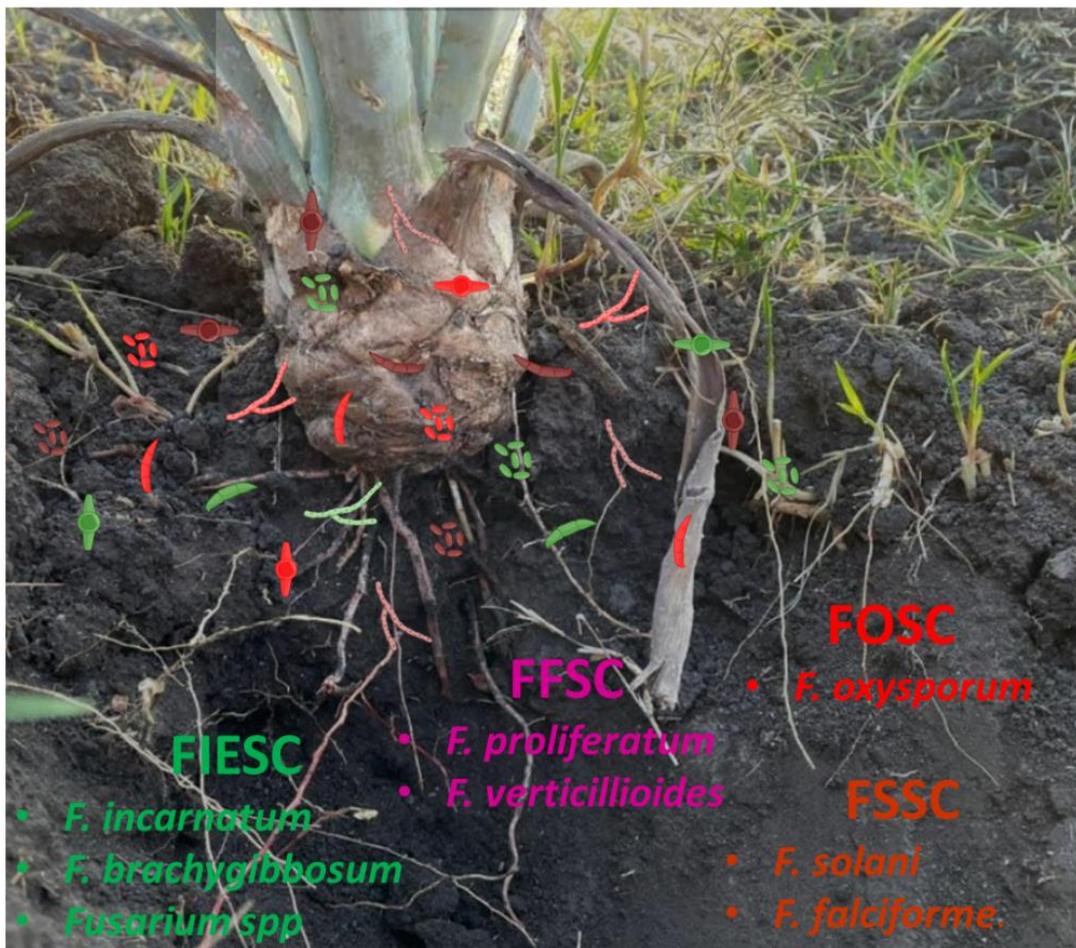


Figura 4.11: Complejos y Especies de *Fusarium* spp. reportadas en suelo adherido a hijuelos de *Agave tequilana* (Mendoza-Ramos *et al.*, 2020).

4.5.2.- Carga de Inoculo de *Fusarium* spp. en Tejido Interno Fresco de Hijuelo

Mendoza-Ramos (2020) reporta que la carga de inoculo endófito de hijuelos de *Agave tequilana*, determinada a partir del macerado del tejido interno fresco, varía en rango según la inductividad de la plantación madre: Alta (2.7-3.4 UFC *Fusarium* spp.), Moderada (0.6-6.3 UFC) y Baja (0.2-1.0 UFC). Los resultados de pruebas preliminares mostraron que el sobrenadante del macerado del tejido interno presentaba la mayor cantidad de UFC hongos totales y UFC *Fusarium* spp.

Complejos y Especies de *Fusarium* spp. reportadas en tejido interno de Hijuelos de *Agave tequilana*

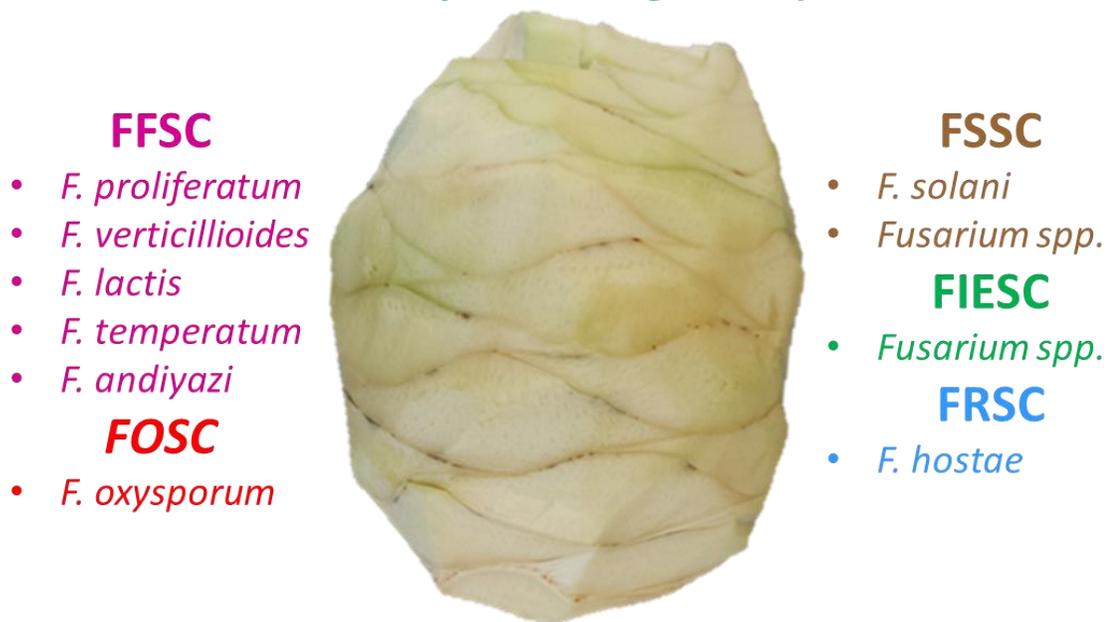


Figura 4.12: Complejos y Especies de *Fusarium* spp. reportadas en tejido interno de hijuelos de *Agave tequilana* (Mendoza-Ramos *et al.*, 2020).

Mediante siembras directas de tejido interno diferenciado, se determinó que la base de las hojas posiblemente sea el sitio de infección primario, ya que el 75% de las UFC contabilizadas se encontraron en este tejido, siendo el único tejido que reporto presencia de *Fusarium* spp. en todos los predios colectados, coincidiendo con los hallazgos en plantas adultas. Posiblemente, debido a la exposición de tejido susceptible al desprenderse del cogollo, mismo que por la inmadurez de sus tejidos, sería el segundo sitio de infección (15% UFC). Por otro lado, la piña (8% UFC) al ser un tejido interno y el cuello (2% UFC)

al no estar en contacto directo con el suelo, sino conectado al rizoma; implican un riesgo menor de infección. Sugiriendo que no existe un movimiento ascendente de cuello a tejido aéreo expuesto como las hojas, sino que existen múltiples vías de entrada.

Esto sugiere una posible especialización histológica a nivel de hijuelo, coincidiendo con lo reportado por López-Bautista *et al.* (2019), donde se documentó la existencia de una distribución diferencial de cepas de *Fusarium* spp. en tejido aéreo y raíces y suelo.

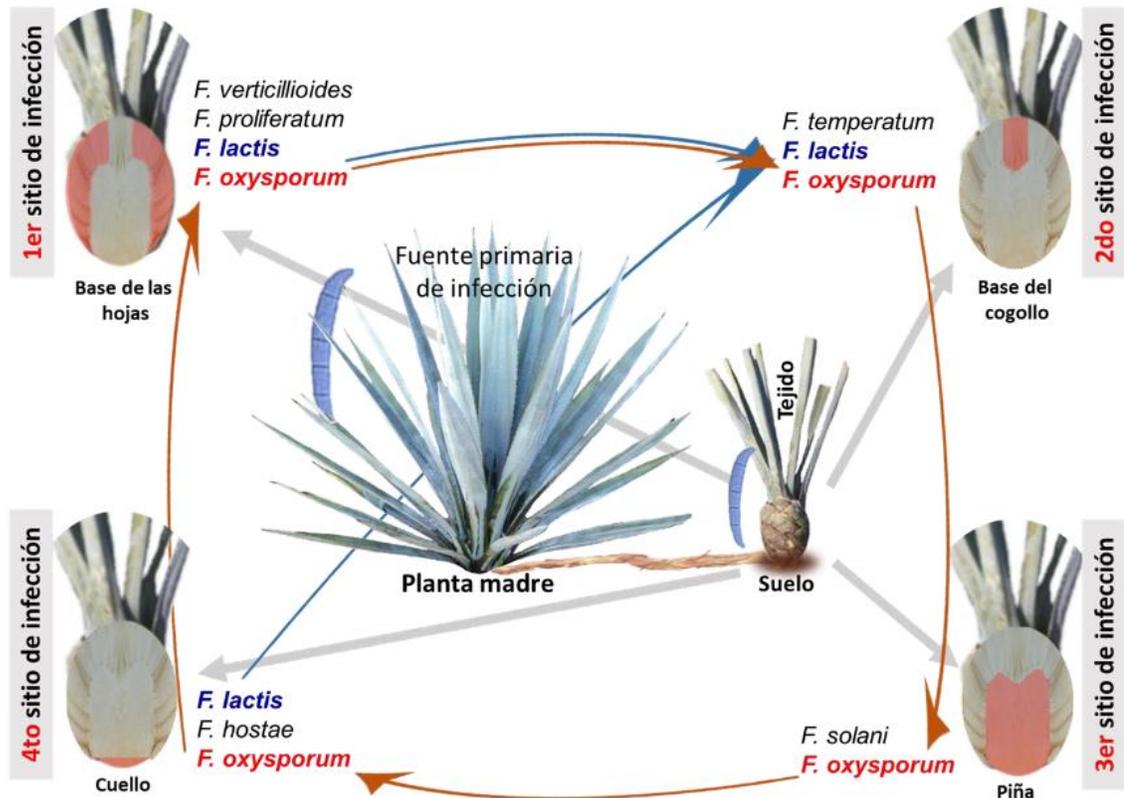


Figura 4.13: Ciclo de infección de *Fusarium* spp. en tejido interno de hijuelo propuesto por Mendoza-Ramos. Fuente: **Mendoza-Ramos, 2020.**

4.5.3.- Variabilidad de *Fusarium* spp. en Tejido Externo e Interno de Hijuelos

Los resultados de Mendoza-Ramos (2020) revelan una amplia diversidad de especies de *Fusarium* spp. en hijuelos de *Agave tequilana* tanto en el sustrato externo como interno. Se identificaron seis especies binomiales: FFSC: *F. verticillioides*, *F. lactis*, *F. nygamai*, *F. proliferatum*; FOSSC: *F. oxysporum*; FSSC: *F. solani*, *F. falciforme* y tres filogenéticas; FIESC 9, FIESC 28, FSSC 35.

Dos especies no identificadas reportadas en planta madre: *Fusarium* sp. 3-Agave (FFSC), *Fusarium* 2-Agave (FSSC), reportadas por López-Bautista *et al.* (2019), también se detectaron en hijuelos, lo que sugiere una posible adaptación o asociación organismo-hospedante más estrecha, que les permite prevalecer hasta la maduración de la planta.

Se confirmó la existencia en hijuelos de los mismos 4 complejos de especies de *Fusarium* reportados por López-Bautista (2019) en plantas adultas, además de un complejo adicional. De un total de 77 aislados de tejido externo e interno, el complejo FOOSC (32%), específicamente *F. oxysporum*, fue el más predominante, seguido del complejo FFSC (30%), FIESC (22%), FSSC (13%) y FRSC (3%).

- **FFSC:** Asociado en plantas adultas a tejido aéreo (92%), presenta una incidencia similar en hijuelos 52% en tejido y 48% en suelo. Este complejo presentó el mayor número de especies: *F. lactis*, *F. temperatum* y *F. andiyaci* aisladas exclusivamente de tejido interno, mientras que *F. verticillioides* y *F. proliferatum* se aislaron de suelo y tejido.
- **FSSC:** Conformado por *F. falciforme* (8/17) y *F. solani* (4/17) aislados exclusivamente de suelo, pero en planta adulta se reportan en raíz y piña, sugiriendo adaptabilidad parasítica.
- Se reporta por primera vez en tejido y suelo de agave las especies:
 - *F. temperatum* (FFSC) en base de cogollo.
 - *F. hostae* (FRSC) en cuello.
 - *F. brachygibbosum* (FIESC) en suelo.

Así mismo, los haplotipos presentan diferencias por prevalencia con respecto a los de planta madre: El Haplotipo 9 del complejo FOOSC es el más prevalente, aislado de suelo y tejido interno (57% de Base de Hoja); sin embargo, no se encuentra en planta adulta, infiriendo una baja sobrevivencia. Por el contrario, en el complejo FFSC, la distribución de haplotipos responde a una agrupación por especie, y los haplotipos predominantes de *F. verticillioides* y *F. proliferatum* se agrupan en el mismo sitio que los haplotipos de sus progenitores. Por otra parte, los nodos centrales del complejo FSSC, son exclusivamente de suelo y los haplotipos más distantes son de tejido, implicando procesos adaptativos a partes aéreas.

4.6.- *Trichoderma* spp.

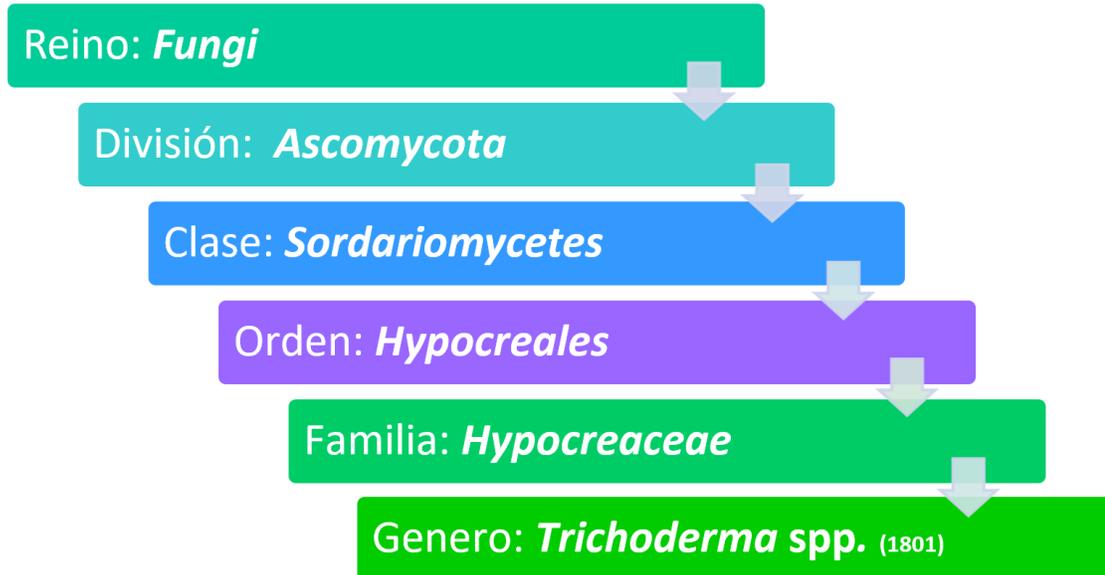


Figura 4.14: Clasificación taxonómica del género *Trichoderma* spp.

Las especies del género *Trichoderma* spp. son hongos saprófitos con una amplia tolerancia al pH, que va desde dos hasta nueve, siendo su rango óptimo de cuatro a siete. Esta plasticidad ecológica les permite una distribución geográfica cosmopolita.

Desde principios de 1930 se reconoció el potencial de las especies de *Trichoderma* spp. como agentes de control biológico de enfermedades en plantas. Desde entonces, se han descrito diversos mecanismos de acción para el control de organismos fitopatógenos, lo que posiciona su uso como una herramienta invaluable ante la resistencia recurrente de los hongos fitopatógenos a los fungicidas convencionales (Chet, 1987).

4.6.1.- Mecanismos de Control Biológico de *Trichoderma* spp.:

- **Competencia**

La competencia interespecífica se define como un comportamiento desigual de dos o más organismos frente a un mismo recurso (sustrato y/o nutrientes), donde la utilización de este por parte de uno de los organismos reduce el recurso disponible para los demás. Este tipo de antagonismo es favorecido por las características de *Trichoderma* spp., como su rápida velocidad de crecimiento y esporulación; siendo la

adaptabilidad a los factores del entorno un factor clave previo a la competición por recursos (Ahmad *et al.*, 1987).

- **Antibiosis**

Es la acción directa de metabolitos tóxicos producidos por un microorganismo sobre otro sensible a ellos. Sin embargo, varios autores advierten que la antibiosis no debe ser el principal mecanismo de acción de un antagonista, ya que existe el riesgo de que aparezcan cepas del patógeno que sean resistentes al metabolito (Vero *et al.*, 1999).

- **Micoparasitismo**

Uno de los mecanismos que posicionan al género *Trichoderma* como el arquetipo de organismo de control biológico es su habilidad de parasitar otros hongos, empleando enzimas extracelulares como quitinasas y celulasas (Ulloa, 1996). Weindling (1934) describió el micoparasitismo observado en *T. lignorum* vs. *Rhizoctonia solani*, incluyendo el enrollamiento alrededor de las hifas del patógeno, penetración y subsecuente disolución del citoplasma. Metcalf y Wilson (2001) describieron la interacción entre *T. koningii* y *Sclerotium cepivorum* en raíces de cebolla, observaron que el agente de control colonizó tanto el tejido cortical como el epidermal de las raíces infectadas, lo que condujo a la destrucción de las hifas del patógeno, sin causar daño detectable en el tejido sano, este efecto se atribuyó a la actividad de endo- y exo-quitinasas.

- **Promotor de crecimiento en las plantas**

La actividad como promotor de crecimiento se ha reportado en suelos tratados con algunas especies de *Trichoderma*. Los mecanismos que apoyan este efecto benéfico no están claros, pero incluyen el aumento de nutrientes disponibles y su absorción por parte de la planta, así como la participación de fitohormonas de crecimiento de la planta (Lindsay y Baker, 1967; Vinale *et al.*, 2008; Lorito *et al.*, 2010).

- **Inducción de respuesta de defensa en las plantas**

Otro mecanismo propuesto para explicar la actividad de biocontrol por especies de *Trichoderma* es la inducción de resistencia en el hospedante (Yedidia, *et al.*, 1999) La

respuesta de la planta colonizada por *Trichoderma* spp. se caracteriza por un incremento en la actividad de la peroxidasa (asociada con la producción de compuestos antifúngicos), un incremento en la actividad de quitinasa y la deposición de engrosamientos en la pared celular. Curiosamente, la defensa de la planta disminuye con el tiempo, iniciando una relación similar a la simbiótica de las micorrizas.

4.6.2.- Interacciones Bióticas Benéficas de *Trichoderma* spp.

Trichoderma spp. ha demostrado tener interacciones positivas con diferentes organismos benéficos. Por ejemplo, en plantas de melón, *Trichoderma harzianum* redujo la incidencia de la marchitez causada por *Fusarium* spp. al interactuar de manera sinérgica con especies de Micorrizas Arbusculares como *Glomus constrictum* o *Glomus intraradices*. La inoculación combinada de ambos organismos resultó en un mayor control del fitopatógeno y un desarrollo vegetativo mejorado en comparación con los tratamientos individuales (Martínez *et al.*, 2011).

4.6.3.- *Trichoderma* spp. como endófitos simbioses de plantas

Se ha observado que algunas cepas de *Trichoderma* spp, conocidas por ser competentes en la rizosfera y utilizadas comercialmente, pueden causar infecciones asintomáticas en las raíces. Inicialmente, se creía que la colonización se limitaba a la región cortical externa (Ahmad y Baker, 1987; Yedidia *et al.*, 1999). Sin embargo, Hodgson *et al.* (1994) demostraron la capacidad de *Trichoderma* spp. para crecer dentro de plantas de tabaco sin causar síntomas de enfermedad. Desde entonces, numerosos estudios han confirmado la presencia de *Trichoderma* spp. como endófito en una amplia variedad de plantas.

Esta interacción íntima con la planta provee varios proporciona varios beneficios, que han sido reconocidos recientemente, tales como:

- a) Inducción de resistencia sistémica adquirida, incrementando la tolerancia a estreses bióticos y abióticos.
- b) Mejoran la eficiencia en el uso del nitrógeno al aumentar los mecanismos de asimilación y reducción de nitrógeno

c) Reducen la expresión de genes de estrés o acumulación de compuestos tóxicos durante la respuesta de la planta a patógenos (Shoresh *et al.*, 2010).

4.6.4.- Sobrevivencia a la Deshidratación de *Trichoderma* spp.

Fravel *et al.* (2012) reportaron que la capacidad de las cepas de *Trichoderma* spp. para sobrevivir a la deshidratación en tejidos vegetales varía según la cepa y el tipo de tejido. Algunas cepas pueden sobrevivir en tejidos deshidratados durante varios días, lo que sugiere su utilidad para el biocontrol en cultivos propensos a la sequedad. Sin embargo, Li *et al.* (2016) demostraron que la deshidratación de cultivos de *T. asperellum* puede afectar negativamente su capacidad para colonizar las raíces de las plantas y, por lo tanto, su eficacia como agente de control biológico. Aunque el mismo tratamiento de deshidratación no afectó significativamente el potencial de colonización del suelo por parte de la misma cepa.

5.- METODOLOGÍA

5.1.- Criterios de selección y datos de predios colectados

La colecta de hijuelos calibre Toronja de *Agave tequilana* var. Azul se realizó en marzo 2021 en 8 plantaciones de entre 3-4 años de edad, distribuidas en 3 municipios de la región agavera de Valles de Jalisco: Ahualulco del Mercado, Magdalena, y Hostotipaquillo (Figura 5.15). El manejo agronómico correspondió a un convencional tecnificado. Las plantaciones se seleccionaron con base al nivel de incidencia de SMAP y al pH, como se indica en el Cuadro 1.

Cuadro 5.2.-: Criterios de Selección y Datos de Predios Colectados en la Colecta de Hijuelos Toronja 2021

Incidencia SMAP	Rango pH	No. Predio	pH Campo	Municipio	Latitud	Longitud	Altitud (msnm)
Baja	pH < 5	2	4.27	Magdalena	20.938096	-104.116094	1, 523
		5	4.65	Hostotipaquillo	21.003471	-104.133095	1, 046
	pH > 5	6	6.5	Hostotipaquillo	21.040908	-104.200219	972
		4	6.56	Magdalena	20.938710	-104.097396	1, 458
Alta	pH < 5	3	4.05	Magdalena	20.933442	-104.110314	1, 487
		8	4.97	Ahualulco De Mercado	20.884112	-104.059213	1, 378
	pH > 5	7	5.29	Magdalena	20.951263	-104.022176	1, 208
		1	5.34	Magdalena	20.949091	-103.999502	1, 416



Figura 5.15: Ubicación geográfica de los 8 predios colectados.

5.2.- Muestreo de Suelo: Delimitación Foco y Perifoco.

Se realizó un muestreo de suelo diferenciado con base en la distribución espacial de SMAP, designando como “Foco” a la sección con una alta incidencia de este, el área circundante donde la sanidad mejoraba fue identificada como "Perifoco" (Figura 5.16). Se integraron varias submuestras de una misma sección, recolectadas a 50 cm de la planta (entre calle) y a una profundidad de 30 cm; descartando los 5 cm superficiales; para conformar una muestra compuesta (500 g/sección); para su posterior análisis biológico. Con el propósito de caracterizar las propiedades edáficas del predio, se combinaron muestras de ambas secciones (500 g), para su análisis fisicoquímico.

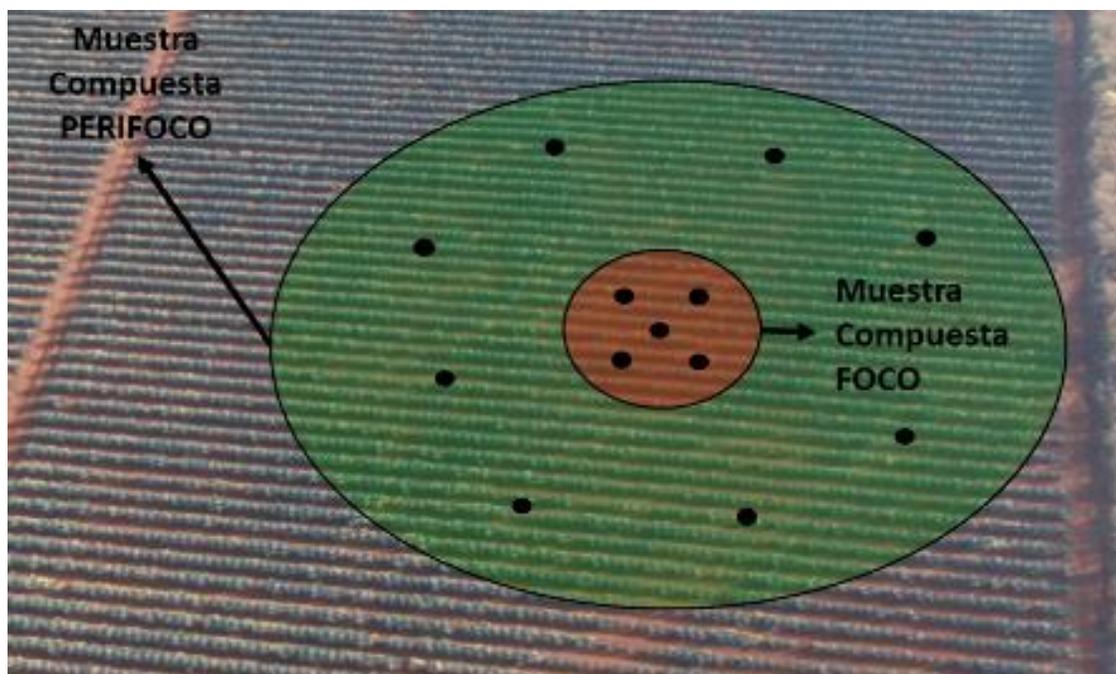


Figura 5.16: Delimitación y Muestreo secciones de Foco y Perifoco.

5.3.- Colecta de Hijuelos Calibre Toronja

Se identificaron 20 hijuelos de dos años o más de edad por predio (>14 cm de diámetro), categorizándolos según la sanidad de la Planta Madre de la que se originaron en: "Aparentemente Sana" y "Enferma". El arranque se realizó empleando un "barreton", insertándolo transversalmente en un solo golpe entre el hijuelo y la planta madre (Figura 5.17-A) para seccionar el estolón. Se enterró el barreton en la base de la piña, realizando movimientos de palanca de arriba-abajo para eliminar la sujeción restante de las raíces (Figura 5.17-B).

Una vez arrancado el hijuelo, se realizó el "Tostoneo" con un machete 30 cm (*Trupper*); eliminando raíces a nivel del cuello y cortando transversalmente la base de las hojas abiertas, conservando las del cogollo y recortando sus puntas (Figura 5.17 C-E). El diámetro del hijuelo se comprobó utilizando un "Aro de Calibre" de 14 cm de diámetro y se etiquetó. Los hijuelos colectados se clasificaron en dos bloques (10 hijuelos/bloque) según la sanidad de la planta madre: Aparentemente Sanas y Enfermas. Cada bloque se dividió en dos grupos (5 hijuelos/grupo), según el lavado que se les realizaría: *In situ* y Deshidratado (Figura 5.17-F, Figura 5.18).



Figura 5.17: Metodología de Arranque y Tostoneo de hijuelos *Agave tequilana* Calibre Toronja. A-B) Arranque de Hijuelo con Barretón, C-D) Tostoneo de Hijuelos con machete, E) Etiquetado de Hijuelos y F) Clasificación de Hijuelos en Grupos con base a la obtención de muestra (*In situ*-Deshidratada).

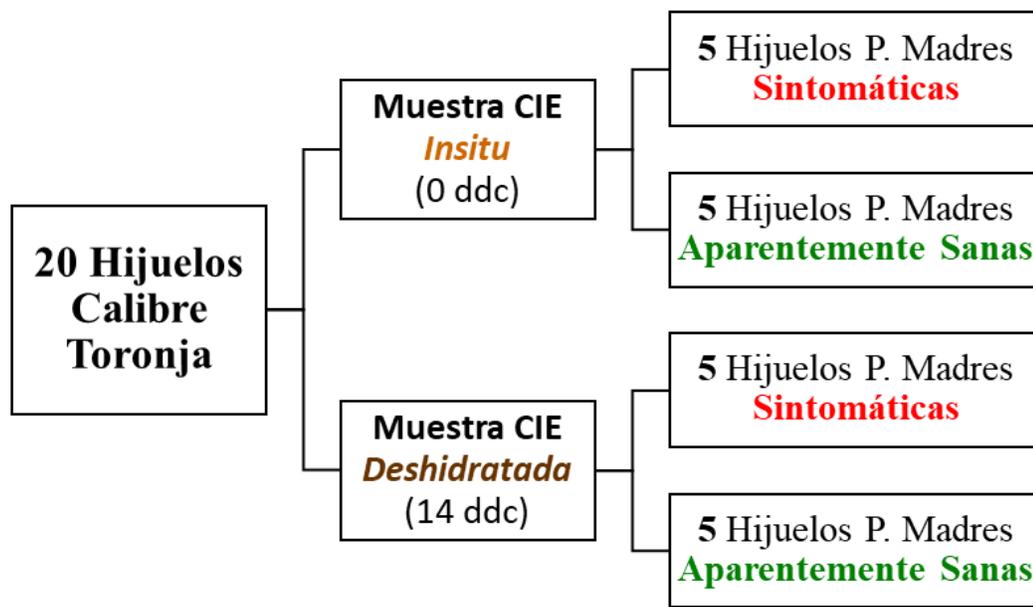


Figura 5.18: Agrupación de Hijuelos por grupo según la cronología de obtención de Muestra de CIE y Sanidad.

5.4.- Obtención muestra de Carga Inoculo Externo (CIE) *In situ*

Para obtener la muestra de CIE de los grupos *In situ*, se realizó el lavado de cuello y la base de las hojas de los hijuelos siguiendo el método *CIFUSAG* (Mendoza-Ramos *et al.*, 2020). El lavado de cada grupo de hijuelos se realizó empleando un litro de agua desmineralizada estéril en una cubeta plástica de 15 L. Los hijuelos se sumergieron parcialmente y se cepillaron con un cepillo plástico para desprender la mayor cantidad de suelo adherido. Finalizado el lavado de los 5 hijuelos del bloque, la muestra se homogeneizó utilizando un taladro modificado y se filtró con una malla plástica (abertura 2x2 mm) a otro recipiente de 2 L, dejando reposar la muestra durante 15 min para eliminar el excedente de agua y recuperar el suelo en tubos Falcon estériles de 50 mL, trasportándolos en hieleras con geles refrigerantes al laboratorio para su secado en sanitas estériles, dentro de la campana de flujo laminar (12-24h). Una vez secas, se conservaron en refrigeración (4°C), en tubos Falcón de 15 mL.



Figura 5.19: Metodología para la obtención de muestra de Carga de Inoculo Externo (CIE) en grupos de hijuelos correspondientes a lavado *In situ*, Método CIFUSAG (Mendoza-Ramos *et al.*, 2021). A) Lavado de Base de hojas con Agua Desmineralizada Estéril y cepillo de plástico, B) Homogenización de la muestra empleando un taladro modificado, C) Filtrado de muestra para eliminación de residuos de tejido, D) Sedimentación de Muestra (15 min) para separación de fases, E) Eliminación de Fase Acuosa y recuperación de suelo y F) Tubo Falcon de 50 ml con Muestra de CIE para traslado al laboratorio en hielera con geles refrigerantes.

5.5.- Procesamiento de Hijuelos (Frescos-Deshidratados), Deshidratación y Muestra de CIE *Deshidratada*.

Todo el material colectado fue trasladado a las instalaciones del Rancho El Indio, ubicado en Tequila, Jalisco, propiedad de SAUZA®. Se registró el diámetro y peso fresco de los hijuelos tostoneados. Manteniendo la trazabilidad, se separaron en sus grupos correspondientes, y se expusieron exponiénd al sol sobre hojas de papel periódico por 14 días (Figura 5.20 B-D). Cumplidos los 14 días, se registró el diámetro y peso de los hijuelos deshidratados. Se obtuvo la muestra de CIE Deshidratada, de los grupos correspondientes, utilizando la metodología previamente descrita, secando y almacenándola en refrigeración (4°C).



Figura 5.20: Procesamiento y Deshidratación de Hijuelos. A) Medición de peso y diámetro, B) Hijuelos Frescos, C) Exposición a la intemperie durante 14 días para deshidratación y D) Hijuelos Post-Deshidratación.

5.6.- Eliminación de Tejido Externo y obtención de muestra de Tejido Interno de Hijuelos

Se lavaron los hijuelos con agua de la llave, jabón y un cepillo plástico. Con un machete desinfectado con alcohol (70%), se eliminaron las hojas basales deshidratadas (Figura 5.21 A), exponiendo así el tallo, que fue seccionado transversalmente (Figura 5.21 B), al igual que las hojas del cogollo remanentes (Figura 5.21 C). El tejido externo restante, base de hojas e inserciones esclerotizadas (daño mecánico), se eliminó empleando una hoja de “barretón” desinfectada con alcohol (70%) (Figura 5.21 D). El tejido interno obtenido se pesó y se fragmentó; eliminando áreas que presentasen esclerotización por daños (Figura 5.21 E-F). Se realizó la desinfección sumergiendo los fragmentos en soluciones de cloro 3% (2 min), alcohol al 70% (2 min), y tres lavados con agua desmineralizada estéril (Figura 5.21 G-H).



Figura 5.21: Obtención de Muestra de Tejido Interno de Hijuelo. A) Eliminación de hojas basales deshidratadas, exposición de cuello, B) Seccionamiento transversal del cuello con un machete, C) Corte de hojas apicales y de cogollo, D) Eliminación de tejido externo restante e inclusiones esclerotizadas por daño, E) Pesado de Tejido Interno, F) Fragmentación de Tejido interno para una des infestación eficiente y G-H) Des infestación de Tejido Interno: Inmersión y lavado con Alcohol 70% (2 min.), Cloro 3 % (2 min.) y 3 enjuagues con agua desmineralizada esteril.

5.7.- Macerado de Tejido Interno y obtención de muestra de Carga de Inoculo Interno *Deshidratada* (CII)

La maceración del tejido interno se realizó en una licuadora industrial *Blendtec*, modelo TB-621-26, a tres mil revoluciones/min. por 60 segundos, con una proporción de dos ml de agua desmineralizada estéril por cada gramo de tejido interno (2:1) (Figura 5.22 A-C). El macerado resultante, se tamizó con una malla plástica (0.5x0.5 cm), eliminando el gabazo (Figura 5.22 D-E), recolectando la fase acuosa para su sedimentación por 15 min (Figura 5.22 F). Se tomó una muestra de 50 mL del sobrenadante en un tubo Falcon estéril de 50 mL (Figura 5.22 G-H), almacenándola a 4°C.



Figura 5.22: Macerado de Tejido Interno de Hijoelo y Obtención de muestra de CII. A-B) Establecimiento de proporción de 1 gr de tejido interno: 2 ml de agua desmineralizada estéril en licuadora Blendtec, modelo TB-621-26, C) Macerado a tres mil revoluciones por 60 s, D-E) Tamizado con malla plástica (0.5x0.5 mm) para eliminar el gabazo, F) Sedimentación de muestra obtenida por 15 min., G-H) Toma de muestra de Sobrenadante del Macerado de tejido Interno y recuperación en tubo falcón 50 ml estéril.

5.8.- Siembra del Sobrenadante del Macerado de Tejido Interno (CII).

Se sembraron 200 µL de la muestra del sobrenadante en Agar Nutritivo y PDA (0.25 g de Cloranfenicol/L) con tres repeticiones por medio. Se incubaron a temperatura ambiente, sin exposición a la luz. El conteo de UFC se realizó a los 3 y 7 DDS, para bacterias y hongos, respectivamente. Se tomo fotografías de las siembras a los 10 DDS. Las colonias putativas a *Bacillus* spp. se aislaron en Agar Nutritivo, mientras que las colonias putativas a *Fusarium* spp. y *Trichoderma* spp., se aislaron en PDA (0.25 g de Cloranfenicol/L).

5.9.- Siembra de Muestras CIE (*In situ*-Deshidratada)

Se realizaron diluciones seriadas para las siembras de muestra de CIE (*In situ* y Deshidratada) a partir de una Solución Madre: 1.66 g de muestra de CIE seca en 14.94 ml de agua desmineralizada estéril (1:9). Se empleo el factor de dilución de 1×10^{-4} para bacterias en Agar Nutritivo y $1 \times 10^{-0.5}$ para hongos en PDA y Komada (0.25 g de Cloranfenicol/L), sembrando 100 µl en 3 repeticiones por medio. Se incubaron a temperatura ambiente, sin exposición a la luz. El conteo de UFC se realizó a los 3 y 7 DDS, para bacterias y hongos, respectivamente. Se tomo fotografías de las siembras originales a los 10 DDS.

Las colonias putativas a *Bacillus* spp. se aislaron en Agar Nutritivo, mientras que las colonias putativas a *Fusarium* spp. y *Trichoderma* spp., se aislaron en PDA (0.25 g de Cloranfenicol/L).

5.10.- Purificación y conservación de aislamientos putativas a *Bacillus* spp.

La purificación de los aislamientos putativos a *Bacillus* spp. se realizó mediante “Estría Cruzada” en Agar Nutritivo. A partir de un crecimiento mono colonial, se re aisló y sembró por estría normal en medio R2-Agar. A los 3 DDS, una vez obtenido un crecimiento optimo, se re aisló de una colonia individual y se sembró Agar Nutritivo para generar biomasa para su conservación, la cual se realizó a los tres días en crio tubos de 2 mL conteniendo 1 mL de glicerol al 10%.

5.11.- Purificación de Organismos Fúngicos por Punta de Hifa

Tras confirmar la identidad de los aislamientos por sus características culturales y estructuras microscópicas, se sembraron en Agua-Agar (adicionado con 10 gotas de ácido láctico + 0.250 gr de cloranfenicol + 0.250 gr de estreptomina/L). Se incubaron a temperatura ambiente, sin exposición a la luz. A los 3 DDS se realizó el aislamiento mediante "punta de hifa": se cortó con una aguja de insulina cinco mL, un recuadro superficial del medio (1x1 mm) que contuviera una única hifa y se sembró en SNA para organismos putativos a *Fusarium* spp. y en PDA para *Trichoderma* spp.

5.12.- Obtención de cultivos Monospóricos

A los 7DDS, se procedió a realizar cultivos monospóricos. Se tomó una muestra de micelio, variando en cantidad dependiendo del organismo, y se diluyó en 1000 µl de agua desmineralizada estéril (SM) en un tubo Eppendorf de 2 mL. La solución se agitó vigorosamente y se realizaron diluciones seriadas, sembrando 100 µl de la dilución de 1×10^{-6} en Saboraud y TSM para *Fusarium* spp. y *Trichoderma* spp., respectivamente. A los 3DDS, se realizó el aislamiento de un crecimiento monoconidial en medio PDA (0.25 g de Cloranfenicol/L)

5.13.- Métodos de conservación

A los 7 DDS, una vez que los aislados esporularon, se procedió a su conservación, empleando tres métodos diferentes:

A) Tubo Inclinado (González, *et al.*, 2006)



- En un tubo de vidrio de 50 mL, se vertieron 15 mL de medio de cultivo PDA (0.25 g de Cloranfenicol/L) y se selló con un tapón de algodón. Posteriormente, se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 min. y se dejó solidificar inclinado a 30°. Se transfirió el micelio con un asa bacteriológica, sellándolo con algodón previamente flameado. Tras una incubación a temperatura ambiente (aproximadamente 4 días) y la corroboración de crecimiento y esporulación óptima, se almacenaron en un refrigerador a 4°C del cepario CP-LANREF con su etiqueta correspondiente.

B) Glicerol al 10% (Barbosa, *et al.*, 2009):



- La solución de glicerol al 10% se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 minutos. Posteriormente, se vertieron 1 mL de esta solución en criotubos de 2 mL previamente esterilizados, dentro de la campana de flujo laminar. Utilizando una hoja de bisturí, se seccionaron bloques (0.5x0.5 cm) de medio de cultivo con micelio; introduciendo la mayor cantidad posible en los criotubos de 2 mL, asegurándose su completa inmersión en la solución para generar una condición anaeróbica. Se almacenaron en un refrigerador a 4°C del cepario CP-LANREF con su etiqueta correspondiente.

C) Silica Gel (Pires-Cunha, *et al.*, 2015)



- Se vertió silica gel (Meyer) hasta la mitad de su capacidad en frascos de vidrio de 50 mL esterilizados específicamente para este propósito. Encima de la silica, se colocó un círculo de papel filtro, para separarla del material conservado. En la caja Petri que contenía el organismo, se añadieron 2 mL de leche descremada al 10% esterilizada, seguido de cuadros de papel filtro de 5x5 mm para absorber la suspensión con micelio y conidios. Los cuadros de papel filtro impregnados se recolectaron con pinzas e introdujeron en el frasco, asegurándose de evitar cualquier contacto con la boca o las paredes del frasco. Se almacenaron en un refrigerador a 4°C del cepario CP-LANREF con su etiqueta correspondiente.

Figura 5.23: Métodos de Conservación Organismos Fúngicos (Cepario CP-LANREF). A) Tubo Inclinado (González, *et al.*, 2006), B) Glicerol al 10% (Barbosa, *et al.*, 2009) y C) Silica Gel (Pires-Cunha, *et al.*, 2015).

5.14.- Caracterización Cultural

A partir de las cepas conservadas en tubo inclinado, se tomó una muestra de micelio, sembrándose en Medio Agua-Agar para eliminar cualquier contaminación bacteriana. Cumplidos los 3 DDS, y previo a la esporulación, se cortaron cuadros de medio de 0.5x0.5 cm y se colocaron en el centro de una caja de Petri grande con el medio de cultivo específico utilizado para caracterizar a cada organismo. Incubándose los primeros tres días dentro de una cámara de incubación sin exposición luz. En el cuarto día, se renovó el sello de Parafilm y se expusieron a luz durante 24 horas al día, durante los siete días restantes, para promover la pigmentación y correcta esporulación de las colonias (Reyes, *et al.*, 2018).

En base al organismo, se realizó la siembra en los medios de cultivos correspondientes de acuerdo con la literatura consultada:

Fusarium spp.: Se emplearon los medios de cultivo **PDA** y **Saboraud** (Estrada, 2019).

Trichoderma spp.: Se emplearon los medios de cultivo **PDA** y **V8** (Mukherjee, 2013)

A los 10 DDS, se tomaron fotografías del anverso y reverso de las colonias, procediendo con su caracterización, en base a las siguientes variables:

- Crecimiento Colonial:
 - ✓ Circular
 - ✓ Ondulado
 - ✓ Irregular
- Cantidad de Micelio:
 - ✓ Escaso
 - ✓ Moderado
 - ✓ Abundante
- Color Colonial Anverso y Reverso: Se empleó la escala de colores RGB, propuesta por la Royal Horticulture Society <http://rhscf.orgfree.com/>

Debido a la gran cantidad de aislamientos de *Fusarium* spp. obtenidos a partir de muestras de CIE, se empleó la caracterización cultural, especialmente en el medio de cultivo Saboraud, como método de agrupación entre morfotipos similares, infiriendo un parentesco filogenético, con el fin de seleccionar las cepas representativas para realizar su secuenciación. Se consideraron, además, variables como la prevalencia, la toma de muestra, el pH y la sanidad de la planta madre de donde se obtuvieron los aislados, para definir aquellos que presentasen un mayor interés desde el punto de vista agronómico.

5.15.- Extracción de ADN, PCR y Secuenciación

A partir de 146 aislados putativos a *Fusarium* spp. caracterizados culturalmente se seleccionaron 71 aislados para su identificación molecular, 47 aislados de CIE Y 24 Endófitos. Junto con los 21 aislados putativos a *Trichoderma* spp. obtenidos.

El gen empleado fue EF-1a, previamente identificados por su consistencia con éste ensamble de especies de *Fusarium* spp. en agave azul (López-Bautista *et al.*, 2020). La extracción de ADN se realizó con el protocolo AP (SDS 1%) (Sambrook y Russell, 2001) modificado. El ADN se cuantificó y determinó su calidad por espectrofotometría con Nano Drop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA), posteriormente se ajustó a 40 ng/ml. Para PCR el volumen final del mix de reacción fue de 25 µL [1X de 32 buffer de PCR (10X), 1.6 mM de MgCl₂, 0.16 mM de desoxinucleótidos trifosfato (dNTP's), 200 nM de cada iniciador, EF1* (5'-ATG GGT AAG GAR GAV AAG AC) / EF2* (5'-GGA DGT ACC AGT RAT CAT G), 0.5 U de Platinum® Taq DNA polimerasa (Invitrogen) y 2.5 µL de ADN (40 ng µL⁻¹). Se utilizó el termociclador T-100 de BioRad. El programa de termociclaje consistió en: desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min y 30 ciclos con desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, alineamiento a 58 °C por 40 s, extensión a 72 °C por 55 s y una extensión final de 72 °C por 7 min. Los fragmentos amplificados se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y TBE 1X. Cada depósito del gel se cargó con 4 µL del producto de PCR y 4 µL de buffer de carga (PROMEGA). Se usó el marcador de peso molecular (MMP) 1KB plus de Invitrogen con 1.5 µL+4 µL buffer. El gel se sometió a 90 volts por 90 min. Se tiñó con bromuro de etidio al 1.4% (Life-Technologies) y se visualizó en fotodocumentador (UVP- Bioluminescence Imaging Systems) con luz

ultravioleta. Una vez confirmada la amplificación de interés, el producto de PCR respectivo se secuenció con el servicio comercial de Macrogen Inc., Korea.

5.16.- Factores y Variables del Análisis Experimental

Factores Experimentales:

- **Incidencia** (Alta-Baja): Determinada por el muestreo inicial de incidencia SMAP.
- **pH** (pH<5-pH>5): Rango del pH de suelo (potenciómetro).
- **Sanidad** (Enferma-Sana): Planta Madre con síntomas de SMAP o Aparentemente Sana.
- **Edad** (0-14 días): Muestra CIE *In situ* o Deshidratada.

Variables:

- **FT**: No. UFC putativas a *Fusarium* spp.
- **IF**: Índice de *Fusarium* spp. (López-Bautista *et al.*, 2019) como una cuantificación de la carga de inóculo:

$$IF = \frac{FT}{HT}$$

Donde:

IF= Índice de *Fusarium* spp.

FT= No. de UFC putativas a *Fusarium* spp.

HT= No. de UFC de Hongos Totales.

5.17.- Análisis Estadístico

Se utilizó el software SAS versión 9.4 para realizar el análisis estadístico de las variables cuantitativas de FT e IF. Dada la naturaleza semi selectiva del medio Komada para *Fusarium* spp., se realizaron análisis independientes por medio de cultivo. Se determinó la normalidad de las variables mediante la prueba de Shapiro-Wilk ($p \geq 0.05$) usando PROC UNIVARIATE y la función NORMAL. Para variables que no cumplieron con los criterios de normalidad se aplicó un análisis no paramétrico, anidando PROC RANK y PROC GLM. Para FT e IF, el diseño experimental fue en parcelas subdivididas, por *Incidencia*, considerando el factor *Edad* como parcela grande, *pH* mediana y *Sanidad*

parcela pequeña. En particular, en la variable Rank-FT para el factor *Alta Incidencia* en PDA, se realizaron pruebas de T con PROC TTEST, para fines validatorios en interacciones marginalmente significativas.

6.- RESULTADOS

6.1.- Efecto de la deshidratación de 14 días en hijuelos de *Agave tequilana* Calibre Toronja

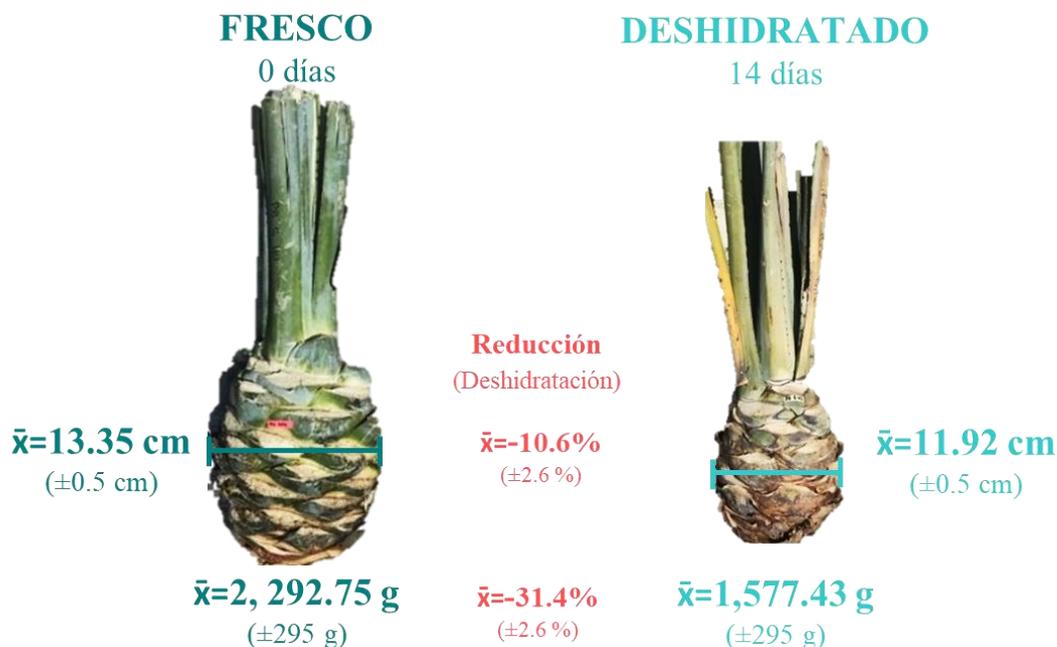


Figura 6.24: Mediciones (diámetro y peso) de 160 hijuelos calibre Toronja de *Agave tequilana*, recién arrancados y post-deshidratación (14 días) emulando práctica agrícola convencional para reducir pudriciones bacterianas y promover enraizamiento.

La plantitas del género *Agave* L. son plantas xerófitas con adaptaciones morfológicas que les permiten prosperar en ambientes con altas temperaturas y de agua. Estas adaptaciones incluyen hojas suculentas con cutículas gruesas, acumulación de ceras y baja frecuencia de estomas. Además, presentan metabolismo CAM, permitiendo la apertura estomática y asimilación de CO₂ durante la noche, minimizando la transpiración. Este mecanismo permite un flujo eficiente de agua almacenada en el parénquima medular, al clorénquima, confiriendo la capacidad de soportar periodos prolongados de sequía incluso superiores a siete años (Pimienta-Barrios *et al.*, 2001; Nobel *et al.*, 2003; Matiz *et al.*, 2013).

De los 160 hijuelos de *Agave tequilana* Calibre Toronja recolectados, se obtuvo un diámetro fresco promedio de 13.35 cm, medido con un vernier, con una mínima variabilidad de 0.5 cm debido a la característica intrínseca del Calibre Toronja de tener un

diámetro >12 cm. El peso promedio, incluyendo las hojas jóvenes adyacentes al cogollo que se conservaron para su protección (práctica estándar regional), fue de 2,292.75 g (± 295 g).

La deshidratación se llevó a cabo mediante exposición al sol en las instalaciones de Rancho “El Indio” en Tequila, Jalisco (20°53’47’’N, 103°53’07’’W; 1,174 msnm) durante el periodo del 23/03/2022 al 23/04/2022. Durante este tiempo, las temperaturas máximas y la radiación solar fueron de 32.1°C y 299.84 W/m² en marzo, y de 34.2°C y 324.83 W/m² en abril. La deshidratación, estandarizada a 14 días, es una práctica generalizada dentro de la DOT para reducir la incidencia de pudriciones, promover el enraizamiento y cicatrización de heridas del corte (Mendoza-Ramos, 2020).

Después de los 14 días de deshidratación, manteniendo la trazabilidad mediante etiquetas, se repitieron las mediciones. El diámetro promedio mostró una reducción del 10.6% ($\pm 2.6\%$), resultando en 11.92 cm (± 0.5), desviándose marginalmente de los estándares del calibre establecidos al momento de la recolección. El peso promedio de los hijuelos post-deshidratación fue de 1,577.43 g (± 295 g), presentando una reducción promedio de 31.4% ($\pm 2.6\%$) respecto a su peso fresco. Los tejidos de las hojas jóvenes adyacentes al cogollo y la base de las hojas basales presentaron los efectos más visibles. Sin embargo, la capacidad de resistencia al estrés hídrico de *Agave tequilana*, permite que esta drástica deshidratación no tenga efecto sobre la viabilidad del material propagativo.

Ramirez-Tobias *et al.* (2014) sometieron a seis especies de *Agave* spp., incluyendo *Agave tequilana*, a condiciones de potencial hídrico (Ψ) de -0.7 a -3.5 MPa para evaluar crecimiento, distribución de biomasa, grosor foliar y contenido de prolina. A menor disponibilidad de humedad (-3.5 MPa), se observó la inhibición síntesis de biomasa. Sin embargo, el número de hojas y la cobertura de la planta se mantuvieron estables en *Agave tequilana*, *A. duranguensis*, *A. lechuguilla* y *A. salmiana*. La redistribución de biomasa y el aumento del contenido de prolina varió entre especies, mostrando respuestas fisiológicas y bioquímicas diversas que reflejan su amplia tolerancia a condiciones ambientales adversas.

Adicionalmente, estudios realizados por Linton y Nobel (2001) determinaron que *Agave tequilana* reduce su conductividad hidráulica (K_h), un parámetro del transporte y mecánica de fluidos dentro de los vasos conductores, en un 50% bajo condiciones de estrés hídrico desde $\Psi -1.72$ MPa. Esto indica una adaptación ecológica ante el déficit hídrico, aumentando la resistencia al flujo del agua a través de los vasos conductores y moderando la pérdida de líquido en condiciones de sequía.

No se encontraron efectos significativos de los factores experimentales (Incidencia de SMAP, pH, Sanidad PM) en las medias de las mediciones frescas y/o deshidratadas. Hasta donde se tiene reporte no se han realizado estudios sobre los efectos de la deshidratación en la carga de inóculo interno y externo de *Fusarium* spp. en hijuelos de *Agave tequilana* y/o otros cultivos.

6.2.- Carga de Inoculo Interno (CII) en hijuelos de *Agave tequilana* post-deshidratación:

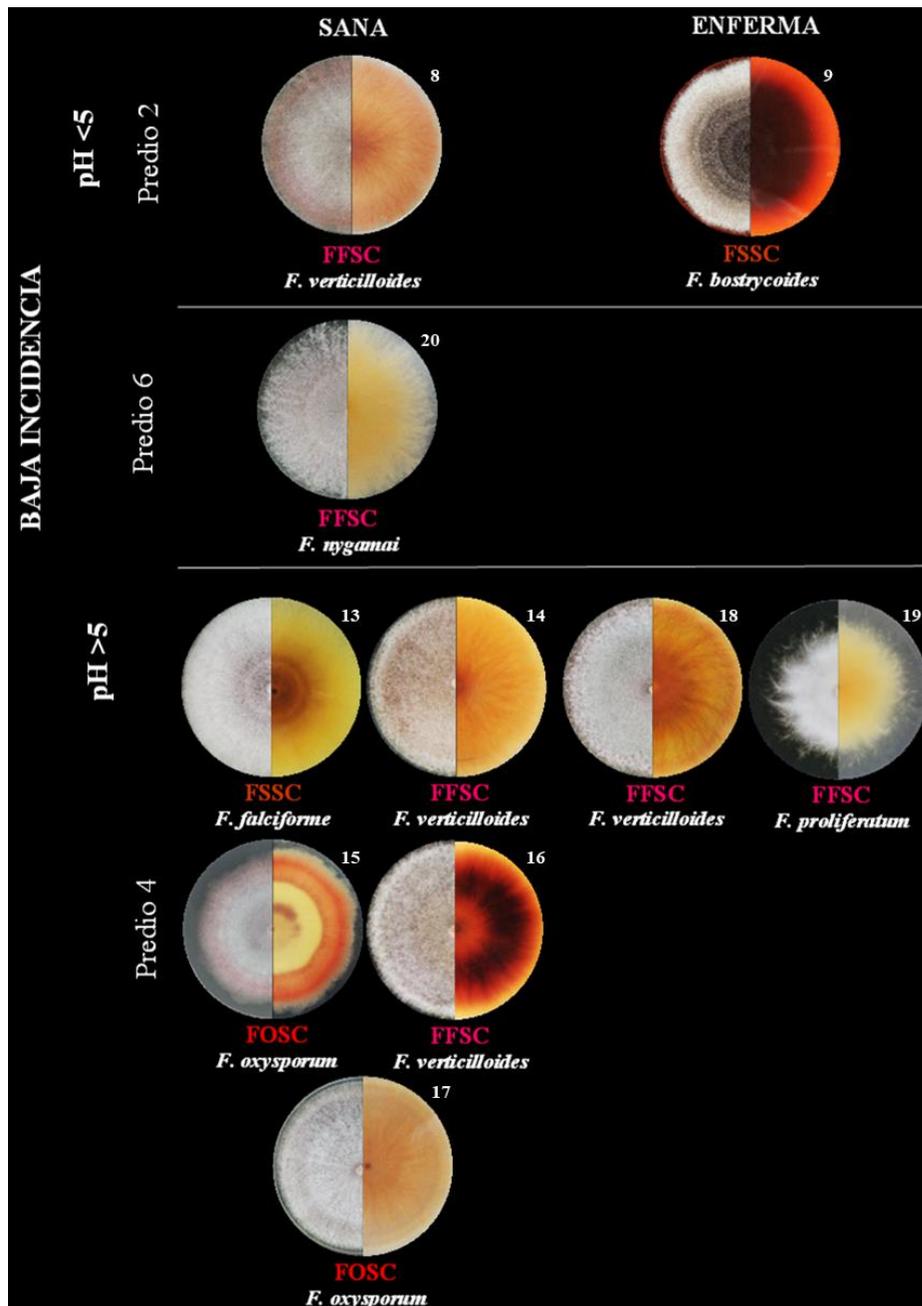


Figura 6.25: Carga de Inoculo Interna (CII) 1/2: Caracterización Cultural (anverso y reverso) en medio de cultivo Sabouraud de *Fusarium* spp. (complejo y especie) aislados del sobrenadante del macerado de tejido interno de hijuelos de *Agave tequilana* deshidratados durante 14 días colectados en predios con Baja incidencia de SMAP. Identificación molecular por: gen EF-1. Foto a los 10 días después de la siembra.

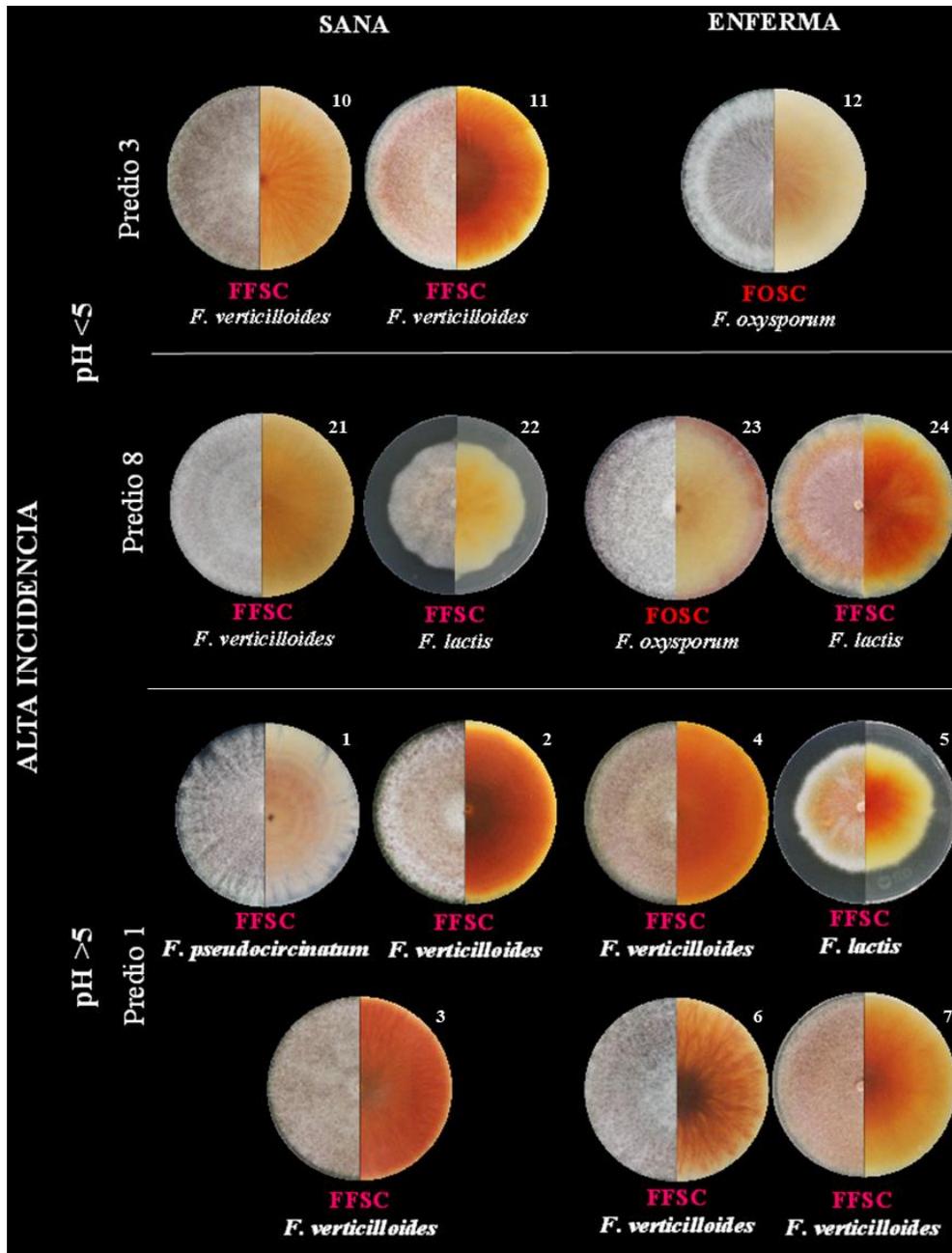


Figura 6.26: Carga de Inoculo Interna (CII) 2/2: Caracterización Cultural (anverso y reverso) en medio de cultivo Sabouraud de *Fusarium* spp. (complejo y especie) aislados del sobrenadante del macerado de tejido interno de hijuelos de *Agave tequilana* deshidratados durante 14 días colectados en predios con Alta incidencia de SMAP. Identificación molecular por: gen EF-1. Foto a los 10 días después de la siembra.

6.2.1- Presencia de *Fusarium* spp. y *Trichoderma* spp. en hijuelos de *Agave tequilana* post-deshidratación:

Derivado de la recolección de 160 hijuelos calibre toronja de *Agave tequilana* en la región de Valles, Jalisco y su posterior deshidratación durante 14 días mediante la exposición al sol. Se determinó la Carga de Inoculo Interno Deshidratada (CII), mediante la siembra del sobrenadante del macerado de tejido interno deshidratado en medio PDA (3 rep./hijuelo).

En predios con baja incidencia del síndrome de marchitez y pudrición del cogollo (SMAP) (Figura 6.27), *Fusarium* spp. se aisló como endófito sobreviviente a la deshidratación en 9 de los 80 hijuelos colectados. La incidencia fue mayor en plantaciones con un pH > 5 (7/9 hijuelos), mientras que los dos hijuelos restantes provinieron de un predio de pH ácido (pH < 5), en el predio restante (P5) no se detectó la presencia *Fusarium* spp. en el tejido interno; sin embargo, se encontró la presencia de un *Trichoderma* spp. endófito sobreviviente a la deshidratación en un hijuelo originado de planta madre (PM) sana. La distribución de la presencia de *Fusarium* spp. en el tejido interno de los 9 hijuelos con respecto a la salud de las plantas madre fue la siguiente: 6/9 hijuelos se originaron de PM sanas y 3/9 de PM enfermas.

La secuenciación del gen *EF-1* de los *Fusarium* spp. aislados reveló la presencia de 3 complejos de especies:

- ***Fusarium Fujikoroi* Species Complex (FFSC):** Este complejo fue el más abundante y diverso, con al menos un aislado por predio con presencia de *Fusarium* spp. Se obtuvieron un total de 6 aislamientos, agrupados en 3 especies diferentes:
 - *F. verticillioides* (4/6): Esta especie fue la más prevalente; con 3 aislamientos obtenidos de hijuelos originados de PM Sana y 1 de PM Enferma.
 - *F. proliferatum* (1/6): Se aisló de un hijuelo de PM Enferma.
 - *F. nygamai* (1/6): Se aisló de un hijuelo con PM Sana.

- ***Fusarium Solani Species Complex (FSSC)***: Este complejo fue el segundo más diverso en tejido interno de hijuelos, representado por 2 especies:
 - *F. bostrycoides*: Se aisló de un hijuelo de PM enferma del predio P2 (pH<5).
 - *F. falciforme*: Se aisló de un hijuelo de PM sana del predio P4 (pH>5).
- ***Fusarium Oxysporum Species Complex (FOSC)***: Este complejo fue el menos diverso, con 2 aislados pertenecientes a la misma especie: *F. oxysporum*. Los aislamientos se obtuvieron de hijuelos del mismo predio (pH>5), ambos de PM Sanas, pero con diferentes características coloniales.

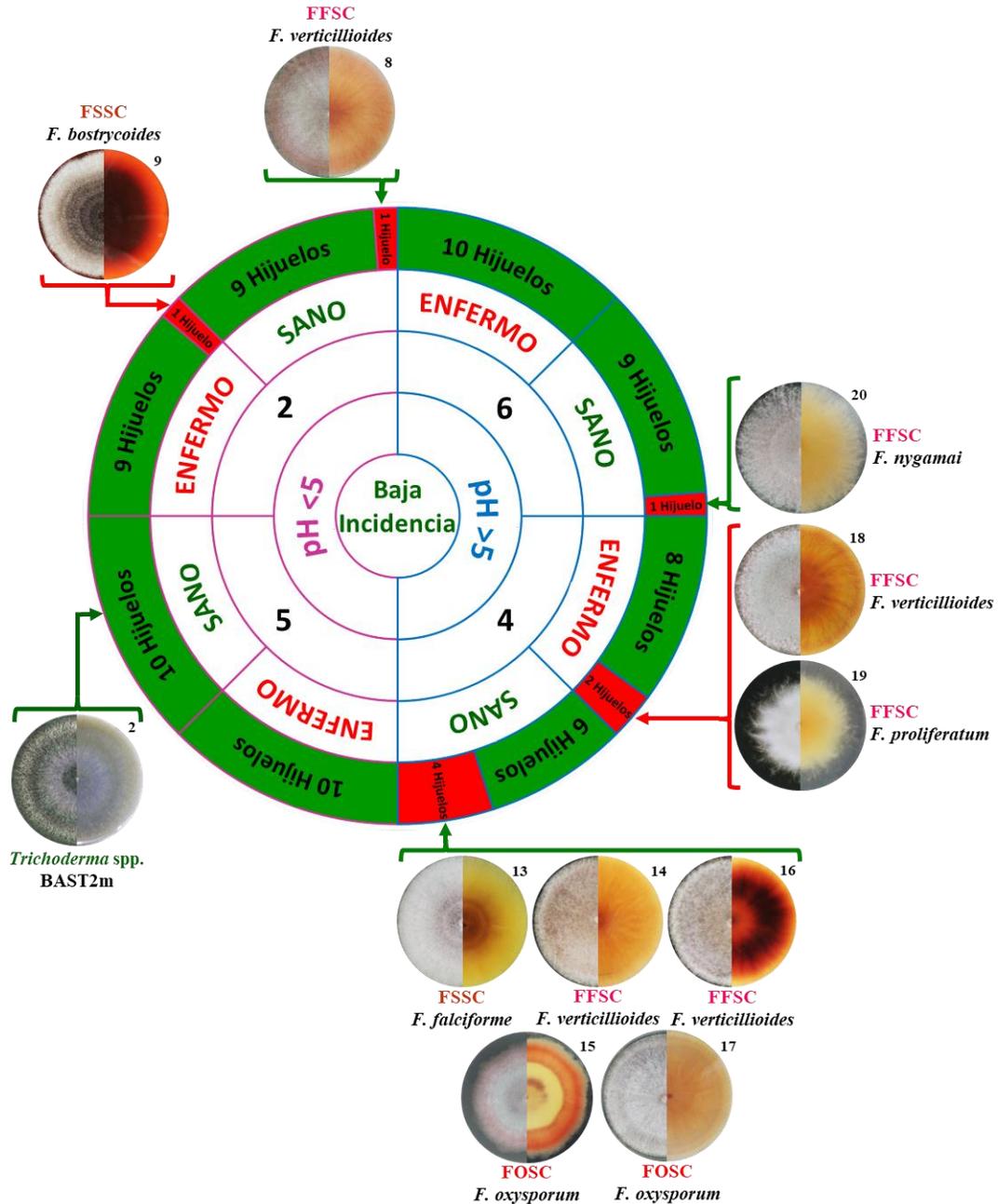


Figura 6.27: Modelo relacional de hijuelos de *Agave tequilana* con presencia de Organismos de Interés Agronómico (*Fusarium* spp. y *Trichoderma* spp.) sobrevivientes a la deshidratación de 14 días, colectados en predios con Baja incidencia del síndrome de marchitez y pudrición de cogollo (SMAP); con base al diseño experimental planteado. Caracterización cultural (anverso y reverso) en medio de cultivo Saboraud y V8, respectivamente. Foto: 10 días después de la siembra. Identificación molecular: gen *EF-1*. Numeración correspondiente a caracterización original (Figura 6.25)

En los predios restantes, con alta incidencia de SMAP (Figura 6.28), se aisló a *Fusarium* spp. como un endófito sobreviviente a la deshidratación en 12 de los 80 hijuelos colectados. Esta presencia se distribuyó equitativamente entre las dos clases de pH en las que se clasificaron los predios. Sin embargo, en la clase de pH>5, los 6 hijuelos con presencia de *Fusarium* spp. provinieron únicamente del predio 1; el predio restante no presentó ningún organismo fúngico de interés agronómico. Respecto a la sanidad de PM, la presencia de *Fusarium* spp. en el tejido interno de los hijuelos también se distribuyó equitativamente: 6 de los 12 aislamientos se obtuvieron de PM sanas y los otros 6 de PM enfermas. Además, se encontró un *Trichoderma* spp. endófito sobreviviente a la deshidratación en un hijuelo originado de una planta madre sana en un predio con pH<5.

En predios con Alta Incidencia de SMAP, se identificó la presencia de 2 complejos de especies:

- ***Fusarium Fujikoroii* Species Complex (FFSC):** Este complejo fue el más abundante y diverso, con al menos un aislado por predio; se obtuvieron un total de 12 aislamientos, agrupados en 3 especies diferentes:
 - *F. verticillioides* (8/12): Nuevamente, esta especie fue la más prevalente, con 5 aislamientos obtenidos de hijuelos originados de PM Sana y 3 de PM Enferma.
 - *F. lactis* (3/12): Se aisló de 2 hijuelos de plantas madre enfermas y 1 de planta madre sana.
 - En el predio 8 (pH<5), se aisló *F. lactis* y *F. verticillioides* del mismo hijuelo originado de PM Sana.
 - *F. pseudocircinatum* (1/12): Se aisló de un hijuelo con PM Sana.
- ***Fusarium Oxysporum* Species Complex (FOSC):** Este complejo fue el segundo más prevalente, con 2 aislados pertenecientes a la especie *F. oxysporum*, ambos obtenidos de PM Enferma y de predios con pH<5.

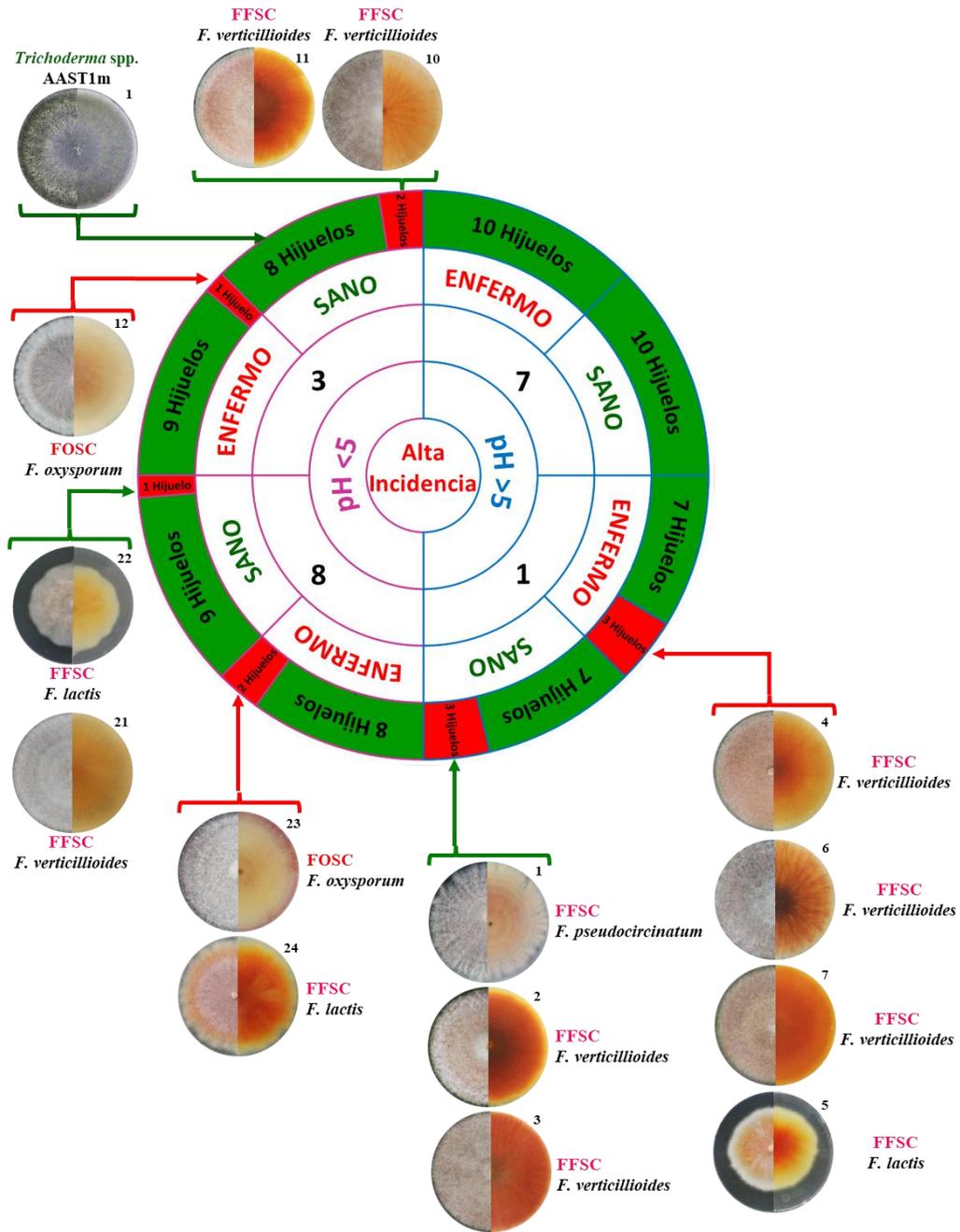


Figura 6.28: Modelo relacional de hijuelos de *Agave tequilana* con presencia de Organismos de Interés Agronómico (*Fusarium* spp. y *Trichoderma* spp.) sobrevivientes a la deshidratación de 14 días, colectados en predios con Alta incidencia del SMAP; con base al diseño experimental planteado. Caracterización cultural (anverso y reverso) en medio de cultivo Saboraud y V8, respectivamente. Foto: 10 días después de la siembra. Identificación molecular: gen *EF-1*. Numeración correspondiente a caracterización original (Figura 6.26)

6.2.2.- Prevalencia de *Fusarium* spp. y *Trichoderma* spp. en tejido interno de hijuelos de *Agave tequilana* post-deshidratación:

Debido al desproporcionado número de hijuelos y siembras sin crecimientos de UFC *Fusarium* spp., posiblemente debido al efecto de la drástica deshidratación de los hijuelos, con una pérdida promedio de peso fresco superior al 30% (Figura 6.24), en la dinámica de las poblaciones endófitas; lo cual imposibilita un correcto análisis de varianza, se optó por utilizar representaciones gráficas:

En predios de Baja incidencia de SMAP (Figura 6.29), se contabilizaron en total 19 UFC *Fusarium* spp. en 240 siembras (80 hijuelos):

- En predios con pH<5 (P2 y P5), se contabilizaron 9 UFC en total en un único predio (P2); sin embargo, solo se identificaron 2 especies: *F. verticillioides* (FFSC) y *F. bostrycoides* (FSSC). De las 9 UFC, 8 provinieron de un mismo hijuelo de PM Sana; debido a sus caracteres culturales idénticos se dedujo que se trataba del mismo organismo, identificado como *F. verticillioides*, probablemente debido a la maceración de micelio endófito, Esta especie no genera Clamidosporas (estructuras de resistencia) (Leslie y Sumerell, 2006).
- *F. bostrycoides* se aisló a partir de una única colonia en un hijuelo de PM Enferma, no se tiene reportes de la generación de clamidosporas por parte de especie.
 - *Trichoderma* spp. se aisló de una única colonia proveniente de un hijuelo con planta madre sana.
- En predios con pH>5 (P4 y P6) se registraron un total 10 UFC. De estas, 7 procedieron de hijuelos con PM Sana; únicamente se contabilizó una UFC en el Predio 6, identificada como *F. nygamai*, esta especie se distingue de *F. verticillioides* y *F. thapsinum*, por su habilidad de producir clamidosporas lisas o rugosas formadas en el medio HCA después de 2-4 semanas y en el medio SNA después de 4- 6 semanas, explicando su sobrevivencia a la deshidratación (Martínez-Fernández *et al.*, 2015)
- Las 6 UFC restantes correspondieron a 5 aislamientos en las siembras de 4 hijuelos del predio 4, correspondientes a 3 especies distintas:

- *F. verticillioides* (FFSC): Se aisló de los hijuelos H2S y H8S, a partir de 1 y 2 UFC respectivamente.
- *F. oxysporum* (FOSC): Se aisló de H7S Y H8S, ambos de una sola UFC, esta especie se caracteriza por la producción de clamidosporas abundantes, globosas o subglobosas, de 8-10 μm , de superficie lisa, terminales o intercalares, solitarias, en pares o formando cadenas cortas (Martínez-Fernández *et al.*, 2015).
 - Se destaca la presencia *F. verticillioides* y *F. oxysporum* en un mismo hijuelo (H8S).
- *F. falciforme* (FSSC): Se aisló a partir de una única UFC en hijuelo de PM Sana (H4S), esta especie tiene la capacidad de producir clamidosporas globosa, rugosa y bicelular (Ayala-Armenta, 2020).
- Las 3 UFC restantes se contabilizaron en 2 hijuelos de PM Enferma del predio 4, correspondientes a 2 aislados del complejo FFSC:
 - *F. veticillioides*: Se encontraron 2 UFC en el hijuelo H7E.
 - *F. proliferatum*: Se identificó 1 UFC en el hijuelo H10E, Esta especie no genera Clamidosporas (estructuras de resistencia) (Leslie y Sumerell, 2006).

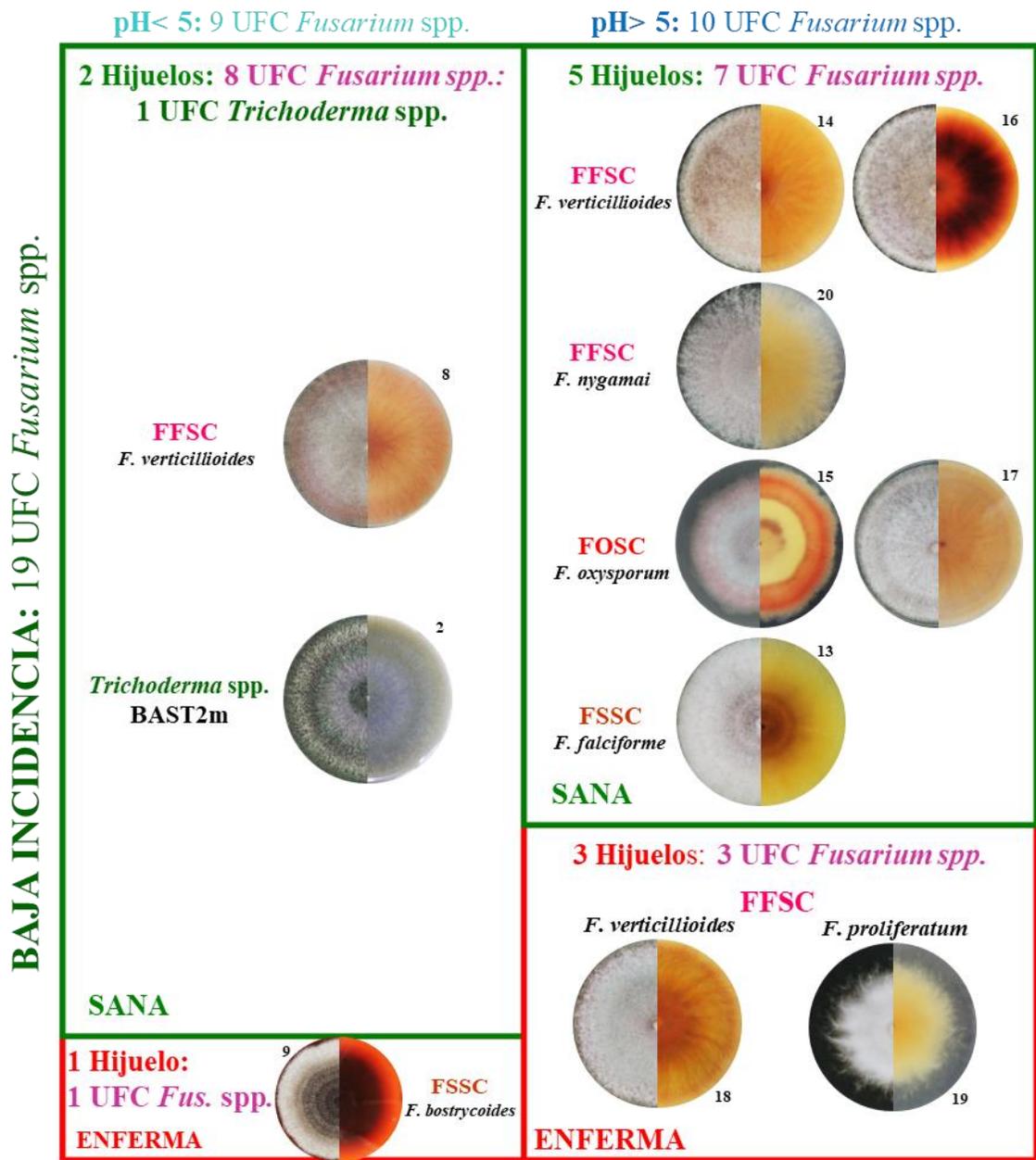


Figura 6.29: Modelo relacional de número de hijuelos de *Agave tequilana*/UFC Organismos de Interés Agronómico (*Fusarium* spp. y *Trichoderma* spp.) /Diversidad de Organismos de Interés Agronómico; sobrevivientes a la deshidratación de 14 días, colectados en predios con Baja incidencia del síndrome de marchitez y pudrición de cogollo (SMAP); con base al diseño experimental planteado. Caracterización cultural (anverso y reverso) en medio de cultivo Saboraud y V8, respectivamente. Foto: 10 días después de la siembra. Identificación molecular: gen *EF-1*. Numeración correspondiente a caracterización original (Figura 6.25).

En predios de alta Incidencia de SMAP (Figura 6.30), se contabilizaron en total 23 UFC *Fusarium* spp. en 240 siembras (80 hijuelos).

En los predios con $\text{pH} < 5$ (P3 y P8) se contabilizaron un total de 11 UFC, 6 de las cuales procedieron de 3 Hijuelos con PM Sana:

- 2/6 UFC se contabilizaron en los hijuelos H8S y H9S del predio 3, obteniendo dos aislamientos de *F. verticillioides*. Las 4 UFC restantes se contabilizaron en el hijuelo H1S de donde se aisló *F. verticillioides* y *F. lactis* (no se tienen reportes de la capacidad de esta especie de producir clamidiosporas) a partir de 3 UFC y 1 UFC respectivamente.

Las 5 UFC restantes se contabilizaron en 3 Hijuelos de PM Enferma:

- 4/5 UFC correspondieron a 2 aislamientos de *F. oxysporum*: 3 UFC en el hijuelo H6E del predio 3 y una UFC del hijuelo H1E del Predio 8. La UFC restante correspondió a *F. lactis* en el hijuelo H7E del Predio 8.
- *Trichoderma* spp. se aisló de una única colonia obtenida de un hijuelo con PM sana.

En los predios con $\text{pH} > 5$ (P1 y P7) se registraron un total de 12 UFC en total, todas ellas en el predio 1:

- 5 UFC se contabilizaron en 3 Hijuelos de PM Sana: correspondientes a 3 aislamientos del complejo FFSC: *F. pseudocircinatum* se aisló de una única UFC en el hijuelo H6S, esta especie no produce clamidiosporas, pero algunas cepas llegan a producir hifas hinchadas que pueden semejar a clamidiosporas o pseudoclamidiosporas (Leslie y Summerell, 2006).

Las 4 UFC restantes correspondieron a 2 aislamientos de *F. verticillioides* en los hijuelos H9S (1 UFC) y H10S (3 UFC).

- Las 7 UFC restantes se contabilizaron en 3 Hijuelos de PM Enferma correspondiendo a 3 aislamientos del complejo FFSC: 5 UFC correspondieron a un aislamiento de *F. lactis* en el hijuelo H6E. Las 2 UFC restantes correspondieron a 2 aislamientos monoclonales de *F. verticillioides* en los hijuelos H2E y H10E.

Mendoza-Ramos (2020) analizó la presencia de *Fusarium* spp. en tejido fresco de hijuelos de *Agave tequilana* recién arrancados, determinando que la base de las hojas presentaba la mayor cantidad de UFC de *Fusarium* spp. (75%), coincidiendo con lo reportado por López-Bautista (2019). Sin embargo, para asegurar la condición endofítica en el presente experimento, se eliminó gran parte de este tejido (Figura 5.22 C-E), principalmente la parte externa. Durante el macerado del tejido interno resultante, se eliminó mediante tamizado el "gabazo" (Figura 5.22 D-E), compuesto principalmente por fibras de la base de las hojas, las cuales no pueden ser maceradas. Esto podría ser una explicación alternativa de la baja carga de inóculo presente en las siembras. A pesar de emplear hijuelos de calibre Toronja (<2 años), que presumiblemente deberían haber tenido una mayor interacción con aislados patogénicos de *Fusarium* spp. que hijuelos de menor calibre (menor edad), presentaron un escaso número de UFC.

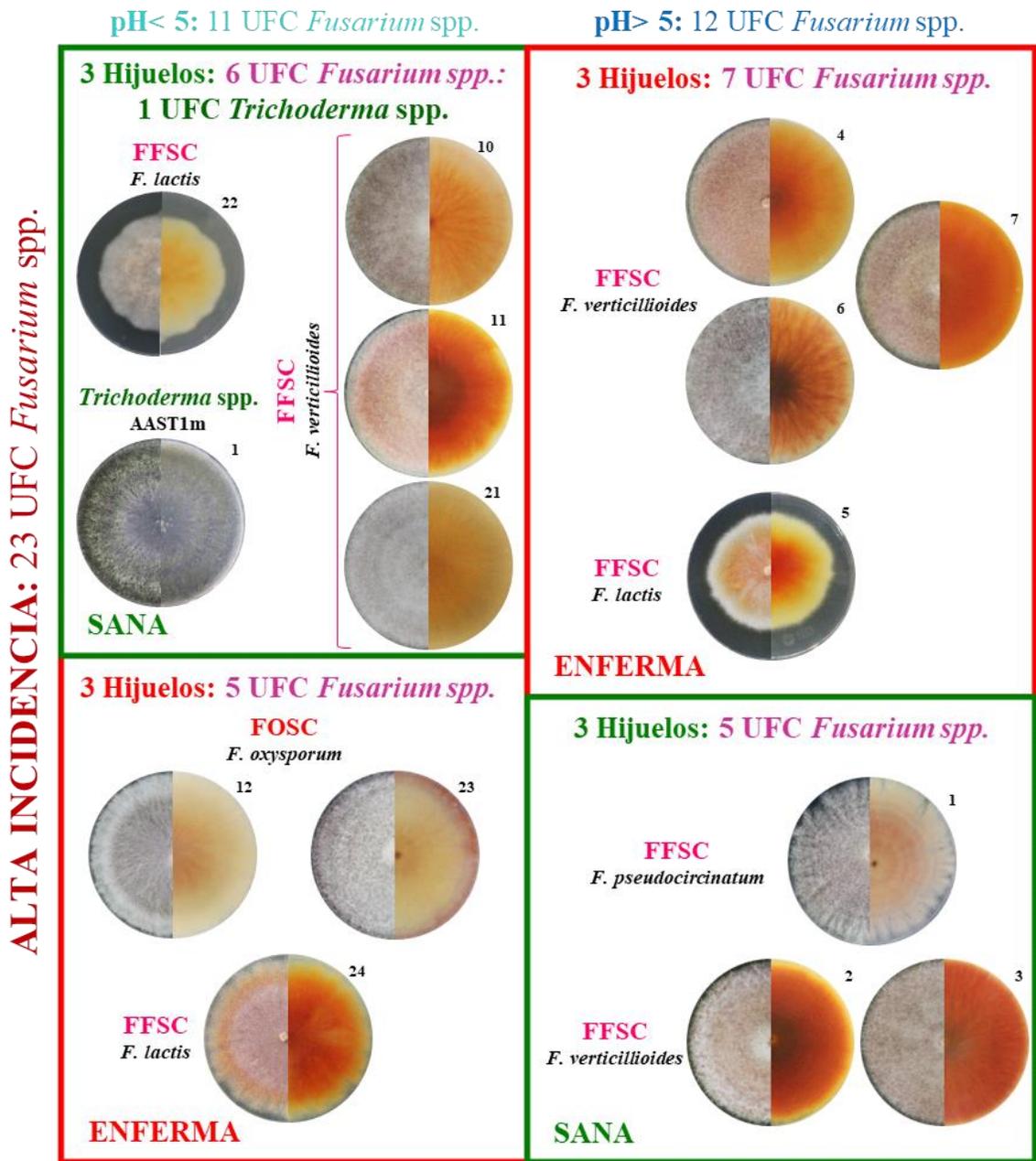


Figura 6.30: Modelo relacional de número de hijuelos de *Agave tequilana*/UFC Organismos de Interés Agronómico (*Fusarium* spp. y *Trichoderma* spp.) /Diversidad de Organismos de Interés Agronómico; sobrevivientes a la deshidratación de 14 días, colectados en predios con Alta incidencia del síndrome de marchitez y pudrición de cogollo (SMAP); con base al diseño experimental planteado. Caracterización cultural (anverso y reverso) en medio de cultivo Sabouraud y V8, respectivamente. Foto: 10 días después de la siembra. Identificación molecular de *Fusarium* spp. por: gen *EF-1*. Numeración correspondiente a caracterización original (Figura 6.26)

6.2.3.- Identificación de complejos/especies de *Fusarium* spp. endófitos sobrevivientes a la deshidratación en hijuelos de *Agave tequilana* y su patogenicidad en otros cultivos en México:

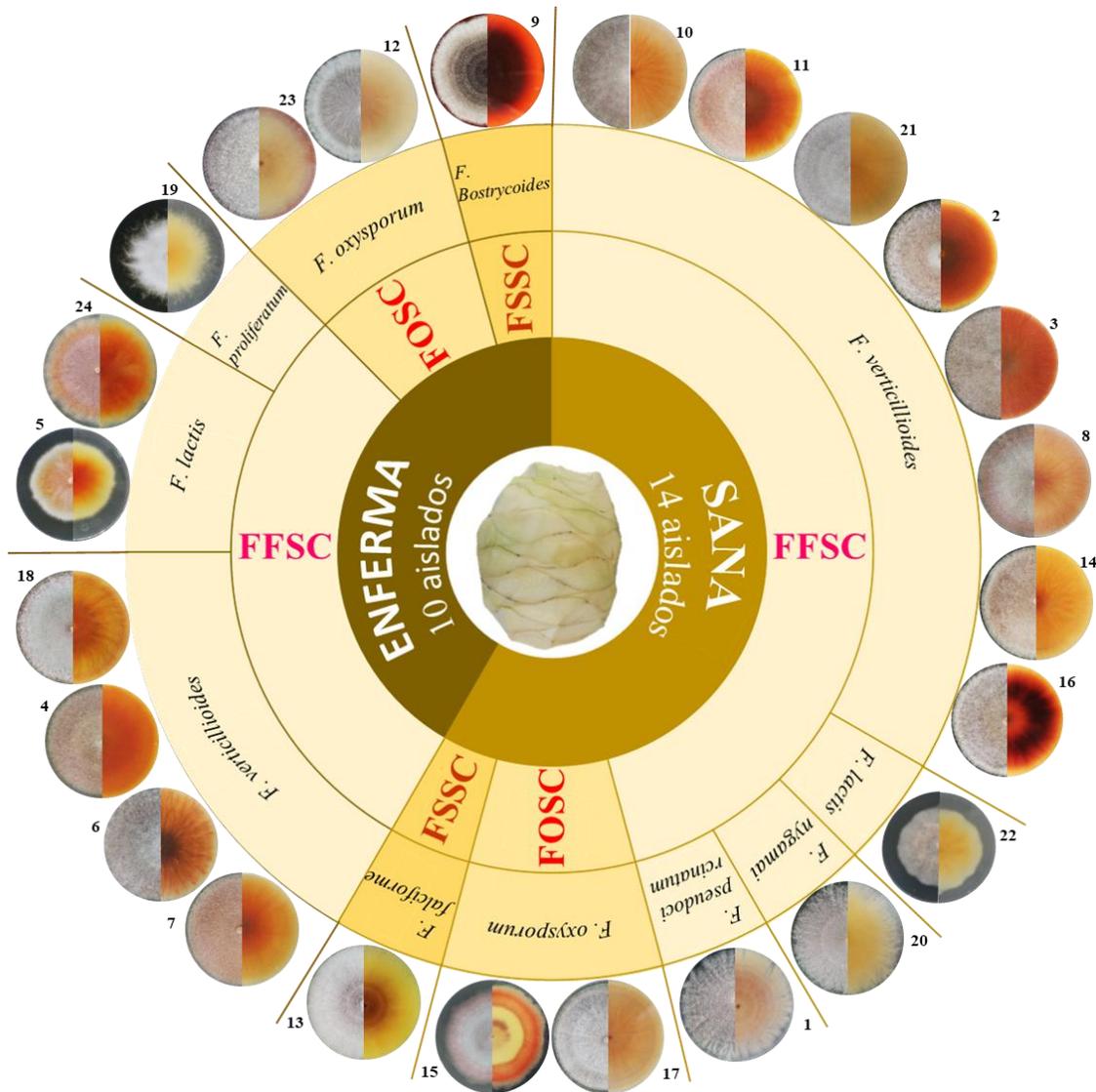


Figura 6.31: Agrupación por Complejo/Especie de *Fusarium* spp. aislados del sobrenadante del macerado de tejido interno de hijuelos *Agave tequilana*, con base en la sanidad de la planta madre de donde se originaron. Caracterización cultural (anverso y reverso) en medio de cultivo Saboraud. Foto: 10 días después de la siembra. Identificación molecular por: gen *EF-1*. Numeración correspondiente a caracterización original (Figura 6.25-26)

A partir de la secuenciación del gen *EF-1* de los 24 aislamientos, se identificaron 8 especies diferentes de *Fusarium* spp. en el tejido interno de los hijuelos calibre Toronja de *Agave tequilana*, sometidos a un período de deshidratación de 14 días mediante exposición solar (Figura 6.31). Estas especies se agruparon en 3 complejos distintos:

- **FFSC:** Con 18 de los 24 aislamientos pertenecientes a él, distribuidos en 5 especies, este complejo fue el más numeroso y diverso en tejido interno:
 - *F. verticillioides*: 12 de los 18 aislamientos del complejo *Fujikoroi* pertenecieron a esta especie. Ocho de ellos se obtuvieron de hijuelos provenientes de PM sana, mientras que los cuatro restantes se originaron de PM enferma. Las colonias de esta especie exhibieron una apariencia algodonosa con bordes regulares, y en algunos casos, bordes más densos y abultados. El micelio fue de moderado a abundante, con tonalidades que variaron de blancas a rosadas. En el reverso de las colonias se observaron pigmentaciones principalmente en tonos salmón, blanco y rojo oscuro. En algunas colonias, se observaron inserciones miceliales en el medio de cultivo con tonalidades más oscuras que se extendieron desde el centro hacia los bordes, formando un patrón radial.
Esta especie está reportada en México como el agente causal de diversas enfermedades en una gran diversidad de hospedantes: *Zea mays* (Maíz): “Pudrición de la mazorca” (Zacamo-Velasquez *et al.*, 2023), *Fragaria* spp. (Fresa): “Secadera de la Fresa” (Mariscal-Amaro *et al.*, 2017), *Solanum tuberosum* (Papa): “Pudrición seca de la papa” (García-Avial *et al.*, 2018), *Triticum aestivum* (Trigo): “Amarillamiento o Madurez prematura del trigo” (Rangel-Castillo *et al.*, 2017), *Saccharum officinarum* (Caña de azúcar): “Marchitez” (Martínez-Fernández *et al.*, 2015)
 - *F. lactis*: Esta especie fue la segunda más abundante, con 3 aislamientos pertenecientes a ella; 2 en hijuelos de PM enferma y 1 en PM sana. Las colonias de esta especie mostraron una apariencia algodonosa con bordes irregulares y tonos amarillentos visibles tanto en el anverso como en el reverso; exhibieron una velocidad de crecimiento reducida y no cubrieron

completamente la caja de cultivo. El micelio fue moderado, con tonalidades que variaron desde blancas hasta naranjas brillantes.

Esta especie esta reportada en México en *Agave salmiana* como el agente causal de la enfermedad “pudrición de las yemas” (Romero-Cortes *et al.*, 2023)

- *F. nygamai*: El único aislamiento se obtuvo de un hijuelo procedente de PM sana. Presentó un micelio moderado de color blanco, con tonalidades amarillentas en el reverso; los bordes irregulares surgieron debido a un cambio en el patrón de crecimiento a partir de la zona media, pasando de un crecimiento uniforme a uno radial.

Esta especie esta reportada en *Zea mayz* (Maíz) como el agente causal de “Pudrición de raíz y tallo” (Leyva-Madrigal *et al.*, 2015; Velarde *et al.*, 2018); *Saccharum officinarum* (Caña de azúcar): “Marchitez” (Martínez-Fernández *et al.*, 2015); *Physalis ixocarpa* (Tomate de Cascara): “Marchitez” (Ayala-Armenta *et al.*, 2022)

- *F. pseudocircinatum*: Este aislamiento se obtuvo de un hijuelo procedente de PM sana. Presentó un micelio moderado de color blanco, con tonalidades rosáceas en el reverso agrupadas en anillos concéntricos; los bordes irregulares surgieron debido a un cambio en el patrón de crecimiento a partir de la zona media, pasando de un crecimiento uniforme a uno radial.

Esta especie esta reportada *Swietenia macrophylla* (Caoba) como el agente causal de: “Malformación de la caoba de hoja grande” en el municipio de La huerta, Jalisco, dentro de la DOT (Santillan-Mendoza, *et al.*, 2020). Su presencia puede ser atribuida a la adaptación de la especie de un hospedante forestal a *Agave tequilana*, por la presión de selección propiciada por la expansión de su superficie cultivada a terrenos silvícolas, como consecuencia del aumento del precio del Agave. En *Mangifera indica* (Mango) esta reportado como el agente causal de: “Malformación del mango (MMD)” (Freeman *et al.*, 2015).

- *F. proliferatum*: Se aisló de un hijuelo proveniente de PM enferma. Mostró un micelio blanquecino abundante con tonalidades amarillentas en el reverso, bordes extremadamente irregulares con una reducción en la densidad al alejarse del centro; exhibió una velocidad de crecimiento reducida y no cubrió completamente la caja de cultivo.

Esta especie esta reportada en *Fragaria* spp. (Fresa): “Secadera de la Fresa” (Mariscal-Amaro *et al.*, 2017); *Triticum aestivum* (Trigo): “Amarillamiento o Madurez prematura del trigo” (Rangel-Castillo *et al.*, 2017); *Saccharum officinarum* (Caña de azúcar): “Marchitez” (Martínez-Fernández *et al.*, 2015); *Allium sativum* (Ajo): “Putridión Basal del Ajo” (Delgado-Ortiz *et al.*, 2016); *Mangifera indica* (Mango): “Malformación del mango (MMD)” (Molina-Cárdenas *et al.*, 2023); *Vanilla planifolia* (Vainilla): “Putridión del tallo y raíz” (Adame-García *et al.*, 2015); *Phaseolus vulgaris* (Frijol): “Putridión de raíz y tallo” (Elos *et al.*, 2005).

- **FOSC**: Aunque constituyo el segundo complejo más prevalente (4 de los 24 aislamientos totales), fue el menos diverso; 2 aislamientos provinieron de hijuelos con PM sana y 2 de hijuelos con PM enferma.

- *F. oxysporum*: Esta especie fue la única de este complejo aislada en el tejido interno de hijuelos post- deshidratación, con los 4 aislamientos correspondientes a ella. Las colonias presentaron un aspecto algodonoso con un micelio de moderado a abundante; las tonalidades oscilaron de blancas a rosadas, con una predominancia del último color en el reverso de las colonias. No se observó una correlación entre la pigmentación colonial y la sanidad de la PM; los bordes de las colonias fueron principalmente regulares.

Esta especie esta reportada en *Fragaria* spp. (Fresa): “Secadera de la Fresa” (Mariscal-Amaro *et al.*, 2017); *Solanum tuberosum* (Papa): “Putridión seca de la papa” (García-Avial *et al.*, 2018); *Triticum aestivum* (Trigo): “Amarillamiento o Madurez prematura del trigo” (Rangel-Castillo *et al.*, 2017); *Saccharum officinarum* (Caña de azúcar); “Marchitez” (Martínez-Fernández *et al.*, 2015); *Vanilla planifolia* (Vainilla):

“Pudrición del tallo y raíz” (Adame-Garcia *et al.*, 2015); *Phaseolus vulgaris* (Frijol): “Pudrición de raíz y tallo” (Elos *et al.*, 2005); *Citrullus lanatus* (Sandía): “Pudrición de la raíz” (Rentería-Martínez *et al.*, 2018); *Physalis ixocarpa* (Tomate de Cascara): “Marchitez” (Ayala-Armenta *et al.*, 2022)

- **FSSC:** A pesar de ser el complejo menos prevalente, con solo 2 de los 24 aislamientos, fue el segundo más diverso, con 2 especies distintas; cada una aislada de distinta sanidad de PM:

- *F. falciforme*: Aislada de un hijuelo de PM Sana. Presento micelio moderado de color blanquecino, con una apariencia polvosa, y exhibió anillos concéntricos de color marrón claro en el centro de la colonia, visibles tanto en el anverso como en el reverso; los bordes fueron regulares. Esta especie esta reportada en *Citrullus lanatus* (Sandía): “Pudrición de la raíz” (Rentería-Martínez *et al.*, 2018); *Annona muricata* (Guanabana) “Pudrición y Necrosis de Tallo y Raíz” (Cambero-Ayón *et al.*, 2023); *Phaseolus vulgaris* (Frijol) “Marchitez y Necrosis del Tallo” (Díaz-Najera *et al.*, 2022); *Zea mays* (Maíz) “Pudrición del Tallo” (Douriet-Angulo *et al.*, 2019); *Allium cepa* (Cebolla) “Pudrición Basal de la cebolla” (Tirado-Ramírez *et al.*, 2018)

- *F. bostrycoides*: La colonia mostró micelio de aspecto polvoso, creciendo al ras del medio de cultivo, con anillos concéntricos de color café oscuro hasta la mitad de la colonia, a partir de la cual el crecimiento fue uniforme y de color blanquecino; los bordes fueron ondulados. En el reverso, el medio de cultivo adquirió una pigmentación café-rojiza brillante, probablemente derivada de una alta producción de metabolitos volátiles, siendo más intensa debajo de la parte café de la colonia.

Esta especie no tiene reportes como patógeno en México. En Brasil esta reportada en *Passiflora edulis* (Maracuyá amarillo): “Marchitez” (Ninos, *et al.*, 2021). En Puerto Rico esta reportada en *Coffea* spp. (Café): “Pudrición del Fruto Café (CFR)” asociada a *Hypothenemus hampei* (Broca del café) como vector del patógeno (Serrato-Díaz *et al.*, 2024).

6.2.4.- Reportes previos en *Agave tequilana* de los complejos/especies de *Fusarium* spp. endófitos sobrevivientes a la deshidratación.

Cuadro 6.3: Reportes en tejido de *Agave tequilana* de especies de *Fusarium* spp. sobrevivientes a la deshidratación en tejido interno de hijuelos calibre Toronja.

Complejo	Especie	Hijuelos¹	Planta Adulta²
FFSC	<i>F. verticillioides</i>	Base de hoja y Macerado de Tejido Interno	Cogollo (Alto, Medio y Bajo), Cuello, Piña
	<i>F. lactis</i>	Base de cogollo, Base de hoja, Cuello y Macerado de Tejido Interno	Cogollo Medio, Cuello, Piña
	<i>F. nygamai</i>	X	X
	<i>F. pseudocircinatum</i>	X	X
	<i>F. proliferatum</i>	Base de hoja y Macerado de Tejido Interno	Cogollo Alto y Bajo
FOSC	<i>F. oxysporum</i>	Base de cogollo, Base de hoja, Cuello, Macerado de Tejido Interno y Piña	Cogollo Medio, Cuello, Piña
FSSC	<i>F. falciforme</i>	X	Cuello
	<i>F. bostrycoides</i>	X	X

¹Mendoza-Ramos C. 2020. Estimación de carga de inóculo in situ de *Fusarium* spp. en hijuelos de *Agave tequilana* a diferentes niveles de inductividad epidémica regional. Tesis de maestría. Posgrado Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Postgraduados. 108p.

²López-Bautista V. 2020. Identificación y regionalidad de especies de *Fusarium* asociadas a marchitez y pudrición seca del cogollo en *Agave tequilana* Weber var. Azul. Tesis de maestría. Posgrado Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Postgraduados. 120p.

El complejo FFSC se encontró asociado predominantemente en tejido aéreo, (92%), en plantas adultas de 3-4 años de edad². En hijuelos¹, se encontró la misma tendencia (52%); la presente investigación lo confirmo como el complejo más prevalente en tejido interno, agrupando al 75% de los aislados sobrevivientes a la deshidratación y representado por las especies:

- *F. verticillioides* (67% de los aislados del complejo): se mantiene como la especie más prevalente en tejido interno, coincidiendo con lo reportado en hijuelo fresco¹, donde se aisló del macerado de tejido interno de hijuelos frescos y en base de hoja.

- *F. lactis* (17%): fue la segunda especie más prevalente del complejo, siendo aislado exclusivamente en tejido interno tanto de hijuelos¹ como de planta adulta², probablemente como resultado de una especialización a tejido.
- *F. nygamai* (5%): Este aislamiento es el primer reporte de esta especie en tejido interno de hijuelos; previamente únicamente se encontraba reportada asociada a suelos y raíces de plantas adultas²(3-4 años) de *Agave tequilana* en Romita, Guanajuato.
- *F. proliferatum* (5%): El único aislamiento se obtuvo de un hijuelo de PM enferma, se ha reportado su presencia en hijuelos¹, en el macerado de tejido interno de hijuelos frescos y en base de hoja de hijuelo. En planta adulta² se han obtenido aislamientos a partir de Cogollo Alto y Bajo, observando una tendencia presentarse en tejidos foliares del Agave.

El complejo FOSC, esta reportado como el complejo más prevalente en tejidos de planta adulta²; sin embargo, su prevalencia en tejido interno de hijuelos frescos¹, es superada por el complejo FFSC. Post- deshidratación, esta tendencia se mantiene, representado el 17% de los aislados sobrevivientes en tejido interno:

- Los 4 aislados pertenecieron únicamente a la especie *F. oxysporum*. 2 aislamientos se obtuvieron de hijuelos con PM enferma y 2 con PM sana.

FSSC fue el complejo menos prevalente en tejido interno coincidiendo con lo reportado en hijuelos frescos¹, donde únicamente se encontraron dos especies no reportadas en hoja y piña; mientras que en plantas adultas² se reporta la presencia de *F. solani* y *F. falciforme* en cuello y una especie no identificada en Piña.

- *F. falciforme*: Se aisló únicamente de un hijuelo de PM sana; a pesar de ser la especie más prevalente en muestras de CIE *In situ* y deshidratadas, solo represento el 4% de las especies de *Fusarium* aisladas de tejido interno deshidratado, posiblemente por su poca capacidad infectiva o su susceptibilidad a la deshidratación, se encuentra reportada en suelo, raíz y cuello de planta adulta² de *Agave tequilana*.

6.3.- Carga de Inoculo Externo (CIE) *In situ*-Deshidratado de *Fusarium spp.* en suelo adherido a hijuelos de *Agave tequilana*:

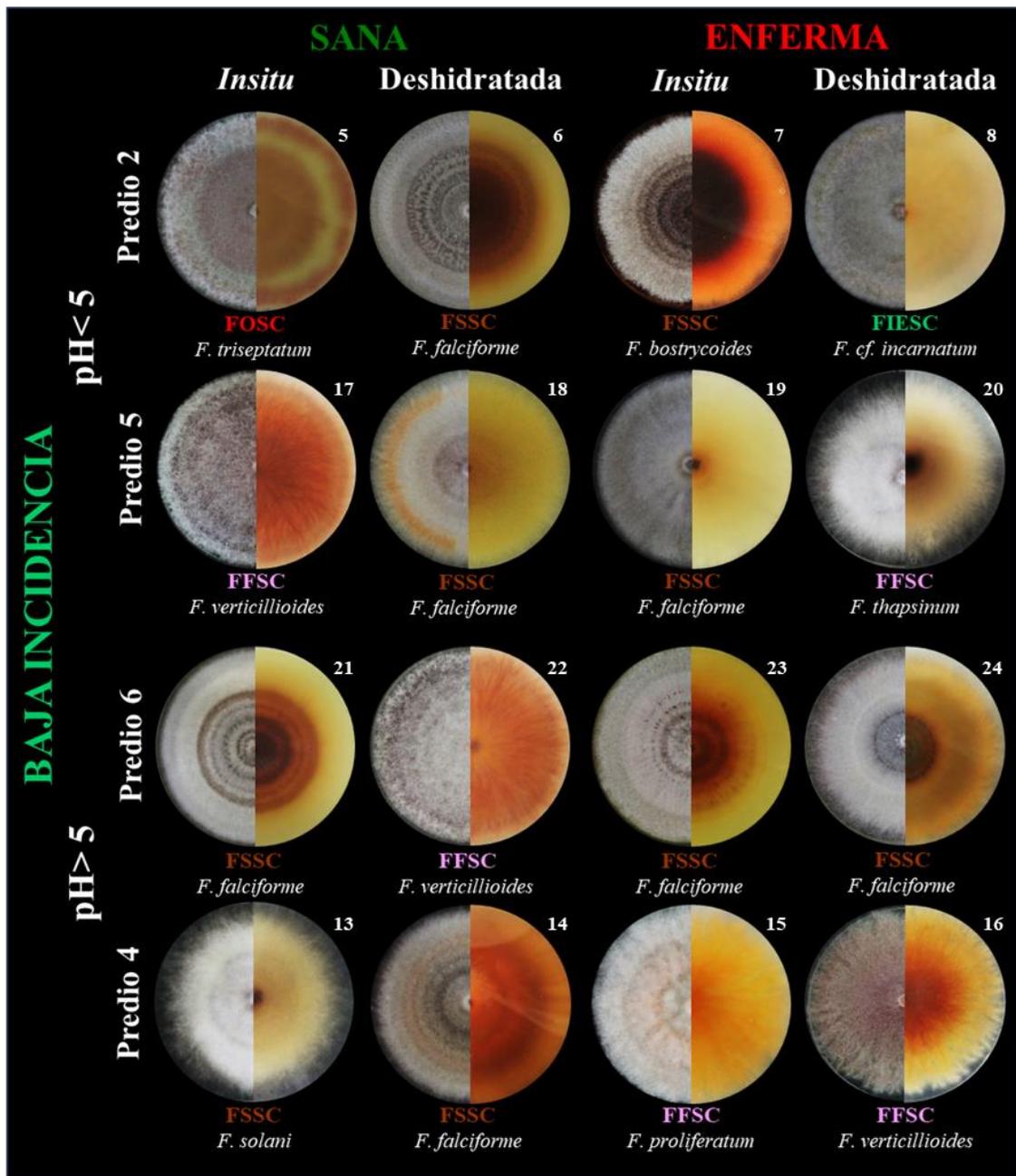


Figura 6.32: Carga de Inoculo Externa (CIE) 1/2: Caracterización Cultural (anverso y reverso) en medio de cultivo Sabouraud de *Fusarium spp.* (complejo y especie) más prevalentes en el lavado de suelo adherido a hijuelos de *Agave tequilana In situ*/Deshidratados durante 14 días colectados en predios con Baja incidencia de SMAP. Identificación molecular: gen EF-1. Foto a los 10 días después de la siembra.

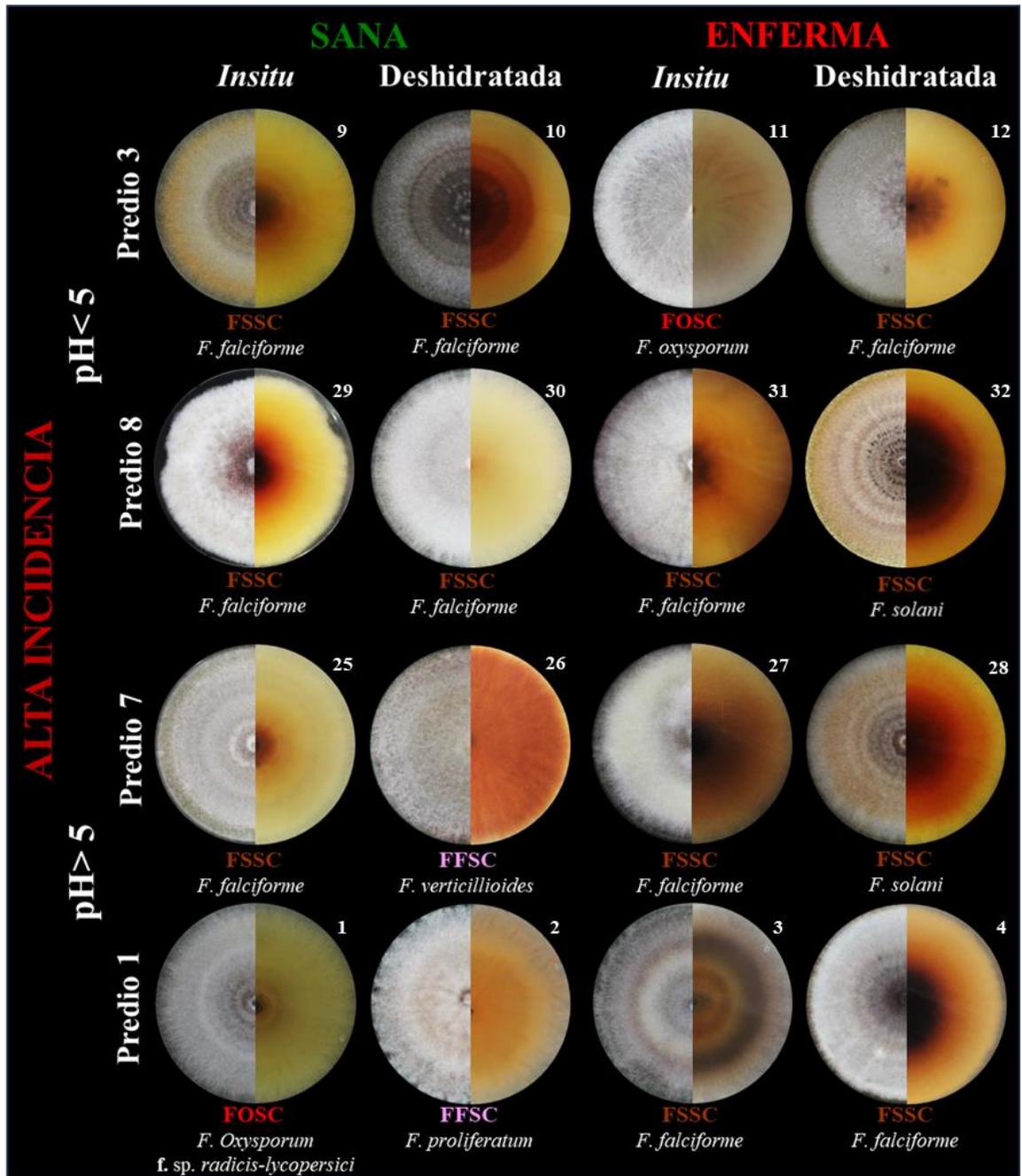


Figura 6.33: Carga de Inoculo Externa (CIE) 2/2: Caracterización Cultural (anverso y reverso) en medio de cultivo Saboraud de *Fusarium* spp. (complejo y especie) más prevalentes en el lavado de suelo adherido a hijuelos de *Agave tequilana* *In situ*/Deshidratados durante 14 días colectados en predios con Alta incidencia de SMAP. Identificación molecular por: gen *EF-1*. Foto a los 10 días después de la siembra.

6.3.1.- Carga de Inoculo Externo de *Fusarium* spp. (In situ/deshidratado): UFC *Fusarium* spp. e Índice de *Fusarium* spp.

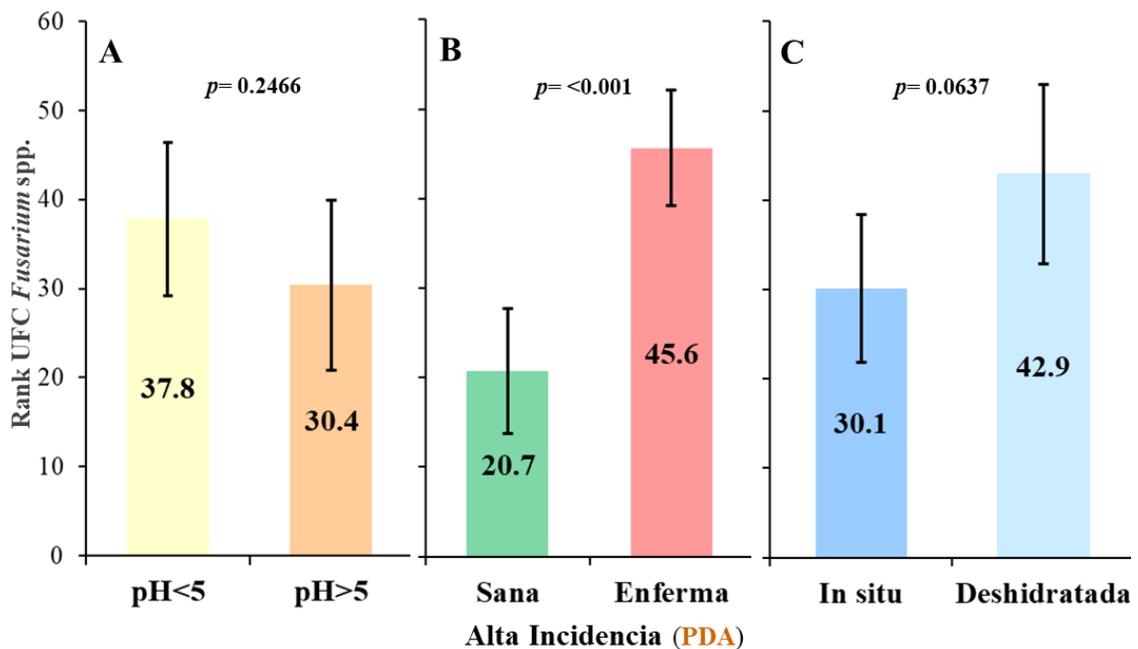


Figura 6.34: Prueba de T (PROC TTEST) de Rank_UFC *Fusarium* spp. en Carga de Inoculo Externo (CIE) en medio PDA para predios de **Alta Incidencia** de Síndrome de marchitez y pudrición de cogollo. A) Clases de pH, B) Sanidad de planta madre y C) Momento de toma de muestra. Barras representan error de ½ de la desviación estándar. *P-value* es el resultado de significancia al 0.05 y 0.10 en C.

En los predios con alta Incidencia de SMAP, la carga de inoculo (PDA) determinada por UFC *Fusarium* spp., no mostró diferencias significativas con respecto a las clases de pH ($p=0.2466$) ni al momento de toma de muestra ($p=0.0637$) (Figura 6.34 A- C). Esto sugiere que, al menos en este contexto, el pH del suelo no influyó de manera significativa en la carga de inóculo de *Fusarium* spp. Sin embargo, es importante destacar que la ubicación de la medición del pH (entre calle) puede no ser representativa del pH presente en el suelo adherido a las plántulas (CIE).

La falta de un efecto del momento de toma de muestra en la carga de inóculo puede atribuirse a la plasticidad de las poblaciones de *Fusarium* spp. para adaptarse a diferentes nichos ecológicos, persistiendo y colonizando de manera eficiente distintos entornos,

desde suelos hasta tejidos de plantas, adaptándose a diferentes condiciones ambientales y persistiendo en el tiempo (Leslie y Summerell, 2006; O'Donnell *et al.*, 2012;).

Además, se ha observado que las especies de *Fusarium* pueden alternar en prevalencia dependiendo de las condiciones ambientales y el estado del huésped, lo que subraya la importancia de evaluar el potencial patogénico de las diferentes especies y complejos que pueden estar presentes en un agroecosistema. Esto es particularmente relevante en contextos agrícolas donde las prácticas culturales generan eventos disruptivos en las dinámicas poblacionales de la rizosfera (Fravel *et al.*, 2012; Baetsen-Young *et al.*, 2020).

En relación con las clases de Sanidad de Planta Madre (PM), se observó una diferencia significativa ($p < 0.001$), evidenciando que los hijuelos originados a partir de PM enfermas presentaron una carga de inóculo más elevada en la piñosfera (Rank_ UFC *Fusarium* spp. = 45.6) en comparación con la aquellos originados de PM Sana (Rank_ UFC *Fusarium* spp. = 20.7) (Figura 6.34 B). Este contraste en la carga de inóculo de *Fusarium* spp. entre clases de sanidad de PM sugiere que la sanidad de la PM puede servir como un indicador de la carga de inóculo de *Fusarium* spp. en la piñosfera de los hijuelos que se originen a partir de esta. Fravel *et al.* (2012) reportó en un estudio de Marchitez en *Solanum lycopersicum* (Tomate), causada por *F. oxysporum*, que las condiciones de la planta hospedante pueden influir significativamente en la prevalencia y carga de *Fusarium* spp.

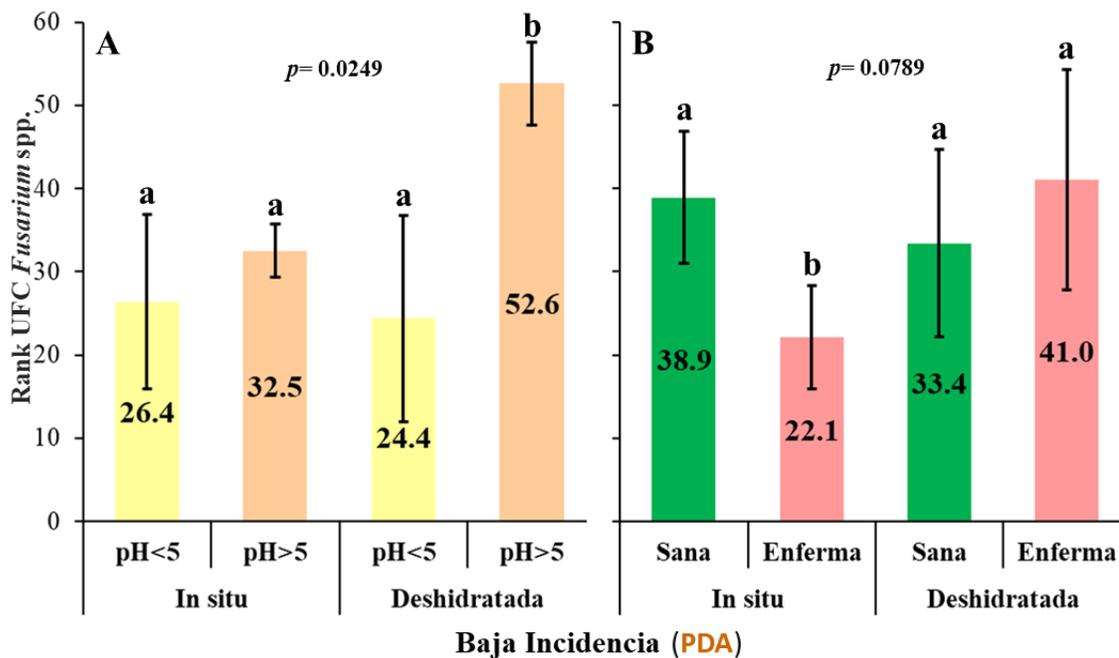


Figura 6.35: Análisis de varianza no paramétrico (PROC GLM) de Rank_UFC *Fusarium* spp. en Carga de Inoculo Externo (CIE) en medio PDA para predios de **Baja Incidencia** de Síndrome de marchitez y pudrición de cogollo. A) Interacción Momento toma de muestra-Clases de pH., B) Interacción Momento toma de muestra- Sanidad de Planta Madre. Barras representan error de ½ de la desviación estándar. Letras diferentes en barra de error muestran diferencias significativas (Tukey, $p < 0.05$).

En los predios con baja incidencia de SMAP, se observó una diferencia significativa en la carga de inoculo (PDA), determinada por la variable rankeada UFC *Fusarium* spp. en las interacciones del momento de toma de muestra-clase de pH ($p = 0.0249$) y marginalmente significativa en momento de toma de muestra-sanidad PM ($p = 0.0789$).

En la interacción del Momento de toma de muestra-Clase de pH (Figura 6.35 A), se encontró que las muestras post- deshidratación de CIE provenientes de predios con pH > 5 presentaron la mayor carga de inóculo (Rank UFC *Fusarium* spp. = 52.6), sugiriendo que la extracción de los hijuelos de un ambiente edáfico supresivo (indicado por la baja incidencia de SMAP) a las poblaciones de *Fusarium* spp., indujo a la explosión de sus poblaciones post-deshidratación.

En predios con $\text{pH} < 5$, Rank UFC *Fusarium* spp. presentó valores similares (26.4-24.4) con alta variación tanto en la muestra *In situ* como posterior a la deshidratación. Esto posiblemente se deba al establecimiento de especies de *Fusarium* spp. adaptadas a la piñosfera, de tal manera que la deshidratación no ejerza efecto sobre sus poblaciones. Mousa y Raizada (2016) establecen que los niveles de pH afectan en gran medida a la comunidad microbiana, favoreciendo el incremento de especies no patogénicas de *Fusarium* spp., lo cual induce a una competencia directa con el patógeno por nutrientes y sitio de infección.

En la interacción del Momento de toma de muestra-Sanidad PM (Figura 6.35 B), se observó que las muestras *In situ* de PM Enferma presentaron la menor carga de inóculo (Rank UFC *Fusarium* spp. =22.1). Sin embargo, el potencial patogénico de esas pequeñas poblaciones, debido a la supresión por parte de los factores edáfico-biológicos, puede ser mayor al generar sintomatología de SMAP en las PM a pesar de su reducida carga de inóculo. Las muestras de la misma sanidad presentaron el mayor aumento de UFC *Fusarium* spp. (+ 18.9 Rank UFC *Fusarium* spp.) post-deshidratación, confirmando la supresión de las poblaciones del patógeno por los factores edáfico-biológicos en el predio.

Las poblaciones de *Fusarium* spp. en la piñosfera de los hijuelos de PM sana se mantuvieron estables en los dos momentos de toma de muestra (38.9-33.4), posiblemente debido a que el rol saprofítico que cumplían *In situ* les permitió proliferar entre la base de las hojas a lo largo de la deshidratación.

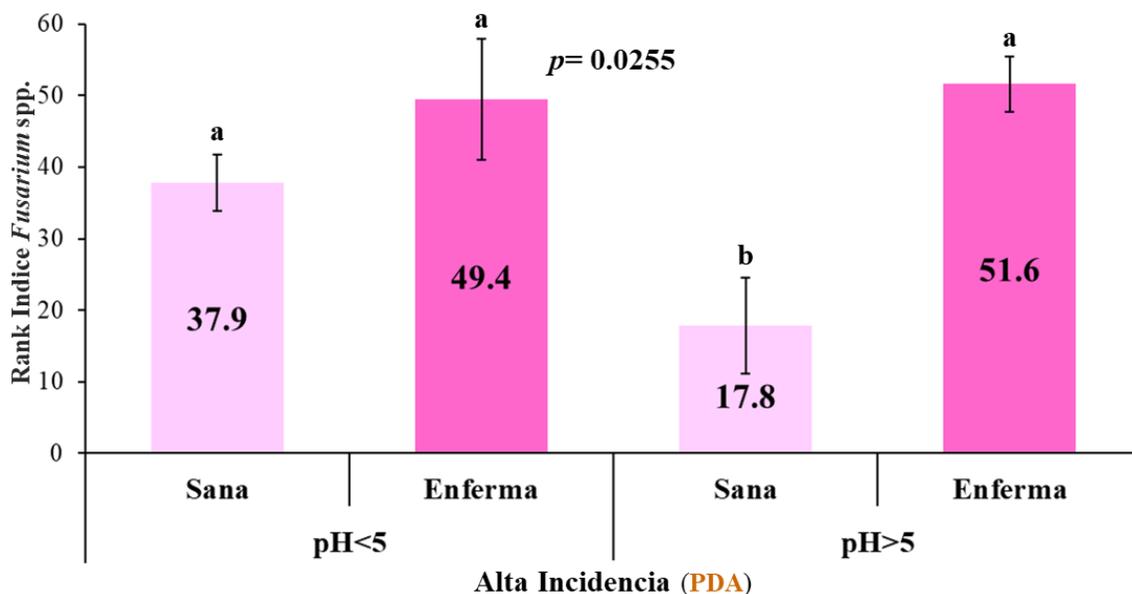


Figura 6.36: Análisis de varianza no paramétrico (PROC GLM) de Rank_Índice *Fusarium* spp. en la interacción de **Clases de pH-Sanidad de planta madre**, en la Carga de Inoculo Externo (CIE) en medio PDA para predios de **Alta Incidencia** de Síndrome de marchitez y pudrición de cogollo. Barras representan error de $\frac{1}{2}$ de la desviación estándar. Letras diferentes en barra de error muestran diferencias significativas (Duncan, $p < 0.05$).

La variable rankeada de Índice de *Fusarium* spp. (Figura 6.36) mostró diferencias significativas ($p=0.0255$) en la interacción entre clases de pH y la sanidad PM. El valor más bajo se registró en las muestras de PM sana provenientes de predios con pH > 5 (Rank_Índice de *Fusarium* spp. = 17.8). Este reducido Índice de *Fusarium* spp. podría atribuirse al rango de pH que resulta no ser óptimo para el desarrollo del patógeno, además de que la sanidad de la PM, podría ser indicativa de la existencia de un entorno microbiológico diverso y equilibrado en la rizosfera. Estudios demuestran que el pH del suelo puede influir en el crecimiento y la colonización de *Fusarium* spp. (Chen et al., 2013; Gatch y du Toit, 2017).

Por otro lado, en las muestras de PM con la misma sanidad, pero con un pH inferior a 5, se observó un Índice de *Fusarium* spp. más elevado, lo que refuerza la inferencia de que el pH influye en las poblaciones de *Fusarium* spp. de manera directa o indirecta (Leslie y Summerell, 2006).

En ambas clases de pH, las muestras de CIE provenientes de PM enferma, presentaron valores similares del Índice de *Fusarium* spp. (Rank_Índice de *Fusarium* spp. =49.4-51.6) los cuales fueron los más altos. Esto sugiere que el elevado Índice de *Fusarium* spp. en la piñosfera de los hijuelos de plantas madres enfermas podría considerarse como un indicador de que la incidencia de SMAP en las plantas adultas es consecuencia de una desproporcionada presencia de *Fusarium* spp. en la rizosfera, en comparación con otros microorganismos, que pudiesen nulificar o limitar su efecto sobre la sanidad del cultivo.

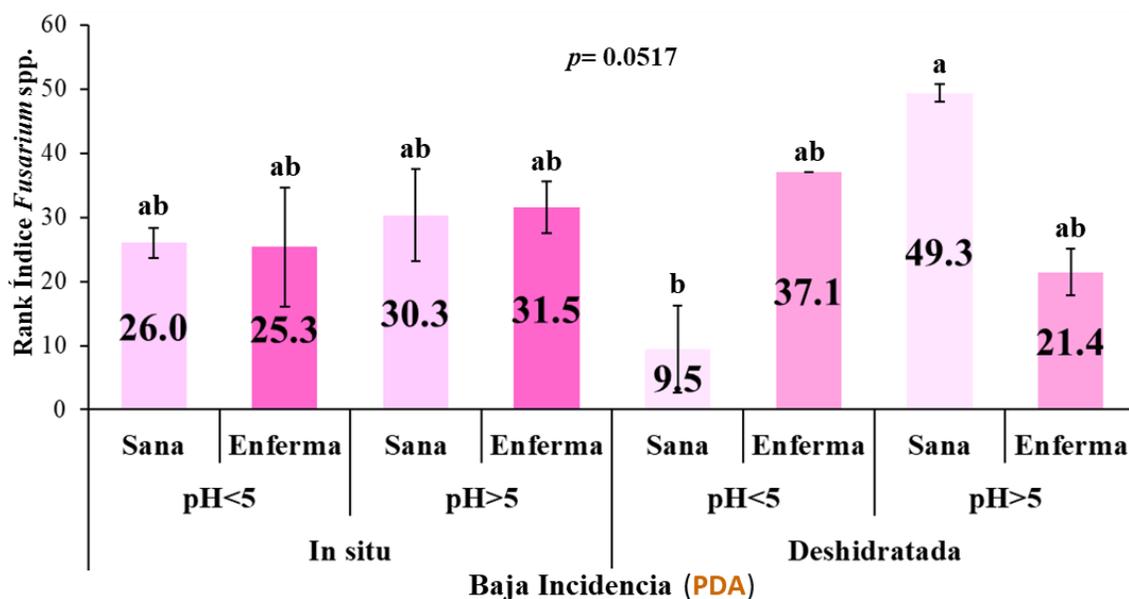


Figura 6.37: Análisis de varianza no paramétrico (PROC GLM) de Rank_Índice *Fusarium* spp. en la interacción de **Momento toma de muestra-Clases de pH-Sanidad de planta madre**, en la Carga de Inoculo Externo (CIE) en medio PDA para predios de **Baja Incidencia** de Síndrome de marchitez y pudrición de cogollo. Barras representan error de ½ de la desviación estándar. Letras diferentes en barra de error muestran diferencias significativas (Duncan, $p<0.05$).

En predios con baja incidencia de SMAP la interacción Momento toma de muestra-Clases de pH-Sanidad de planta madre mostró diferencias significativas ($p=0.0517$) en la variable rankeada de Índice de *Fusarium* spp. (Figura 6.37).

En las muestras tomadas *In situ* los valores del Índice de *Fusarium* spp. fueron estadísticamente similares en todas las muestras, lo que podría explicar la Baja incidencia

de SMAP a nivel de predio; como resultado de una rizosfera con poblaciones microbiológicas diversas y equilibradas, las cuales podrían impedir el aumento de las poblaciones de *Fusarium spp.* hasta un grado que pudiesen afectar a la planta

Mousa y Raizada (2016) establecen una relación directa entre la potencial de supresión de un suelo y la actividad microbiana, caracterizada por altos contenidos de biomasa microbiana, tanto en la edáfica como en la rizosfera de la planta, durante una etapa vital en el ciclo de vida del fitopatógeno. Esta relación tiende a ser general y no específica, lo que permite actuar contra un amplio espectro de fitopatógenos e involucra la actividad de múltiples organismos residentes. La eficacia de esta estrategia depende de la calidad y cantidad de materia orgánica disponible, que provee los nutrientes necesarios para el desarrollo y la proliferación de los microorganismos benéficos.

Una vez que los hijuelos son extraídos de este ecosistema rizosferico supresivo a las poblaciones de *Fusarium spp.*, en las muestras post-deshidratación, el índice de *Fusarium spp.* muestra una alteración basada en la sanidad de PM. En las muestras de PM sanas, se observan cambios contrastantes entre las clases de pH del predio de origen. En muestras de predios con $\text{pH} > 5$, se registra un aumento significativo en el Índice de *Fusarium spp.* posiblemente como consecuencia de la extracción del hijuelo de su entorno supresivo. Sin embargo, en las muestras deshidratadas de predios con $\text{pH} < 5$, que es inductivo para *Fusarium spp.*, se observa una marcada disminución, posiblemente debido al aumento de poblaciones de organismos saprofiticos entre la base de las hojas de los hijuelos durante la deshidratación.

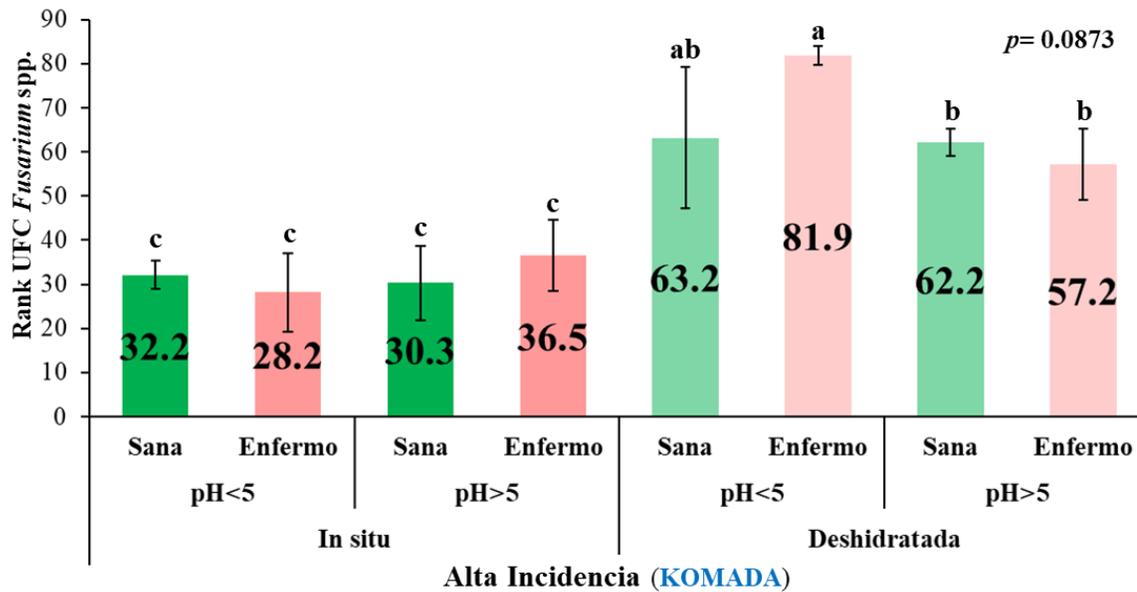


Figura 6.38: Análisis de varianza no paramétrico (PROC GLM) de Rank_UFC *Fusarium* spp. en la interacción de Momento toma de muestra-Clases de pH-Sanidad de planta madre, en la Carga de Inoculo Externo (CIE) en medio **KOMADA** para predios de **Alta Incidencia** de Síndrome de marchitez y pudrición de cogollo. Barras representan error de ½ de la desviación estándar. Letras diferentes en barra de error muestran diferencias significativas (Tukey, $p < 0.05$).

En el medio de cultivo semiselectivo de *Komada*, adicionado con fungicida PCNB, la carga de inoculo determinada por UFC *Fusarium* spp. en predios con alta incidencia SMAP presento diferencias marginalmente significativas ($p=0.0873$) en la interacción momento toma de muestra, la clase de pH del predio y la sanidad de la PM de los hijuelos de los que se obtuvieron las muestras de CIE (Figura 6.38).

La carga de inoculo de *Fusarium* spp. en el suelo adherido a los hijuelos obtenida *In situ* no mostró diferencias estadísticamente significativas entre todas las muestras, independientemente del pH del predio o la sanidad de la PM. Sin embargo, después de la deshidratación, se observó un aumento significativo en el Rank_UFC *Fusarium* spp. en todas las muestras, lo que respalda la tendencia, ligeramente sugerida en PDA (Figura 6.34 C), de la capacidad de las poblaciones de *Fusarium* spp. para proliferar en el ambiente saprofítico de la piñosfera durante la deshidratación.

La propiedad semiselectiva del medio facilita la precisa contabilización de UFC *Fusarium* spp., al inhibir el crecimiento de organismos saprofiticos, que tienden a tener un crecimiento más precoz y competitivo, y que restringían e impedían la cuantificación del aumento poblacional post-deshidratación en medio PDA. Sin embargo, esta misma propiedad, podría estar homogeneizando la posible variabilidad generada por las diferencias inherentes entre los factores experimentales (clase de pH-Sanidad) en las UFC *Fusarium* spp., ya que al fomentar la germinación de propágulos de *Fusarium* spp. sin la interferencia de otros organismos, existe el riesgo de sobreestimar la carga de inóculo viable presente.

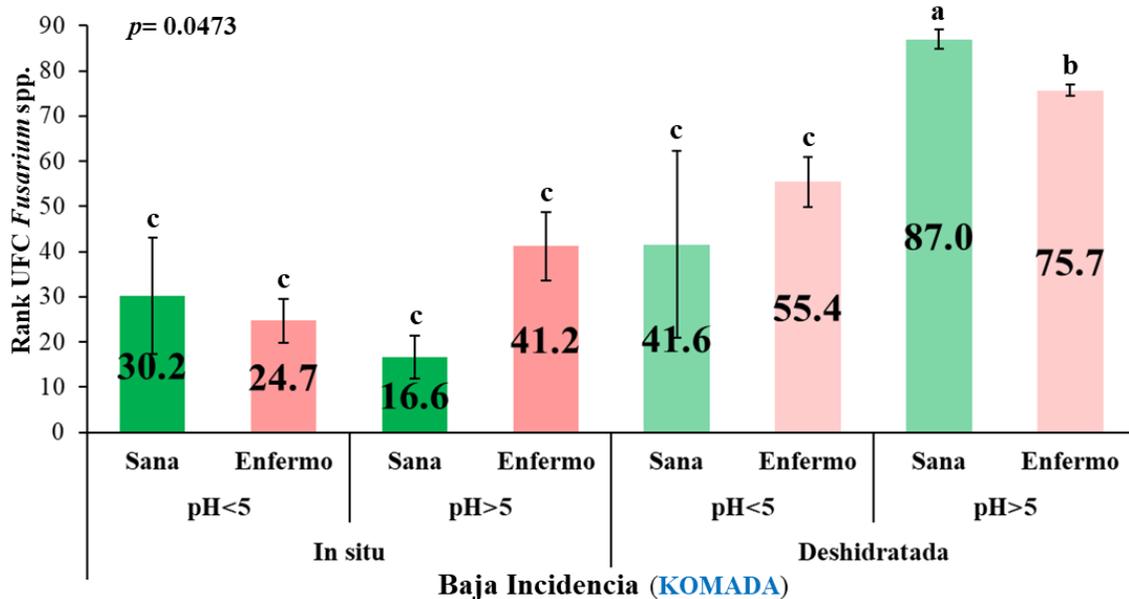


Figura 6.39: Análisis de varianza no paramétrico (PROC GLM) de Rank_UFC *Fusarium* spp. en la interacción de Momento toma de muestra-Clases de pH-Sanidad de planta madre, en la Carga de Inoculo Externo (CIE) en medio **KOMADA** para predios de **Baja Incidencia** de Síndrome de marchitez y pudrición de cogollo. Barras representan error de ½ de la desviación estándar. Letras diferentes en barra de error muestran diferencias significativas (Tukey, $p < 0.05$).

En predios con Baja Incidencia de SMAP la carga de inóculo determinada por UFC *Fusarium* spp. (Komada), presento diferencias significativas ($p=0.0473$) en la interacción entre el momento de toma de muestra, la clase de pH y la sanidad de la PM. Las UFC *Fusarium* spp. para las muestras tomadas *In situ* fueron estadísticamente similares para

la interacción de ambas clases de pH y sanidad PM (Figura 6.39). Sin embargo, se observó que las sanidades de PM en predios con pH mayor a 5 mostraron valores ligeramente contrastantes, siendo mayores en PM enferma (Rango de UFC de *Fusarium* spp. = 41.2) en comparación con PM sana (Rango de UFC de *Fusarium* spp. = 16.6).

En muestras Deshidratadas, se observa la misma tendencia que en predios de alta incidencia, con un incremento significativo en el Rank_UFC *Fusarium* spp. para todas las interacciones, siendo mayor en predios con pH>5. Las muestras de PM sana de predios con pH mayor a 5, presentaron el mayor incremento en UFC *Fusarium* spp. (+ 46 Rank_UFC *Fusarium* spp.), posiblemente debido al ambiente supresivo al que estaban sometidas sus poblaciones en las muestras *In situ* (pH no óptimo y Sanidad de PM). En medio de cultivo PDA, este incremento poblacional post-deshidratación, no fue tan visible debido al crecimiento de otros hongos que dificultan el correcto conteo de las UFC *Fusarium* spp. o inhibían su germinación.

6.3.2.- Especies más prevalentes de *Fusarium* spp. en muestras de suelo adherido a hijuelos de *Agave tequilana* (CIE) en muestras *In situ* y deshidratadas.

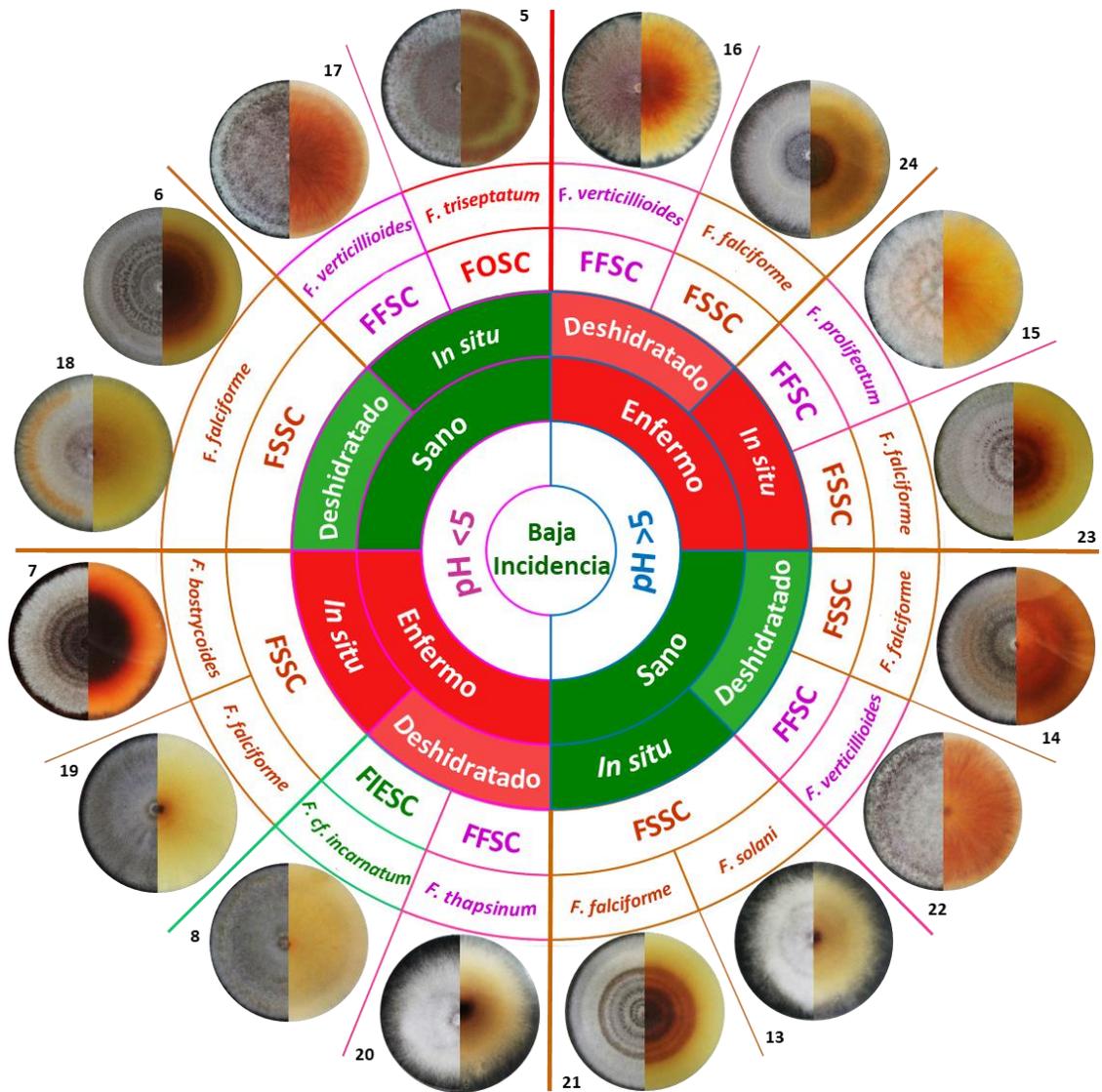


Figura 6.40: Modelo relacional de Complejos/Especies de *Fusarium* spp. más prevalentes en el lavado *In situ*/Deshidratado de suelo adherido a hijuelos de *Agave tequilana* colectados en predios con Baja incidencia de SMAP; con base al diseño experimental planteado. Caracterización cultural (anverso y reverso) en medio de cultivo Saboraud. Foto: 10 días después de la siembra. Identificación molecular: gen *EF-1*. Numeración correspondiente a caracterización original (Figura 6.36)

A partir de las muestras de CIE (*In situ*/deshidratadas) obtenidas del lavado de suelo adherido a los hijuelos, y su posterior siembra en medio semiselectivo Komada, se cuantificaron UFC *Fusarium* spp. Totales y por prevalencia (morfortipos diferentes). Se identificó el morfortipo más prevalente (con el mayor número de UFC), y se caracterizó culturalmente en medios: PDA y Saboraud; identificándolo mediante secuenciación del gen *EF-1*; obteniendo como especies más prevalentes de *Fusarium* spp. en muestras de predios con baja incidencia de SMAP (Figura 6.32):

- En los predios con pH>5 en muestras *In situ* de PM Enfermas, se encontró que las especies más prevalentes fueron *F. proliferatum* (FFSC) y *F. faciforme* (FSSC). En las muestras deshidratadas, las especies más prevalentes fueron *F. verticillioides* (FFSC) y *F. falciforme* (FSSC). Se observó una prevalencia estable por complejo, pero con una alternancia de especies dentro del complejo FFSC de *F. proliferatum* a *F. verticillioides* en las muestras del mismo predio post-deshidratación.

Por otro lado, en hijuelos de PM Sana, las especies más prevalentes *In situ* fueron del complejo FSSC: *F. falciforme* y *F. solani*. Posterior a la deshidratación, las especies *F. verticillioides* (FFSC) y *F. falciforme* (FSSC) aumentaron sus poblaciones, desplazando a las especies más prevalentes *In situ* de sus respectivos predios.

- En predios con baja incidencia de SMAP y con pH>5, las especies más prevalentes fueron: *F. falciforme* (FSSC) con 4 de los 8 aislamientos, identificada en ambos momentos de toma de muestra y en ambas sanidades de PM. *F. verticillioides* (FFSC) fue la segunda especie más prevalente, con 2/8 aislamientos, provenientes únicamente de muestras deshidratadas en ambas condiciones de sanidad.

En el predio 4, *F. proliferatum* (FFSC) y *F. solani* (FSSC) fueron las especies más prevalentes *In situ* en muestras de PM Enferma y Sana, respectivamente. Este ensamble biológico *In situ*, podría atribuirse a las características edafológicas y biológicas específicas que favorecieron la prevalencia de ciertas especies. Sin embargo, las condiciones saprofitas presentes en la piñosfera de los hijuelos

durante la deshidratación favorecieron el aumento poblacional de *F. verticillioides* (FFSC) y *F. falciforme* (FSSC), que, si bien estaban presentes *In situ*, eran suprimidos por el ensamble biológico-edafológico del predio y/o el ambiente de la piñosfera resulto ser inductivo para ellos.

- En los predios clasificados como de baja incidencia de SMAP con $\text{pH} < 5$, las especies de *Fusarium* spp. más prevalentes en muestras de CIE *In situ* de hijuelos de PM Enferma fueron del complejo FSSC: *F. bostrycoides* y *F. falciforme*. Sin embargo, posterior a la deshidratación, ninguna especie de este complejo mantuvo su prevalencia, siendo reemplazadas por poblaciones de *F. cf. Incarnatum* (FIESC) y *F. thapsinum* (FFSC), respectivamente, en muestras de la misma sanidad de PM.

Por otro lado, en muestras de PM Sana, la diversidad de complejos y especies de *Fusarium* spp. con respecto al momento de toma de muestra, mostró una tendencia contrastante: se observó una mayor diversidad *In situ*, representada por las especies *F. verticillioides* (FFSC) y *F. triseptatum* (FOSC), seguida de una homogenización posterior a la deshidratación, siendo *F. falciforme* (FSSC) la especie más prevalente en ambos predios.

En predios de baja incidencia de SMAP con $\text{pH} < 5$, el complejo más abundante, con 4 de los 8 aislados pertenecientes a este, nuevamente fue FSSC. La especie *F. falciforme* nuevamente fue la más prevalente, con 2 aislamientos de muestras deshidratadas de PM sana y uno de muestra *In situ* de PM Enferma.

En las muestras de CIE de predios con Baja Incidencia de SMAP y $\text{pH} < 5$, se encontró la mayor diversidad de complejos y especies de *Fusarium* spp; posiblemente por la idoneidad del rango de pH para este género de hongos. Además, la baja incidencia de SMAP puede ser un indicador de un entorno rizosférico diverso que propicie interacciones microbiológicas únicas, lo que podría culminar en la prevalencia de especies que posean el ensamble genómico adecuado para prosperar en las características edáfico-biológicas particulares de cada predio, dando como resultado el aislamiento de:

- *F. triseptatum* (FOOSC): Aislado de muestra de CIE *In situ* de PM Sana, único asilamiento perteneciente a esta especie y primer reporte en México y asociando a la piñosfera de hijuelos de *Agave tequilana*. Se ha reportado como el agente causal de marchitez y pudrición radicular del Tomate (*Solanum lycopersicum*) en Brasil (Severo, *et al.*, 2024)
- *F. bostrycoides* (FSSC) fue la especie más prevalente en la muestra *In situ* de PM Enferma del predio 2, donde a su vez se encontró en el tejido interno deshidratado de un hijuelo de PM enferma (Figura 6.30, F9), exponiendo la plasticidad de esta especie. Al poseer los mecanismos metabólicos y fisiológicos que le conceden la habilidad de prosperar en el entorno edáfico, siendo la especie más prevalente en la piñosfera; así como de superar las defensas de la planta, colonizando los tejidos internos, posiblemente de manera patogénica, y sobrevivir al estrés de la deshidratación de los tejidos de su hospedante.
- *F. cf. Incarnatum* (FIESC): Aislado de muestra deshidratada de PM enferma, única especie del complejo *Fusarium Incarnatum-Equiseti* Species Complex en la presente colecta.
- *F. thapsinum* (FFSC): Aislado de muestra deshidratada de PM enferma único aislado perteneciente a esta especie y primer reporte asociándolo a la piñosfera de hijuelos de *Agave tequilana*.

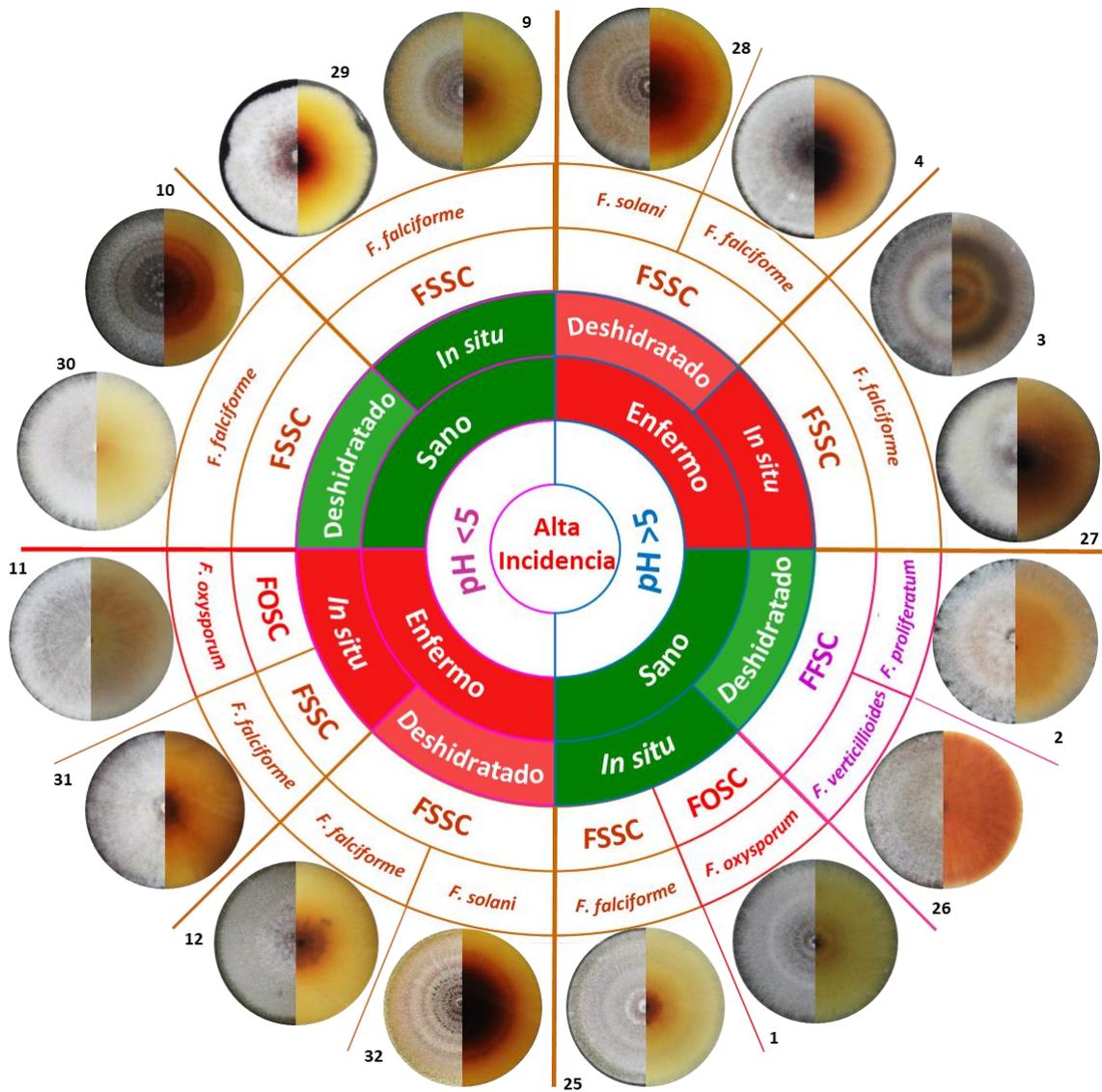


Figura 6.41: Modelo relacional de Complejos/Especies de *Fusarium* spp. más prevalentes en el lavado *In situ*/Deshidratado de suelo adherido a hijuelos de *Agave tequilana* colectados en predios con Alta incidencia de SMAP; con base al diseño experimental planteado. Caracterización cultural (anverso y reverso) en medio de cultivo Saboraud. Foto: 10 días después de la siembra. Identificación molecular: gen *EF-1*. Numeración correspondiente a caracterización original (Figura 6.33)

A partir de las muestras de CIE (*In situ*/deshidratadas) obtenidas del lavado de suelo adherido a los hijuelos, y su posterior siembra en medio semiselectivo Komada, se cuantificaron UFC *Fusarium* spp. Totales y por prevalencia (Morfortipos diferentes). Se identificó el morfotipo más prevalente (con el mayor número de UFC), y se caracterizó culturalmente en medios: PDA y Saboraud; identificándolo mediante secuenciación del gen *EF-1*; obteniendo como especies más prevalentes de *Fusarium* spp. en muestras de predios con alta incidencia de SMAP (Figura 6.41):

- En predios con pH>5, *F. falciforme* (FSSC) fue la especie más prevalente en muestras *In situ* de CIE de hijuelos con PM Enferma. Tras la deshidratación, el complejo FSSC mantuvo su prevalencia en general, aunque en el predio 7 se registró un cambio en la prevalencia de especies, reemplazando a *F. falciforme* por *F. solani* como la especie más prevalente. En las muestras de PM sana, los aislados más prevalentes se identificaron como *F. oxysporum* (FOSC) y *F. falciforme* (FSSC); sin embargo, posterior a la deshidratación, los aislados más prevalentes pertenecieron al complejo FFSC: específicamente: *F. verticillioides* y *F. proliferatum*.

En muestras de CIE obtenidas de predios con alta incidencia de SMAP y pH>5, FSSC fue el complejo más prevalente, representando 5 de los 8 aislados. Dentro de este complejo, *F. falciforme* fue la especie más prevalente, con 4 de los 5 aislados, de los cuales 3 se obtuvieron de muestras *In situ* (2 de hijuelos de PM Enferma y 1 de PM Sana); el aislamiento restante se obtuvo de una muestra deshidratada de PM Enferma. La especie de *F. solani* se aisló únicamente de una muestra de PM enferma, posterior deshidratación.

El segundo complejo más prevalente fue FFSC, con 2 de los 8 aislamientos más prevalentes, pertenecientes a este complejo: *F. verticillioides* y *F. proliferatum*, ambos aislados de muestra CIE deshidratada de PM sana.

El único aislamiento del complejo FOSC provino de una muestra CIE *In situ* de PM sana y se identificó como *F. oxysporum*.

- En los predios con pH<5, *F. oxysporum* (FOSC) y *F. falciforme* (FSSC) fueron las especies más prevalentes en muestras de PM enferma. Transcurridos los 14 días

de deshidratación, los aislamientos más prevalentes pertenecieron al complejo FSSC: *F. falciforme* y *F. solani*. En las muestras de CIE de PM Sana, *F. falciforme* (FSSC) se mantuvo como el aislado más prevalente en ambos predios y momentos de toma de muestra. Sin embargo, las características culturales difirieron en color, abundancia y tipo de crecimiento micelial.

En muestras de CIE obtenidas de predios con alta incidencia de SMAP y pH>5, FSSC fue el complejo más prevalente, agrupando 7 de los 8 aislamientos. Nuevamente la especie más prevalente fue *F. falciforme*, con 6 de 8 aislamientos, identificados como esta; siendo la especie más prevalente en ambos momentos de toma de muestra de CIE de hijuelos de PM sana, demostrando una alta plasticidad ecológica, manteniendo su prevalencia durante la alternancia de un medio edafológico a uno saprofítico. El aislamiento restante se perteneció a *F. solani* en muestra deshidratada de PM enferma.

El único aislamiento que no perteneció al complejo FSSC se realizó de una muestra *In situ* de hijuelos con PM Enferma, identificado *F. oxysporum* (FOSC).

6.3.3.- Inductividad potencial de los aislamientos más prevalentes de *Fusarium* spp. en muestras de CIE hijuelos de *Agave tequilana*, con base en los factores experimentales

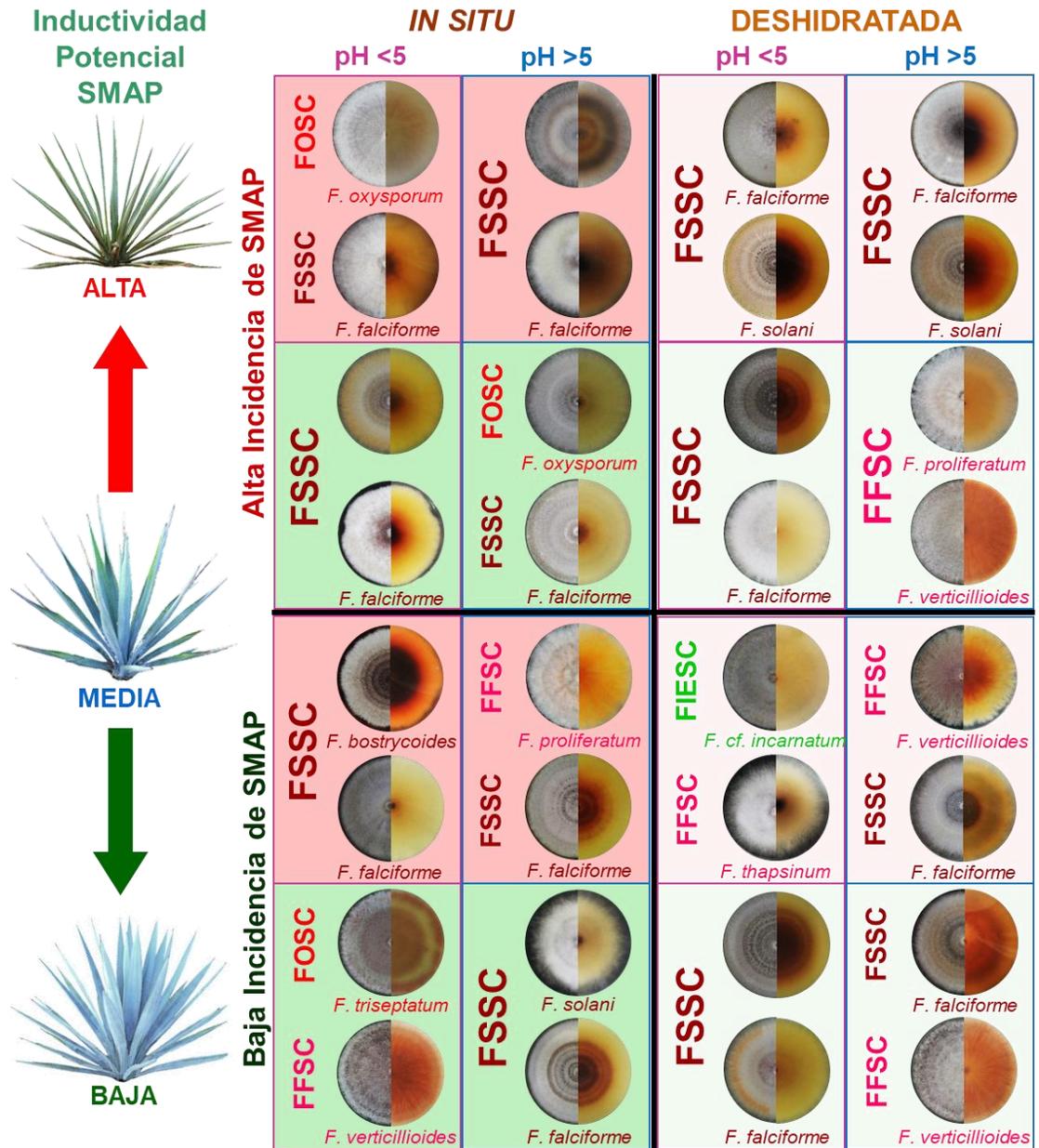


Figura 6.42: Modelo relacional de Complejos/Especies de *Fusarium* spp. más prevalentes en muestras de CIE de hijuelos de *Agave tequilana* y su potencial inductivo al SMAP, con base a la incidencia de este a nivel predio y la Sanidad de PM. Caracterización cultural (anverso y reverso) en medio de cultivo Saboraud. Foto: 10 días después de la siembra. Identificación molecular: gen *EF-1*.

El Síndrome de Marchitez y Pudrición del Cogollo (SMAP) en *Agave tequilana* se presenta generalmente en plantas de 3 a 4 años. La incidencia de esta enfermedad es el resultado de la interacción entre variables edafológicas (textura, compactación, pH), antropogénicas (uso de herbicidas, prácticas culturales) y biológicas (presencia de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp.; carga de inóculo y ensamblaje genómico de *Fusarium* spp.). Esta última es de crucial importancia debido a la implicación de la existencia de un conjunto de poblaciones patogénicas y saprofíticas en la rizosfera de las plantas, las cuales están en constante dinamismo y fluctuación en respuesta a prácticas agrícolas disruptivas. Las poblaciones de *Fusarium* spp. y su prevalencia en el suelo adherido a los hijuelos, especialmente en hijuelos de calibre Toronja (>2 años), pueden ser un posible indicador del resultado de la interacción estas variables. La sanidad de las plantas madre y la incidencia de SMAP a nivel de predio pueden ser factores indicativos del potencial inductivo de estas especies; de particular interés son aquellas con capacidad de internalización, requiriendo de pruebas de patogenicidad posteriores para dilucidar su rol endofítico o patogénico (López-Bautista *et al.*, 2020; Mendoza-Ramos *et al.*, 2020).

Bajo este razonamiento, las especies más prevalentes en muestras de predios con alta incidencia de SMAP (indicando la inductividad de las variables edafológicas o antropogénicas) en muestras de PM enferma (denotando la presencia de poblaciones patogénicas de *Fusarium* spp. en la rizosfera) presentan el mayor potencial inductivo, siendo identificadas como *F. oxysporum* [FOSC] (1 de 4 aislamientos) y *F. falciforme* [FSSC] (3 de 4 aislamientos). Por otro lado, las especies más prevalentes en muestras de PM sana de los mismos predios, *F. oxysporum* [FOSC] (1 de 4 aislamientos) y *F. falciforme* [FSSC] (3 de 4 aislamientos), presentan un potencial inductivo medio, ya que la sanidad de la PM puede indicar un entorno rizosférico supresivo focalizado o su limitada capacidad patogénica. Cabe destacar que ninguno de los aislamientos presento un crecimiento colonial idéntico a sus homólogos de especie.

En predios con baja incidencia de SMAP (indicando la supresividad de las variables edafológicas o antropogénicas a nivel predio); las muestras de PM enferma (denotando la presencia de poblaciones patogénicas de *Fusarium* spp. en la rizosfera, ausencia de antagonistas o condiciones edafológicas inductivas localizadas) presentan un potencial

inductivo medio, identificadas como: *F. falciforme* [FSSC] (2 de 4 aislamientos), *F. bostrycoides* [FSSC] (1 de 4 aislamientos) y *F. proliferatum* [FFSC] (1 de 4 aislamientos). Las especies más prevalentes en muestras de los mismos predios de hijuelos originados de PM Sana: *F. triseptatum* [FOSC], *F. verticillioides* [FFSC], *F. solani* [FSSC] y *F. falciforme* [FSSC]; presentan el menor potencial inductivo a SMAP; muestra de esto es la presencia de 4 especies diferentes de 4 aislamientos realizados, resultado de un entorno rizosférico diverso y supresivo.

Después de los 14 días de deshidratación, la identidad de los *Fusarium* spp. más prevalentes en la piñosfera se modificó, posiblemente como consecuencia de su extracción de un medio edáfico original que dictaminaba la prevalencia en las muestras *In situ*.

La alteración y sustitución de la especie más prevalente de *Fusarium* spp. post deshidratación puede deberse a diferentes factores. Por un lado, podría ser el resultado de la incapacidad de la especie más prevalente *In situ* para sobrevivir a la deshidratación o para prosperar en un ambiente saprofítico (falta de mecanismos de competencia, susceptibilidad a la antibiosis de otros organismos, o una sobre adaptación al medio edáfico original); por otro lado, la plasticidad ecológica de la especie más prevalente post deshidratación (mecanismos de competencia y rutas metabólicas adaptadas al ambiente saprofítico).

6.3.4.- Identificación de complejos y especies de *Fusarium* spp. más prevalentes en muestras de CIE *In situ* y su incidencia en la Rizosfera de otros cultivos en México:

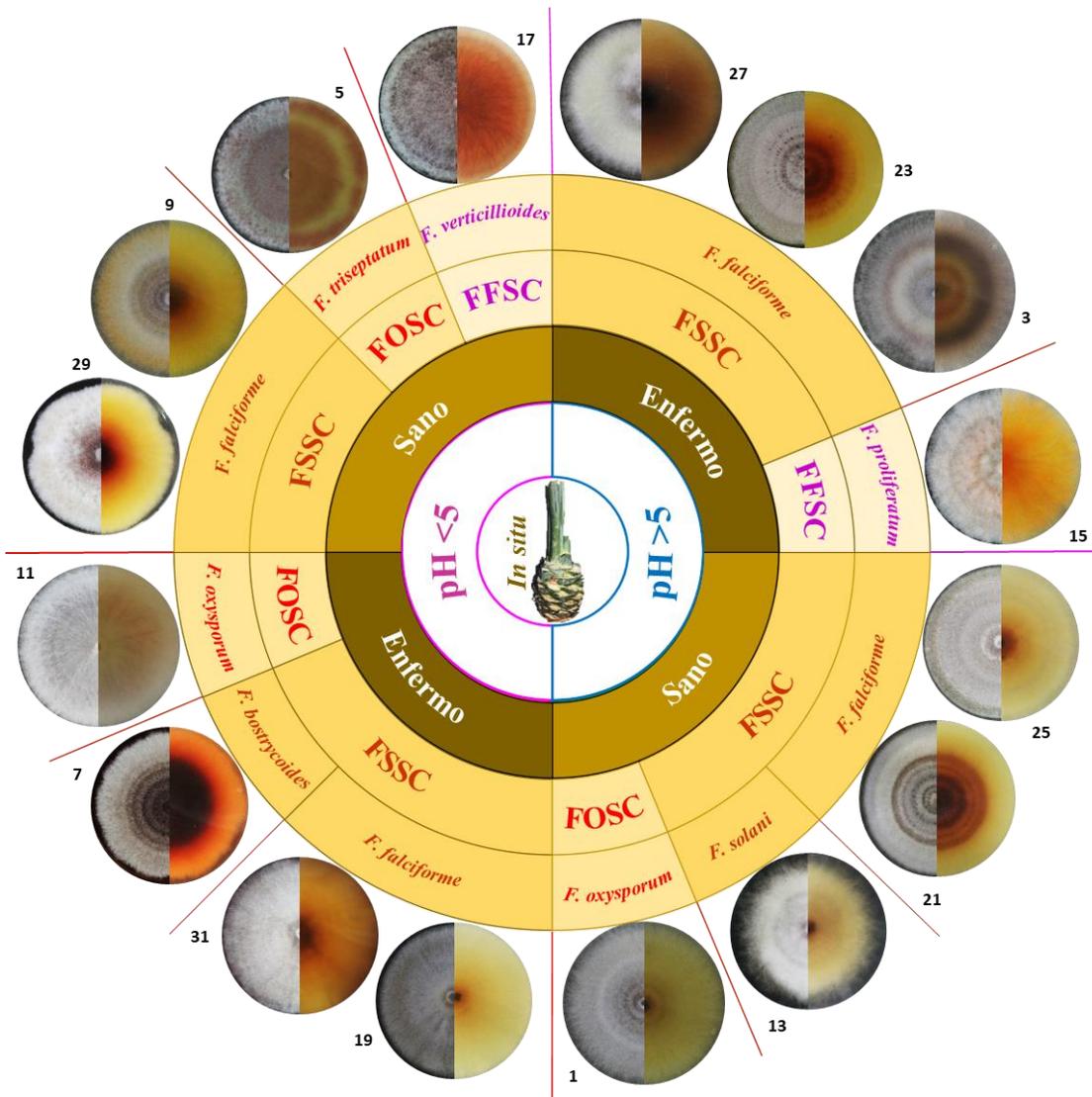


Figura 6.43: Agrupación por Complejo/Especie de *Fusarium* spp. más prevalentes en muestras *In situ* de suelo adherido a hijuelos *Agave tequilana* (CIE), con base en el pH del predio y la sanidad de PM de donde se originaron. Caracterización cultural (anverso y reverso) en medio de cultivo Saboraud. Foto: 10 días después de la siembra. Identificación molecular por: gen *EF-1*. Numeración correspondiente a caracterización original (Figura 6.33-34)

Basado en la secuenciación del gen EF-1 de los 16 *Fusarium* spp. más prevalentes aislados del suelo adherido a los hijuelos de *Agave tequilana* en muestras *In situ*, se identificaron 6 especies distintas, agrupadas en 3 complejos de especies diferentes:

- **FSSC:** Fue el complejo más numeroso con 11 aislamientos pertenecientes a este complejo, distribuidos en 3 especies distintas:
 - *F. falciforme*: 9 de los 11 aislados identificados pertenecieron a esta especie. En general, las colonias exhibieron micelio de moderado a abundante, presentando tonalidades que variaron desde blanco a café. Se observaron anillos de crecimiento concéntricos, siendo más oscuros, densos y cercanos, entre más al centro de la colonia. Los bordes de las colonias mostraron una tendencia a disminuir en densidad y presentaron una regularidad notable. En el reverso de las colonias se apreciaron pigmentaciones más oscuras, especialmente en el centro y en los anillos concéntricos, las cuales también fueron visibles desde esta perspectiva. Esta especie se ha reportado en raíces de *Citrullus lanatus* (Sandía) en Sonora (Rentería-Martínez *et al.*, 2018); *Annona muricata* (Guanabana) en Nayarit (Cambero-Ayón *et al.*, 2023); *Allium cepa* (Cebolla) en Sinaloa (Tirado-Ramírez *et al.*, 2018). No se encontraron reportes de su aislamiento de suelo en México.
 - *F. solani*: El único representante de esta especie *In situ*, mostró un desarrollo micelial moderado con un aspecto algodonoso, de color blanco tanto en el anverso como en el reverso de la colonia. Se observaron pigmentaciones de color café en el centro. Los bordes de la colonia fueron irregulares y mostraron una disminución en densidad hacia la periferia. Se ha reportado la presencia de esta especie en suelo de: *Asparagus officinalis* (Espárrago) en Guanajuato (Quilambaqui-Jara *et al.*, 2004); *Phaseolus vulgaris* (Frijol) en Estado de México e Hidalgo (Navarrete-Maya y Acosta-Gallegos, 1999; Plazasola *et al.*, 2004); *Cicer arietinum* (Garbanzo) en Sonora (Aguilar *et al.*, 2022). Se ha reportado su presencia en raíces de: *Saccharum officinarum* (Caña de azúcar) en Morelos (Martínez-Fernández *et al.*, 2015); *Phaseolus vulgaris* (Frijol) en

Aguascalientes, Guanajuato, Querétaro, San Luis Potosí y Zacatecas (Montiel-González *et al.*, 2005); *Asparagus officinalis* (Esparrago) en Guanajuato (Quilambaqui-Jara *et al.*, 2004); *Gossypium hirsutum* (Algodón) en Baja California (Gonzalez-Soto *et al.*, 2022) y en *Pinus patula* (Pino Mexicano) en Guerrero (Robles-Yerena *et al.*, 2016); *Allium sativum* (Ajo) en Aguascalientes, Guanajuato, Zacatecas (Delgado-Ortiz *et al.*, 2016)

F. bostrycoides: La colonia presentó micelio con aspecto polvoriento, adherido al medio de cultivo, con anillos concéntricos de color café hasta la mitad de la colonia, a partir de la cual el crecimiento fue homogéneo y de color blanquecino. Los bordes de la colonia fueron ondulados. En el reverso del medio de cultivo se observó una pigmentación café-rojiza brillante, posiblemente derivada de una alta producción de metabolitos volátiles, siendo más pronunciada debajo de la parte café de la colonia. Esta especie no tiene reportes en México; en Brasil está reportado en el fruto en *Passiflora edulis* (Ninos, *et al.*, 2021) y en Puerto Rico esta reportada en el fruto de *Coffea* spp. (Serrato-Diaz *et al.*, 2024). No se encontraron reportes de esta especie en suelo o raíces de ningún cultivo.

- **FOSC**: Este complejo fue el segundo más abundante y diverso, con tres aislados distribuidos en dos especies distintas:

- *F. oxysporum*: Las dos colonias de esta especie presentaron micelio moderado de color blanquecino con ligeras tonalidades rosáceas o cafés. Presentaron un crecimiento radial y bordes semirregulares.

Se ha reportado la presencia de esta especie en suelo de: *Citrullus lanatus* (Sandía) en Sonora (Mora *et al.*, 2022); *Solanum lycopersicum* (Tomate) en Sinaloa (Apodaca-Sánchez *et al.*, 2002); *Asparagus officinalis* (Esparrago) en Guanajuato (Quilambaqui-Jara *et al.*, 2004); *Phaseolus vulgaris* (Frijol) en Estado de México (Navarrete-Maya y Acosta-Gallegos, 1999); *Cicer arietinum* (Garbanzo) en Sonora (Aguilar *et al.*, 2022).

Se ha reportado su presencia en raíces de: *Saccharum officinarum* (Caña de azúcar) en Morelos (Martínez-Fernández *et al.*, 2015); *Phaseolus*

vulgaris (Frijol) en Aguascalientes, Guanajuato, Querétaro, San Luis Potosí y Zacatecas (Montiel-González *et al.*, 2005); *Triticum aestivum* (Trigo) en Guanajuato (Leyva-Mir *et al.*, 2017); *Fragaria* spp. (Fresa) en Guanajuato (Mariscal-Amaro *et al.*, 2017); *Asparagus officinalis* (Esparrago) en Veracruz (Sierra-Moya *et al.*, 2022); *Allium sativum* (Ajo) en Aguascalientes, Guanajuato, Zacatecas (Delgado-Ortiz *et al.*, 2016).

- *F. triseptatum*: El único aislamiento de esta especie, se obtuvo *In situ* de PM Sana, presento micelio moderado que aumentó en cantidad hacia la periferia, con bordes regulares. La colonia presentó una coloración rosácea, disminuyendo en intensidad hacia las orillas, pero manteniendo matices de este color. En el reverso, la coloración fue similar, con un anillo de color amarillento en la mitad de la colonia, donde comenzó el cambio de crecimiento en el anverso.

Esta especie no tiene reportes en México. En Brasil esta reportada en raíces de *Solanum lycopersicum* (Tomate) como agente causal de “Marchitez y Pudrición radicular” (Severo, *et al.*, 2024). En Estados Unidos esta reportada en plántulas de *Pinus* spp. (Pino) (Dobbs *et al.*, 2023); su presencia en la piñosfera de los hijuelos podría explicarse por la conversión de suelos forestales a agrícolas debido al incremento en los precios del Agave, lo que ha impulsado la deforestación para expandir la superficie de cultivo de *Agave tequilana*.

- **FFSC:** Este complejo fue el menos abundante en las muestras de CIE *In situ*, con solo dos aislamientos, identificados como diferentes especies y realizados en distintos clases de pH y sanidades de PM:
 - *F. proliferatum*: Aislado de una muestra de PM enferma de un predio con pH mayor a 5. Presentó micelio moderadamente abundante de color blanco, con bordes semirregulares y tonalidades naranjas en el centro. Mostró un crecimiento radial y, en el reverso, fueron visibles inserciones en el medio de cultivo de color naranja brillante. El medio adyacente adquirió tonalidades amarillentas brillantes, posiblemente debido a una alta producción de metabolitos por parte del aislamiento.

Se ha reportado su presencia en raíces de: *Saccharum officinarum* (Caña de azúcar) en Morelos (Martínez-Fernández *et al.*, 2015); *Phaseolus vulgaris* (Frijol) en Zacatecas (Montiel-González *et al.*, 2005); *Triticum aestivum* (Trigo) en Guanajuato (Leyva-Mir *et al.*, 2017); *Fragaria* spp. (Fresa) en Guanajuato (Mariscal-Amaro *et al.*, 2017); *Asparagus officinalis* (Esparrago) en Veracruz (Sierra-Moya *et al.*, 2022); *Allium sativum* (Ajo) en Aguascalientes, Guanajuato, Zacatecas (Delgado-Ortiz *et al.*, 2016). No se encontraron reportes de esta especie aislada de suelo en México.

- *F. verticillioides*: Aislado de una muestra de PM Sana de un predio con pH<5. La colonia presentó micelio moderado de color rosa fuerte, volviéndose blanco en los bordes regulares. En el reverso, se observaron inserciones radiales en el medio de cultivo con un color rosa-naranja brillante, que disminuyeron en densidad y grosor hacia los bordes.

Se ha reportado su presencia en raíces de: *Saccharum officinarum* (Caña de azúcar) en Morelos (Martínez-Fernández *et al.*, 2015); *Phaseolus vulgaris* (Frijol) en Aguascalientes (Montiel-González *et al.*, 2005); *Triticum aestivum* (Trigo) en Guanajuato (Leyva-Mir *et al.*, 2017); *Fragaria* spp. (Fresa) en Guanajuato (Mariscal-Amaro *et al.*, 2017); *Asparagus officinalis* (Esparrago) en Veracruz (Sierra-Moya *et al.*, 2022); *Allium sativum* (Ajo) en Aguascalientes, Guanajuato, Zacatecas (Delgado-Ortiz *et al.*, 2016). No se encontraron reportes de esta especie aislada de suelo en México.

6.3.5.- Identificación de complejos y especies de *Fusarium* spp. más prevalentes en muestras de CIE *Deshidratada* y su plasticidad adaptativa-saprofítica:

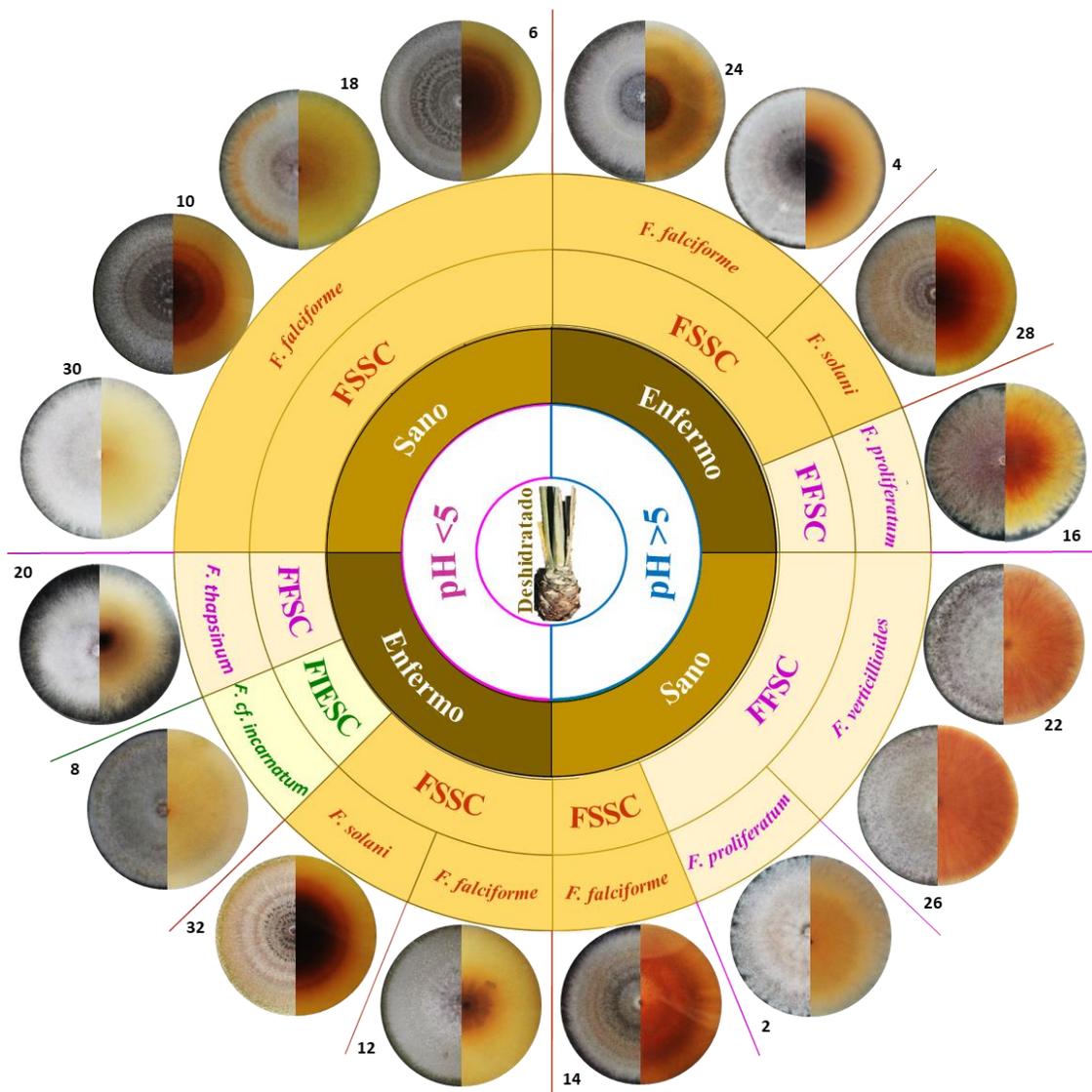


Figura 6.44: Agrupación por Complejo/Especie de *Fusarium* spp. más prevalentes en muestras *Deshidratada* de suelo adherido a hijuelos *Agave tequilana* (CIE), con base en el pH del predio y la sanidad de PM de donde se originaron. Caracterización cultural (anverso y reverso) en medio de cultivo Saboraud. Foto: 10 días después de la siembra. Identificación molecular por: gen *EF-1*. Numeración correspondiente a caracterización original (Figura 6.33-34)

De las muestras de CIE obtenidas posterior a la deshidratación (Figura 6.44), los aislamientos más prevalentes se identificaron por secuenciación del gen *EF-1*, resultando en la identificación de 6 especies agrupadas en tres complejos:

- **FSSC:** Una vez más, este complejo se destacó como el más prevalente en las muestras de CIE. Su prevalencia como el complejo de la especie más numerosa en las muestras post-deshidratación se redujo de 11 a 10 aislados. Aunque pareciera que el efecto de la deshidratación fue mínimo en la presencia de este complejo en las muestras de CIE, la distribución de los aislamientos no coincidió con las muestras *In situ*.

- *F. falciforme*: Una vez más, esta especie fue la más prevalente, con 8 de los 10 aislamientos identificados como pertenecientes a ella. Destacando que los 4 aislamientos más prevalentes post-deshidratación en muestras de PM sana con pH<5, pertenecieron a esta especie, sin presentar caracteres culturales idénticos entre ellos. Las colonias de esta especie mostraron micelio de moderado desarrollo, con aspecto polvoso en la mayoría de los casos, aunque algunos presentaron un micelio algodonoso de baja densidad. Las tonalidades cafés predominaron en la mayoría de los aislamientos, siendo más oscuros en el centro de la colonia tanto en el anverso como en el reverso. Algunas colonias exhibieron una alternancia entre un centro con micelio adherido al medio de color oscuro y un micelio algodonoso blanquecino con tonalidades café. En los casos donde se observaron anillos de crecimiento concéntricos, estos variaron en tonalidades y grosor, manteniendo la tendencia de una mayor pigmentación en el centro de la colonia. Contrariamente a la tendencia de la especie, un aislamiento de PM sana no mostró ninguna pigmentación en su micelio con aspecto algodonoso; sin embargo, provocó una ligera pigmentación en el medio (F30).

La plasticidad adaptativa-saprofítica de esta especie está demostrada por su aislamiento en: Ojo de *Equus caballus* (Caballo), cabeza de *Canis lupus* (Perro), caparazón de *Aldabrachelys gigantea* (Tortuga Aldabra) en

Estados Unidos (O'Donnell *et al.*, 2016); huevos de *Caretta caretta* (Tortuga Marina) en Cabo verde (Sarmiento-Ramírez *et al.*, 2010)

- *F. solani*: Los dos aislamientos de esta especie fueron obtenidos de muestras de PM enferma con diferentes niveles de pH. Las colonias mostraron un micelio de desarrollo moderado, creciendo adheridas al medio de cultivo y con un aspecto polvoriento. Exhibieron un crecimiento con anillos concéntricos de distintas tonalidades de café, siendo más oscuros en el centro y disminuyendo su pigmentación hasta alcanzar tonalidades naranjas en los bordes coloniales. En el reverso de las colonias, se observó pigmentación del medio de cultivo, siendo más concentrada en el centro de la colonia y casi inexistente en los márgenes coloniales.

La plasticidad adaptativa-saprofítica de esta especie está demostrada por su aislamiento en: Pie de *Canis lupus* (Perro) en Estados Unidos (O'Donnell *et al.*, 2016); huevos de *Caretta caretta* (Tortuga Marina) en Cabo verde (Sarmiento-Ramírez *et al.*, 2010)

- **FFSC**: Este complejo fue el segundo más abundante en las muestras deshidratadas, aumentando su prevalencia con respecto a las muestras in situ, pasando de 2 aislamientos en muestras de CIE de hijuelos frescos a 5 post-deshidratación.

F. verticillioides: Esta especie fue una de las dos más prevalentes, con dos aislamientos obtenidos, ambos de muestras de PM sana, recolectadas en predios con pH>5. Las colonias mostraron micelio moderado de color blanquecino con tonalidades rosáceas, con bordes regulares. En el reverso de la colonia, se observaron inserciones radiales de micelio dentro del medio de cultivo con tonalidades color salmón, características distintivas de esta especie.

La plasticidad adaptativa-saprofítica de esta especie está demostrada por su aislamiento en: nariz de *Felis catus* (Gato Domestico) en Estados Unidos (O'Donnell *et al.*, 2016).

- *F. proliferatum*: Los dos aislamientos fueron realizados en predios con un pH>5, de distintas sanidades de PM, lo que se reflejó en diferencias en la

pigmentación colonial y del medio, dependiendo de la sanidad de origen. El aislamiento obtenido de PM enferma mostró micelio moderado con crecimiento radial y tonalidades rosáceas, más concentradas en el centro de la colonia. En el reverso, se observó una pigmentación del medio de color naranja brillante en la parte central, con un gradiente hacia el amarillo brillante conforme se acercaba a los márgenes coloniales. Por otro lado, el aislamiento de PM sana careció de pigmentación profusa, mostrando un micelio de aspecto algodonoso de color blanco con tonalidades rosas-naranjas, bordes semirregulares y un anillo de micelio más denso cerca de los bordes. No se observó generación de pigmentación en el medio de cultivo.

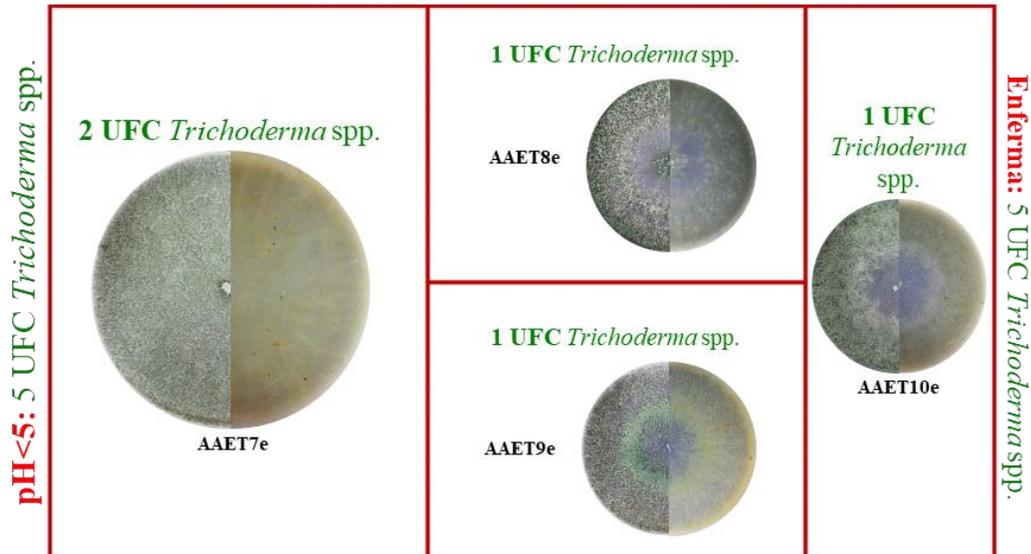
La plasticidad adaptativa-saprofítica de esta especie está demostrada por su aislamiento en: cuerno de *Ceratotherium simum* (Rinoceronte), Ojo de *Equus caballus* (Caballo), en Estados Unidos (O'Donnell *et al.*, 2016).

- *F. thapsinum*: El único aislamiento de esta especie se obtuvo de una muestra de PM Enferma en un predio de pH<5. Presentó un aspecto algodonoso, con crecimiento radial y una reducción en la densidad colonial cerca de los bordes, sin mostrar pigmentación. En el reverso, se observó una pigmentación cafésosa en el centro de la colonia, disminuyendo en intensidad hacia los bordes. Esta especie está reportada en: *Zea mays* (Maíz): “Putrefacción de la mazorca de maíz” (Leyva-Madriral, *et al.*, 2015), “Amarillamiento o Madurez prematura del trigo” (Rangel-Castillo *et al.*, 2017)
- **FIESC**: El único aislamiento perteneciente a este complejo se obtuvo de una muestra de deshidratada de CIE de hijuelos de PM enferma en un predio con pH<5 de baja incidencia de SMAP.
 - *F. cf. Incarnatum*: La única colonia de esta especie mostró micelio moderado ligeramente abultado, de color blanquecino, con bordes regulares y aumento en la densidad micelial en la periferia. En el reverso, se observó una ligera pigmentación del medio de cultivo de color amarillo, a excepción de la zona debajo de los bordes.

La plasticidad adaptativa-saprofítica de esta especie está demostrada por su aislamiento en: nariz de *Canis lupus* (Perro), ojo de *Ceratotherium simum* (Rinoceronte), placenta de *Equus caballus* (Caballo), piel de *Aldabrachelys gigantea* (Tortuga Aldabra) en Estados Unidos (O'Donnell *et al.*, 2016).

6.4.- *Trichoderma* spp. en muestras In situ/Deshidratadas de CIE de hijuelos calibre Toronja de *Agave tequilana*

Alta Incidencia: 5 UFC *Trichoderma* spp.



Baja Incidencia: 14 UFC *Trichoderma* spp.

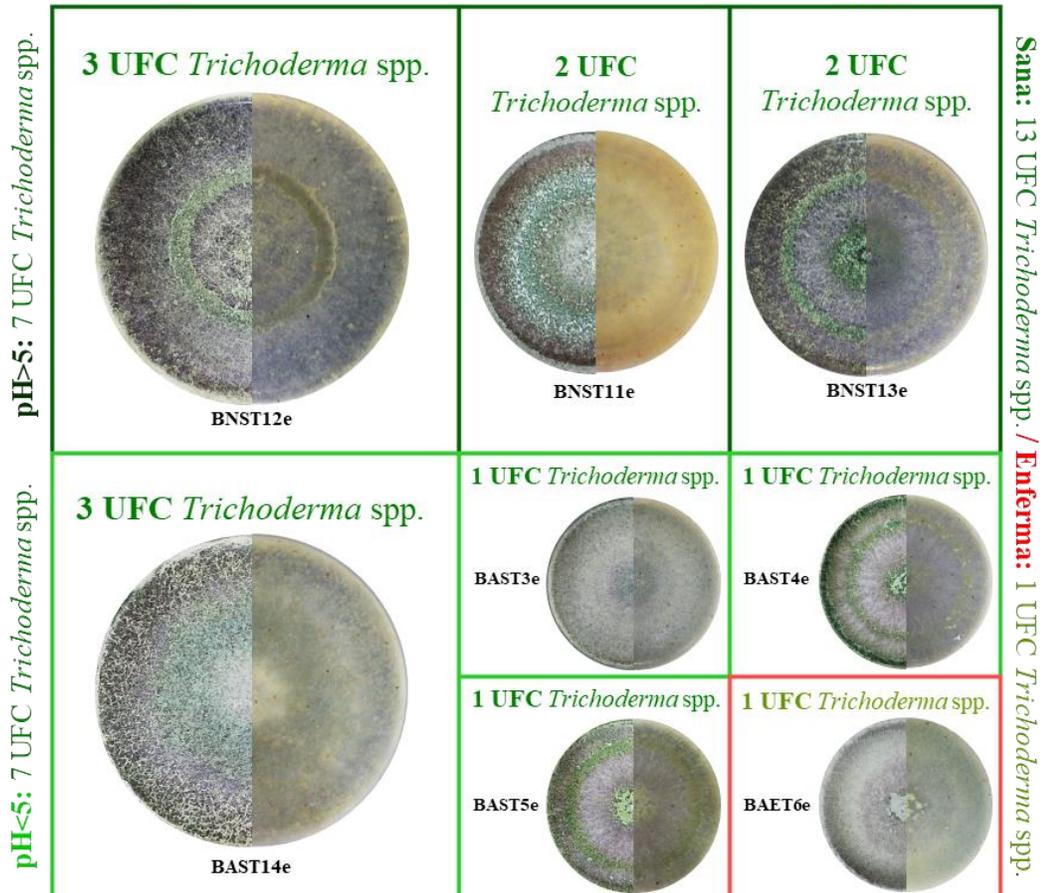


Figura 6.45: Modelo relacional de UFC *Trichoderma* spp. contabilizadas en muestras de lavado Insitu/Deshidratado de suelo adherido a hijuelos de *Agave tequilana* en predios con Alta y Baja incidencia del síndrome de marchitez y pudrición de cogollo (SMAP); con base al diseño experimental planteado. Caracterización cultural (anverso y reverso) en medio de cultivo V8. Foto: 10 días después de la siembra.

A partir de la siembra de muestras de CIE (*In situ*-Deshidratadas) en PDA, se realizó el aislamiento de crecimientos putativos de *Trichoderma* spp. La identificación se llevó a cabo mediante la observación de estructuras microscópicas y características culturales distintivas del género, como conidióforos ramificados y esporulación agrupada en "pompones", respectivamente.

Debido a la rápida tasa de crecimiento de las colonias de *Trichoderma* spp., que les permite colonizar casi por completo las cajas Petri con medios genéricos (PDA), suprimiendo el crecimiento de otros organismos e inhibiendo la germinación de otros propágulos de *Trichoderma* spp., la cuantificación de UFC tiende a ser un indicador de la presencia de este género más que de la prevalencia entre especies; indicando posibles condiciones edafológicas-biológicas favorables para la proliferación de este género, o a la capacidad adaptativa de los aislamientos para prevalecer ante condiciones adversas.

En predios categorizados como con alta incidencia de SMAP, se obtuvieron 4 aislamientos de *Trichoderma* spp., todos ellos en el predio 3 ($\text{pH} < 5$), en muestras *In situ* de hijuelos de PM Enferma, mostrando diferencias culturales entre sí (V8-Agar), lo que sugiere la posible presencia de diferentes especies (Figura 6.44). Tres de estos aislamientos se obtuvieron a partir de crecimientos monoconidiales. Del aislamiento AAE7e se contabilizaron 2 UFC, ambas con un crecimiento distinto respecto a los demás, posiblemente debido a diferentes rutas metabólicas que le confieren la adaptabilidad para prevalecer sobre sus congéneres.

En predios con baja incidencia de SMAP, se realizaron 8 aislamientos de *Trichoderma* spp., con diferencias culturales entre sí (V8-Agar), exclusivamente de muestras de CIE *In situ*. Siete de los ocho aislamientos se obtuvieron de muestras de PM Sana: Cuatro de ellos procedían de predios con un $\text{pH} < 5$ (tres del predio 2 y uno del predio 5: BAST14e) mientras que los tres aislamientos restantes se obtuvieron del predio 4 ($\text{pH} > 5$).

El único aislamiento de *Trichoderma* spp. obtenido a partir de muestras de PM enferma, fue en el Predio 4 (pH<5); BAET6e, que mostró diferencias culturales respecto a los aislamientos del mismo predio.

Se destaca la ausencia de *Trichoderma* spp. en las 16 muestras de CIE post-deshidratación (48 siembras en PDA). Esta ausencia de poblaciones del género podría atribuirse a una posible susceptibilidad a la deshidratación a la que se someten a los hijuelos o a la sustitución de sus poblaciones por parte de organismos más adaptados al medio saprofítico.

A partir de muestras de rizosfera de hijuelos *Agave tequilana* inoculados previamente a su establecimiento con cepas de *Trichoderma harzianum*, *T. virens* y *T. aureoviridae*, colectadas cada 90 días durante el periodo de septiembre 2009 a julio 2011, Tlapal-Bolaños (2013) reporta la susceptibilidad de *Trichoderma* spp. a altas temperaturas ambientales y al estrés hídrico. Durante las épocas de sequía (marzo-junio) y de mayor temperatura (30-34°C), las UFC del antagonista redujeron drásticamente sus valores, llegando incluso a desaparecer por completo, en los tratamientos con *T. harzianum* y *T. aureoviridae*. Esta reducción en la población de *Trichoderma* spp. coincidió con un incremento en las UFC de *Fusarium* spp.

En cualquier caso, la deshidratación agrícola de los hijuelos de *Agave tequilana* previo a su establecimiento, elimina las poblaciones de *Trichoderma* spp. en la piñosfera de estos, pone en riesgo la sanidad de estos, al desocupar un nicho ecológico que podría ser aprovechado por organismos patogénicos, mismos que se encontraban suprimidos por la actividad de *Trichoderma* spp. y otros agentes biológicos, en la rizosfera de la planta madre (Baiyee, *et al.*, 2019)

6.4.1.- Relación de la presencia de *Trichoderma* spp. y las especies *Fusarium* spp. más prevalentes en muestras de CIE *In situ*/ Deshidratadas

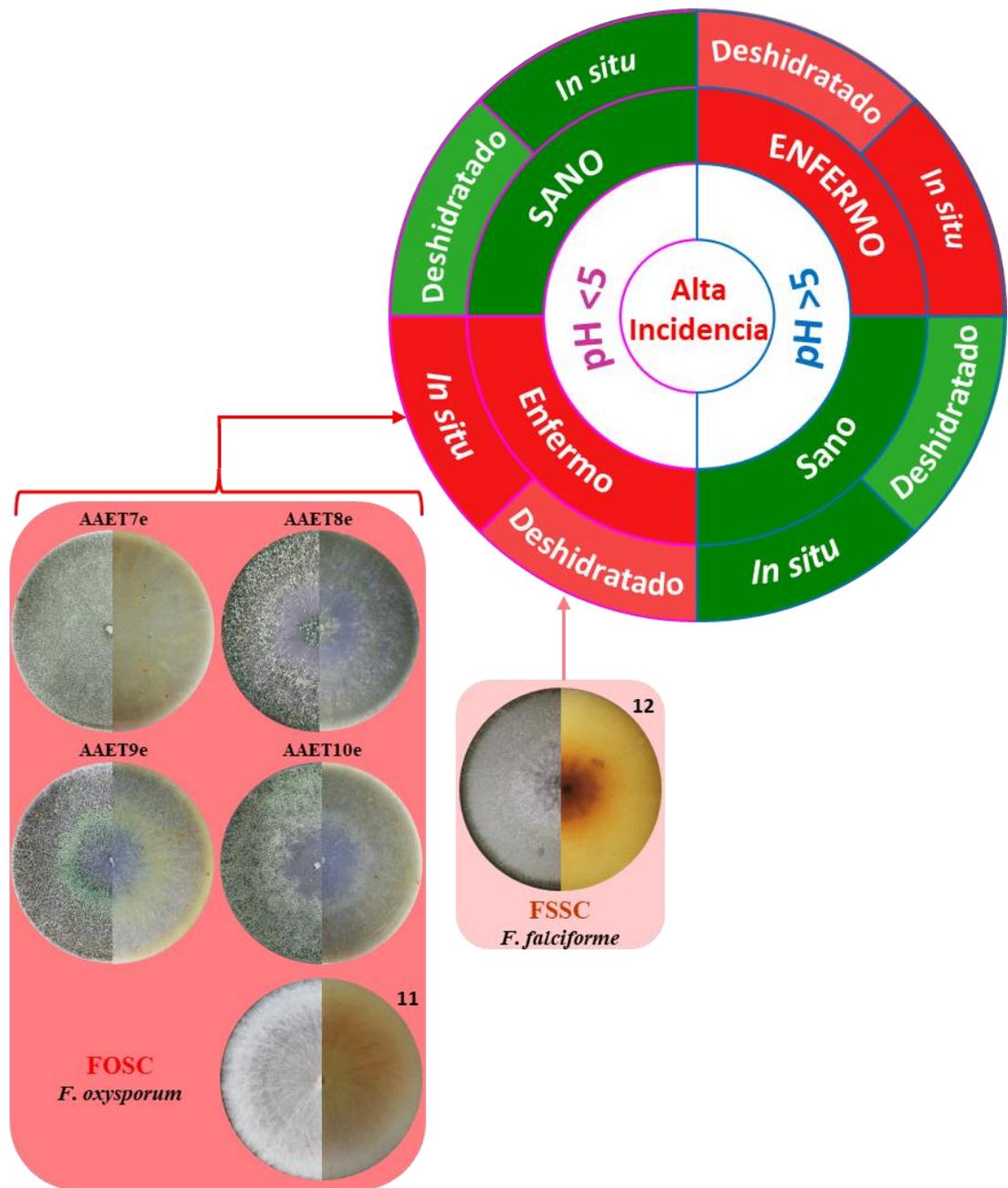


Figura 6.46: Modelo relacional de morfotipos (putativas especies) de *Trichoderma* spp aislados del lavado *In situ*/Deshidratado de suelo adherido a hijuelos de *Agave tequilana*. colectados en predios con Alta incidencia del síndrome de marchitez y pudrición de cogollo (SMAP); con base al diseño experimental planteado. Caracterización cultural (anverso y reverso) en medio de cultivo V8. Foto: 10 días después de la siembra.

La presencia de *Trichoderma* spp. dentro de una muestra de CIE, no es necesariamente excluyente de poblaciones de *Fusarium* spp. En todas las muestras de CIE donde se detectó la presencia de *Trichoderma* spp., las poblaciones de *Fusarium* spp. (No. UFC) no mostraron alteraciones significativas en comparación con las muestras donde no se detectó la presencia del agente de control biológico. Esto podría ser el resultado de la existencia de un ambiente homeostático entre poblaciones de organismos en la piñosfera de los hijuelos. Sin embargo, la perturbación ambiental de la piñosfera, ocasionada por el arranque (extracción de hijuelos del medio edáfico donde se originaron) y la posterior deshidratación, generan una disrupción en las relaciones edáfico-biológicas. Esto favorece algunos géneros/especies de organismos más adaptados a un medio saprofítico y propicia de manera directa o indirecta, la supresión de otros, incluyendo a *Trichoderma* spp.

Esto se ve evidenciado en el incremento poblacional de *Fusarium* spp., la alteración de la especie/complejo más prevalente y la ausencia de *Trichoderma* spp., en muestras de CIE post-deshidratación. Estos efectos contrastantes entre las poblaciones del patógeno y el agente de biocontrol pueden ser el resultado de diversas interacciones complejas entre las características físico-químicas y el ensamble biológico de la piñosfera durante la deshidratación. Sin embargo, es posible que estas tendencias estén correlacionadas, lo que sugiere una posible influencia entre el aumento de población de *Fusarium* spp. y la desaparición de *Trichoderma* spp.

En el predio 3 (pH<5), único predio con presencia del antagonista y categorizado con alta incidencia de SMAP, se contabilizaron 5 UFC de *Trichoderma* spp., lo que resultó en 4 aislamientos con diferencias culturales entre sí. Obtenidos de la muestra de CIE *In situ* de hijuelos de PM Enferma, donde *F. oxysporum* (FOSC) (Figura 6.46; F11) fue la especie más prevalente. Posterior a la deshidratación, *F. falciforme* (FSSC) (Figura 6.46; F12) aumentó su población, hasta constituirse como la especie más prevalente en la muestra respectiva, mientras que *Trichoderma* spp. no mostró crecimiento alguno.

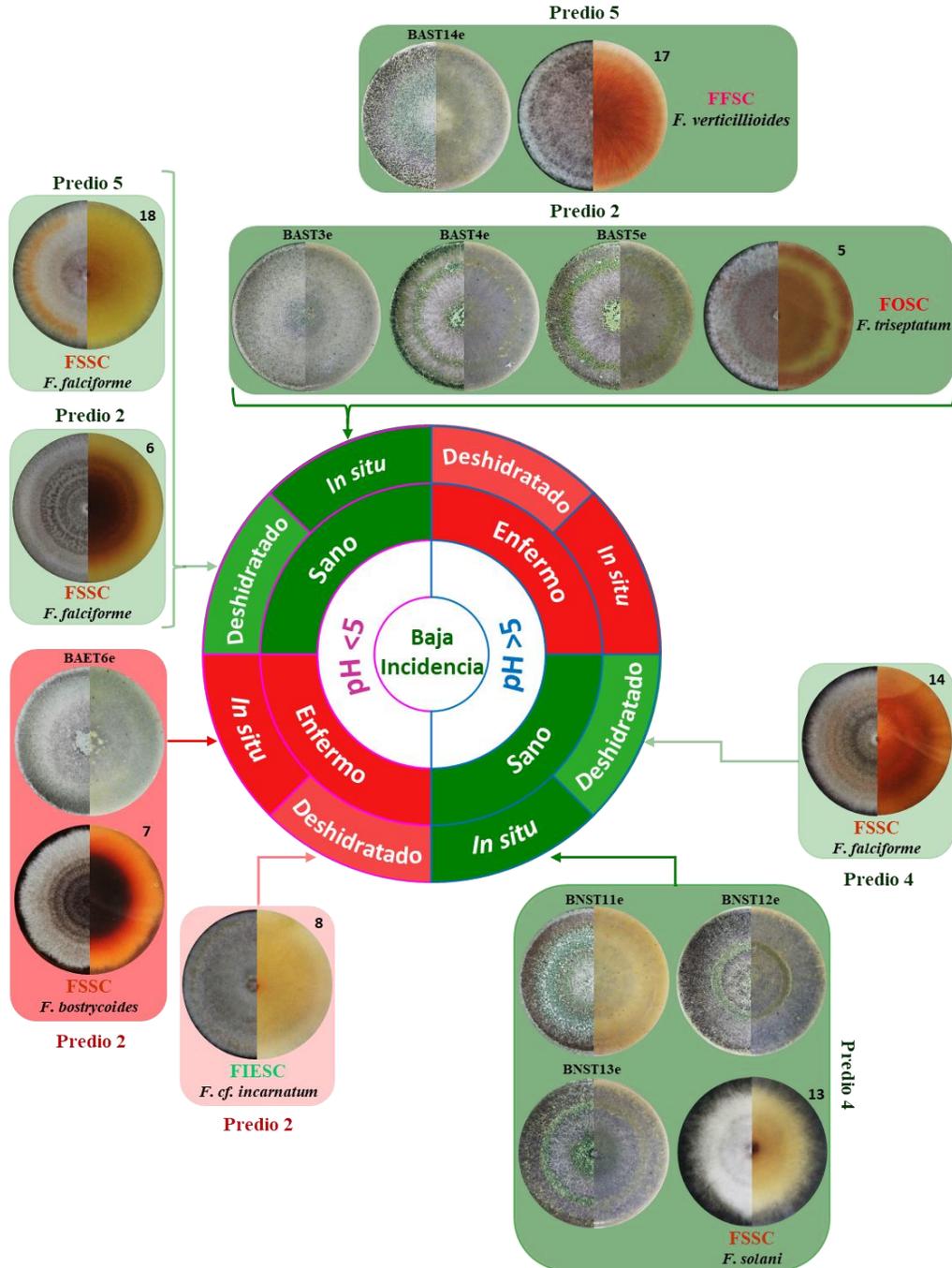


Figura 6.47: Modelo relacional de morfotipos (putativas especies) de *Trichoderma* spp aislados del lavado In situ/Deshidratado de suelo adherido a hijuelos de *Agave tequilana*. colectados en predios con Baja incidencia del síndrome de marchitez y pudrición de cogollo (SMAP); con base al diseño experimental planteado. Caracterización cultural (anverso y reverso) en medio de cultivo V8. Foto: 10 días después de la siembra.

En predios categorizados con baja incidencia de SMAP, se determinó la presencia de *Trichoderma* spp. en 3 de los 4 predios colectados, exclusivamente en muestras *In situ*:

- Dentro de los predios con un pH<5: en el predio 2, se realizaron 4 aislamientos de *Trichoderma* spp.: 3 en muestra de PM Sana, donde *F. triseptatum* (FOSC) (Figura 6.47; F5) fue la especie más prevalente; posterior a la deshidratación, *F. falciforme* (FSSC) (Figura 6.47; F6) se convirtió en la especie más prevalente. El aislamiento restante se realizó de muestra de PM Enferma, donde *F. bostrycoides* (FSSC) fue la especie más prevalente *In situ* (Figura 6.47, F7), sustituida por *F. cf. Incarnatum* (FIESC) posterior a la deshidratación (Figura 6.47, F8).

El predio 5, presento 3 UFC de *Trichoderma* spp., pertenecientes a un único aislamiento, en muestra de PM Sana, donde la especie de *Fusarium* spp. más prevalente fue *F. verticillioides* (FFSC) (Figura 6.47; F17); *F. falciforme* (FSSC) (Figura 6.47; F18), nuevamente se constituyó como la especie más prevalente post-deshidratación

- El predio 4, fue el único de los 4 predios con pH>5, en el que se encontró presencia de *Trichoderma* spp., con 7 UFC contabilizadas, distribuidas en 3 aislamientos con diferencias culturales entre sí; obtenidos de la muestra *In situ* de CIE de hijuelos de PM Sana; donde *F. solani* (FSSC) (Figura 6.47; F13) fue la especie de *Fusarium* spp. más prevalente. Posterior a la deshidratación, nuevamente *F. falciforme* (Figura 6.47; F14) fue la especie más prevalente.

La plasticidad ecológica de *F. falciforme* (FSSC) que le permite aumentar sus poblaciones posterior a la deshidratación (Figura 6.38-39), mostrando una heterogeneidad de características culturales y desplazando a la especie más prevalente en muestras de CIE *In situ*, en 4 de los 5 predios con presencia de *Trichoderma* spp. (Figura 6.46-47; F6, F12, F14, F18), despierta un interés particular en esta especie. Obviando la necesidad de pruebas de confrontación entre los aislamientos de esta especie y los aislamientos de *Trichoderma* spp. para determinar si la desaparición de estos últimos fue causada directa o indirectamente por el incremento poblacional de esta especie. Además de determinar su potencial patogénico mediante pruebas de patogenicidad con tejido de *Agave tequilana*, con el fin de evaluar la necesidad de la aplicación de un tratamiento preventivo para

reducir la carga de inóculo de *Fusarium* spp. en el suelo adherido a hijuelos de *Agave tequilana* sometidos a la deshidratación agrícola. Por otro lado, es pertinente considerar la posibilidad de que el aumento de poblaciones de *Fusarium* spp. adaptadas a un medio saprofítico genere una mayor competencia frente a especies o haplotipos patogénicos, lo que podría ofrecer una alternativa de control biológico.

7.-CONCLUSIONES

- La deshidratación agrícola de hijuelos de *Agave tequilana* calibre Toronja durante 14 días mediante solarización generó una reducción promedio en el diámetro del 10.6% ($\pm 2.6\%$) con respecto a su medición en fresco, resultando en un diámetro promedio post-deshidratación de 11.92 cm (± 0.5). El peso de los hijuelos post-deshidratación presentó una reducción promedio de 31.4% ($\pm 2.6\%$), resultando en un peso promedio de 1,577.43 g (± 295 g) post-deshidratación. No se observaron efectos significativos de los factores experimentales en ambas mediciones. Las hojas adyacentes al cogollo y la base de las hojas basales mostraron los efectos más notables de la deshidratación.
- La deshidratación de hijuelos de *Agave tequilana* durante 14 días no eliminó la presencia de *Fusarium* spp. en tejido interno, obteniendo aislamientos en 21 de los 160 hijuelos recolectados. Ninguno de los factores experimentales fue determinante en la presencia de *Fusarium* spp. en tejido interno. La drástica deshidratación, la eliminación de la parte más externa de la base de las hojas y la tamización del "gabazo" durante el procesamiento del tejido interno contribuyeron a la baja presencia de UFC de *Fusarium* spp.
- Se identificaron tres complejos de especies de *Fusarium* spp. presentes en tejido interno de hijuelos *Agave tequilana* sobrevivientes a la deshidratación. El complejo más prevalente fue FFSC: siendo *F. verticillioides* la especie más prevalente (12/24), seguida de *F. lactis* (3/24), *F. nygamai*, *F. pseudocircinatum* y *F. proliferatum* presentaron únicamente un aislamiento; seguido del complejo FOOSC, representado únicamente por *F. oxysporum* (4/24) y FSSC fue el complejo menos prevalente (2/24), representado por aislamientos únicos de *F. falciforme* y *F. bostrycoides*. No se encontró relación entre la presencia de *Fusarium* spp. en tejido interno de los hijuelos y la sanidad de las plantas madre.
- Primer reporte de las especies *F. nygamai* (FFSC) *F. pseudocircinatum* (FFSC), *F. falciforme* (FSSC) y *F. bostrycoides* (FSSC) asociadas a tejidos internos de hijuelos de *Agave tequilana* calibre toronja y sobrevivientes a la deshidratación de estos.
- Se obtuvieron dos aislamientos de *Trichoderma* spp. en tejido interno de hijuelos de *Agave tequilana*, sometidos a deshidratación agrícola, originados de plantas madre

sanas. Abriendo la puerta a investigaciones futuras sobre el potencial de *Trichoderma* spp. endófito para el manejo integrado del SMAP.

- En predios de alta incidencia de SMAP, la sanidad de la Planta Madre (PM) fue el factor experimental determinante en la carga de inóculo de *Fusarium* spp. en la piñosfera de los hijuelos (CIE), hijuelo originados de PM enferma presentaron una mayor carga de inóculo en comparación con aquellos originados de PM sana. No se encontró un efecto significativo del momento de toma de muestra de la CIE.
- En predios con baja incidencia de SMAP, se observó una diferencia significativa en la carga de inóculo de *Fusarium* spp. en la interacción del momento de toma de muestra y el pH del suelo. Las muestras de PM enferma presentaron el mayor incremento la carga de inóculo de *Fusarium* spp. post-deshidratación.
- En muestras de CIE de predios con un $\text{pH} > 5$, se observó una prevalencia dominante del complejo FSSC representado por *F. falciforme* y *F. solani* como las especies más prevalentes tanto en muestras *In situ* como post-deshidratación. El complejo FFSC fue representado por las especies *F. verticillioides* y *F. proliferatum*, con una prevalencia diversa en momento de toma de muestra y sanidad de Planta Madre.
- En contraste, en predios con $\text{pH} < 5$, nuevamente el complejo FSSC predominó, con *F. falciforme* siendo altamente prevalente. Sin embargo, se observó una mayor diversidad de especies y complejos, con la presencia de FFSC, FOOSC, y FIESC, que incluyen especies como *F. proliferatum*, *F. thapsinum*, *F. triseptatum*, *F. oxysporum* y *F. cf. Incarnatum*. Las muestras de PM Sana mostraron una mayor dinámica en la prevalencia de especies, con cambios significativos post-deshidratación, especialmente en predios de baja incidencia de SMAP. En contraste, las muestras de PM Enferma exhibieron una estabilidad relativa en la composición de especies, aunque también se observaron cambios en algunos predios.
- Primer reporte de las especies: *F. thapsinum* (FFSC), *F. triseptatum* (FOOSC) y *F. bostrycooides* (FSSC) asociados a la piñosfera de hijuelos de *Agave tequilana*
- La presencia *Trichoderma* spp. en muestras de CIE, exhibe una tendencia a presentar una mayor prevalencia en $\text{pH} < 5$ y una diferencia significativa entre predios con alta y baja incidencia de SMAP. En predios con alta incidencia de SMAP, se observó una presencia limitada de *Trichoderma* spp., exclusivamente de muestras *In situ* de

hijuelos de PM enferma. En contraste, en predios con baja incidencia de SMAP, se obtuvieron un mayor número de aislamientos de *Trichoderma* spp., exclusivamente de muestras *In situ* de hijuelos originados en principalmente de PM sanas, lo que sugiere una asociación entre la sanidad de la planta madre y la presencia de *Trichoderma* spp. en la piñosfera de los hijuelos, como resultado de un entorno rizosferico balanceado.

- La presencia de *Trichoderma* spp. en muestras de CIE no excluye necesariamente la presencia de *Fusarium* spp. Las poblaciones de *Fusarium* spp. no mostraron cambios significativos en presencia de *Trichoderma* spp., sugiriendo una posible coexistencia en la piñosfera de los hijuelos.
- Es importante destacar que no se observó la presencia de *Trichoderma* spp. en las muestras deshidratadas, lo que podría indicar una susceptibilidad de este antagonista a la deshidratación o una supresión por parte de otros organismos más adaptados al medio saprofitico. Estos hallazgos resaltan la importancia de considerar los efectos en la dinámica poblacional *Trichoderma* spp. de las prácticas culturales en el *Agave tequilana*, para mantener la salud del suelo y prevenir la proliferación de patógenos.

8.- BIBLIOGRAFIA

- Adame-García, Jacel, Rodríguez-Guerra, Raúl, Iglesias-Andreu, Lourdes Georgina, Ramos-Prado, José María, y Luna-Rodríguez, Mauricio. 2015. Molecular identification and pathogenic variation of *Fusarium* species isolated from *Vanilla planifolia* in Papantla Mexico. *Botanical Sciences*, 93(3), 669-678. <https://doi.org/10.17129/botsci.142>
- Aguilar, B. Z. G., y Murrieta, P. F. O. 2022. Caracterización morfológica y molecular de aislados de *Fusarium* en suelos y plantas de Garbanzo del noroeste de México. In *Simposio Nacional De Garbanzo* (p. 22).
- Aguirre, R.J., Charcas, S. y Flores, J. L. 2001. El maguey mezcalero potosino. Universidad Autónoma de San Luis Potosí, S.L.P, México. 87 p.
- Ahmad, JS y Baker, R. 1987. Competencia de la rizosfera de *Trichoderma harzianum*. *Fitopatología*, 77 (2): 182-189. <https://doi:10.1094/Phyto-77-182>
- Altinok, H. H. 2013. *Fusarium* species isolated from common weeds in eggplant fields and symptomless hosts of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae* in Turkey. *Journal of phytopathology* 161(5): 335-340. <https://doi.org/10.1111/jph.12074>
- Apodaca-Sánchez, M.A., Zavaleta-Mejía, E., GarcíaEspinoza, R., Osada-Kawasoe, S. y Valenzuela-Ureta, J.G. 2002. Frecuencia de campos infestados con *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* en Sinaloa, México, y su control. *Revista Mexicana de Fitopatología* 20:1-7.
- Avasthi S., Gautam A. K. and Bhaduarua, R. 2018. Isolation and characterization of *Fusarium* species causing leaf spot and root rot diseases on *Aloe vera*. *Journal on New Biological Reports* 7(1): 1-9. <https://doi.org/10.24425/119125>
- Ávila-Miranda M. E., López-Zazueta J. G., Arias-Castro C., Rodríguez-Mendiola M. A., Guzmán-de Peña D. A., Vera-Núñez J. A. and Peña-Cabriaes J. J. 2010. Vascular wilt caused by *Fusarium oxysporum* in agave (*Agave tequilana* Weber var. azul). *Journal of the Professional Association for Cactus Development* 12: 166-180.
- Aviña-Padilla K, Virgen-Galleros G, Ochoa-Sánchez J, Gómez-Leyva J, Martínez-Leal J y Martínez-Soriano R. 2008. El mal llamado SIDA del agave tequilero. *Clatidades Agropecuarias*. 175: 27-33.

- Ayala-Armenta Q. A., López-Valenzuela B.E., Valenzuela-Escoboza F.A., Ruelas-Islas J. R., Pérez-Mora J. L. 2022. Susceptibilidad de cultivares de tomatillo (*Physalis ixocarpa* Brot.) a la marchitez por *Neocosmospora falciformis* y *Fusarium nygamai* en Sinaloa. *Investigación en Ciencias Agrícolas*, 537.
- Ayala-Armenta Q. A. 2020. Hongos con origen en el suelo asociados a la marchitez en tomatillo (*Physalis ixocarpa* Brot.) en Sinaloa. Doctorado en Ciencias Agropecuarias (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Sinaloa) 154p.
- Baetsen-Young, A., Wai, C. M., VanBuren, R., and Day, B. 2020. *Fusarium virguliforme* Transcriptional Plasticity Is Revealed by Host Colonization of Corn vs. Soybean. *The Plant Cell*, 32(2), 336-351.
- Barbosa, R. N., Bezerra, J. D. P., Souza-Motta, C. M., y Lima, D. M. M. 2009. Conservación de hongos filamentosos en glicerol al 20%. *Revista de Biología Tropical*, 57(2): 441-449.
- Baiyee, B., et al. 2019. *Trichoderma* as a biological control agent: mechanisms of action and applications in agriculture. *Biological Control Journal*.
- Bermudez C. I. 2014. Herramientas biotecnológicas para el combate de la raza 4 tropical de *Fusarium oxysporum* f. sp. cúbense en *Musa* spp. *Biotecnología vegetal* 14(4): 195-202
- Brady, N., and Weil, R. 2017. *The nature and properties of soils*. Boston, USA.: Pearson
- Camero-Ayón, C.B., Rios-Velasco, C., Luna-Esquivel, G., López-Guzmán, G.G., Estrada-Virgen, M.O., Camero-Campos, O.J. 2023. In vitro suppression of fungal root pathogens in *Annona muricata* L. by *Trichoderma* strains and conventional fungicides. *Revista Bio Ciencias*, 10, e1497. <https://doi.org/10.15741/revbio.10.e1497>
- Castañedas-Vázquez, H. 2002. Aislamiento e identificación de microorganismos responsables de la marchitez del agave tequilero. pp. 21-24. In FloresLópez, H.E. (ed). *Análisis agroecológico del Agave tequilana* Weber var. Azul con énfasis en problemas en problemas fitosanitarios en Jalisco, INIFAPCIRPAC. C.E. Altos de Jalisco, Publicación especial No. 1. Tepatitlán, Jalisco, México.

- Chen, Y., Feng, H., Jiao, Y., and Sun, H. 2013. Soil pH and *Fusarium oxysporum*: How acidity and alkalinity impact growth and disease. *Plant Pathology Journal*, 29(3), 209-216. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.03.2013.0024>
- Chen, X. H., Koumoutsi, A., Scholz, R., Borriss, R., and Groß, J. 2018. Vaterite formation induced by *Pseudomonas fluorescens* strain 69/2 and *Bacillus subtilis* strain GB03 through different bacterial surface compounds. *Scientific reports*, 8(1): 1-10.
- Chet, I. 1987. *Trichoderma*-Application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soilborne pathogenic fungi. pp: 137-160 in: *Innovative Approaches to Plant Disease Control*. I. Chet, ed. John Wiley & Sons, New York.
- Consejo Regulador del Tequila A.C (CRT). 2005. Enfermedades bióticas. Ed. Comité Técnico Agronómico. En: plagas y enfermedades del *Agave tequilana* Weber var. azul. Jalisco, México. pp: 91-100.
- Consejo Regulador del Tequila, CRT. 2010. Actualización de la base de datos y diagnóstico fitosanitario: *Agave tequilana* Weber var. azul. Comité Técnico Agronómico. Subcomité de Fitosanidad.
- Cook, J. and Baker, K. 1983. *The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens*. American Phytopathological Society, St. Paul.
- Cuevas F. y Domínguez X. 2007. Evaluación in vitro de *Trichoderma* spp. encontrados en la región de Tequila, Jalisco contra *Fusarium* spp. Tesis profesional. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo.
- Delgado-Ortiz, J. C., Ochoa-Fuentes, Y. M., Cerna-Chávez, E., Beltrán-Beache, M., Rodríguez-Guerra, R., Aguirre-Urbe, L. A., y Vázquez-Martínez, O. 2016. Patogenicidad de especies de *Fusarium* asociadas a la pudrición basal del ajo en el centro norte de México. *Revista argentina de microbiología*, 48(3), 222-228.
- Delgado-Sánchez, P., González-Morales, S., González-Márquez, H., y Peña-Ramírez, Y. J. 2012. *Bacillus* spp. inoculation improves photosystem II efficiency and enhances photosynthesis in *Agave tequilana* Weber var. Azul. *Journal of Plant Physiology*, 169p

- Di-Prieto A, Madrid MP, Caracuel Z, Delgado-Jarana J y Roncero MG. 2003. *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. *Molecular Plant Pathology*. 4(5): 315-325.6
- Díaz-Nájera, J. F., Ayvar-Serna, S., Mena-Bahena, A., Baranda-Cruz, E., Vargas-Hernández, M., Alvarado-Gómez, O. G., y Fuentes-Aragón, D. 2021. First report of *Fusarium falciforme* (FSSC 3+ 4) causing wilt disease of *Phaseolus vulgaris* in Mexico. *Plant Disease*, 105(3), 710-710. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-20-1160-PDN>
- Dobbs JT, Kim M-S, Reynolds GJ, Wilhelmi N, Dumroese RK, Klopfenstein NB, Fraedrich SW, Cram MM, Bronson J and Stewart JE. 2023. Fusarioid community diversity associated with conifer seedlings in forest nurseries across the contiguous USA. *Front. Plant Sci*. 14:1104675. doi: 10.3389/fpls.2023.1104675
- Douriet-Angulo, A., López-Orona, C. A., López-Urquídez, G. A., Vega-Gutiérrez, T. A., Tirado-Ramírez, M. A., Estrada-Acosta, M. D., ... y Yáñez-Juárez, M. G. 2019. Maize stalk rot caused by *Fusarium falciforme* (FSSC 3+ 4) in Mexico. *Plant disease*, 103(11), 2951.
- Elos, M. M., González, L. M., Flores, F. G., García, B. M. S., Rivera, S. G., Vázquez, F. P. G., ... y Enciso, M. C. 2005. Especies de *Fusarium* presentes en raíces de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) con daños de pudrición, en cinco estados del centro de México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 23(1), 1-7.
- Estrada S. G. I. y Ramírez G. M. C. 2019. *Micología general*. Universidad Católica de Manizales, Colombia 345p
- FAO. 1994. ECOCROP 1. The adaptability level of the FAO crop environmental requirements database. Versión 1.0. AGLS. FAO. Rome, Italy.
- Figueroa-Montero, A., Gutiérrez-Méndez, N., Castañeda-Ramírez, J. C., Rodríguez-Herrera, R., y Jiménez-Islas, H. 2018. Caracterización química y microbiológica de hijuelos de *Agave tequilana* Weber var. Azul deshidratados al sol y al horno. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 9(3): 571-584

- Flores LHE, Ireta MJ, Ruíz CJA. 2010. Tecnología para la prevención y/o control de la marchitez del agave tequilero en Jalisco. Folleto técnico núm. 2 Campo Experimental Centro Altos de Jalisco. México. 36 pp.
- Fravel, D. R., Olivain, C., Alabouvette, C., and Tronsmo, A. 2012. The potential of biological control of soilborne and foliar diseases with *Trichoderma*. In F. Kempken (Ed.), Fungal Genomics. 229-241.
- Fravel, D. R., Olivain, C., and Alabouvette, C. 2012. *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. New Phytologist, 157(3), 493-502.
- Freeman, S., Otero-Colina, G., Rodríguez-Alvarado, G., Fernández-Pavía, S., Maymon, M., Ploetz, R. C., y O'Donnell, K. 2014. First report of mango malformation disease caused by *Fusarium pseudocircinatum* in Mexico. Plant Disease, 98(11), 1583-1583.
- Fuckikovsky, L. Z. 2000. La tristeza y muerte del *Agave tequilana* Weber var. Azul (TMA) y los microorganismos e insectos importantes relacionados. pp. 90. In Memorias del XXVII Congreso Nacional de Fitopatología. Puerto Vallarta, Jalisco, México. Del 9 al 13 de julio del 2000.
- García-Ávila, Clemente de Jesús, Valenzuela-Tirado, Gilda Abigail, Florencio-Anastasio, José Guadalupe, Ruiz-Galván, Isabel, Moreno-Velázquez, Magnolia, Hernández-Macías, Bárbara, López-Buenfil, José Abel, Bravo-Pérez, Daniel, Pineda-Ríos, José Manuel, Quezada-Salinas, Andrés, y Ávila-Quezada, Graciela. 2018. Organismos asociados a daños en tubérculos de papa en postcosecha. Revista mexicana de fitopatología, 36(2), 308-320. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1801-1>
- Gatch, E. W., and du Toit, L. J. 2017. The influence of soil pH on the incidence and severity of *Fusarium* wilt in spinach. Plant Disease, 101(10), 1817-1824. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-17-0524-RE>
- Geiser, D. M., Jiménez, M., Kang, S., Makalowska, I., Veeraraghavan, N., Ward, T. J. 2004. DNA sequence database for identifying *Fusarium*. European Journal of Plant Pathology 110: 473-479.
- Gil, V., Nava, A. 2005. AFLP analysis of *Agave tequilana* varieties. Plant science. 170:904-909.

- González, A. M. R., Vázquez, C. E. G., y Téllez, J. R. G. 2006. Métodos para la conservación de hongos. *Revista Mexicana de Micología*, 22, 21-29.
- Gonzalez-Soto, Tania, Troncos-Rojas, Rosalba, Gonzalez-Mendoza, Daniel, y Mendez-Trujillo, Vianey. 2022. Patogenicidad de las cepas nativas de *Fusarium solani* en plantas de algodón transgénico en Baja California, México. *Revista especializada en ciencias químico-biológicas*. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2022.420>
- Haware, M. P., Nene, Y. L. y Natarajan, M. 1995. The survival of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* in the soil in the absence of chickpea. *Phytopathologia Mediterranea* 9-12 p.
- Hennessy, C., Walduck, G., Daly, A. and Padovan, A. 2005. Weed hosts of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 in northern Australia. *Australasian Plant Pathology* 34(1):115-117. <https://doi.org/10.1071/AP04091>
- Hodgson, S., Copping, L. G., Hywel-Jones, N. L., Arnold, N. T., and Rutledge, P. J. 1994. Endophytic fungi in roots and leaves of sugar beet. *Mycological Research*, 98(6): 645-648.
- Hofgaard, S., Heidi U., Riley, H., Razzaghian V., Dill-Macky R. 2009. Inoculum potential of *Fusarium* spp. relates to tillage and straw management in norwegian fields of spring oats. *Front Microbiol* 7: 556p.
- Huisman, O. C. 1982. Interactions of root growth dynamics to epidemiology of root-invading fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 20: 303-327. <https://10.1146/annurev.py.20.090182.001511>
- Jayaraman, S., Naorem, A., Lal, R., Dalal, R., Sinha, N., Patra, A., and Chaudhari, S. 2021. Disease-Suppressive Soils-Beyond Food Production: a Critical Review. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, (21), 1437–1465. Recuperado de <https://link.springer.com/article/10.1007/s42729-021-00451-x>
- Kloepper, J. W., Ryu, C. M., and Zhang, S. 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology*, 94(11): 1259-1266.
- Leyva-Madriral, K.Y., Larralde-Corona, C.P., Apodaca-Sánchez, M.A., Quiroz-Figueroa, F.R., Mexia-Bolaños, P.A., Portillo-Valenzuela, S., Ordaz-Ochoa, J. and Maldonado-Mendoza, I.E. 2015, *Fusarium* Species from the *Fusarium fujikuroi* Species Complex

- Involved in Mixed Infections of Maize in Northern Sinaloa, Mexico. *J Phytopathol*, 163: 486-497. <https://doi.org/10.1111/jph.12346>
- Leyva-Mir, S. G., Vega-Portillo, H. E., Villaseñor-Mir, H. E., Tlapal-Bolaños, B., Vargas-Hernández, M., Camacho-Tapia, M., y Tovar-Pedraza, J. M. 2017. Caracterización de especies de *Fusarium* causantes de pudrición de raíz del trigo en el bajío, México. *Chilean journal of agricultural & animal sciences*, 33(2), 142-151. <https://dx.doi.org/10.4067/S0719-38902017005000404>
- Leslie, J. F. y Summerell, B. A. 2006. *The Fusarium laboratory manual* (Vol. 2, No. 10). Ames, IA, USA: Blackwell Pub.388pp.
- Li, B., Li, G., Kronzucker, H. J., Baluska, F., and Shi, W. 2016. Effect of dehydration on the biological control efficacy of *Trichoderma asperellum* against *Fusarium* wilt of cucumber. *Biological Control*, 100: 9-15.
- Liew, E. C. Y., Laurence, M. H., Pearce, C. A., Shivas, R. G., Johnson, G. I., Tan, Y. P., Edwards, J., Perry, S., Cooke, A. W. and Summerell, B. A. 2016. Review of *Fusarium* species in association with mango malformation in Australia. *Australasian Plant Pathology* 45:547-559. <https://doi.org/10.1007/s13313-016-0454-z>
- Lindsay DL, y Baker R. 1967 Effect of certain fungi on dwarf tomatoes grown under gnotobiotic conditions. *Phytopathology* 57: 1262-63.
- Linton, M. J. and Nobel, P. S. 2001. Hydraulic conductivity, xylem cavitation, and water potential for succulent leaves of *Agave deserti* and *Agave tequilana*. *International Journal of Plant Sciences*, 162 (4), 747-754. DOI: 10.1086/320782.
- López-Bautista V. 2020. Identificación y regionalidad de especies de *Fusarium* asociadas a marchitez y pudrición seca del cogollo en *Agave tequilana* Weber var. Azul. Tesis de maestría. Posgrado Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Postgraduados. 120p.
- López-Bautista V., Mora-Aguilera G., Gutiérrez-Espinosa M.A., Mendoza-Ramos C. Martínez-Bustamante V.I., Coria-Contreras J. J., Acevedo-Sánchez G., Santana-Peñaloza B. 2019. Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp. Associated to the regional occurrence of wilt and dry bud rot in *Agave tequilana*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 38(S):79-106. <https://rmf.smf.org.mx/Vol3812020/V3812020.pdf>

- López-Cortés, A., Martínez-González, J. C., y Acosta-González, A. 2015. Bacterias lácticas: Características generales, importancia y aplicaciones. *Revista Científica, FCV-LUZ*, 25(6): 605-616.
- Lorito, M., Woo, S. L., Harman, G. E. and Monte, E. 2010. Translational research on *Trichoderma*: from ´omics to the field. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48: 395-417
- Luna-Hernández, G. 1996. Pudrición del tallo de *Agave tequilana* L. Weber en el Estado de Jalisco, México. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. 58 p
- M. N., Rodríguez R. R. y Virgen C. G. 1998. Proyecto: Epidemiología y manejo integrado de problemas fitosanitarios en *Agave tequilana* Weber var. Azul. *Revista Mexicana de Fitopatología* 16: 116.
- Ma, L. J., Geiser, D. M., Proctor, R. H., Rooney, A. P., O'Donnell, K., Trail, F., Gardiner, D. M., Manners, J. M. and Kazan K. 2013. *Fusarium* Pathogenomics. *Annual Review of Microbiology* 67:399-416. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155650>
- Ma, L. J., van der Does, H. C., Borkovich, K. A., Coleman, J. J., Daboussi, M. J., Di Pietro, A., Dufresne, M., Freitag, M., Grabherr, M., Henrissat, B., Houterman, P. M., Kang, S., Shim, W. B., Woloshuk, C., Xie, X., Xu, J. R., Antoniw, J., Baker, S. E., Bluhm, B. H., Breakspear, A., Brown, D. W., Butchko, R. A., Chapman, S., Coulson, R., Coutinho, P. M., Danchin, E. G., Diener, A., Gale, L. R., Gardiner, D. M., Goff, S., Hammond-Kosack, K. E., Hilburn, K., Hua-Van, A., Jonkers, W., Kazan, K., Kodira, C. D., Koehrsen, M., Kumar, L., Lee, Y. H., Li, L., Manners, J. M., Miranda-Saavedra, D., Mukherjee, M., Park, G., Park, J., Park, S. Y., Proctor, R. H., Regev, A., Ruiz-Roldán, M. C., Sain, D., Sakthikumar, S., Sykes, S., Schwartz, D. C., Turgeon, B. G., Wapinski, I., Yoder, O., Young, S., Zeng, Q., Zhou, S., Galagan, J., Cuomo, C. A., Kistler, H. C., and Rep, M. 2013. Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. *Phytopathology*, 103(5): 1-12
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H. and Stahl, D. A. 2015. *Brock Biology of Microorganisms*. Pearson Education.
- Mariscal-Amaro, Luis A., Rivera-Yerena, Alfredo, Dávalos-González, Pedro A., y Ávila-Martínez, Daniel. 2017. Situación actual de hongos asociados a la Secadera de la Fresa (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) en Guanajuato, México. *Agrociencia*, 51(6), 673-681.

- Martínez-Fernández, Edgar, Martínez-Jaimes, Patricia, Guillén Sánchez, Dagoberto, Peña-Chora, Guadalupe, & Hernández-Hernández, Víctor Manuel. 2015. Diversidad de *Fusarium* en las raíces de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) en el estado de Morelos, México. *Revista mexicana de micología*, 42, 33-43.
- Martínez, M. A., Roldán, A., and Pascual, J. A. 2011. Interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and *Trichoderma harzianum* under conventional and low input fertilization field condition in melon crops: growth response and *Fusarium* wilt biocontrol. *Applied Soil Ecology*, 47(2): 98-105.
- Matiz, A., Miotto, P. T., Mayorga, A. Y., Freschi, L. and Mercier, H. 2013. CAM photosynthesis in bromelias and Agaves: What can we learn from these plants? En Z. Dubinsky (Ed.), *Photosynthesis*. Croacia: Intech. DOI: 10.5772/56219.
- McKenney, C. L., and McLaughlin, J. R. 1997. Agave: A review of biology and uses. *HortScience*, 32(6): 1016-1022.
- Mendoza-Ramos, C., Mora-Aguilera, G., Coria-Contreras, J. J., Santana-Peñaloza, B., Acevedo-Sánchez, G., Martínez-Bustamante, V., ... y Rubio-Cortés, R. 2021. *Fusarium* spp. y estimación de carga de inóculo asociados a hijuelos de Agave tequilana en diferentes niveles de inductividad epidémica regional. *Revista mexicana de fitopatología*, 39(1): 94-121.
- Molina-Cárdenas, L., López-Urquidez, G. A., Román-Román, L., Vega-Gutiérrez, T. A., Tirado-Ramírez, M. A., Leyva-Hernández, H. A., y López-Orona, C. A. 2023. First report of mango malformation disease caused by *Fusarium proliferatum* in Mexico. *Plant Disease*, 107(2), 581. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-22-1213-PDN>
- Montiel-González, L., González-Flores, F., Sánchez-García, B.M., Guzmán-Rivera, S., Gámez-Vázquez, F.P., AcostaGallegos, J.A., Rodríguez-Guerra, R., Simpson-Williamson, J., Cabral-Enciso, M. y Mendoza-Elos, M. 2005. Especies de *Fusarium* presentes en raíces de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) con daños de pudrición, en cinco estados del centro de México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23:1-10.
- Mora, N. G. R., Soto, E. U. C., Peñuelas-Rubio, O., y López, A. M. F. 2022. Capítulo X Caracterización morfológica y perfil patogénico de aislados fúngicos provenientes de la rizósfera de sandía (*Citrullus lanatus* Thunb.) en el sur de Sonora.

- Mousa, W. and Raizada, M. 2016. Natural Disease Control in Cereal Grains. Reference Module in Food Science. Elsevier. DOI:10.1016/B978-0-08-100596-5.00206-7
- Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A., Herrera-Estrella, A., Schmoll, M., Kenerley, C. M., and Singh, U. S. 2013. *Trichoderma* research in the genome era. Annual review of phytopathology, 51, 105-129.
- Nash, S.M. y Snyder, W.C.1965. Quantitative and qualitative comparasions of *Fusarium* populations in cultivated fields and noncultivated parent soils. 939-945 p.
- Navarrete-Maya, R., y Acosta-Gallegos, J. 1999. Reacción de variedades de frijol común a *Fusarium* spp. y *Rhizoctonia solani* en el altiplano de México. Agronomía Mesoamericana, 37-46.
- Navas-Cortés, J. A., B. B., Méndez-Rodríguez, M. A., and Jiménez-Díaz, R. M. 2007. Quantitative modeling of the Effects of Temperature and Inoculum Density of *Fusarium oxysporum* f. sp. Ciceris Races 0 and 5 on development of *Fusarium* Wilt in Chickpea Cultivars. Phytopathology. 97:564-573
- Nelson, E. B. 1991. Exudate molecules initiating fungal responses to seed and roots. In D. L. Keister, and P.B. Cregan (Eds.) The rhizosphere and plant growth. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 197–209.
- Niazi, A., Manzoor, S., Asari, S., Bejai, S., Meijer, J., and Bongcam-Rudloff, E. 2014. Biological control of *Fusarium culmorum* in wheat by antagonistic *Bacillus subtilis*, an endophyte of Chickpea (*Cicer arietinum* L.). Journal of Plant Pathology & Microbiology, 5(3):1-10.
- Ninos, T.F., Veloso, J.S., da Silva, M.A. *et al.* Occurence of *Fusarium bostrycoides* as cause of wilt on yellow passion fruit plants in Brazil. J Plant Pathol 103, 1361–1362 (2021). <https://doi.org/10.1007/s42161-021-00928-9>
- Nobel, P. S., and Valenzuela, A. G. 1987. Environmental responses and productivity of the CAM plant, *Agave tequilana*. Agric. For. Meteorol. 39:319–334
- Nobel, P. S. 2003. Environmental biology of Agaves and cacti. Nueva York, EE.UU.: Cambridge University Press.

- Nobel P.S. 2011. Sabiduría del desierto, agaves y cactus: CO₂, agua, cambio climático. 2a ed. Biblioteca Básica de Agricultura, Texcoco.
- O'Donnell, K., y Cigelnik, E. 2012. *Fusarium: Genomics, Molecular and Cellular Biology*. Horizon Scientific Press.
- O'Donnell y Todd J. Ward y Vincent A. R. G. Robert y Pedro W. Crous y David M. Geiser y Seogchan Kang. 2015. DNA sequence-based identification of *Fusarium*, current status and future directions. *Phytoparasitica* 43:583-595.
- O'Donnell K, Sutton DA, Wiederhold N, Robert VARG, Crous PW, Geiser DM. 2016. Veterinary *Fusarioses* within the United States. *J Clin Microbiol* 54: <https://doi.org/10.1128/jcm.01607-16>
- OIRSA-SAGARPA-SENASICA. 2015. Plan de acción de América latina y el Caribe para la prevención y preparación contra el mal de Panamá (*Fusarium oxysporum* f. sp. cubense) Raza 4 tropical. Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, Tecámac, Edo. México. 69p.
- Okungbowa, F. I., and Shittu, H. O. 2012. *Fusarium* wilts: An overview. *Environ. Res. J*, 6(2): 83-102.
- Pimienta-Barrios, E., Robles-Murguía, C. and Nobel, P. S. 2001. Net CO₂ uptake for Agave tequilana in a warm and a temperate environment. *Biotropica*, 33 (2), 312-318. DOI: 10.1111/j.1744-7429.2001.tb00181.x.
- Pires-Cunha, M. A., Souza-Motta, C. M., Lima, A. O. S., y Santiago, I. F. 2015. Sílica gel como agente desecante en la conservación de cepas fúngicas. *Revista Brasileira de Biociências*, 13(4): 247-251
- Plazola, R. A. G., Pauza, R. G., Espinosa, R. G., y Reyes, F. G. 2004. Distribución espacial de la pudrición radical del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) por *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. f. sp. *phaseoli* (Burk.) Snyd. y Hans. en la Vega de Metztlán, Hidalgo, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 22(2), 246-258.
- Ploetz, R. C. 1990. *Fusarium* Wilt of Banana. APS Press, St. Paul, Minnesota 12:15-21.
- Quilambaqui-Jara, M., Zavaleta-Mejía, E., Mora-Aguilera, G., Delgadillo-Sánchez, F., y Marín-Jarillo, A. 2004. Patogenicidad de tres especies de *Fusarium* asociadas con el

- declinamiento del espárrago (*Asparagus officinalis* L.) en Guanajuato, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22:30-36.
- Ramírez-Ramírez M. J., Mancilla-Margalli N. A., Meza-Álvarez L., Turincio-Tadeo R., Guzmán-de Peña D. and Ávila-Miranda M. E. 2017. Epidemiology of *Fusarium* agave wilt in *Agave tequilana* Weber var. azul. *Plant Protection Science* 53:144-152. <https://doi.org/10.17221/142/2016-PPS>
- Ramírez-Tobías, H. M., Peña-Valdivia, C. B., and Aguirre, J. R. 2014. Respuestas bioquímico-fisiológicas de especies de agave a la restricción de humedad. *Bot. Sci.* 92:131–139. DOI: 10.17129/botsci.156.
- Rangel-Castillo, A., Valadez-Moctezuma, E., y Lozoya Saldaña H. 2017. Caracterización molecular y patogénesis de *Fusarium* asociado al amarillamiento del trigo. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 40(4), 439–450. <https://doi.org/10.35196/>
- Rentería-Martínez, María Eugenia, Guerra-Camacho, Miguel Ángel, Ochoa-Meza, Andrés, Moreno-Salazar, Sergio Francisco, Varela-Romero, Alejandro, Gutiérrez-Millán, Luis Enrique, y Meza-Moller, Amparo del Carmen. 2018. Análisis filogenético multilocus del complejo fúngico asociado a pudrición radicular de sandía en Sonora, México. *Revista mexicana de fitopatología*, 36(2), 233-255. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1710-1>
- Reyes-Cárdenas, M. A., García-Orduña, F., y Hernández-Lauzardo, A. N. 2018. Efecto de la luz sobre la pigmentación y el crecimiento de cepas de hongos filamentosos. *Revista mexicana de micología*, 46: 33-41.
- Robles-Yerena, L., Leyva-Mir, S. G., Cruz-Gómez, A., Camacho-Tapia, M., Nieto-Ángel, D. y Tovar-Pedraza, J. M. 2016. *Fusarium oxysporum* Schltdl. y *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. causantes de la marchitez de plántulas de *Pinus* spp. en vivero. *Revista mexicana de ciencias forestales*, 7(36), 25-36.
- Rodríguez-Gálvez, E. and Mendgen, K. 1995. The infection process of *Fusarium oxysporum* in cotton root tips. *Protoplasma* 189: 61–72.
- Rodriguez-Guzmán MP. 2001. Biodiversidad de los hongos fitopatógenos. *Acta Zoológica Mexicana* 1: 53- 78.

- Rodríguez-Molina, M.C. 2003. Vascular colonisation patterns in susceptible and resistant tomato cultivars inoculated with *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* races 0 and 1. *Plant Pathology* 52: 199–203.
- Romero-Cortés, Teresa, Victor H. Pérez España, José A. Pescador-Rojas, Eduardo Rangel-Cortés, María M. Armendáriz-Ontiveros, and Jaime A. Cuervo-Parra. 2024. "Primer informe de la enfermedad de la mancha foliar ("Negrilla") en plantas de *Agave salmiana* Otto Ex Salm-Dyck (ssp. *salmiana*) causada por *Bipolaris zea* Zivan en México" *Agronomía* 14, no. 3: 623. <https://doi.org/10.3390/agronomy14030623>
- Rosenberg, E., DeLong, E. F., Lory, S., Stackebrandt, E., and Thompson, F. (Eds.). 2016. *The prokaryotes: Firmicutes and Tenericutes* (Vol. 4). Springer.
- Rubio, C. R. 2007. Enfermedades del cultivo de agave. *In*: Rulfo V. (ed.) *Conocimiento y prácticas agronómicas para la producción de Agave tequilana* Weber en la zona de denominación de origen del tequila. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Centro de Investigación Regional del Pacífico. Libro Técnico 4. Tepatitlán de Morelos, Jalisco, México 198 pp.
- Ruiz C., J. A., G. Medina, I. J. González, C. Ortiz, H. E. Flores L., R. A. Martínez y K. F. Byerly. 1999. Requerimientos agroecológicos de cultivos. Libro Técnico Núm. 3. INIFAP-CIRPAC. Ed. Conexión Gráfica. Guadalajara, Jalisco, México México. 362 p.
- Russell, E. y A. Wild. 1992. Interacciones entre las raíces de las plantas y los microorganismos del suelo. En E. Russell y A. Wild, *Condiciones del suelo y desarrollo de las plantas según Russell*. Mundi-Prensa Libros. Madrid, España. 555-594 pp.
- Santillán-Mendoza, R., Montoya-Martínez, A.C., Pineda-Vaca, D. *et al.* Genetic diversity of *Fusarium pseudocircinatum* in the central western region of Mexico: the case of big-leaf mahogany malformation disease. *Mol Biol Rep* 47, 6599–6609 (2020). <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05711-0>
- Sarmiento-Ramírez JM, Abella E, Martín MP, Tellería MT, López-Jurado LF, Marco A, Diéguez-Uribeondo J. 2010. *Fusarium solani* is responsible for mass mortalities in

- nests of loggerhead sea turtle, *Caretta caretta*, in Boavista, Cape Verde. FEMS Microbiol Lett. 2010 Nov;312(2):192-200. doi: 10.1111/j.1574-6968.2010.02116.x.
- Schnathorst, W. C. 1981. Life cycle and epidemiology of *Verticillium*. In: Fungal Wilt Diseases of Plants. M. E. Mace, A. A. B. a. C. H. B. (Eds.), Academic Press, Inc., New York. pp. 81-111
- Serrano-Carreón L y Galindo-Fentanes E. 2007. Control biológico de organismos fitopatógenos: un reto multidisciplinario. Ciencia. 1(58): 77-88.
- Serrato-Diaz, L. M., Mariño, Y. A., de Jesus Gonzalez, J., Goenaga, R., and Bayman, P. 2024. Coffee Fruit Rot: The Previously Unrecognized Role of *Fusarium* and Its Interactions with the Coffee Berry Borer (*Hypothenemus hampei*). Phytopathology, <https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-24-0046-R>
- Severo, R., Soki Shibutani, L. J., da Silva, G. F., da Silva Costa Guimarães, S., de Alcântara Neto, F., Beserra Jr, J. E. A., ... and de Melo, M. P. 2024. *Fusarium* species causing root rot and wilt in tomato in Brazil. Journal of Phytopathology, 172(1), e13261. <https://doi.org/10.1111/jph.13261>
- Shoresh M., Harman, G. E, Mastouri, F. 2010. Induce systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. Ann. Rev. Phytopathol. 48:21-43.
- Siddiqui-Zaki A. 2006. PGPR: Prospective biocontrol agents of plant pathogens. Ed. ZakiSiddiqui A. En: PGPR: Biocontrol and Biofertilization. Springer. Aligarh, India. pp: 111-142.
- Sierra-Moya, J. A., Guzmán-López, O. T y Salinas-Castro, A. 2022. Caracterización de especies de *Fusarium* que afectan al cultivo de espárrago en Veracruz, México. Scientia Agropecuaria, 13(4), 343-349. <https://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2022.031>
- Sotomayor H., I. 2012. La raza tropical 4 del mal de Panamá: amenaza potencial para la industria bananera y platanera del Ecuador. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias Quevedo, Ecuador 418:42. <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/337>

- Sperschneider, J., Gardiner, D. M., Thatcher, L. F., Lyons, R., Singh, K. B., Manners, J. M. and Taylor, J. M. 2015. Genome-wide analysis in three *Fusarium* pathogens identifies rapidly evolving chromosomes and genes associated with pathogenicity. *Genome Biology and Evolution* 7(6):1613-1627. <https://doi.org/10.1093/gbe/evv092>
- Steinkellner, S., Mammeler, R. and Vierheilig, H. 2008. Germination of *Fusarium oxysporum* in root exudates from tomato plants challenge with different *Fusarium oxysporum* strains. *European Journal of Plant Pathology* 122:395-401
- Sunder, S. and Satyavir S. 1998. Survival of *Fusarium moniliforme* in soil, grains and stubbles of paddy. *Indian Phytopathology* 47-50 p.
- Timmer, L. W. 1982. Host range and host colonization, temperature effects and dispersal of *Fusarium oxysporum* f. Spp. *Citri*. *Phytopathology*. Vol. 72, p 698- 702
- Tirado-Ramírez, M. A., López-Orona, C. A., Velázquez-Alcaraz, T. D. J., Díaz-Valdés, T., Velarde-Félix, S., Martínez-Campos, A. R., y Retes-Manjarrez, J. E. 2018. First report of onion basal rot caused by *Fusarium falciforme* in Mexico. *Plant Disease*, 102(12), 2646.
- Tlapal B. B. 2013. Efecto de *Trichoderma* y *Bacillus* en la dinámica poblacional de *Fusarium* spp. en agave tequilero (*Agave tequilana* Weber. Var. Azul) en Jalisco. Tesis de Doctorado. Posgrado Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Postgraduados. 95p.
- Ulloa, C. J. 1996. Enzimas micolíticas producidas por el agente de biocontrol *Trichoderma harzianum*. In Actas del V de Simposio de control biológico, Anais: Conferencias y Palestras, Foz de Iguazu-arana-Brasil pag 234-238.
- Vakalounakis D., Chalkias J. 2004. Survival of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* in soil *Journal Crop Protection* 871–873 p.
- Valdiviezo R. J. E. 2020. Aislamiento, patogenicidad y caracterización molecular de *Fusarium oxysporum*. Schltdl, que afecta piña (*Ananas comosus*) en Poroto, La libertad. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Trujillo, Perú 59p. URI: <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/15813>
- VanderMolen, G. E., Beckman, C. H., and Rodehorst, E. 1977. Vascular gelation: A general response phenomenon following infection. *Physiology and Plant Pathology*, 11, 95-100.

- Velarde Félix, Sixto, Valdez Rubio, Nallely, Zamora Galván, Francisco, López Molina, Ramón, Melgoza Villagómez, Claudia María, & Garzón Tiznado, José Antonio. 2018. Identificación molecular de *Fusarium* spp. aislados de maíz en Sinaloa, México. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 9(8), 1675-1689.
- Vega-Ramos KL, Uvalle-Bueno JX, Gómez Leyva JF. 2013. Molecular variability among isolates of *Fusarium oxysporum* associated with root rot disease of *Agave tequilana*. *Biochemical Genetics*, 51: 243-255.
- Vero, S. M., y Mondino, P. 1999. Control biológico postcosecha en Uruguay. *Horticultura internacional*, 7, 1-10.
- Vicente R., I., y J. I. Del Real L. 2007. Métodos de propagación del Agave tequilana Weber var. Azul. p. 57-67 In Rulfo V., F. O. *et al.* (ed.). Conocimiento y prácticas agronómicas para la producción de Agave tequilana Weber en la zona de denominación de origen del tequila. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Pacífico Centro.
- Vinale F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Barbetti, M. J. 2008. A novel role for Trichoderma secondary metabolites in the interactions with plants. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 72:80-86.
- Virgen-Calleros G, Méndez-Moran L, Espitia Carlos C. 2011. Evolución histórica y situación actual de la marchitez y pudrición seca del cogollo en el cultivo del agave azul tequilero. Pp: 28-34. In: Briceño-Félix GA, Hurtado-de la Peña S, Díaz-Mederos P, Pérez-Mejía FA. (eds). Primer foro de discusión fitosanitaria en el cultivo del agave azul tequilero. Editorial Digital Consejo Regulador del Tequila A. C. Guadalajara, Jalisco, México. 140 p.
- Virgen-Calleros, G. 2000. Epidemiología y manejo integrado de problemas fitosanitarios en *Agave tequilana* Weber var. azul. Guadalajara.
- Virgen-Galleros G. 2004. Epidemiología y manejo integrado de problemas fitosanitarios en *Agave tequilana* Weber var. azul Enfermedades del agave tequilero. Eds. CRT. En: Avances en la investigación del agave tequilero. Jalisco, México. pp: 95-144.
- Walter, S., Nicholson, P. and Dooha, F.M. 2009. Action and reaction of host and pathogen during *Fusarium* head blight disease. *New Phytologist* 185: 54–66.

- Wang, Y., Li, Y., Wang, S., and Liu, H. 2017. Biocontrol of *Fusarium graminearum* Growth and Deoxynivalenol Production in Wheat Kernels with Bacterial Antagonists. *International journal of molecular sciences*, 18(7); 1540.
- Weindling R. 1934. Studies on a lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi. *Phytopathology* 24:1153-79.
- Yedidia, I., Benhamou, N., and Chet, I. 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied Environmental Microbiology*, 65: 1061-1070
- Zacamo-Velázquez, N. Y., Ireta-Moreno, J., Salinas-Moreno, Y., Gómez-Rodríguez, V. M., Ramírez-Vega, H., y Martínez-Loperena, R. 2023. Variabilidad morfológica/patogénica de *Fusarium verticillioides* en la Ciénega/Chapala, México y evaluación de técnicas de inoculación. *Agronomía Mesoamericana*, 34(1). <https://doi.org/10.15517/am.v34i1.49679>

9.-ANEXOS

9.1.- Medios de Cultivo empleados:

Organismos	Medio de Cultivo	Objetivos	Reactivos	Cantidad (1000 ml)	Notas
HONGOS (<i>Fusarium</i> spp. y <i>Trichoderma</i> spp.)	PDA	Aislamiento, Crecimiento y Caracterización	PDA	39 g	Todos los medios se esterilizan en autoclave a 121 °C por 20 min. -Todos los medios de cultivo llevan *0.250 g antibiótico/1000 ml. -Reactivos con (*) se agregan post-esterilización.
			Agar	5 g	
	KOMADA	Aislamiento Semiselectivo <i>Fusarium</i> spp.	L-Asparagine	2 g	
			KH ₂ PO ₄	1 g	
			MgSO ₄ + 7H ₂ O	0.5 g	
			KCl	0.5 g	
			D-Galactosa	20 g	
			Agar	20 g	
			*PCNB	1.6 g	
	TSM	Aislamiento Semiselectivo <i>Trichoderma</i> spp.	NH ₄ NO ₃	1 g	
			KH ₂ PO ₄	0.9 g	
			MgSO ₄ + 7H ₂ O	0.2 g	
			KCl	0.15 g	
			Glucosa	3 g	
			Rosa de Bengala	0.15 g	
			Agar	20 g	
	*PCNB	0.2 mL			
	AGUA-AGAR	Purificación (Punta de Hifa)	Agar	20 g	
			*Cloranfenicol	0.25 g	
			*Estreptomina	0.25 g	
			*Acido Lactico	20 ml	
	SNA	Esporulación de <i>Fusarium</i> spp.	L-Asparagine	2 g	
			KH ₂ PO ₄	1 g	
			MgSO ₄ + 7H ₂ O	0.5 g	
			KCl	0.5 g	
			Glucosa	0.2 g	
			Sacarosa	0.2 g	
Agar			20 g		
V8-AGAR	Caracterización <i>Trichoderma</i> spp.	Jugo de V8	250 ml		
		Agar	20 g		
SABORAUD	Caracterización <i>Fusarium</i> spp.	Glucosa	40 g		
		Peptona de Carne	5 g		
		Triptona	3 g		
		Agar	20 g		
BACTERIAS (<i>Bacillus</i> spp.)	AGAR NUTRITIVO	Aislamiento, Crecimiento, Purificación	Agar Nutritivo	39 g	Sin antibiótico
			Agar	5 g	
	R2A-AGAR®	Aislamiento y Purificación de <i>Bacillus</i> spp.	R2A-AGAR®	18 g	
			Agar	5 g	

9.2.- Organismos monospóricos conservados:

Cuadro 9.4.- 7 aislamientos monospóricas de *Fusarium* spp. conservadas a partir de siembras de **Muestras de Suelo**:

Incidencia	Rango pH.	Predio	Muestra	Prev.	ID conservación	Especie (EF-1a)
Alta	pH > 5	1	Foco	1	ANEF140s	•
				2	ANEF141s	•
				3	ANEF142s	•
			PeriFoco	1	ANSF143s	•
			pH < 5	3	PeriFoco	1
Baja	pH < 5	2	Foco	1	BAEF144s	•
	pH > 5	4	PeriFoco	1	BNSF146s	•

Cuadro 9.5.- 8 aislamientos monospóricas de *Trichoderma* spp. conservadas a partir de siembras de **Muestras de Suelo**:

Incidencia	Rango pH.	Predio	Muestra	Prev.	ID conservación	Especie (EF-1a)		
Alta	pH > 5	1	Foco	1	ANET14s	•		
				2	ANET15s	•		
			Perifoco	1	ANST16s	•		
			pH < 5	3	Foco	1	AAET18s	•
				8	Perifoco	1	AAST21s	•
Baja	pH > 5	4	Perifoco	1	BNST19s	•		
	pH < 5	2	Perifoco	1	BAST17s	•		
		5	Perifoco	1	BAST20s	•		

Cuadro 9.6.- 24 aislamientos monospóricas de *Fusarium* spp. conservadas a partir de siembras de **Sobrenadante del Macerado de Tejido Interno:**

Inciden.	Rango pH	Predio	Sanidad P. Madre	No. Hij.	ID conser.	Especie (EF-1a)
Baja	pH < 5	2	Sana	2	BASF8m	<i>F. verticilloides</i>
			Enferma	3	BAEF9m	<i>F. bostrycoides</i>
	pH > 5	6	Sana	6	BNSF20m	<i>F. nygamai</i>
			Enferma	4	BNSF13m	<i>F. falciforme</i>
				2	BNSF14m	<i>F. verticilloides</i>
				7	BNSF15m	<i>F. oxysporum</i>
		4	Sana	7	BNSF16m	<i>F. verticilloides</i>
				8	BNSF17m	<i>F. oxysporum</i>
			Enferma	7	BNEF18m	<i>F. verticilloides</i>
				10	BNEF19m	<i>F. proliferatum</i>
Alta	pH < 5	3	Sana	8	AASF10m	<i>F. verticilloides</i>
			9	AASF11m	<i>F. verticilloides</i>	
			Enferma	6	AAEF12m	<i>F. oxysporum</i>
		8	Sana	1	AASF21m	<i>F. verticilloides</i>
					AASF22m	<i>F. lactis</i>
			Enferma	1	AAEF23m	<i>F. oxysporum</i>
	pH > 5	1	Sana	6	ANSF1m	<i>F. pseudocircinatum</i>
				9	ANSF2m	<i>F. verticilloides</i>
			Enferma	10	ANSF3m	<i>F. verticilloides</i>
				2	ANEF4m	<i>F. verticilloides</i>
6	6	ANEF5m	<i>F. lactis</i>			
	6	ANEF6m	<i>F. verticilloides</i>			
	10	ANEF7m	<i>F. verticilloides</i>			

Cuadro 9.7.- 2 aislamientos monospóricas de *Trichoderma* spp. conservadas a partir de siembras de **Sobrenadante del Macerado de Tejido Interno:**

Inciden.	Rango pH	Predio	Sanidad P. Madre	No. Hij.	ID conser.	Especie (EF-1a)
Alta	pH < 5	3	Sana	1	AAST1m	•
Baja	pH < 5	5	Sana	6	BAST2m	•

Cuadro 9.8.- 116 aislamientos monospóricas de *Fusarium* spp conservadas a partir de siembras de **Muestras de CIE:**

Inciden .	Rang o pH.	Predi o	Sanidad Muestr a	Toma Muestra	Prev.	ID conser.	Especie (EF-1a)
Baja	pH <5	2	Sano	<i>In situ</i>	1	BASF40e	<i>F. triseptatum</i>
					2	BASF41e	.
					3	BASF42e	.
					4	BASF43e	.
					5	BASF44e	<i>F. compactum</i>
					6	BASF45e	.
					7	BASF46e	.
			Deshidratad o	1	BASF47e	<i>F. falciforme</i>	
				2	BASF48e	.	
				3	BASF49e	.	
			Enfermo	<i>In situ</i>	1	BAEF50e	<i>F. bostrycoides</i>
					2	BAEF51e	<i>F. falciforme</i>
					3	BAEF52e	.
				1	BAEF53e	<i>F. cf. Incarnatum</i>	
		Deshidratad o		2	BAEF54e	<i>F. oxysporum f.sp. radicyl-copersici</i>	
				3	BAEF55e	.	
				4	BAEF56e	.	
		5	Sano	<i>In situ</i>	1	BASF83e	<i>F. verticillioide s</i>
					2	BASF84e	.
					3	BASF85e	.
				Deshidratad o	1	BASF86e	<i>F. falciforme</i>
2	BASF87e				.		
3	BASF88e				.		
4	BASF89e				<i>F. falciforme</i>		
5	BASF90e				.		
Enfermo	<i>In situ</i>			1	BAEF91e	<i>F. falciforme</i>	
				2	BAEF92e	.	

			3	BAEF93e	.
			4	BAEF94e	.
		Deshidratad	1	BAEF95e	<i>F. thapsinum</i>
		o	2	BAEF96e	.
			3	BAEF97e	.
			1	BNSF71e	<i>F. solani</i>
		<i>In situ</i>	2	BNSF72e	.
	Sano		3	BNSF73e	.
			4	BNSF74e	.
		Deshidratad	1	BNSF75e	<i>F. falciforme</i>
		o	2	BNSF76e	.
4			1	BNEF77e	<i>F. proliferatum</i>
		<i>In situ</i>	2	BNEF78e	<i>F. bostrycoides</i>
	Enfermo		3	BNEF79e	.
		Deshidratad	1	BNEF80e	<i>F. verticillioide</i>
		o	2	BNEF81e	.
			3	BNEF82e	.
			1	BNSF98e	<i>F. falciforme</i>
pH <5			2	BNSF99e	.
		<i>In situ</i>	3	BNSF100e	.
	Sano		4	BNSF101e	.
			5	BNSF102e	.
			6	BNSF103e	.
		Deshidratad	1	BNSF104e	<i>F. verticillioide</i>
		o			<i>s</i>
6			1	BNEF105e	<i>F. falciforme</i>
			2	BNEF106e	.
		<i>In situ</i>	3	BNEF107e	<i>F. solani</i>
	Enfermo		4	BNEF108e	.
		Deshidratad	1	BNEF109e	<i>F. falciforme</i>
		o			

Inciden.	Rango pH	Predio	Sanidad Muestra	Toma Muestra	Prev.	ID conser.	Especie (EF-1a)
Alta	pH <5	3	Sano	<i>In situ</i>	1	AASF57e	<i>F. falciforme</i>
					2	AASF58e	<i>F. falciforme</i>
					3	AASF59e	.
					4	AASF60e	.
			Deshidratado	1	AASF61e	<i>F. falciforme</i>	
				2	AASF62e	<i>F. falciforme</i>	
			Enfermo	1	AAEF63e	<i>F. oxysporum</i>	
				2	AAEF64e	.	
				3	AAEF65e	.	
				4	AAEF66e	.	
	5	AAEF67e		.			
	Deshidratado	1	AAEF68e	<i>F. falciforme</i>			
		2	AAEF69e	.			
		3	AAEF70e	<i>F. verticillioides</i>			
	pH >5	1	Sano	<i>In situ</i>	1	AASF125e	<i>F. falciforme</i>
					2	AASF126e	.
					3	AASF127e	.
					4	AASF128e	.
					5	AASF129e	.
					6	AASF130e	.
8		Deshidratado	1	AASF131e	<i>F. falciforme</i>		
			2	AASF132e	.		
		Enfermo	1	AAEF133e	<i>F. falciforme</i>		
			2	AAEF134e	.		
3	AAEF135e		.				
Deshidratado	4	AAEF136e	.				
	5	AAEF137e	.				
1	Sano	<i>In situ</i>	1	ANSF25e	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>radicis-lycopersici</i>		
			2	ANSF26e	.		
			3	ANSF27e	.		
Deshidratado	1	ANSF28e	<i>F. proliferatum</i>				
	2	ANSF29e	.				
	3	ANSF30e	.				

Enfermo	<i>In situ</i>	1	ANEF31e	<i>F. falciforme</i>	
		2	ANEF32e	.	
		3	ANEF33e	.	
		4	ANEF34e	.	
		5	ANEF35e	.	
Deshidratado		1	ANEF36e	<i>F. falciforme</i>	
		2	ANEF37e	<i>F. verticillioides</i>	
		3	ANEF38e	.	
		4	ANEF39e	<i>F. falciforme</i>	
Sano	<i>In situ</i>	1	ANSF110e	<i>F. falciforme</i>	
		2	ANSF111e	.	
		3	ANSF112e	<i>F. falciforme</i>	
Deshidratado		1	ANSF113e	<i>F. verticillioides</i>	
		2	ANSF114e	.	
		3	ANSF115e	.	
7	Enfermo	<i>In situ</i>	1	ANEF116e	<i>F. falciforme</i>
			2	ANEF117e	<i>F. falciforme</i>
			3	ANEF118e	.
			4	ANEF119e	.
			5	ANEF120e	.
	Deshidratado		1	ANEF121e	<i>F. solani</i>
			2	ANEF122e	<i>F. falciforme</i>
			3	ANEF123e	.
4	ANEF124e	.			

Cuadro 9.9: 11 aislamientos monospóricas de *Trichoderma* spp conservadas a partir de siembras de **Muestras de CIE:**

Inciden.	Rango pH	Predio	Sanidad Muestra	Toma Muestra	Prev.	ID conser.	Especie (EF-1a)	
Baja			Sano	Insitu	1	BAST3e	.	
					2	BAST4e	.	
					3	BAST5e	.	
	pH < 5	2		Enfermo	Insitu	1	BAET6e	.
						2	BAET7e	.
						3	BAET8e	.
						4	BAET9e	.
	pH >5	4	Sano	Sano	Insitu	1	BAST13e	.
						1	BNST10e	.
						2	BNST11e	.
						3	BNST12e	.