



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

Efecto de *Trichoderma* y *Bacillus* en la dinámica poblacional de *Fusarium* spp. en agave tequilero (*Agave tequilana* Weber. var. Azul) en Jalisco

Bertha Tlapal Bolaños

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

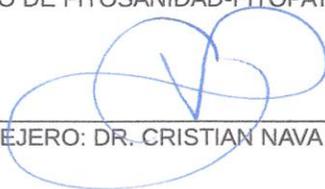
MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2013

La presente tesis titulada: **Efecto de *Trichoderma* y *Bacillus* en la dinámica poblacional de *Fusarium* spp en agave tequilero (*Agave tequilana* Weber var. Azul) en Jalisco** realizada por la alumna Bertha Tlapal Bolaños, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para la obtención del grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS

INSTITUTO DE FITOSANIDAD-FITOPATOLOGIA



CONSEJERO: DR. CRISTIAN NAVA DIAZ



ASESOR: DRA. EMMA ZAVALETA MEJIA



ASESOR: DR. HECTOR GONZALEZ HERNANDEZ



ASESOR: DR. IGNACIO DEL REAL LABORDE



ASESOR: DR. PROMETEO SANCHEZ GARCIA

Montecillo, Texcoco, estado de México, Octubre de 2013

RESUMEN

Efecto de *Trichoderma* y *Bacillus* en la dinámica poblacional de *Fusarium* spp., en agave tequilero *Agave tequilana* Weber var. Azul en Jalisco

Bertha Tlapal Bolaños, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2013

La marchitez es uno de los problemas fitosanitario más importantes en el agave tequilero *Agave tequilana* Weber var. Azul, enfermedad que esta asociada con varios microorganismos y que principalmente se presenta en plantaciones de más de 2 años de edad. Entre los posibles agentes causales de esta enfermedad se reportan a varias especies de *Fusarium* spp., así como a *Thielaviopsis paradoxa*. En el presente trabajo se planteó el de inocular con organismos benéficos plantas de agave tequilero que se usan como material propagativo en vivero para nuevas plantaciones, como parte de un manejo preventivo e integrado del cultivo. En este trabajo se estudió en vivero (Rancho El Indio, Tequila, Jalisco) y en campo, en plantaciones comerciales de agave en las localidades de Ahualulco y Tecalitlán, Jalisco, el establecimiento y desarrollo de aislados nativos de especies de *Trichoderma harzianum*, *T. virens* y *T. aureoviride* y la presentación comercial de la bacteria *Bacillus subtilis*, aislados que se inocularon en plantas de agave en vivero. También se estudió el posible efecto de los organismos benéficos sobre la dinámica poblacional de propágulos de *Fusarium* spp., en plantas de agave a nivel de vivero y en campo, determinando en campo la flora microbiana nativa previo a los ensayos. En ambos casos, en vivero y en campo, se registraron las variables siguientes: unidades formadoras de colonias (UFC) de los organismos citados por gramo de suelo y características agronómicas de las plantas de agave como altura, cobertura y contenido de clorofila. Las plantas tratadas desde vivero tuvieron una menor densidad de UFC de *Fusarium* spp., y un buen establecimiento en vivero de *T. harzianum*, *T. aureoviride* y *B. subtilis*, así como la mezcla de los últimos. Sin embargo en campo, su comportamiento y desarrollo de estos organismos benéficos se ve influenciado por las condiciones climáticas y características propias de cada nicho ecológico que se encuentra en la rizosfera que comparte la planta con flora microbiana nativa y condiciones físicas de suelo. En campo se encontró que *B. subtilis* tolera

temperatura de 32 a 34°C y periodos de sequia con humedad relativa por debajo del 40%; mientras que *Trichoderma* si se ve afectado y disminuido en estos periodos críticos. Por el contrario, en áreas con temperaturas similares pero mayor humedad relativa cercana al 60%, *Trichoderma* se adapta fácilmente, no obstante que ya existen cepas nativas bien establecidas, las cuales desplazarán poco a poco a las introducidas debido a que han coevolucionado con el ambiente y el hospedante. Con ambos organismos y en las localidades de estudio, *Fusarium* spp., se mantuvo con densidades menores a las de los organismos benéficos.

Palabras clave: marchitez del agave, *Fusarium* spp., antagonismo, supresividad.

ABSTRACT

Effect of *Trichoderma* and *Bacillus* on the population dynamics of *Fusarium* spp., on agave tequilero *Agave tequilana* Weber var. Azul in Jalisco

Bertha Tlapal Bolaños, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2013

The agave wilt is one of the most important plant pathology problems of the agave tequilero *Agave tequilana* Weber var. Azul, disease that has been associated with several plant pathogens such as *Fusarium* spp., and *Thielaviopsis paradoxa*, and this disease is present mainly on crops of 2 or more years old. In the present study agave tequilero plants that are used as propagative plant material were inoculated with beneficial organisms, and as a part of a preventive and integrated crop management strategy. Experiments were established in a greenhouse (Rancho el Indio, Tequila, Jalisco) condition and on two commercial agave crops, in the localities of Ahualulco and Tecalitlán, Jalisco, in order to study the possible establishment and later development of native isolate of *Trichoderma harzianum*, *T. virens* y *T. aureoviride*, and the commercial formulation of the bacteria *Bacillus subtilis*. These isolates were inoculated in the agave plants grown in the greenhouse. The possible effect of beneficial organisms on the population dynamics of *Fusarium* spp., present on agave plants growing on the greenhouse and the commercial agave plantations was also studied, where the microbial compositions was determined before the experiments were established. In both cases, at the greenhouse and the commercial agave plantation, the following variables were recorded: precursor units of colonies (PUC) of the beneficial organisms from the soil, content of chlorophyll, height and width of the agave plants were recorded. Treated agave plants had less PUC densities of *Fusarium* spp., and had a good establishment of *T. harzianum*, *T. aureoviride* and *B. subtilis* at the greenhouse, as well as with the mixture of the last ones. However, at the commercial plantation, the behavior and development of these beneficial organisms were affected by characteristic weather conditions of each ecological niche that is present at the rhizosphere, where the plant has an association with the native microbiological flora and the physical properties of the soil. At the commercial agave plantations *B. subtilis* may tolerate

temperatures between 32 to 34°C and wet extended conditions, with 40% relative humidity, while *Trichoderma* has been affected and reduced for such weather conditions. However, in regions with similar temperatures but with high relative humidity around 60%, *Trichoderma* could adapt very easily, regardless if native strains already existed, which may displace in some times the introduced ones; this is because they had co-evolved with the weather and the host. *Fusarium* spp., were maintained at low levels compared to the introduced beneficial organisms at both experimental sites.

Key words: Agave wilt, *Fusarium* spp., antagonism and suppressive.

DEDICATORIA

A: María José, Angélica y Alberto

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico para la realización del programa doctoral.

A la Universidad Autónoma Chapingo y el Departamento de Parasitología Agrícola por apoyar mi programa doctoral.

A Tequila Sauza S. de R.L de C. V. y Casa Herradura, por el apoyo económico y logístico a los proyectos: “Biología, Efectividad Biológica de Insecticidas y Ecología Química del Picudo del Agave” y “Manejo Integrado de Plagas del Agave”, respectivamente.

Al Colegio de Postgraduados por las facilidades otorgadas en el Programa de Fitosanidad en Fitopatología Campus Montecillo.

Al Dr. Cristian Nava Díaz por todo el apoyo, dirección y revisión para este trabajo, pero sobre todo por su amistad.

Al Dr. Héctor González Hernández por la confianza depositada en mi para este trabajo, por permitir hacerme parte de su equipo de investigación, por todo el apoyo, revisión y sugerencias, y por la amistad.

Al Dr. Ignacio Del Real Laborde del Área de Investigación de Tequila Sauza, Rancho “El Indio”, por las aportaciones y sugerencias a esta tesis y por facilidades otorgadas para la realización del presente trabajo.

Al Dra. Emma Zavaleta Mejía por su paciencia y disposición en la participación de mi comité, así como por sus aportaciones.

Al Dr. Prometeo Sánchez García por todas sus sugerencias y disposición para este trabajo, por su amistad.

Al M.C. Ramón Rubio Cortés del Área de Investigación de Tequila Sauza, Rancho “El Indio” por la disponibilidad en la logística de los experimentos, por toda la experiencia de campo compartida respecto a las prácticas que se realizan en el cultivo.

A mis compañeros de Parasitología Agrícola de Chapingo del área de Fitopatología Dr. Santos Gerardo Leyva Mir, M.C. Camilo Hernández Juárez, M.C. Calixto Carillo Fonseca, M.C. María de Lourdes Rodríguez Mejía, M.C. Dimas Mejía Sánchez, por su solidaridad cuando necesite apoyo. Especialmente al Dr. Leyva.

A los trabajadores de Parasitología Agrícola Mario Salazar Segura, Victor, Patricia Bojorgés, Mariana y Juanito, quienes siempre han mostrado su amistad y solidaridad en cualquier trabajo que les solicite apoyo.

A las secretarias de la coordinación de Fitopatología Michelle, Hilda, Verónica, que siempre se portaron serviciales en cualquier solicitud.

A la M.C. Alejandra Sánchez Almaraz, por su apoyo y contribuciones a este trabajo.

A mis amigos Dr. Dionicio Alvarado Rosales, Dr. Gustavo Mora Aguilera y Dr. Daniel Ochoa Martínez, por apoyarme cuando los he requerido.

A M.Sc Mariana González Rodríguez por el apoyo en la revisión de los resúmenes en inglés.

A todos los integrantes de la comunidad de Fitopatología profesores, trabajadores, amigos y compañeros, que han contribuido a mi desarrollo y crecimiento profesional.

CONTENIDO

	Página
INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO 1. REVISION DE LITERATURA	4
1.1. Historia y normatividad del tequila en México	4
1.2. Importancia del <i>Agave tequilana</i> Weber var. Azul.....	5
1.3. Estadísticas de la bebida tequila	6
1.4. Plagas del agave tequilero	8
1.5 LITERATURA CITADA	19
CAPITULO DOS	28
EFFECTO DE <i>Trichoderma</i> spp. Y <i>Bacillus subtilis</i> EN PLÁNTULAS DE <i>Agave tequilana</i> WEBER, var. AZUL	28
EFFECT OF <i>Trichoderma</i> spp. AND <i>Bacillus subtilis</i> IN SEEDLING FROM <i>Agave tequilana</i> WEBER, var. AZUL	28
2.1 RESUMEN	28
2.2 ABSTRACT.....	29
2.3 INTRODUCCION	30
2.4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
2.5 RESULTADOS.....	35
2.6 DISCUSIÓN	42
2.7 CONCLUSIONES	44
2.8 LITERATURA CITADA	45
CAPITULO TRES	48
DINÁMICA DE <i>Trichoderma</i> y <i>Bacillus</i> EN RELACION A <i>Fusarium</i> EN DOS LOCALIDADES DE REGIONES PRODUCTORAS DE <i>Agave tequilana</i> Weber var. Azul EN JALISCO	48
DYNAMICS OF <i>Trichoderma</i> AND <i>Bacillus</i> IN RELATION TO <i>Fusarium</i> IN TWO PRODUCTION AREAS OF <i>Agave tequilana</i> Weber VAR. AZUL EN JALISCO	48
3.1 RESUMEN	48
3.2 ABSTRACT.....	50
3.3 INTRODUCCIÓN	51

3.4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	53
3.5 RESULTADOS.....	59
3.6 DISCUSIÓN	66
3.7 CONCLUSIONES	71
3.8 LITERATURA CONSULTADA	71
CAPITULO CUATRO.....	77
DISCUSIÓN GENERAL.....	77
4.2 LITERATURA CONSULTADA	80

INDICE DE FIGURAS

Número		Página
1.1	Consumo de agave para tequila, tequila 100 % y total de agave (en miles de toneladas) (CRT, 2013a).	6
1.2	Producción anual de tequila, tequila 100 % y total (en millones de litros en alcohol 40%) (CRT, 2013a).	7
2	Incidencia de marchitez del agave en las diferentes zonas productoras del estado de Jalisco durante los ciclos 2006, 2007 y 2008 (CRT, 2010).	10
3	Resultados de UFC (x1000) por gramo de suelo determinados en el sustrato empleado en la etapa de vivero con plántulas de micropropagación.	36
4	Fig. 4 Comportamiento de los tratamientos T1 <i>T. harzianum</i> (Th), T2 <i>T. virens</i> (Tv), T3 <i>T. aureoviride</i> (Ta), T4 <i>B. subtilis</i> (Bs), T5 <i>T. virens</i> + <i>B. subtilis</i> (Tv + Bs), T6 <i>T. aureoviride</i> + <i>B. subtilis</i> (Ta + Bs), T7 Testigo absoluto (Tabs) y T8 Testigo regional (Treg), durante seis meses de diciembre 2008 a mayo de 2009, inoculados al sustrato durante la etapa de adaptación de vivero del agave (<i>Agave tequilana</i> Weber var. Azul) en el Rancho el Indio, Tequila, Jalisco.	38
5	Diagrama del diseño experimental en el predio de agave tequilero Loma Alta Chapulimita en Ahualulco, Jalisco.	55
6	Panorámica del predio Loma Alta Chapulimita en Ahualulco, Jalisco.	55
7	Diagrama del diseño experimental en el predio de agave tequilero Tecalitlan, Jalisco.	56
8	Panorámica que muestra los trabajos de campo para el establecimiento del experimento en Tecalitlán.	56
9	Dinámica poblacional de UFC de <i>Trichoderma</i> , <i>Bacillus</i> y <i>Fusarium</i> , así como de las variables clorofila, altura, cobertura, diámetro de piña y número de hijuelos de septiembre de 2009 a julio de 2011, en los diferentes tratamientos (Th <i>T. harzianum</i> ; Tv <i>T. virens</i> ; Ta <i>T. aureoviride</i> ; Bs <i>B. subtilis</i> ; Tabs Testigo absoluto; Treg Testigo regional) establecidos en el predio de agave tequilero en Ahualulco (AH), Jalisco.	63
10	Temperatura (A) y humedad realtiva (B) en Ahualulco, Jalisco, de agosto de 2009 a julio de 2011. Nota: en Materiales y Métodos describir como se tomaron estos datos climáticos.	64
11	Dinámica poblacional de UFC de <i>Trichoderma</i> , <i>Bacillus</i> y <i>Fusarium</i> , así como de las variables clorofila, altura, cobertura de la planta, diámetro de piña y número de hijuelos, de agosto de 2009 a julio de 2011, en los diferentes tratamientos (Th <i>T. harzianum</i> ; Tv <i>T. virens</i> ; Ta <i>T. aureoviride</i> ; Bs <i>B. subtilis</i> ; Tabs Testigo absoluto; Treg Testigo	11

	regional) establecidos en el predio de agave tequilero en Tecalitlán (TEC), Jalisco.	
12	Temperatura (A) y humedad realtiva (B) en Tecatiltlán, Jalisco, de agosto de 2009 a julio de 2011.	66

ÍNDICE DE CUADROS

Número		Página
1	Tratamientos considerados dentro de la fase experimental de vivero sobre plantas de micropropagación, establecida en el Rancho el Indio, en Tequila Jalisco, México.	33
2	Comparación de medias de Duncan del área bajo la curva (ABC) de las UFC de <i>Trichoderma</i> sp. detectadas en suelo y raíces en los tratamientos establecidos en la etapa de vivero en agave de micro-propagación después de seis muestreos de diciembre de 2008 a abril de 2009 con intervalo de muestreo de 30 días.	39
3	Comparación de medias de Duncan del área bajo la curva (ABC) de las UFC de <i>B. subtilis</i> detectadas en suelo y raíces en los tratamientos establecidos en la etapa de vivero en agave de micro-propagación después de seis muestreos de diciembre de 2008 a abril de 2009 con intervalo de muestreo de 30 días.	40
4	Comparación de medias de Duncan del área bajo la curva (ABC) de las UFC de <i>Fusarium</i> sp. detectadas en suelo y raíces en los tratamientos establecidos en la etapa de vivero en agave de micro-propagación después de seis muestreos de diciembre de 2008 a abril de 2009 con intervalo de muestreo de 30 días.	41
5	Comparación de medias de Duncan del área bajo la curva (ABC) de las variables altura y clorofilas en los tratamientos establecidos en la etapa de vivero en agave de micro-propagación después de seis muestreos de diciembre de 2008 a abril de 2009 con intervalo de muestreo de 30 días.	42
6	Tratamientos considerados dentro de la fase experimental de campo para los predios de Ahualulco y Tecalitlan, Jalisco, México.	54
7	Área bajo la curva de las variables UFC de <i>Trichoderma</i> , <i>Fusarium</i> y <i>Bacillus</i> ; así como las variables clorofila, altura y cobertura de la planta. Prueba de comparación de medias LSD ($\alpha=0.05$), en Ahualulco, Jalisco.	60
8	Análisis de varianza (ANAVA) y prueba de comparación de medias LSD ($\alpha=0.05$) para las variables DIAMP e HIJU en la evaluación final en Ahualulco, Jal.	61
9	Área bajo la curva de las variables UFC de <i>Trichoderma</i> , <i>Fusarium</i> y <i>Bacillus</i> ; así como las variables clorofila, altura y cobertura. Prueba de comparación de medias LSD ($\alpha=0.05$), en Tecalitlán, Jalisco.	62
10	Análisis de varianza (ANAVA) y prueba de comparación de medias LSD ($\alpha=0.05$) para las variables DIAMP e HIJU en la evaluación final en Tecalitlán, Jalisco.	62

INTRODUCCIÓN

De acuerdo con Valenzuela (2000), el 75% de las 300 especies de agaves se encuentran presentes en México y el resto en Estados Unidos y Norte de Sudamérica. A inicios del siglo XX, la mayoría de las áreas cultivadas con agaves se destinaban a la producción de fibra, como es el caso del cultivo henequén en México (*Agave fourcroydes*) y del sisal (*Agave sisalana*) en África oriental (Novel, 1998). Actualmente la demanda mundial del tequila, ha provocado que se extienda la superficie sembrada de este cultivo en México, lo cual representa un fuerte desafío para fisiólogos, biotecnólogos, fitomejoradores y en general a todas aquellas personas encargadas de mantener el cultivo en buenas condiciones hasta su jima.

Entre las bebidas alcohólicas que se obtienen de los agaves se encuentra el pulque, que se obtiene de *Agave atrovirens*, *Agave mapisaga*, *Agave salmiana* y *Agave americana*; el mezcal bacanora se produce a partir del *Agave potatorum*; el sotol es producido con *Agave dasylirion*; el mezcal se obtiene principalmente del *Agave angustifolia* y el tequila es producido con *Agave tequilana* var. *Azul* (Gentry, 1982; Bravo, 2007). Existen variedades de agave tequilero como la mano larga, chato, bermejo, azul, pata de mula, sigüin, zopilote, Moraleño y Zahuayo de las cuales también se obtiene tequila. Sin embargo, la norma para la producción de tequila (NOM-006-SCFI-2005) sólo permite el uso de la variedad de agave *A. tequilana* var. *Azul* (Gentry, 1982; Martínez, 1999). México es el único país productor de tequila. Hoy día el agave tequilero se puede plantar solo en 181 municipios comprendidos en la zona geográfica de denominación que incluye cinco estados, protegidos dentro de la Denominación de Origen del Tequila (DOT) (NOM-006-SCFI- 2005; CRT, 2009a), con una superficie sembrada para el año 2012 de 118,195 ha y con una producción de 1,420,395 ton (SIAP, 2013). Jalisco es el principal productor, con una superficie plantada para el año 2012 de 82,776 ha (SIAP, 2013) de agave tequilero, con una producción de 1,200,136 ton y un total 253,033,239 plantas sembradas del año 2000 al 2009 (CRT, 2013). El actual aprovechamiento representa una fuente importante de ingresos económicos para los productores por la generación de empleos, así como por la captación de divisas para el país al exportar volúmenes importantes de la producción

de tequila, por ejemplo para el año 2012 se exportaron 166.7 millones de litros (CRT, 2013). Sin embargo, este cultivo reporta diversos problemas fitosanitarios, uno de los cuales es la marchitez, síntoma que puede ser provocado por varios microorganismos y las incidencias más elevadas se presentan en plantaciones que superan los 2 años de edad (2010). La marchitez que se presenta en cualquier plantación, se debe a una deshidratación de los tejidos y esto se da a su vez porque hay una reducción, muerte o destrucción del sistema radical, o bien porque hay destrucción o taponamiento de haces vasculares (CRT, 2005). Luna-Hernández (1996), Virgen-Calleros (2000) y Fucikovsky-Zak (2001), reportaron como agentes causantes de este síntoma de marchitez a los hongos fitopatógenos *Fusarium oxysporum* y *Thielaviopsis paradoxa*. En 2007 Cuevas y Domínguez, reportaron que el complejo de especies *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. verticillioides*, *F. culmorum* y *F. equiseti*, podría ser el causante de la marchitez del agave tequilero. También, el mismo síntoma puede ser ocasionado por varias especies de insectos barrenadores que se alimentan del agave y su acción puede provocar heridas que también pueden aprovechar los patógenos para invadir o infectar a la planta (CRT, 2005); entre estos esta la gallina ciega, que al alimentarse de la raíz, lo que provoca que la planta tenga menos área para absorber agua y nutrientes, a la vez provoca heridas que son una fuente de entrada potencial para patógenos de la raíz, como *Fusarium* sp. Otro insecto que puede ocasionar marchitez es el gusano blanco del maguey, ya que al barrenar la piña, afecta diversas zonas del tallo, incluyendo haces vasculares y aunque tal vez no haya invasión de microorganismos, si puede observarse encarrujamiento de hojas, así como una detención del crecimiento (síntoma de marchitez). Cuando una planta esta estresada por algún otro factor (puede ser manejo, nutrición, herbicidas, enfermedad o estrés hídrico), es fácilmente atacada por el picudo del agave *Scyphophorus acupunctatus*, el cual además de alimentarse dentro de la planta, también puede provocar síntomas de marchitez, pudrición y muerte de la misma (CRT, 2005; González Hernández *et al.*, 2007).

Es importante diagnosticar adecuadamente los problemas de marchitez, tomando en cuenta que existen diferentes agentes causales como insectos, exceso de humedad, aplicación de herbicidas, hongos, entre otros. Por lo anterior, el manejo integrado del cultivo debe involucrar diversas estrategias que tiendan a monitorear los factores

bióticos y abióticos asociados al síntoma de marchitez, para establecer las estrategias de manejo más adecuadas. Algunas de las medidas de manejo preventivas, que tienden a reducir la marchitez del agave, involucra principalmente la elección del terreno, preparación del mismo, selección de la plantas madre, arranque de hijuelos, clasificación del hijuelos, fechas de plantación, método de plantación, fertilización y enmiendas, manejo de malezas, monitoreo y reducción de poblaciones de insectos plaga, tratamiento de hijuelos, (Uvalle-Bueno *et al.*, 2007).

La introducción de competidores del suelo es una de las medidas más efectivas reportadas para regular las densidades de población de las especies de fitopatógenos como *Fusarium* spp., *Thielaviopsis paradoxa*, *Pectobacterium carotoborum*, que afectan las raíces de cultivos (Steinberg *et al.*, 2007); y siendo el cultivo del agave la materia prima para la producción de la bebida nacional en México “el tequila”, el presente trabajo tuvo como objetivos introducir especies de *Trichoderma* spp., aisladas de las áreas productoras de San Juanito y Ameca (Lote los Pitayos) de agave azul *A. tequilana* var. *Azul*, y *Bacillus subtilis* comercial (Serenade ®), con el propósito de determinar su establecimiento en planta de agave tequilero obtenida por el proceso de micropropagación y desarrollo en vivero; así como observar en campo el comportamiento de estos microorganismos en el tiempo y espacio, durante 2 años y su posible efecto en reducir la densidad de poblaciones de las especies de *Fusarium* spp., presentes.

CAPITULO 1. REVISION DE LITERATURA

1.1. Historia y normatividad del tequila en México

En mayo de 1902, Weber propuso el nombre de *Agave tequilana* y la variedad Azul al agave productor de tequila. En 1945 se otorgó la primera concesión para producir vino mezcal de tequila y en junio de 1949, se publicó la PRIMER NORMA OFICIAL DE CALIDAD para el tequila DGN R-9-1949 (CRT, 2008d).

En 1974, se publicó la DECLARATORIA que otorga protección a la Denominación de Origen del Tequila (DOT) para México. Esta protección incluye todo el estado de Jalisco con 125 municipios, siete municipios de Guanajuato, 30 de Michoacán, ocho de Nayarit y 11 de Tamaulipas, que en total suman 181 municipios con DOT (CRT, 2009c).

En 1992 se publicó la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, la cual permite que la evaluación de conformidad sea llevada a cabo por organismos privados.

En 1994 se creó el Consejo Regulador del Tequila, A. C. (CRT). Este Consejo es una organización, sin fines de lucro, donde se reúnen agentes y actores productivos ligados a la producción de tequila. Este consejo está dedicado a promover la calidad, la cultura y el prestigio del tequila. Actualmente el CRT cuenta con las acreditaciones siguientes: laboratorio de pruebas, unidad de verificación y organismo de certificación. Los objetivos del CRT son los siguientes: verificar y certificar el cumplimiento de la norma del tequila (NOM-006-SCFI-2005), garantizar al consumidor la autenticidad del tequila y generar información oportuna y veraz, útil a la cadena productiva agave-tequila, así como salvaguardar la DOT en México y el extranjero (CRT, 2009b).

El 6 de enero de 2006, se publicó la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-2005: Bebidas alcohólicas- Tequila- especificaciones. Esta Norma establece las características, especificaciones y los requisitos a cumplir en el abasto de agave, la producción, envase, comercialización, información y prácticas comerciales vinculadas a la bebida alcohólica destilada denominada Tequila. Estos requisitos están sujetos a verificación permanente, además establece que todo el tequila debe estar certificado

con la finalidad de garantizar al consumidor la calidad del tequila e involucra todos los procesos de la cadena productiva agave-tequila (CRT, 2009d; CRT, 2009b).

1.2. Importancia del *Agave tequilana* Weber var. Azul

El agave *A. tequilana* var. Azul o maguey de tequila, es posiblemente originario del estado de Jalisco, ya que se encuentra en estado silvestre en los alrededores de los municipios de Tequila, Ahualulco, Tehuchitlán y Etzalan. Se menciona que las tribus de la región cultivaban la planta y de las hojas sacaban fibras para la fabricación de tejidos y del tronco obtenían por torrefacción un jarabe que evaporado daba una especie de miel y fermentado daba una bebida alcohólica (CRT, 2008d). El agave se cultiva en varios estados de la República Mexicana con una superficie plantada de 165,310.38 ha y una superficie cosechada de 19, 731.10 ha, con un rendimiento de 86.35 ton/ha (SIAP, 2011 actualizar para 2012, ver página 2). El cultivo del agave, en la industria tequilera, es una fuente importante de materia prima para la producción de tequila (García, 2009).

Este cultivo se encuentra distribuido en cinco estados de la república mexicana con 181 municipios protegidos por la Denominación de Origen de Tequila (DOT) (SAGARPA, 2010; CRT, 2009a; CRT, 2009b; CRT, 2008d). Jalisco es el principal estado productor de agave, cuenta con una superficie plantada de 122,555 ha, con un total 513,769,901 plantas de agave registradas en el CRT a diciembre de 2008, con un total de 35,748 productores (CRT, 2008c; CRT, 2008e). SAGARPA registra para el año 2010 un inventario de 318 millones de plantas de agave que abastecen a 150 fábricas productoras de tequila. Este cultivo genera 60,000 empleos directos y 900,000 jornales cada año en toda la cadena productiva agave-tequila (SAGARPA, 2010; CRT, 2008c). En noviembre de 2009 el Consejo Regulador del Tequila (CRT) reportó 17,500 agricultores, generando empleos a más de 50,000 familias (CRT, 2009a; CRT, 2009b). El consumo de agave para la producción de tequila ha variado en los últimos 18 años, con un incremento en el consumo de materia prima en el periodo 1995-1999, sin embargo, en el periodo 2000-2003 se registró un descenso en el consumo, asociado a la escasez de agave, por lo que la introducción de tequila perdió participación en los

mercados, equivalente a los 250 millones de litros, con un valor aproximado de 700 millones de dólares (CRT, 2009a; CRT, 2009b). Esta pérdida de mercado se vio afectada por bebidas apócrifas ofrecidas por el sector informal en México y el extranjero. Sin embargo, a partir del 2004 el comercio de agave nuevamente se recuperó, ya que durante el 2008 se obtuvieron 1,125.1 ton, un total de 35 millones de plantas con peso promedio de 30 kg y un consumo de 100% dado por la exportación a Estados Unidos y la Unión Europea como principales importadores (CRT, 2009a). Actualmente se reporta un decremento (Figura 1.1) en los últimos 4 años a causa de los problemas económicos que enfrentan los países a los que exporta.

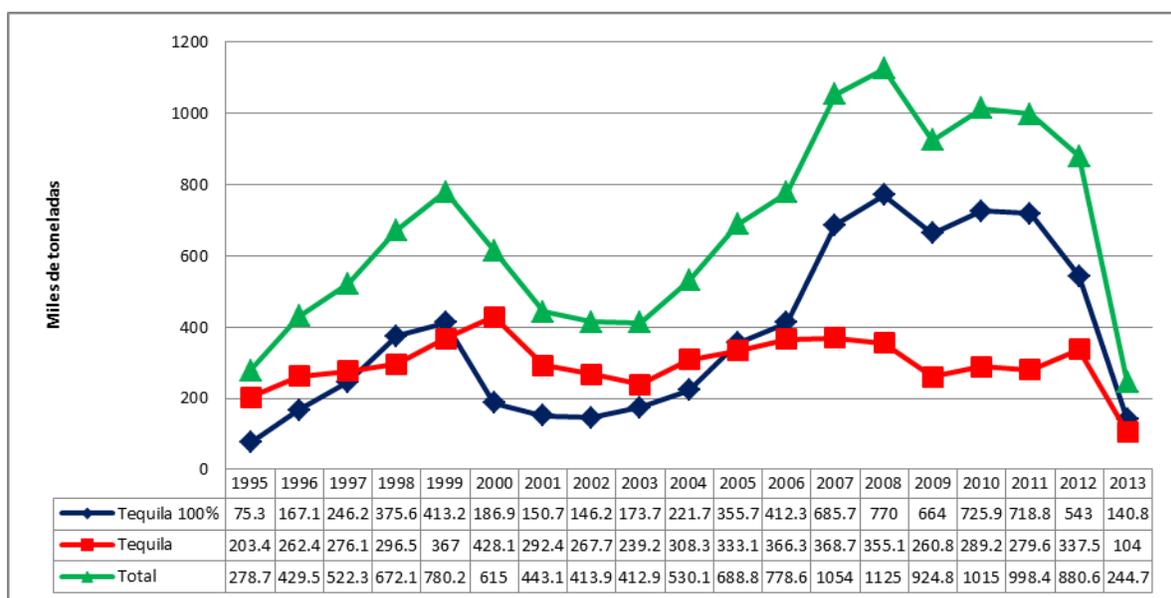


Figura 1.1. Consumo de agave para tequila, tequila 100 % y total de agave (en miles de toneladas) (CRT, 2013a).

1.3. Estadísticas de la bebida tequila

Jalisco es el principal estado productor de tequila que cubre un 99 % del total de la producción con 309, 237,841 litros de tequila, seguido de Guanajuato con 2, 794,852 litros; Michoacán con 70,052 litros, Tamaulipas con 37,785 litros, y Nayarit con 7,784 litros. En el año 2008 México exportó 138.4 millones de litros a más de 100 países, de un total de 312.1 millones de litros de tequila (CRT, 2009a; CRT, 2008c) (Figura 1.2). De esta producción 102.2 millones de litros fueron tequila y sólo 36.2 millones de litros

fue tequila 100 %. Se exportaron 80.2 millones de litros de tequila a granel y 58.2 millones de litros envasado. En 2008 el país exportó a Estados Unidos de Norteamérica 106.4 millones de litros de tequila envasado y a granel (CRT, 2009a; CRT, 2008c). Hasta octubre de 2009 se tenían registradas 149 empresas certificadas con actividad exportadora (CRT, 2009a).

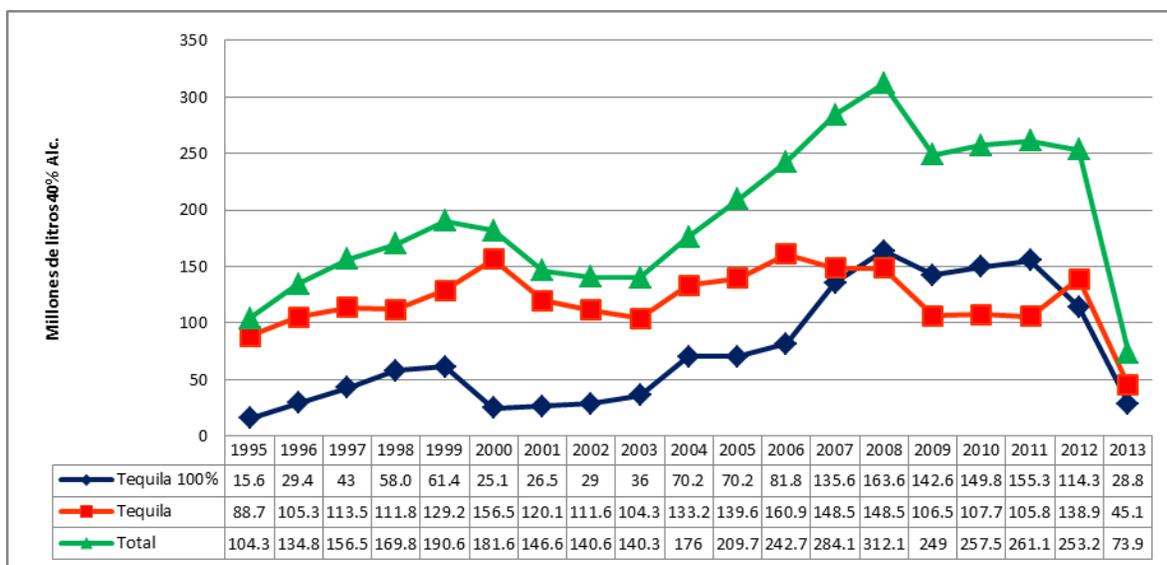


Figura 1. 2. Producción anual de tequila, tequila 100 % y total (en millones de litros en alcohol 40%) (CRT, 2013a).

A pesar del crecimiento en los últimos años de la producción de agave y de tequila, existen factores que afectan el comportamiento de la cadena productiva agave-tequila, como la baja en el mercado del tequila por bebidas apócrifas ofrecidas por el sector informal en México y el extranjero, abandono de plantaciones cultivo por la caída de precios y posterior escasez de agave en los años 2000-2003 y la proliferación de problemas fitosanitarios (CRT, 2009a). En materia de fitosanidad no existe una zona libre al 100 %. Las plantas cultivadas en las zonas de la Ciénega, Centro y Tequila, en el estado de Jalisco, tuvieron en 2008, valores mayores a 40 % de síntomas de enfermedad, siendo la pudrición de tallo o cogollo el principal problema fitosanitario (CRT, 2008c). Con la creación del CRT, se iniciaron los inventarios de agave, se incorporó personal capacitado, se fortaleció la protección a la DOT y el desarrollo de proyectos de investigación sobre el cultivo agronómico del agave, tanto en campo como en la industria para el desarrollo de la cadena productiva agave-tequila.

1.4. Plagas del agave tequilero

El agave como cualquier otro cultivo presenta plagas que afectan directa o indirectamente su calidad dependiendo del estado fenológico de la planta, inóculo e individuos presentes (CRT, 2005). Algunas plagas no sólo causan daños directos a las plantas, sino que además favorecen la entrada de organismos fitopatógenos que acentúan las pérdidas económicas (CRT, 1999; Hernández *et al.*, 2005). Entre estas plagas se tienen insectos que pueden afectar el área de la raíz, o las pencas. De las plagas que afectan a la raíz se reportan diversas especies de los géneros de gallinas ciegas como *Cyclocephala*, *Anomala* y *Phyllophaga* (Lugo, 2007). Respecto a los insectos que dañan el tallo se encuentran el escarabajo rinoceronte *Strategus aloeus*, el picudo del agave *Scyphophorus acupunctatus*, el cerambicido del agave *Acanthoderes funeraria*, el barrenador de pencas *Agathymus rethon* y el gusano blanco del agave *Aegiale hesperiaris* (González *et al.*, 2007). El grupo de plagas que incluye especies que se alimentan del follaje generalmente son consideradas plagas secundarias, como el piojo harinoso *Pseudococcus* sp., la escama armada *Acutaspis agavis*, la chinche del agave *Caulatops agavis* y varias especies de chapulines de la familia Acrididae y Tettigonidae (González, *et al.*, 2007; Pérez y Rubio, 2007).

Otro tipo de plagas son los patógenos que ocasionan diversos síntomas en el cultivo como la mancha gris *Cercospora*, sp., mancha anular *Didymosphaeria* sp., marchitez del agave asociada a *Fusarium* spp., y la pudrición del cogollo, la cual se ha relacionado con bacterias como *Erwinia carotovora* y *Pseudomonas* (Aquino *et al.*, 2006; Rubio, 2007). Además de los estudios realizados en hongos y bacterias en agaves existe el grupo de los nematodos con especies fitopatógenas o transmisoras de enfermedades, en este caso Bruner (1963, citado por Luna, 2001) menciona y describe a varios nematodos de los géneros *Helicotylenchus*, *Pratylenchus*, *Tylenchorhynchus*, *Hoplolaimus*, *Xiphinema*, *Criconemoides* y *Hemicriconemoides* que atacan al maguey pulquero *A. atrovirens*.

1.4.1. La marchitez del agave

En 1987 el cultivo presentó un problema fitosanitario que alertó a los agricultores. Las hojas de las plantas mostraban un enrollamiento anormal, seguido de una necrosis regresiva, posteriormente secamiento total de las hojas y finalmente la muerte de la planta; el nombre que se le dio a esta enfermedad fue “marchitez del agave” y/o “tristeza y muerte del agave” (Fucikovsky, 2000). Luna-Hernández (1996), Virgen-Calleros (2000) y Fucikovsky-Zak (2000), reportaron a *Fusarium oxysporum* y *Thielaviopsis paradoxa* como agentes causales de la marchitez del agave. *Fusarium oxysporum*, *F. solani* y *F. moniliforme* han sido aislados repetidamente de tallos de plantas de agave tequilero con el mismo síntoma (Loera, 2000; Castañeda, 2002). Esta enfermedad se ha reportado en 11 municipios productores de agave tequilero en los Altos y Centro del Estado de Jalisco (Aceves, 2003). Los censos de planta y condición fitosanitaria de la misma, realizados por el CRT (CRT, 2010) durante 2006, 2007 y 2008, reportan a la marchitez del agave como la de mayor incidencia en el estado de Jalisco y la de mayor importancia (Figura 2).

Aunque esta enfermedad fue inicialmente observada en plantaciones de agave mayores de 3 años, actualmente se le encuentra en plantaciones de un año. En plantaciones nuevas el síntoma es el característico “clavo” (Rubio, 2007).

En general, en casi cualquier planta de agave de la cual se tomen algunas muestras de raíz, se aislará a *Fusarium* spp., pese a que la planta no manifieste síntomas, esto se debe a que el hongo es habitante natural del suelo, además de ser parasito facultativo, puede sobrevivir en materia orgánica sin que haya un hospedante establecido (Timmer, 1982). Es probable que este hongo penetre a las raíces del agave a través de heridas. Con el incremento de la marchitez, las hojas se encarrujan y se secan, en estado avanzado de la enfermedad, la planta se desprende fácilmente (Jones *et al.*, 1989; citado por Rubio, 2007).

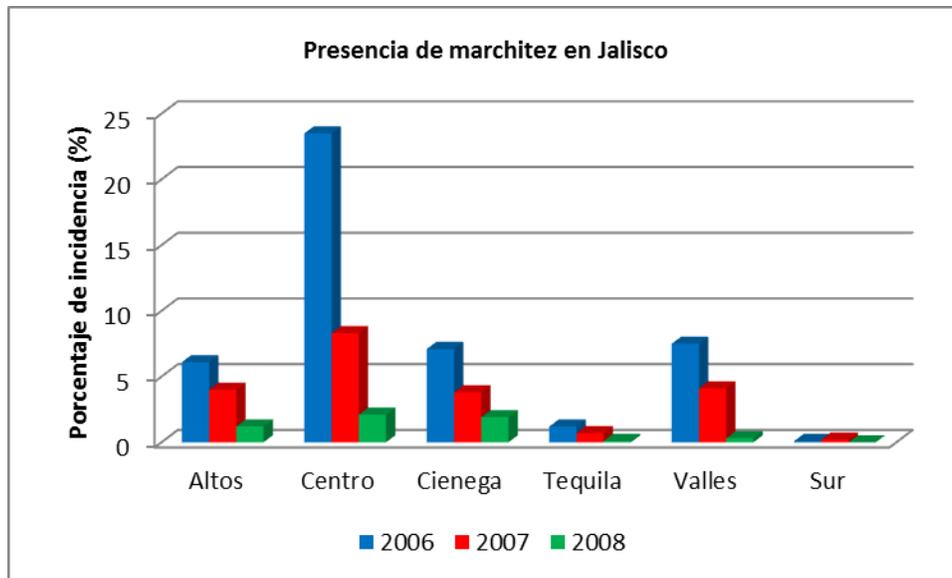


Figura 2. Incidencia de marchitez del agave en las diferentes zonas productoras del estado de Jalisco durante los ciclos 2006, 2007 y 2008 (CRT, 2010).

Es importante conocer los factores principales con capacidad para inducir la marchitez en las plantas, para saber qué métodos o prácticas pueden ser considerados en la prevención de la enfermedad, con la finalidad de reducir la incidencia, buscando no eliminar la densidad de propágulos de *Fusarium* spp., de los suelos donde se cultive agave, sino reducirlos a niveles donde los daños sean menores pero que no lleguen a provocar la muerte de la planta antes de la jima y el impacto económico en la producción del cultivo no sea trascendental (Rubio, 2007).

Algunos de los factores que favorecen el desarrollo de estos fitopatógenos son la presencia insectos que dañan las raíces, excesiva fertilización nitrogenada y alta humedad y temperatura del suelo (González, 2000).

El conocimiento de los síntomas, causas y mecanismos de desarrollo de una enfermedad es muy interesante y científicamente justificado, pero lo más importante de todo es conocer los métodos de prevención y manejo de enfermedades. Los métodos de control varían considerablemente de una enfermedad a otra, dependiendo del fitopatógeno, el hospedante y la interacción de los dos, e inclusive del medio ambiente (Luna, 1998). La agricultura moderna intensiva ha dado como resultado el uso indiscriminado de agroquímicos, la compactación del suelo, o de prácticas de

monocultivo, lo que ha reducido en forma general la diversidad y el equilibrio de microorganismos en el suelo (Conrad, 2007).

Para el caso de la marchitez, es poco útil el uso de fungicidas con base en cobre, debido principalmente a que el problema se presenta en raíz y no en follaje. Aunque se observó efectividad del sulfato de cobre pentahidratado contra *Fusarium* spp., en pruebas de laboratorio, cuando ataca raíz es difícil que alcance la concentración necesaria para afectar a este hongo (Soltero, 2002). Otro aspecto a considerar es que el cobre es un elemento que en concentraciones altas es inhibidor de la emisión de raíces nuevas, se emplea en algunos viveros para dirigir las raíces a un mismo punto dentro del cepellón.

1.4.2 Estrategias de manejo para reducir la incidencia de marchitez del agave

Prevenir es mejor que curar, esta aseveración indica que la mayoría de los problemas fitosanitarios deben entrar dentro del manejo integrado del cultivo. El manejo del mismo requiere de la implementación de acciones que prevengan o favorezcan la tolerancia de las plantas de agave a diversas situaciones de estrés a las que estén sometidas, entre ellas la marchitez. Las prácticas más efectivas incluyen las siguientes: a) Adecuada elección de terreno para plantación como evitar establecer plantaciones en sitios con heladas o alta humedad relativa, así como suelos compactos y drenaje deficiente. Sobre todo si hay antecedentes de incidencia de enfermedades en ciclos anteriores. b) Preparación del terreno; plantación en el lomo de la cama en curvas de nivel para evitar encharcamientos, favorece el drenaje en el periodo de lluvias o bien la retención de la humedad en épocas de secas. c) Selección de plantas sanas para plantación, los hijuelos para nuevas plantaciones de agave deben provenir de planta madre sana y vigorosa, de 3 a 4 años de edad. Una de las alternativas a la del uso de hijuelos es la micropropagación o propagación *in vitro*, que tienen la ventaja de producir grandes cantidades de plantas en espacios relativamente reducidos todo el año; esto permite controlar la condición sanitaria de las plantas y constituir grupos de plantas de la misma edad para su manejo agrícola (Vicente y del Real, 2007). d) En el arranque de hijuelos la prevención de enfermedades, mediante la desinfestación de las

herramientas juega un papel primordial, así como la clasificación de los mismos. e) Fecha de plantación. La plantación del agave se ubica entre el 15 de febrero y el 15 de junio, pudiendo prolongarse en algunas zonas hasta el 15 de julio. Un estudio realizado en zona Altos, con tres fechas de plantación, tres densidades y tres calibres de hijuelos, reportó que las plantaciones en septiembre y octubre deben evitarse, pues la incidencia de marchitez y enfermedades en general es elevada ya que es la época de mayor humedad del suelo y ambiental. f) Método de plantación. El tipo de suelo determina si la plantación se hace en seco o en húmedo; cuando se trata de plantaciones en temporal, es conveniente realizar las plantaciones en los suelos arcillosos pesados y cerrar en los suelos medio o ligeros con buen drenaje. Si la plantación es de riego, en suelos arcillosos pesados se planta después de regar y se espera a que el terreno esté en un punto adecuado de humedad. En suelos medios o ligeros con buen drenaje, se planta y luego se riega. g) Fertilización y enmiendas. La fertilización balanceada por prescripción, sustentada en los análisis de suelo y material vegetal fortalece a la planta contra las enfermedades. La fertilización unilateral y en exceso de nitrógeno fomenta la incidencia de enfermedades, especialmente si se emplean solo fuentes de nitrógeno amoniacal como la urea y el sulfato de amonio. h) Manejo de plagas. Para el caso de malezas es importante evitar el uso de herbicidas no selectivos como el glifosato y el glufosinato, en todo caso realizar aplicaciones dirigidas y con mucha precaución. Dado que los suelos desnudos son susceptibles a la erosión, el uso de cubierta vegetal entre las hileras de agave es una buena opción (Uvalle-Bueno *et al.*, 2007; Vicente y Del Real, 2007; CRT, 2005).

Respecto a plagas insectiles se ha reportado que los predios de agave que tuvieron cultivo de maíz presentan altos niveles poblacionales de gallina ciega, y con ello incidencia de marchitez, por lo que prácticas culturales como el barbecho, y la aplicación racional de insecticidas o el uso de agentes de control biológico (entomopatógenos), reducen la densidad de población de la gallina ciega.

No menos importante es el picudo del agave *Scyphophorus acupunctatus*, ya que tanto los adultos como sus larvas también ocasiona lesiones en varias partes de la planta y que son puntos de entrada para fitopatógenos como *Fusarium* spp. Este picudo presenta altos niveles poblacionales de mayo a octubre, para lo cual el trampeo con

feromonas de agregación, uso de insecticidas y agentes de control biológico (hongos entomopatógenos y nematodos) pueden ser efectivos para reducir las densidades de población de esta plaga (Uvalle-Bueno *et al.*, 2007; Angelina-Baños, 2006; Molina-Ochoa, 2006).

Una de las alternativas sustentables para reducir las densidades de población para la mayoría de los patógenos que afectan las raíces de plantas son los agentes biológicos como *Trichoderma* spp., y *Bacillus subtilis*, los cuales pueden competir por espacio y nutrientes en el área de la rizósfera de varios cultivos e inducir suelos supresivos que permitan la convivencia entre el hospedante y las poblaciones microbianas (Steinberg *et al.* 2007).

1.4.2.1 *Trichoderma* spp., como agentes de control biológico en patógenos que afectan la rizósfera

El potencial de las especies de *Trichoderma* spp., como agentes de control biológico de enfermedades en plantas se reconoció a principios de 1930 y en los siguientes años, se siguió reportando el control de varias enfermedades (Howell, 2002; Metcalf and Wilson, 2001; Harman, 2000; Kapat *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1996; Chet, 1987). Esto culminó con la producción comercial de diversas especies de *Trichoderma* para mejorar la protección y crecimiento de varios cultivos en Estados Unidos (MsSpadden and Fravel, 2002), así como en la India, Israel, Nueva Zelanda y Suecia (Howell, 2002). Uno de los aspectos más interesantes del control biológico es el estudio de los mecanismos empleados por los agentes de control para llevar a cabo la regulación de organismos patogénicos.

Micoparasitismo y producción de antibióticos (toxinas)

Una de las características sobresalientes de las especies de *Trichoderma* es su habilidad de parasitar otros hongos. Weindling (1934; 1932) describió en detalle el micoparasitismo de *T. lignorum* en plántulas de cítricos con ahogamiento ocasionado por *Rhizoctonia solani*, incluyendo el enrollamiento alrededor de las hifas del patógeno,

penetración y subsecuente disolución del citoplasma del hospedante. Dos años más tarde también reportó que *T. lignorum* producía la toxina gliotoxina que actuaba sobre *R. solani* y *Sclerotinia americana*; posteriormente se demostró que la especie que trabajó fue *Gliocladium virens*, renombrada después como *T. virens* (Howell, 2002; Kubicek-Pranz, 1998; Lumsden *et al.*, 1992).

Competencia

La competencia en la rizósfera es importante porque un agente de biocontrol no puede competir por espacio y nutrientes si no le es posible crecer en la rizósfera. *Trichoderma koningii* es un colonizador excelente de las raíces pero tiene poca o nula actividad de biocontrol contra *R. solani* en plántulas de algodón (Zhang *et al.*, 2009; Howell, 2003). Un concepto asociado a la competencia en la rizósfera es la sustitución de hongos endógenos sobre la superficie de las raíces (Howell, 2003).

Enzimas

Investigaciones respecto a los posibles mecanismos involucrados en el control biológico por especies de *Trichoderma*, dilucidan varias alternativas que explican el éxito del biocontrol. Una idea es que las enzimas tales como quitinasas y/o glucanasas producidas por los agentes de biocontrol son responsables en la supresión de los patógenos de plantas. La función de estas enzimas a través de la degradación de polisacáridos como quitina, y β -glucanas que son responsables de la rigidez de las paredes celulares, destruyendo así la integridad de la misma. Metcalf y Wilson (2001) describieron la colonización de raíces de cebolla infectadas con *Sclerotium cepivorum* por *T. koningii* (Tr5). La hifa del agente de biocontrol penetra dentro del tejido cortical y epidermal infectado de la raíz para destruir la hifa del patógeno, con daño mínimo o nulo hacia el tejido sano de la cebolla. Los autores atribuyen este fenómeno de biocontrol a la producción de endo- y exo-quitinasas por *T. koningii*. Elad y Kapat (1999), sugirieron que el biocontrol de *Botrytis cinerea* por *T. harzianum* (T39) puede llevarse a cabo, en parte, por la acción de proteasas producidas por *T. harzianum* que

inactivan las enzimas hidrolíticas producidas por *B. cinerea* sobre hojas de frijol. Las proteasas degradan las enzimas hidrolíticas dentro de la cadena de péptidos y/o sus aminoácidos constituidos y de esta manera destruyen su capacidad para actuar sobre las células vegetales. La producción de proteasas por *T. harzianum* se reportó como el mecanismo a través del cual este organismo actúa sobre *Meloidogyne javanica* que parasita plantas de tomate. Sharon *et al.* (2001) demostraron que plantas de tomate tratadas con *T. harzianum* (T-203) y cultivadas en suelo infestado con este nematodo reportaron una reducción drástica de agallamiento al ser comparadas con el testigo.

El concepto de biosíntesis enzimática como un mecanismo de biocontrol se consideró hacia la inclusión del sinergismo entre enzimas y antibióticos. Di Pietro *et al.* (1993) estudiaron los efectos de sinergismo de endoquitinasas y gliotoxina sobre la germinación de conidios de *B. cinerea*. Ellos encontraron que el tratamiento con la combinación sobre los conidios de *B. cinerea* fue más efectiva que el tratamiento solo con la enzima o la toxina. Schirmbock *et al.* (1994) observaron un efecto similar sobre la germinación de conidios y elongación hifal de *B. cinerea* cuando el hongo fue tratado con una combinación de enzimas hidrolíticas y peptibolos producidos por *T. harzianum* (ATCC36042). Ninguna de las enzimas ni antibiótico por separado fueron efectivos como la combinación de ambos. Lorito *et al.* (1996) ampliaron este concepto por la combinación de compuestos antifungales con varios tipos de enzimas hidrolíticas y aplicándolas sobre propágulos de *B. cinerea* y *Fusarium oxysporum*. El sinergismo ocurrió en todos los casos, pero esto dependió del nivel de actividad antifungal de la enzima. El fenómeno fue menor cuando la enzima fue adicionada después del compuesto antifungal, indicando que la degradación de la pared celular fue necesaria para establecer la interacción.

Promotor de crecimiento en las plantas

La actividad como promotor de crecimiento se ha reportado en suelos tratados con algunas especies de *Trichoderma* lo que podría significar un beneficio adicional por encima en el control de la enfermedad (Lindsay y Baker, 1967). Lo anterior ha incrementado la atención hacia el uso de estos hongos en la producción comercial de

cultivos. El efecto podría ser más importante respecto a la promoción del crecimiento de raíces, aun cuando no es usual detectar otros factores de crecimiento como el engrosamiento en tallo y longitud del mismo, área foliar, contenido de clorofila y rendimiento (tamaño y/o número de flores o frutos) (Lorito *et al.*, 2010; Hartman *et al.*, 2004). Los mecanismos que apoyan este efecto benéfico no están claros e incluyen el aumento de nutrientes disponibles y la absorción por parte de la planta (Lorito *et al.*, 2010; Altomare *et al.*, 1999), así como la participación de fitohormonas de crecimiento tanto de la planta como del hongo (Vinale *et al.*, 2008). Estos procesos de requerimiento de energía, como el aumento de crecimiento, estimulan la respiración de la planta lo que mejora eficiencia fotosintética (Shoresh *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) demostraron que la inoculación de raíces de 7 días de edad de plántulas de pepino en un sistema hidropónico aséptico con esporas de *T. harzianum* (T-203) a una concentración final de 10^5 por mL inició respuestas de defensa en raíces y hojas de plantas tratadas. Ellos encontraron que las hifas del hongo de biocontrol penetró la epidermis y el cortex superior de la raíz de pepino. La respuesta de la planta fue marcada por un incremento en la actividad de la peroxidasa (con frecuencia asociada con la producción de compuestos fungitóxicos), un incremento en la actividad de quitinasa y la deposición de engrosamientos en la pared celular. El incremento en la actividad enzimática se observó tanto en hojas como en raíces. De manera interesante, la defensa de la planta se debilitó con el tiempo e inicio una relación semejante a la simbiótica de las micorrizas. Posteriormente Yedidia *et al.* (1999) mostraron que la inoculación de raíces de pepino con *T. harzianum* (T-203) indujo una diversidad de proteínas relacionadas con la patogénesis, incluyendo un número de enzimas hidrolíticas. Las plantas tratadas con un inductor químico de resistencia a enfermedad (ácido 2,6- dicloroisonicotínico) que dispara la respuesta de defensa fueron similares a las plantas inoculadas con el agente de biocontrol.

En otro estudio, Howell *et al.* (2000) demostraron que el tratamiento de semillas de algodón con preparados de *T. virens* (G-6, G-11, G6-5) o la aplicación de filtrados de *T. virens* a la radícula de plántulas de algodón indujo la síntesis de concentraciones más elevadas de los terpenoides desoxyhemigossypol (dHG), hemigossypol (HG), y gossypol (G) que las del testigo. El gossypol (G) fue tóxico solo a niveles altos, pero las rutas intermedias dHG y Hg a concentraciones bajas fueron inhibitorios a *R. solani* en plántulas de algodón. La actividad de biocontrol contra *R. solani* fue correlacionada con la inducción de síntesis de terpenoides en las raíces de algodón por especies de *Trichoderma*. Adicional a la síntesis de terpenoides, las raíces de algodón tratadas con *T. virens* también indujeron niveles elevados de actividad de peroxidasa que no se encontraron en el testigo. La actividad de la peroxidasa y los niveles de terpenoides en hipocotilos de plántulas no fueron significativamente diferentes de aquellos encontrados en el testigo. En este caso, la respuesta de defensa de la planta se confirmó en el sistema radical.

La inducción de resistencia sistémica o localizada ocurre en todas o en la mayoría de las plantas en respuesta al ataque de microorganismos patogénicos, daños físicos ocasionados por insectos u otros factores, tratamiento con varios inductores químicos y la presencia de rizobacterias (Kuc, 2001; Oostendorp *et al.*, 2001). En muchos casos, el ácido salicílico o jasmónico, junto con el etileno u el óxido nitroso, inducen una cascada de eventos que permiten la producción de una variedad de metabolitos y proteínas con diversas funciones (Hammerschmid *et al.*, 2001; van Loon *et al.*, 1998).

Redefinición de *Trichoderma* spp., como endófitos simbiotes de plantas

Algunas razas de *Trichoderma*, descritas como competentes de la rizosfera (Ahmad y Baker, 1987) y usadas para desarrollo comercial, causan infecciones asintomáticas de raíces, donde la colonización de los hongos está limitada a la región cortical externa (Yedidia *et al.*, 1999). Esta interacción íntima con la planta provee varios beneficios reconocidos recientemente como por ejemplo: a) incrementan la resistencia de la planta a varios estrés bióticos a través de la inducción de la resistencia sistémica adquirida y a estreses abióticos tales como la deficiencia o exceso de agua, salinidad

alta, y temperaturas extremas; b) mejoran la eficiencia en el uso del nitrógeno al aumentar los mecanismos de asimilación y reducción de nitrógeno; y 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).

1.4.2.2 Uso de *Bacillus* spp., como agentes de biocontrol en patógenos que afectan las raíces

Existe un gran número de bacterias que se han descubierto como posibles agentes de control. Las Enterobacteriaceas, habitantes de la rizosfera, generan condiciones ácidas, inducen mecanismos de defensa en la planta y sintetizan compuestos antimicrobiales. Dentro de este grupo, destaca *Bacillus* como productor de antibióticos con características antifúngicas, además de que el género *Bacillus* está considerado como promotor del crecimiento con potencial para incrementar el rendimiento en las plantas. Varias especies de *Bacillus* han sido objeto de investigaciones para su implementación como agentes de control biológico debido a sus características de alta capacidad de colonización de la raíz y de supervivencia que le confieren las esporas. Actualmente *Bacillus subtilis* se distribuye comercialmente como agente de control de hongos fitopatógenos. (Kloepper *et al.*, 1992; Van Veen *et al.*, 1997); es un grupo de bacterias que se encuentran en diversos nichos ecológicos incluyendo el suelo, agua y aire (Pang *et al.*, 1998). Estas bacterias producen endosporas las cuales permiten ser resistente a condiciones ambientales desfavorables y sobrevivir por periodos prolongados en un rango amplio de temperatura, lo que hizo posible el desarrollo de formulaciones comerciales y su liberación (Zhang *et al.*, 2009; Collins y Jacobsen, 2003). Diversos estudios han demostrado su eficacia en el control de pudriciones de raíz como las ocasionadas por *Phoma* sp. en chícharo (Ryder *et al.*, 1999), marchitez por *Fusarium* spp. de tomate y la pudrición de raíces de trigo por *Rhizoctonia* (Zhang *et al.*, 2009). Algunos de los estudios también reportaron a razas de *B. subtilis* como promotoras de crecimiento (Zhang *et al.*, 2009; Ryder *et al.*, 1999).

Bacillus subtilis se ha investigado ampliamente debido a su alta capacidad de inhibición de fitopatógenos. El tratamiento bacteriano de semillas de cacahuate, fue fundamental

en el desarrollo del primer producto a base de una bacteria supresora de enfermedades en los E.U. El producto contiene a *B. subtilis* y fue registrado en 1988 por Gustafson Inc., como “Quantum 400” y “Kodiak”. Las bacterias colonizan el sistema radicular de la semilla recién emergida, compitiendo con los microorganismos, principalmente hongos fitopatógenos que atacan a las raíces. Conforme la raíz se desarrolla y madura, el bacilo se distribuye con ésta (Lara, 2000).

En 1990 había más de 4 millones de hectáreas de algodón tratadas con este producto. Actualmente existen otros productos comerciales a base de esta especie que son utilizados en el control de bacterias y hongos en los cultivos de papa, maíz, algunas legumbres y plantas de ornato (Lara, 2000). También se sugirió que el tratamiento con *B. subtilis* tiene un efecto en los mecanismos de resistencia de la plántula, ya que en semillas de chícharo infectadas con *Fusarium udum* y tratadas con la bacterias se incrementó la cantidad de PAL (fenil alanina amonio liasa) y la actividad de la peroxidasa (Podile y Laxmi, 1998).

1.5 LITERATURA CITADA

- Aceves, R. J. J. 2003. Prevención y Manejo Integral de la Marchitez de *Agave tequila* Weber. Var. Azul en Jalisco. Folleto Técnico No. 1. Campo Experimentales Centro Altos de Jalisco, INIFAP. 62 p.
- Angelina-Baños, R., González-Hernández, H., Morón-Ríos, M., y Del Real, L. I. 2006. Complejo gallina ciega (Coleoptera: Melolonthidae), en *Agave tequilana* Weber var. Azul, en Tepatitlán, Jalisco. México.
- Aquino, B. T., Ruiz, V. J., & Iparraguirre, C. M. 2006. Biological control of the black weevil (*Scyphophorus interstitialis* Gyllenhal) with entomophagous nematodes and fungi in agave in Oaxaca, México. *Revista Científica UDO Agrícola* 6: 92-101.
- Altomare, C., Norvelli, W. A., Björkman, T. and Harman, G. E. 1999. Solubilization of Phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2926-2933.

- Bravo, M. E., Rojas J., H. Espinosa P. & P. López L. 2007. Evaluación de atrayentes para la captura de *Scyphophorus interstitialis* Gyllh. pp:10-14. *Rev. Agroproduce*. Fundación Produce Oaxaca A. C.
- Castañeda-Vázquez, H. 2002. Aislamiento e identificación de los microorganismos responsables de la marchitez de agave tequilero. pp 21-24. *In* Flores López, H. E. (ed). Análisis agroecológico del *Agave tequilana* Weber var. Azul con énfasis en problemas fitosanitarios en Jalisco, INIFAP-CIRPAC. E. Altos de Jalisco, Publicación especial No. Tepatitlán, Jalisco, México.
- 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.
- Chet, I. 1987. *Trichoderma* - application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. Pages 137-160 *Innovative Approaches to Plant Disease Control*, I. Chet, ed. John Wiley & Sons: New York.
- Conrad, R. 2007. Soil microbial communities and global climate change-methanogenic communities as paradigms. In: *Modern soil microbiology*. Edited by Van Elsas, J.D., Jansson, J.K. and Trevors, J. T. Second edition. CRPress, New York. 263-282.
- Collins, D. P. and Jacobsen, B. J. 2003. Optimizing a *Bacillus subtilis* isolate for biocontrol of sugar beet cercospora leaf spot. *Biol. Control* 26:153-161
- CRT (Consejo Regulador del Tequila) 1999. Avances en la investigación científica del Agave tequilana Weber variedad azul. P: 6-7. *En*: Bernache P., F. y A. Avalos, C. (Eds). El agave, Gaceta Informativa. Año 1. No. 2. Unión Agrícola Regional de Mezcal Tequilero del Estado de Jalisco. Guadajara, Jalisco, México.
- CRT (Consejo Regulador del Tequila) 2008c. Informe de las principales actividades enero- diciembre de 2008. Disponible en: <http://www.crt.org.mx>. Consulta 14 de febrero 2013.
- CRT (Consejo Regulador del Tequila) 2008d. Capturar, proteger el valor intangible utilizando la propiedad intelectual. Disponible en: <http://www.crt.org.mx>. Consulta 21 de febrero 2013.

- CRT (Consejo Regulador del Tequila) 2008e. Inventario general de *Agave tequilana* Weber var. Azul dentro del territorio protegido por la Denominación de Origen del Tequila. Disponible en: <http://www.crt.org.mx>. Consulta 25 de febrero 2013.
- CRT (Consejo Regulador del Tequila). 2005. Plagas y enfermedades del *Agave tequilana* Weber var Azul. Ed. Pandora. Impreso en México. 123 p.
- CRT (Consejo Regulador del Tequila). 2009a. Innovación y Desarrollo Tecnológico para el Crecimiento Sustentable de la Cadena Productiva Agave-Tequila. Seminario Internacional sobre Indicaciones Geográficas. Noviembre 5 - 6, 2009 Zapopan, Jalisco, Méx. Disponible en: <http://www.crt.org.mx>. Consulta: 26 de febrero de 2013.
- CRT (Consejo Regulador del Tequila). 2009b. Creación y uso de las denominaciones de origen e indicaciones geográficas en el sector agroindustrial. Disponible en: <http://www.crt.org.mx>. Consulta : 28 de febrero del 2013.
- CRT (Consejo Regulador del Tequila). 2009c. La certificación del tequila. Denominaciones de origen en México. Disponible en: <http://www.crt.org.mx>. Consulta: 10 de abril 2013.
- CRT (Consejo Regulador del Tequila). 2009d. Innovación y Desarrollo Tecnológico para el crecimiento sustentables de la cadena productiva Agave-Tequila Seminario Internacional sobre indicaciones Geográficas. Noviembre 5-6, 2009. Zapopan , Jalisco, Méx. Disponible en: <http://www.crt.org.mx>. Consulta 14 de Abril de 2013
- CRT (Consejo Regulador del Tequila). 2010. Actualización de la base de datos y diagnóstico fitosanitario: *Agave tequilana* Weber Var. Azul. Comité técnico agronómico-Subcomite de fitosanidad. Consejo Regulador del Tequila (CRT). 10p.
- CRT (Consejo Regulador del Tequila). 2013. Consejo Regulador del Tequila. Información Estadística. <http://www.crt.org.mx/EstadisticasCRTweb>. Fecha de consulta: 2 de septiembre de 2013.
- Elad, Y. and Kapat, A. 1999. The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*. 105:177–189

- Fucikovsky, L.Z. 2000. La tristeza y muerte de *Agave tequilana* Weber var. Azul (TMA) y los microorganismos e insectos importantes relacionados. pp: 90. In: Memorias del XXVII Congreso Nacional de Ftopatología. Puerto Vallarta, Jalisco, México. Del 9 al 13 de julio del 2000.
- Fucikovsky-Zak. 2001. Tristeza and death of Agave tequila Weber, var .azul. Ed. De Boer, S.H., In: Plant Pathogenic Bacteria. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Boston, London. 454 p.
- García-Coapio, G. 2009. Sistema de trampeo con feromona de agregación y volátiles vegetales para el picudo del agave, *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae). Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 75 p.
- Gentry, H. S. 1982. Agaves of Continental North America. University of Arizona Press. Tucson, U.S.A. p. 669.
- González, A.A. 2000. Enfermedades del Cultivo del Agave. Consejo Regulador del Tequila. Guadalajara, Jal. México. 21 pp.
- González Hernández, H., Del Real Laborde, J.I., y Solís Aguilar, J.F. 2007. Manejo de plagas del agave tequilero. Colegio de Posgraduados y Tequila Sauza, S.A. de C.V. 123 p.
- Hammerschmid, R., Metraux, J. P. and van Loon, L. C. 2001. Inducing resistance: a summary of papers presented at the First international Symposium on induced Resistance to Plant Diseases. Eur. J. Plant Pathol. 107:1-6.
- Harman, G.E. 2000. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum*. Plant Dis. 84: 377-993
- Harman. G. E. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. Phytoapthology 96:190-194.
- Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M., 2004. *Trichoderma* Species-opportunistic, a virulent plant symbionts. Nat. Rev. Microbiol. 2:43–56.
- Hernández-García, E., Uvalle B., J. X., Vélez, G. C., Rubio, C. R., Salamanca, C. M. y del Real, L. J. I. 2005. Plagas y enfermedades del *Agave tequilana* Weber Var. Azul. Consejo Regulador del Tequila, A. C. 111 p.

- Howell, C.R., L.E. Hanson, R.D. Stipanovic, and L.S. Puckhaber. 2000. Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. *Phytopathology* 90:248-252.
- Howell, C. R. 2002. Cotton seedling preemergence damping-off incited by *Rhizopus oryzae* and *Pythium* spp., and its biological control with *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 92:177-180.
- Howell, C. R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease* 87: 4-10.
- Kloepper JW, Tuzun S, Kuc J (1992) Proposed definitions related to induced disease resistance. *Biocontrol Sci. Technol* 2:349–351.
- Kuc, J. 2001. Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. *Eur. J. Plant Pathol.* 107: 7-12.
- Kapat, A., Zimand, G., and Elad, Y. 1998. Effect of two isolates of *Trichoderma harzianum* on the activity of hydrolytic enzymes produced by *Botrytis cinerea*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 52:127-137.
- Lara R. J. 2000. Marcaje por recombinación ilegítima con un plásmido integrativo de cepas de *Bacillus subtilis* nativas de la rizosfera y detección por PCR en suelo. Tesis de Doctorado. CINVESTAV-Irapuato, Gto.
- Lindsay DL, y Baker R. 1967 Effect of certain fungi on dwarf tomatoes grown under gnotobiotic conditions. *Phytopathology* 57: 1262-63
- Lorito, M., Woo, S. L., Harman, G. E. and Monte, E. 2010. Translational research on *Trichoderma*: from ómics to the field. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48: 395-417.
- Loera, Q. M. M. 2000. Selección *in Vitro* de *Agave tequilana* Weber var. azul para resistencia a *Fusarium oxysporum*. Tesis de Maestría en Ciencias. Posgrado en Procesos Biotecnológicos. Universidad de Guadalajara.
- Lumsden, R.D., Locke, J. C., Adkins, S.T., Water, J.F. , and Ridout, C.J. 1992. Isolation and localization of the antibiotic gliotoxin produce by *Gliocladium virens* from alginate prill in soil and soilles media. *Phytopathology* 82:230-235
- Luna-H.G.1996. Pudrición de tallo de *Agave tequila* Weber, var.azul en el estado de Jalisco, México. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Chapingo.

- Lugo, G. G. 2007. Determinación de especies de gallina ciega (Coleoptera: Melolonthidae) asociadas al *Agave tequilana* Weber var. Azul en Jalisco, México. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, México. 71
- Luna, H.G. 1998 Hacia un manejo integrado de plagas y recomendaciones prácticas en *Agave tequila*. Editorial Agata y Cheminova. Agro México Guadalajara, Jalisco. 57 p.
- Luna, H. G. 2001. Hacia un manejo integrado de plagas. Fundamentos y recomendaciones prácticas. *Agave tequilana*. 2° ed. Guadalajara, Jal. México. 184 p.
- Martínez, L. E. 1999. Tequila: tradición y destino. Revimundo. México. Valenzuela.
- Z. A. G. 2000. El mundo diverso del agave. In: 100% tequila. Jul-sep. Año 1(4): 22-23.
- Metcalf, D. D., and Wilson, C. R. 2001. The process of antagonism of *Sclerotium cepivorum* in White rot affected onion roots by *Trichoderma koningii*. Plant Pathol. 50:249-257.
- Molina-Ochoa, J. 2006. Susceptibilidad de *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae), a cepas y aislados de nematodos entomopatógenos (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae) Documento interno. División Agrícola. Casa Cuervo, S.A. de C.V.
- Morgan K.T and Timmer, L.W. 1984. Effect of inoculums density, nitrogen source and saprophytic fungi on *Fusarium wil* of Mexican lime. Plant and Soil 89,2003-210
- MsSpadden Garden, B.B., Fravel, D. R. 2002. Biological control of plant pathogens: Research, commercialization, and application in the USA. Plant Health Progress. Online, publication doi:10.1094/php-2002=0510-01-RV.
- NOM-006-SCFI-2005. Bebidas alcohólicas-tequila especificaciones. Nordlung, D.
- A & W. J. Lewis. 1976. Terminology of chemical releasing stimuli in intraspecific and interspecific interactions. *J. Chem. Ecol.* 2: 211-220.
- Nobel, P. S. 1998. Los incomparables agaves y cactus. Editorial Trillas. México, D. F. 211p.
- Oostendorp, M., Kunz, W., Dietrich, B. and Staub, T. 2001. Induced disease resistance in plants by chemicals. *Eur. J. Plant Pathol.* 107: 19-28.

- Pang, L., Close, M., Noonan, M., and Rhodamine, W. T. 1998. *B. subtilis* transport through an alluvial gravel aquifer. *Ground Water* 36:112-122.
- Podile, A.R., and Laxmi, V.D.V. 1998. Seed bacterization with *Bacillus subtilis* AF 1 increases phenylalanine ammonia lyase and reduce the incidence of fusarial wilt in pigeonpea. *Journal of Phytopathology* 146:255-259.
- Rubio C., R. 2007. Enfermedades del cultivo del agave. Pp. 169-195. *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. *Libro Técnico* No. 4. Tepatitlán de Morelos, Jal
- Rubio C., R. 2007. Enfermedades del cultivo del agave. Pp. 169-195. *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. *Libro Técnico* No. 4. Tepatitlán de Morelos, Jal.
- Ryder, M. H., Zhinong, Y., Terrace, T. E., Rovira, R. D., Wunhua, T., Carrell, R. L., Yan, Z., and Tang, W. 1999. Use of strains of *Bacillus* isolate in China to suppress take-all and *Rhizoctonia* root rot, and promote seedling growth of glasshouse-grown wheat in Australian soils. *Soil Biol. Biochem.* 31:19-29.
- Pérez D., J. F. y R. Rubio C. 2007. Tecnología de manejo y control de plagas del agave. P. 135-168 *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
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación) 2010. Disponible en: <http://www.sagarpa.org.mx>. Consulta: (16 de febrero 2013)

- Sharon, E., Bar-Eyal, M., Chet, I., Herra-Estrella, A., Kleifeld, O., and Spiegel, Y. 2001. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 91:687-693.
- SIAP, 2013. Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera. Cierre de producción agrícola por estado. SAGARPA. http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=351. Fecha de consulta: 2 de septiembre de 2013.
- Schirmbock, M., Lorito, M., Wang, Y. L., Hayes, C. K., Arisan-Atac, I., Scala, F., Harman, G. E., and Kubicek, C. P. 1994. Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:4364-4370.
- Shoresh M., Harman, G. E, Mastouri, F. 2010. Induce systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Ann. Rev. Phytopathol.* 48:21-43.
- Soltero-Quintana, R. 2002. Pruebas de patogenicidad del *Fusarium oxysporum* y *Erwinia* sobre plantas de *Agave tequilana* Weber var. Azul in vitro. Pp. 257-321. In: Flores-López, H.E. (ed). Análisis agroecológico del *Agave tequilana* Weber var. Azul con énfasis en problemas fitosanitarios en Jalisco. INIFAP. CIRPAC. C.E. Altos de Jalisco. Publicación especial No. 1. Tepatitlán, Jalisco, México.
- Steinberg, Ch., Edel-Hermann V., Alabouvette C. and Lemanceau Ph. 2007. Soil suppressiveness to plant diseases. In: *Modern soil microbiology*. Edited by Van Elsas, J.D., Jansson, J.K. and Trevors, J. T. Second edition. CRPress, New York. 455-477.
- Uvalle B., J. X. y C. Vélez G. 2007. Nutrición del *Agave tequilero* (*Agave tequilana* Weber var. azul) p .69-88 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 Pacifico Centro
- Van Veen, J. A., Van Oberbeek, L. S . and Van Elsas, J.D. 1997. Fate and activity of microorganisms introduced into soil. *Microbiology Molecular Review* 61:121-135.

- Van Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M. and Pieterse, C. M. J. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36:453-483.
- Vicente R., I., y J.I. Del Real L. 2007. Métodos de propagación del Agave tequila 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.
- Virgen-Calleros, G. 2000. Epidemiología y manejo integrado de problemas fitosanitarios en *Agave tequilana* Weber, var. azul. Departamento de producción agrícola. CUCBA. U de G. Informe técnico para el programa general de apoyo y desarrollo tecnológico a la cadena productiva agave – tequila.
- 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.
- Weindling, R. 1932. *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. *Phytopathology* 22:837-47
- 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.
- Zhang, J.X., Xue, A.G., et Tambong, J.T. 2009. Evaluation of seed and soil treatments with novel *Bacillus subtilis* strains for control of soybean root rots caused by *Fusarium oxysporum* and *F. graminearum*. *Plant Disease*, 93(12) 1317-1323.

CAPITULO DOS

EFECTO DE *Trichoderma* spp. Y *Bacillus subtilis* EN PLÁNTULAS DE *Agave tequilana* WEBER, var. AZUL

EFFECT OF *Trichoderma* spp. AND *Bacillus subtilis* IN SEEDLING FROM *Agave tequilana* WEBER, var. AZUL

Bertha Tlapal Bolaños, Cristian Nava Díaz, Héctor González Hernández, Emma Zavaleta Mejía, Prometeo Sánchez García. Postgrado Fitopatología, Entomología y Nutrición Vegetal. Colegio de Postgraduados Km. 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Edo. De México. CP. 56230. José Ignacio Del Real Laborde, Ramón Rubio Cortes. Área de Investigación de Tequila Sauza S.A. de R.L., rancho "El Indio", Tequila Jalisco. Correo-e: cnava@colpos.mx, navadiaz57@prodigy.net.mx (autor responsable).

2.1 RESUMEN

Un problema fitosanitario en agave *Agave tequilana* var. *Azul*. es la marchitez, provocado por varios organismos en plantaciones de más de 2 años de edad después de trasplante. Entre los posibles agentes causales se reportan a varias especies de *Fusarium* spp. y *Thielaviopsis paradoxa*. En el presente trabajo se planteó el objetivo de introducir organismos benéficos en plantas de agave tequilero obtenidas por el sistema de micropropagación, como manejo preventivo contra esta enfermedad en vivero. Los tratamientos fueron T1: *Trichoderma harzianum* (Th), T2: *T. virens* (Tv), T3: *T. aureoviride* (Ta), T4: *Bacillus subtilis* (Bs), T5: Tv + Bs, T6: Ta + Bs, T7: testigo absoluto (Tabs solo la composta) y T8: testigo regional (Treg composta más tratamiento con Captan en el área de la raíz). Se estableció un diseño en bloques al azar con dos repeticiones, la unidad experimental (UE) consistió de 122 plántulas y 488 por tratamiento; el tamaño mínimo de la muestra comprendió 26 plántulas. Las variables evaluadas fueron altura de planta; unidades formadoras de colonias (UFC) de *Trichoderma*, *Fusarium* y *Bacillus* en sustrato y raíz; niveles de clorofila y carotenos, y área bajo la curva de las variables anteriores (ABC). Se realizaron seis muestreos mensuales, de octubre 2008 a mayo 2009. Los resultados indican que los tratamientos Th, Ta, Bs y Ta+Bs, fueron los que presentaron mayor capacidad de establecimiento, generando un ambiente de supresividad con densidades de *Fusarium* spp., en suelo y raíz que oscilaron entre 2 y 2.5 log (UFC mL⁻¹). No se registraron diferencias significativas en el ABC de *Fusarium* spp., sin embargo, este valor fue menor que la de los antagonistas en suelo Treg con nivel de 120 y Tabs 75.75, el resto osciló por debajo

de 50; en raíces los niveles más altos de ABC de *Fusarium* spp. fueron para el Ta+B_s con 375, el Treg con 262.5 y los valores menores se encontraron en Ta con 105, Tv+B_s con 187.5, B_s con 187.5 y Th con 210. No se observaron diferencias estadísticas en los niveles de contenido de clorofilas, carotenos y alturas.

Palabras clave: marchitez del agave, *Fusarium* spp., antagonismo, supresividad

2.2 ABSTRACT

One of the most important plant pathology problems in two-year of *Agave tequilana* var. Azul plantations, is the agave wilt which have several microorganisms as possible causal agents; among those plant pathogens several species of *Fusarium* and *Thielaviopsis* have been reported. The main goal of this research was to introduce beneficial organisms in agave tequilero plants obtained from a plant tissue culture technique as a preventive control measure in greenhouse conditions. Inoculated treatments were T1: *Trichoderma harzianum* (Th); T2: *T. virens* (Tv); T3: *T. aureoviride* (Ta); T4: *Bacillus subtilis* (B_s); T4, T5: Tv + B_s; T6: Ta + B_s; T6, T7: absolute control (T_{abs}), and T8: regional control (Treg). Treatments were established in a randomized block design with two replications, the experimental unit (EU) consisted of 122 plants; the minimum sample size was 26 plants. Evaluated variables were colony forming units (CFU) of *Trichoderma*, *Fusarium* spp. and *Bacillus* from roots and plant substrate, and plant height, chlorophyll and carotenoids content from plants. Variables were evaluated monthly from October 2008 to May 2009. The area under the curve (AUC) was calculated for each variable. Our results show that microorganism in the Th, Ta, B_s and Ta + B_s treatments colonized agave roots and maintain high levels suppressing *Fusarium* spp. in soil and roots. Under this conditions *Fusarium* density ranged from 2 to 2.5 log (cfu / ml). Analysis of variance did not detect any significant difference among treatments. However, *Fusarium* density on soil (AUC) was higher in treatments T8 Treg (120) and T7 T_{abs} (75.75) compared with the rest of treatments (50 or less). *Fusarium* density on roots was higher on treatments T6 Ta + B (375) and T7 Treg (262.5) compared to T3 Ta (105), T5 Tv + B (187.5), and T1 T4 Th B (210). No significant differences were found on chlorophylls and carotenoids content, and plant heights.

Keywords: suppressive, agave wilt, *Fusarium* spp., antagonism.

2.3 INTRODUCCION

El tequila ha adquirido importancia por la creciente demanda en los mercados nacional e internacional, siendo la actividad de campo un componente importante y decisivo para el abastecimiento de la materia prima, el agave tequilero *Agave tequilana* Weber var. Azul, para la producción de tan importante bebida, el tequila (Pérez y Del Real, 2007). Las plantaciones de agave tequilero dentro de la zona de Denominación de Origen del Tequila (DOT) integran un inventario de 253,033,239 plantas sembradas (CRT, 2010). La cadena agave-tequila ha crecido en forma sostenida durante los últimos años y con un mayor potencial de crecimiento, por lo que se requiere de un abasto sostenido y predecible de materia prima para asegurar su producción (Byerly, 2007).

La Norma Oficial Mexicana para la producción de tequila (NOM-006-SCFI- 2005), especifica la variedad Azul de *Agave tequilana* como la única autorizada para elaborar tequila, lo que implica que los métodos de propagación deben cumplir el requisito, por lo que se desecha la reproducción sexual que traería variación genética o segregación entre las plantas hijas. La reproducción asexual se da a través de la propagación vegetativa, donde los individuos obtenidos mediante este tipo de reproducción, constituyen un clon y estos, a excepción de mutaciones naturales, son genéticamente idénticos a la planta madre (Vicente y Del Real, 2007). Para la propagación de *A. tequilana*, var. Azul, se tienen los métodos de multiplicación asexual siguientes: bulbillos, rizomas (hijuelos) y micropropagación. Este último método tiene la ventaja de producir grandes cantidades de plantas en espacios relativamente reducidos durante todo el año. La propagación *in vitro* permite controlar la condición sanitaria de las plantas a lo largo de su producción y constituir grupos de plantas de la misma edad para su manejo agrícola (Vicente y Del Real, 2007).

El mejoramiento de la condición sanitaria y proliferación de raíces en muchas plantas de vivero se puede ver fortalecida con el uso de microorganismos como *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. (Van Veen *et al.*, 1997; Kloepper *et al.*, 1992) en diversos cultivos hortícolas, ornamentales y forestales, en los cuales se ha observado el desarrollado de

múltiples mecanismos con incremento en resistencia a enfermedades, crecimiento y productividad de las plantas, así como tolerancia al estrés provocado por diversas situaciones en los cultivos (Lorito *et al.*, 2010; Harman, 2005; Hartman *et al.*, 2004). El cultivo del agave *A. tequilana* var. *Azul*. presenta varios problemas fitosanitarios, uno de los cuales es la marchitez, síntoma que puede ser provocado por varios microorganismos, que de acuerdo al CRT esta enfermedad se ha presentado debido a las elevadas incidencias en plantaciones que superan los 2 años de edad (CRT, 2010). La marchitez que se presenta en cualquier plantación y se debe a una deshidratación de los tejidos, así como por una reducción, muerte o destrucción del sistema radical, o bien porque hay destrucción o taponamiento de haces vasculares (CRT, 2005). Luna-Hernández (1996), Virgen-Calleros (2000) y Fucikovsky-Zak (2001), reportaron como agentes causantes de este síntoma a *Fusarium oxysporum* y *Thielaviopsis paradoxa*. En 2007 Cuevas y Domínguez, reportaron que el complejo de especies como *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. verticillioides*, *F. culmorum* y *F. equiseti*, podría ser el causante de la marchitez del cultivo. También, el mismo síntoma puede ser ocasionado por insectos que se alimentan del agave y su acción puede provocar heridas que son aprovechadas por los patógenos para acceder a la planta (CRT, 2005); entre estos está el complejo de especies de gallina ciega, especialmente *Phyllophaga* spp., que al alimentarse de las raíces, hace que la planta tenga menos área para absorber agua y nutrientes, a la vez que provoca heridas que son una fuente de entrada potencial para fitopatógenos de la raíz, como *Fusarium* spp. Otro insecto que puede ocasionar marchitez es el gusano blanco del maguey *Aegiale hesperiaris*, ya que al barrenar la pina, afecta diversas zonas del tallo, incluyendo haces vasculares, y aunque tal vez no haya invasión de microorganismos, si puede provocar encarrujamiento de hojas, así como una detención del crecimiento. Cuando una planta esta estresada por algún otro factor (manejo, nutrición, herbicidas o enfermedad), es fácilmente atacada por el picudo del agave *Scyphophorus acupinctatus*, el cual además de alimentarse dentro de la planta, también puede provocar marchitez, pudrición y muerte de la misma (CRT, 2005).

Como parte de un manejo integrado del cultivo, en el presente trabajo se planteó el objetivo de introducir y establecer microorganismos benéficos en el sustrato de plantas de agave tequilero obtenidas por la técnica de micropropagación, como una estrategia preventiva contra marchitez en plantas del agave tequilero antes de su establecimiento en campo.

2.4 MATERIALES Y MÉTODOS

2.4.1. Localización del área de estudio

El experimento de vivero fue establecido en el “Rancho el Indio” de la empresa Tequila Sauza S.A. de R.L. Tequila, Jalisco.

2.4.2 Tratamientos

Los tratamientos considerados fueron tres cepas nativas aisladas de plantaciones comerciales de agave tequilero de San Juanito y Ameca, Jalisco (Lote los Pitayos): *Trichoderma harzianum*, *T. virens* y *T. aureoviride*; así como una cepa comercial de *Bacillus subtilis*, las mezclas de *T. virens* + *B. subtilis*, *T. aureoviride* + *B. subtilis*; y dos testigos un absoluto y uno comercial (Cuadro 1).

Los tratamientos correspondientes a las tres especies de *Trichoderma* fueron adicionadas en medio líquido papa dextrosa (PD) a una concentración de 1×10^4 UFC mL⁻¹, y 10mL por planta de agave al cuello de las mismas. Estas plantas se desarrollan durante 4 a 6 meses en macetas de fibra de coco y así son llevadas a plantar. La cepa QST 713 de *Bacillus subtilis* se agregó en la dosis comercial de 1g L⁻¹ de agua del producto comercial Serenade ® (concentración de 8×10^9 UFC g⁻¹ de producto comercial), la forma de aplicación y el volumen usado en las plantas de agave fue similar a *Trichoderma* spp.. El experimento se estableció en el vivero en octubre de 2008 y se realizaron cuatro aplicaciones a los tratamientos, las dos primeras cada 30

días, se dio un receso de treinta y después las dos restantes con el mismo intervalo que las primeras dos.

Cuadro 1. Tratamientos considerados dentro de la fase experimental de vivero sobre plantas de micropropagación, establecida en el Rancho el Indio, en Tequila Jalisco, México.

TRATAMIENTOS	
T1	Sustrato enriquecido con <i>Trichoderma harzianum</i> (Th)
T2	Sustrato enriquecido con <i>T. virens</i> (Tv)
T3	Sustrato enriquecido con <i>T. aureoviride</i> (Ta)
T4	<i>Bacillus subtilis</i> (Serenade®) (Bs)
T5	<i>T. virens</i> + <i>B. subtilis</i> (Tv + Bs)
T6	<i>T. aureoviride</i> + <i>B. subtilis</i> (Ta + Bs)
T7	Sustrato sin enriquecimiento (testigo absoluto) (Tabs)
T8	Sustrato comercial + fungicida (testigo regional) (Treg)

2.4.3 Diseño experimental

El diseño establecido fue un bloques completamente al azar con dos repeticiones, una por nave comercial y éste se definió usando la ecuación siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$$

Donde: Y_{ij} es el valor de la variable respuesta, μ es la media general, T es el efecto que produce el tratamiento i , T1, T2, ..., T_i , ε_{ij} es el error experimental

Para evaluar el establecimiento de los tratamientos en las plantas de agave en maceta, posterior a la aplicación de los tratamientos, se realizaron seis muestreos con un intervalo de 30 días, de diciembre de 2008 a mayo de 2009.

Cada tratamiento se conformó por 244 plántulas, la unidad experimental comprendió 122 plántulas por repetición, con un total 1952 para todo el experimento; el tamaño de la muestra comprendió 26 plantas. Las variables evaluadas fueron altura de planta, unidades formadoras de colonias (UFC) de *Trichoderma*, *Fusarium* y *Bacillus* en sustrato y en raíz; determinación del contenido de clorofila y carotenos; en cada una de

estas variables se determinó el área bajo la curva (ABC), usando la siguiente ecuación sugerida por Madden *et al.* (2007):

$$ABCPE = \sum_i^{n-1} \left(\frac{y_i + y_{i+1}}{2} \right) * (t_{i+1} - t_i)$$

Donde, n es el número de mediciones, y_i es la variable evaluada, y t_i es el número de días desde el inicio del experimento a la fecha de medición i .

Los datos se sometieron a un análisis de varianza y comparación de medias de Duncan, con el paquete estadístico SAS. El sustrato empleado fue una mezcla de composta de bagazo de piña de agave, fibra de coco y corteza de pino. Las macetas usadas fueron de fibra de coco con capacidad de 1L.

2.2.4 Cuantificación de UFC

Para *Trichoderma* spp. y *Fusarium* spp., la cuantificación de las UFC provenientes de sustrato de la maceta de la planta, se hizo a través del procedimiento siguiente: 1) se pesaron 10g de una muestra del sustrato y se agregaron en 90mL de agua destilada estéril en un matraz de 125mL, de esta solución se hicieron diluciones hasta 10^{-3} . Se empleó el medio de cultivo Papa Dextrosa Agar Tergitol Estreptomicina (PDA-TS) con 0.5mL del surfactante comercial Penetrex® en sustitución de tergitol, 0.01g de estreptomicina y 0.0075g de clorhidrato de tetraciclina y este medio se agitó suavemente para no formar burbujas. De la dilución 10^{-3} se tomó 1mL seccionado en 10 cajas de Petri, de tal forma que en cada caja se agregaron 0.1mL de dilución y posteriormente se agregó el medio PDA-TS. El material se incubó por siete días a temperatura ambiente de 22 a 24°C. La determinación de UFC de *Bacillus subtilis* se realizó con la misma técnica anterior, sólo que empleando la dilución 10^{-8} en medio de cultivo agar nutritivo (AN).

En el sustrato empleado se cuantificaron las UFC g^{-1} de sustrato de *Trichoderma* spp., *Fusarium* spp. y *Bacillus* spp., presentes en la composta natural, la cual se emplea por

la empresa para el crecimiento en vivero de su material de micropropagación y no pasa por esterilización.

2.4.5 Cuantificación sobre raíces. De las raíces muestreadas mensualmente de las plantas de agave de cada tratamiento, se pesó 1g de raíces y se lavaron con agua común, las muestras destinadas a determinar *Trichoderma* spp. y *Fusarium* spp., se desinfestaron en hipoclorito de sodio al 3% por 3 min, posteriormente se enjuagaron con agua destilada esterilizada y se secaron para sembrarse en medio de cultivo PDA portado en cajas de Petri e incubarse en cámara de crecimiento a temperatura de 22 a 24°C. Las cajas de Petri se evaluaron a los 7 y 10 días. Mientras que para cuantificar *B. Subtilis*, las raíces se sembraron en medio AN, incubándose a la misma temperatura indicada arriba y se evaluaron a las 24 y 48h.

2.4.6 Determinación de clorofila

Se tomaron al azar 10g de hojas de agave por tratamiento y se introdujeron en 80mL de acetona al 70%, se dejaron reposar por 24h en oscuridad y posteriormente se llevaron al espectrofotómetro para su cuantificación.

2.5 RESULTADOS

2.5.1 Cuantificación de flora microbiana fungosa en el sustrato

En la cuantificación de la flora microbiana fungosa en el sustrato empleado en las plántulas se detectó la presencia de *Trichoderma* spp., con 1.2 UFC(x1000) g⁻¹; *Penicillium* spp., con 21.4 UFC(x1000) g⁻¹; *Aspergillus* spp., con 7.7 UFC (x1000) g⁻¹; *Mucor* spp., con 12.1 UFC (x1000) g⁻¹; y *Chalaropsis* spp., con 0.4 UFC (x1000) g⁻¹ (Figura 4). Estos resultados son normales, ya que se trató de un sustrato natural y que fue la referencia de los microorganismos con los cuales conviven aquellos introducidos para enriquecer el mismo.

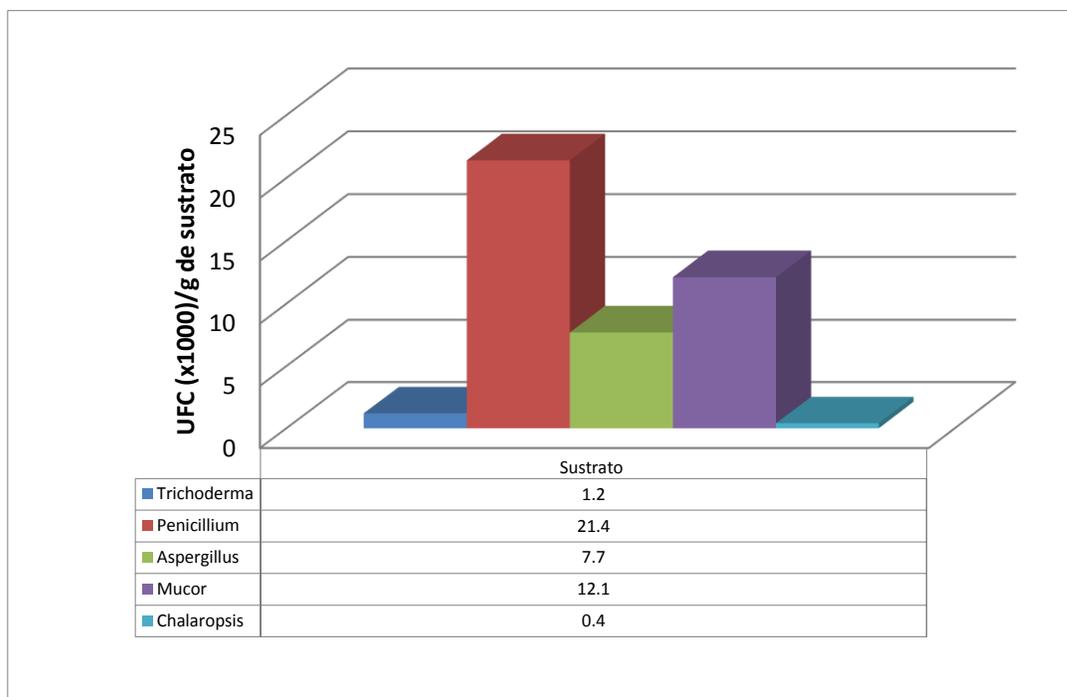


Fig. 3 Resultados de UFC (x1000) por gramo de suelo determinados en el sustrato empleado en la etapa de vivero con plántulas de micropropagación.

2.5.2 Dinámica de UFC en suelo y raíz

El establecimiento de las especies de *Trichoderma* spp. ocurrió desde la primera evaluación a los 30 días después de la inoculación (ddi) en todos los tratamientos (Figura 2) y se mantuvo constante durante el tiempo (60, 90, 120, 150 y 180ddi) en valores de 3.5 a 4 log (UFC mL⁻¹) en todos los tratamientos.

Los propágulos de *Fusarium* spp., tuvieron un comportamiento diferente en suelo y raíz. En los primeros 30 días en raíz los tratamientos Th, Tv y Bs no registraron UFC, sin embargo, a los 60 ddi las UFC ya oscilaban entre 2 y 2.5 log (UFC mL⁻¹); el tratamiento Ta alcanzó los mismos niveles entre los 100 y 120 ddi; para el Tv + Bs se obtuvieron 90 ddi. En el resto de los tratamientos (Ta + Bs, Tabs y Treg) se detectaron niveles a los 30 ddi.

En suelo la colonización ocurrió a los 30 ddi, cuando se alcanzaron niveles de 2 y 2.5 log (UFC mL⁻¹) en todos los tratamientos, sin embargo, en los tratamientos Ta y Tabs,

ocurrió un descenso de UFC a los 150 ddi, y lo cual coincidió con la evaluación en marzo de 2009. En el tratamiento Tv + Bs se detectó un descenso de UFC de *Fusarium* spp. a los 60 ddi (enero 2009), no obstante alcanzó los niveles de 2 y 2.5 log (UFC mL⁻¹) posteriormente.

En la colonización de *B. subtilis* en los tratamientos Bs, Bs + Tv y Bs + Ta, se detectaron elevados niveles de UFC en raíces y su población se mantuvo entre 6.5 a 7.0 log(ufc/ml). En los tratamientos Th, Tv, Ta, Bs, Tabs y Treg, la bacteria *B. subtilis* descendió sus niveles de densidad a los 180 ddi en la raíz; sin embargo, en los tratamientos Tv+Bs y Ta+Bs las UFC se mantuvieron constante en los niveles de 6.5 a 7.0 log(ufc/ml) (Fig. 2). Por otro lado, en los tratamientos T2 Tv y T8 Treg, no se detectó establecimiento de la bacteria. A los 150 ddi en los tratamientos Th, Ta y Tabs, la densidad de *B. subtilis* se empezó a incrementar; los tratamientos que incluyeron a la bacteria desde el inicio Bs, Tv+Bs y Ta+Bs, se establecieron en suelo desde los 30 ddi y se mantuvieron en densidades similares que los de raíz.

2.5.3 Área Bajo la Curva (ABC)

2.5.3.1 *Trichoderma* sp., en suelo

Se detectaron diferencias significativas entre tratamientos ($P= 0.0003$) respecto a la colonización de UFC de *Trichoderma* sp., en suelo, donde el tratamiento Ta presentó la mayor ABC con 1338.75; el Th alcanzó niveles de 1160.25, le siguieron T4 Bs con 1012.50 y T8 Treg 1048.50; Ta, Th y Treg son iguales; Treg y Bs son iguales; Tv tuvo el menor valor de UFC con 703.5). El resto de los tratamientos, Tabs 951.00, T5 Tv + Bs 921.00, Ta + Bs 836.25 y Tv 703.50 (Cuadro 2).

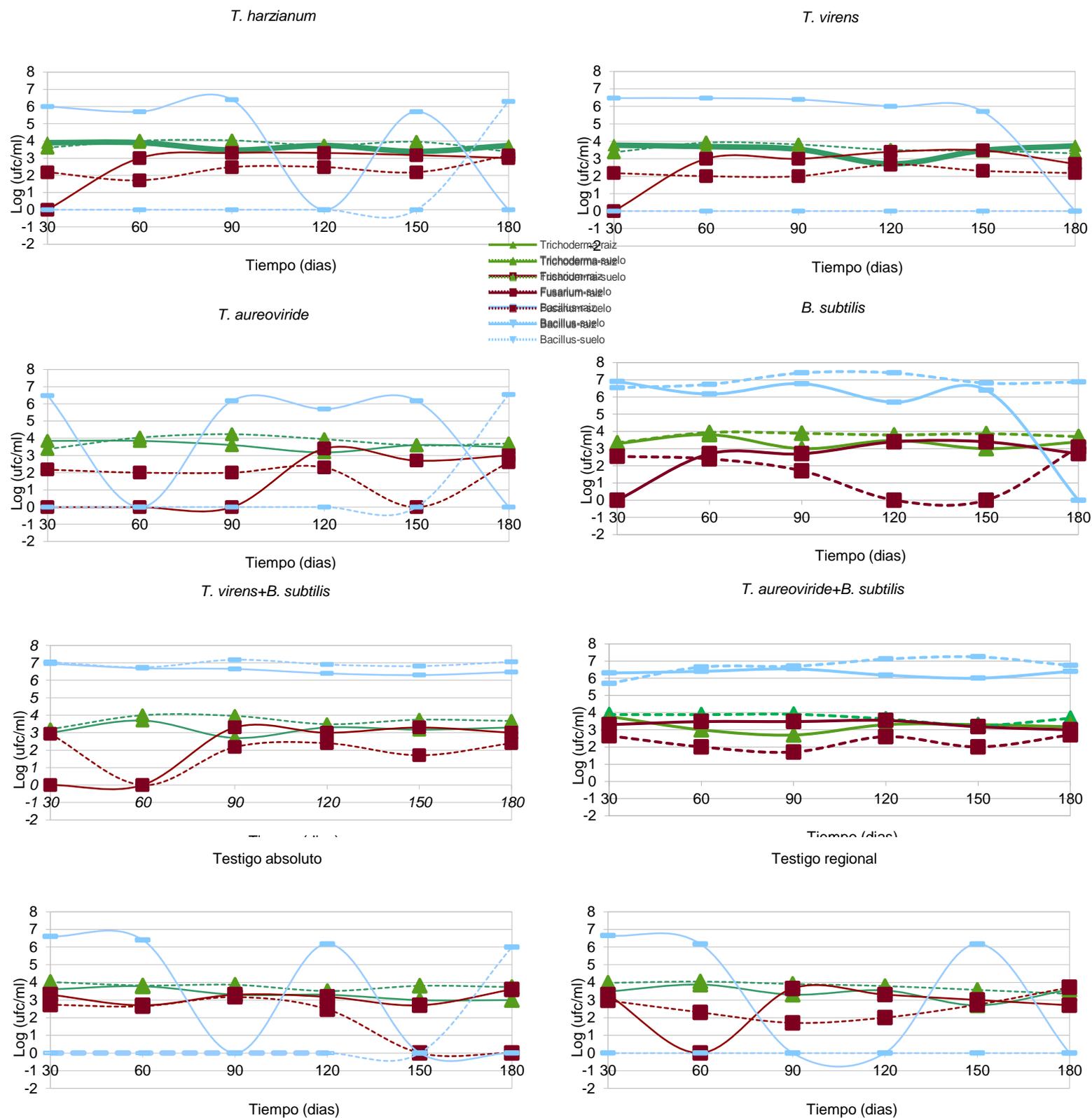


Fig. 4 Comportamiento de los tratamientos T1 *T. harzianum* (Th), T2 *T. virens* (Tv), T3 *T. aureoviride* (Ta), T4 *B. subtilis* (Bs), T5 *T. virens* + *B. subtilis* (Tv + Bs), T6 *T. aureoviride* + *B. subtilis* (Ta + Bs), T7 Testigo absoluto (Tabs) y T8 Testigo regional (Treg), durante seis meses de diciembre 2008 a mayo de 2009, inoculados al sustrato durante la etapa de adaptación de vivero del agave (*Agave tequilana* Weber var. Azul) en el Rancho el Indio, Tequila, Jalisco.

2.5.3.2 *Trichoderma* sp., en raíz

En raíz se detectaron diferencias significativas entre tratamientos de las UFC de *Trichoderma* sp. ($P = 0.0325$). El tratamiento Th resultó con la mayor ABC de 772.5, aunque fue similar a un grupo de cinco tratamientos Ta 645.0, Tv 532.5, Treg 518, Bs 412.5 y Tabs 405, los tratamientos con las menores ABC fueron Tv + Bs y Ta + Bs, con 315.0 y 277.5, respectivamente (Cuadro 2).

Cuadro 2. Comparación de medias de Duncan del área bajo la curva (ABC) de las UFC de *Trichoderma* sp. detectadas en suelo y raíces en los tratamientos establecidos en la etapa de vivero en agave de micro-propagación después de seis muestreos de diciembre de 2008 a abril de 2009 con intervalo de muestreo de 30 días.

Tratamiento	ABC de UFC <i>Trichoderma</i> sp.	
	Suelo*	Raíces*
T1 Th	1160.25 ab	772.5 a
T2 Tv	703.50 d	532.5 ab
T3 Ta	1338.75 a	645.0 ab
T4 Bs	1012.50 bc	412.5 ab
T5 Tv + Bs	921.00 bcd	315.0 b
T6 Ta + Bs	836.25 cd	277.5 b
T7 Tabs	951.00 bcd	405.0 ab
T8 Treg	1048.50 abc	518.0 ab

* Valores con la misma letra son estadísticamente iguales

2.5.3.3 *Bacillus subtilis* en suelo

Respecto al ABC de las UFC de *B. subtilis* en suelo, si se detectaron diferencias significativas entre tratamientos ($P= 0.061$). El tratamiento con el mayor valor de ABC fue el de Bs con 2055.0, aunque este fue igual a los tratamientos Tv + Bs 1387.50 y Ta + Bs 1290.0. Los menores niveles de ABC fueron en los tratamientos Th 30.0, Ta 52.5 y Tabs 15.0. Mientras que los tratamientos Tv y Treg no se detectaron UFC de *B. subtilis* (Cuadro 3).

2.5.3.4 *Bacillus subtilis* en raíz

Un comportamiento similar al de *B. subtilis* en suelo se observó en raíces, donde también se mostró la existencia de diferencias estadísticas entre tratamientos del ANAVA del ABC ($P= 0.0135$). El ABC de *B. subtilis* en raíz fue mayor en el tratamiento Tv + Bs con 600.0, seguido de Bs con 435.0 y Ta + Bs con 322.5; Tv con 255.0. Th, Ta, Tabs y Treg, resultaron con las ABC más bajas, con valores de 120.0, 150.0, 180.0 y 157.5, respectivamente (Cuadro 3).

Cuadro 3. Comparación de medias de Duncan del área bajo la curva (ABC) de las UFC de *B. subtilis* detectadas en suelo y raíces en los tratamientos establecidos en la etapa de vivero en agave de micro-propagación después de seis muestreos de diciembre de 2008 a abril de 2009 con intervalo de muestreo de 30 días.

Tratamiento	ABC de UFC de <i>Bacillus subtilis</i>	
	Suelo*	Raíces*
T1 Th	30.00 b	120.0 c
T2 Tv	0.00 b	255.0 bc
T3 Ta	52.50 b	150.0 c
T4 Bs	2055.00 a	435.0 ab
T5 Tv + Bs	1387.50 ab	600.0 a
T6 Ta + Bs	1290.00 ab	322.5 bc
T7 Tabs	15.00 b	180.0 c
T8 Treg	0.00 b	157.5 c

* Valores con la misma letra son estadísticamente iguales

2.5.3.5 *Fusarium* spp., en suelo

Las ABC de la UFC de *Fusarium* spp., en suelo no fueron significativamente diferentes entre tratamientos, sin embargo, se detectaron UFC con niveles por debajo de 50 para la mayoría de los tratamientos, excepto para el Tabs y Treg, donde se reportaron ABC de 75.75 y 120 (Cuadro 4).

2.5.3.6 *Fusarium* sp., en raíz

Si hubo diferencias estadísticas entre tratamientos en las ABC de UFC de *Fusarium* sp. en raíces, El tratamiento Ta + Bs obtuvo el nivel más alto de ABC con 375.0 y que fue significativamente diferente solo con el Ta con 105. Los valores más bajos se detectaron en los tratamientos Ta 105.0, Bs 187.5 y Tv + Bs 165.0.

Cuadro 4. Comparación de medias de Duncan del área bajo la curva (ABC) de las UFC de *Fusarium* sp. detectadas en suelo y raíces en los tratamientos establecidos en la etapa de vivero en agave de micro-propagación después de seis muestreos de diciembre de 2008 a abril de 2009 con intervalo de muestreo de 30 días.

Tratamiento	ABC de UFC de <i>Fusarium</i> sp.	
	Suelo*	Raíces*
T1 Th	48.00 a	210.0 ab
T2 Tv	30.00 a	232.5 ab
T3 Ta	20.25 a	105.0 b
T4 Bs	32.25 a	187.5 ab
T5 Tv + Bs	30.00 a	165.0 ab
T6 Ta + Bs	33.75 a	375.0 a
T7 Tabs	75.75 a	225.0 ab
T8 Treg	120.00 a	262.5 ab

* Valores con la misma letra son estadísticamente iguales

2.5.3.7 Contenido de Clorofila y Altura de la planta

No se detectaron diferencias significativas entre tratamientos respecto al contenido de clorofila y la altura de las plantas.

Cuadro 5. Comparación de medias de Duncan del área bajo la curva (ABC) de las variables altura y clorofilas en los tratamientos establecidos en la etapa de vivero en agave de micro-propagación después de seis muestreos de diciembre de 2008 a abril de 2009 con intervalo de muestreo de 30 días.

Tratamiento	Área bajo la curva	
	Altura*	Clorofila*
T1 Th	4160.4 a	119.69 a
T2 Tv	4313.9 a	107.42 a
T3 Ta	4336.1 a	115.29 a
T4 Bs	4469.6 a	116.67 a
T5 Tv + Bs	4212.6 a	107.16 a
T6 Ta + Bs	4292.4 a	110.89 a
T7 Tabs	4325.2 a	108.55 a
T8 Treg	4271.4 a	112.80 a

* Valores con la misma letra son estadísticamente iguales.

2.6 DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo demuestran que los microorganismos benéficos como *Trichoderma* spp. y *Bacillus subtilis* son capaces de establecerse en suelo y algunos de estos tienen la capacidad de hacer a las raíces su nicho; por lo que tienen la cualidad de reducir las densidades de población de organismos patógenos como varias de las especies de *Fusarium* spp., comunes en la mayoría de los suelos del mundo y equilibrar las poblaciones de microorganismos en los suelos o sustratos que se empleen. El control biológico de fitopatógenos involucra el mejorar o aumentar el antagonismo alrededor de las plantas o en el suelo pero en poblaciones bajas que permitan un adecuado control (Gnanamanickan, 2002). Este tipo de herramientas prácticas permiten la protección contra infecciones que pudieran establecerse; el material que se plantará puede protegerse vía raíces, suelo o en semilla. Gnanamanickan (2002) reportó el éxito de tratamiento de la semilla en millones de hectáreas de algodón en china con *Streptomyces* 5406 en la protección de cultivos desde el punto de vista preventivo. La capacidad que se observó en este trabajo de Th

para establecerse en suelo y raíz, también lo reportó Harman (2000) para la especie *T. harzianum* T-22 donde señaló además que la cualidad de colonizar el área de la rizósfera en las plantas trae el beneficio de poder actuar como un inductor de mecanismo de resistencia sistémica adquirida, lo que conlleva a prolongar la protección de las plantas hacia ciertos fitopatógenos. En la presente investigación el tratamiento Ta tuvo un comportamiento similar a Th. Howell (2002) y Harman *et al.* (2004) reportaron que son varias las especies de *Trichoderma* que tienen la capacidad de poder colonizar el área del sistema de raíces de plantas donde se aplica, con la finalidad de conferir protección y que los organismos pueden actuar contra los fitopatógenos a través de la producción o liberación de varios compuestos que pueden inducir respuestas de resistencia sistémica adquirida o localizada en las plantas. Dicha asociación microorganismo-raíz causa cambios sustanciales en el metabolismo y proteoma de la planta. El poder establecerse en suelo también trae como beneficio que las especies puedan actuar a través de competencia por espacio o por micoparasitismo, mecanismos que se han reportado desde la década de 1970 para algunas de las especies de *Trichoderma* (Harman, 2006; Harman *et al.*, 2004 y Howell, 2002). La aplicación preventiva también fue reportada por Horst *et al.* (2005) quienes mencionan que varios de los aislamientos y especies de *Trichoderma* pueden reducir la severidad de enfermedades en plantas cuando se aplicaron en tratamiento a la semilla o trasplante. Entre algunas se reportan a *T. asperellum* T-203, *T. hamatum* GT3-2, *T. hamatum* T382, *T. harzianum* T39, *T. harzianum* T22 y *T. virens* G6.

Respecto al comportamiento de *B. subtilis* los resultados de este trabajo demuestran la capacidad que tiene de establecimiento donde esta bacteria se adiciona, ya sea en suelo o sustrato, así como en las raíces. El género *Bacillus* está considerado como promotor del crecimiento con potencial para incrementar el rendimiento en las plantas. Varias especies de *Bacillus* han sido objeto de investigación para su implementación como agentes de control biológico debido a sus características de alta capacidad de colonización de la raíz y de supervivencia que le confieren las esporas (Kloepper *et al.*, 1992; Van Veen *et al.*, 1997); es un grupo de bacterias que se encuentran en diversos nichos ecológicos incluyendo suelo, agua y aire (Pang *et al.*, 1998). Jacobsen *et al.*

(2004) señalaron que *Bacillus* spp. son agentes de control biológico que tienen un gran potencial como herramienta en un sistema de manejo integrado de plagas con tendencias hacia un manejo sustentable. Zhang *et al.* (2009) aplicaron *B. subtilis* en tratamiento a semilla y directo al suelo, en cultivo de soya contra *Fusarium oxysporum* y *F. graminearum*. *Bacillus subtilis* fue capaz de reducir la severidad de pudrición de raíces en un 68 a 74% e incrementar la emergencia de plántulas en un 13 a 17%, la altura de la planta en un 9 a 18%, y el peso seco de raíz en un 8.4 a 19%. Veerubommu *et al.* (2011) encontraron que una mezcla de rizobacterias *Bacillus atrophaeus* + *Burkholderia cepacia* reducen la incidencia de *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* en un 48.6% bajo condiciones de producción en invernaderos y de un 46.1% a nivel de campo; comparado con el tratamiento con fungicida (carbendacin) que resultó en una reducción de 51.5 a 47.1%.

Por otro lado, Turner y Backman (1991) mostraron que *B. subtilis* podía colonizar consistentemente el sistema radicular de plantas de cacahuate. El tratamiento a las semillas de cacahuate provocó una mayor emergencia que las semillas no tratadas. Dukare *et al.* (2010) también encontraron resultados similares a los autores anteriores en el tratamiento de semilla y en composta con *B. subtilis* contra el ahogamiento ocasionado en plántula por *Pythium aphanidermatum*, *P. debaryanum*, *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum*, al observar una reducción de la incidencia y severidad de la enfermedad. Chae *et al.* (2006) evaluaron una composta conteniendo diversas bacterias con capacidad de producir quitinasas, entre ellas *B. subtilis*, como enmienda de suelo contra la marchitez del chile ocasionada por *Phytophthora capsici* tratamiento que fue capaz de abatir la actividad del fitopatógeno al crear condiciones supresivas en el área de la rizósfera.

2.7 CONCLUSIONES

Los resultados del presente trabajo indican que el uso de *Trichoderma* spp., *B. subtilis* o la mezcla de ambos, en algunos casos, puede ser un tratamiento preventivo en el material de propagación en el cultivo del *A. tequilana* var. Azul, ya que tiene la capacidad de establecerse como poblaciones antagonistas creando un ambiente de

supresividad en el área de la rizósfera posiblemente provocando que las poblaciones de *Fusarium* spp., no se desarrollen adecuadamente o que las UFC se mantengan en densidades que no puedan causar marchitez en vivero. Esta posible colonización será de apoyo cuando las plantas de agave de vivero sean llevadas a campo y sean sometidas al estrés del transplante y después se enfrenten al complejo de microorganismos nativos habitantes de los diferentes suelos.

2.8 LITERATURA CITADA

- Byerly, M. K. F. 2007. Prologo. P 7-8 *in* Pérez y Del Real (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 Centro. Tepatlán, Jalisco. Libro Técnico No. 4.
- CRT. 2005. Plagas y enfermedades del *Agave tequilana* Weber var Azul. Consejo Regulador del Tequila (CRT). Ed. Pandora. Impreso en México. 123p.
- CRT. 2010. Actualización de la base de datos y diagnóstico fitosanitario: *Agave tequilana* Weber Var. Azul. Comité técnico agronómico-Subcomite de fitosanidad. Consejo Regulador del Tequila (CRT). 10p.
- Chae, D.H., Jin, R.D., Hwangbo, H., Kim, Y.W., Kim, Y.C., Park, R.D., Krishnan, H.B. and Kim, K.Y. 2006. Control of late blight (*Phytophthora capsici*) in pepper plant with compost containing multitude of chitinase producing bacteria. *Biocontrol* 51: 339-351.
- Kim, K.Y., 2006. Control of late blight (*Phytophthora capsici*) in pepper plant with compost containing multitude of chitinase producing bacteria. *Biocontrol* 51: 339-351.
- Fucikovsky-Zak, L. 2001. Tristeza and death of *Agave tequilana* Weber, var. Azul. Ed. De Boer, S.H., In: Plant Pathogenic Bacteria. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Boston, London. 454 p.
- Gnanamanickan, S. S. 2002 . Biological control of crop diseases. Merceel Dekker, Inc. USA. 468p.

- Harman, G.E. 2000. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derive from research on *Trichoderma harzianum* T-22. Plant Dis 84: 393
- Harman, G.E., Lorito, M., and Lynch, J. M.2004. Uses of *Trichoderma* spp., to remediate soil and water pollution. Adv. Appl. Microbiol. 56:313-330
- Harman, G.E. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. Phytopathology 96:190-194
- Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M., 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. Nat. Rev. 2:43-56
- Horst, L. E., Locke, J., Krause, C. R., McMahon, R. W., Madden, L. V., and Hoitink, H. A. J. 2005. Suppression of *Botrytis* blight of begonia by *Trichoderma hamatum* 382 in peat and compost-amended potting mixes. Plant Dis. 89:1195-1200
- Howell, C. R. 2002. Cotton seedling pre-emergence damping-off incited by *Rhizopus oryzae* and *Pythium* spp. and its biological control with *Trichoderma* spp. Phytopathology 92:177-180.
- Jacobsen, B. J., Zidack, N. K., and Larson, B. J. 2004. The role of *Bacillus*-based biological control agents in integrated pest management systems: Plant diseases. Phytopathology 94:1272-1275.
- Kloepper J.W, Tuzun S, Kuc J. 1992. Proposed definitions related to induced disease resistance. Biocontrol Sci Technol 2:349–351.
- Lorito, M., Woo, S. L., Harman, G. E. and Monte, E. 2010. Translational research on *Trichoderma*: from ómics to the field. Annu. Rev. Phytopathol. 48: 395-417.
- Luna-Hernández G.1996. Pudrición de tallo de *Agave tequilana* Weber, var.azul en el estado de Jalisco, México. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Chapingo.
- Madden, L. V., Hughes, G., and van den Bosch, F.2007. The study of plant disease epidemics. APS Press, The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, U.S.A. 421 p.
- Pérez, D.J.F y Del Real, 2007. Conocimiento y prácticas agrónomicas para la producción de *Agave tequilana* Weber en la zona de denominación de origen de tequila. Prometeo editores e INIFAP, Guadalajara, Jalisco México. 195 p.

- Turner, J. T., and Backman, P. A. 1991. Factors relating to peanut yield increases after seed treatment with *Bacillus subtilis*. *Plant Dis.* 75:347-353.
- Van Veen , J. A., Van Oberbeek, L. S., and Van Elsas, J.D.1997. Fate and activity of microorganisms introduced into soil. *Microbiology Molecular Review* 61:121-135.
- Veerubommu, S., Nandina, K., Markandey S., Sukhjinder, S. and Ramdeen, P. 2011. Biocontrol of vascular wilt and corm rot of gladiolus caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* using plant growth promoting rhizobacterial mixture. *Crop Protection* 30:807-813.
- Vicente, R. I., y Del Real, J.I. 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 (INIFAP). Centro de Investigación Regional del Pacífico Centro
- Virgen-Calleros, G.2000. Epidemiología y manejo integrado de problemas fitosanitarios en *Agave tequilana* Weber, var. Azul. Departamento de producción agrícola. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agronómicas (CUCBA). Universidad de Guadalajara. Informe Técnico para el Programa General de Apoyo y Desarrollo Tecnológico a la Cadena Productiva Agave-Tequila.
- Zhang, J.X., Xue, A.G., et Tambong, J.T. 2009. Evaluation of seed and soil treatments with novel *Bacillus subtilis* strains for control of soybean root rots caused by *Fusarium oxysporum* and *F. graminearum*. *Plant Disease*, 93(12) 1317-1323.

CAPITULO TRES

DINÁMICA DE *Trichoderma* y *Bacillus* EN RELACION A *Fusarium* EN DOS LOCALIDADES DE REGIONES PRODUCTORAS DE *Agave tequilana* Weber var. Azul EN JALISCO

DYNAMICS OF *Trichoderma* AND *Bacillus* IN RELATION TO *Fusarium* IN TWO PRODUCTION AREAS OF *Agave tequilana* Weber VAR. AZUL EN JALISCO

Bertha Tlapal Bolaños¹, Cristian Nava Díaz¹, Héctor González Hernández¹, Emma Zavaleta Mejía¹, Prometeo Sánchez García¹, José Ignacio Del Real Laborde² y Ramón Rubio Cortés². ¹Postgrado Fitopatología, Entomología y Nutrición Vegetal. Colegio de Potgraduados Km. 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Edo. De México. CP. 56230. ²Área de Investigación de Tequila Sauza S.A. de R.L., rancho "El Indio", Tequila Jalisco. Correo-e: cnavas@colpos.mx, navadiaz57@prodigy.net.mx (autor por correspondencia).

3.1 RESUMEN

Uno de los problema fitosanitarios más importantes en el agave *Agave tequilana* Weber var. Azul es la marchitez, provocado por varios microorganismos principalmente en plantaciones de más de 2 años de edad. Entre los posibles agentes causales de esta enfermedad se reportan a varias especies de *Fusarium* spp., así como a *Thielaviopsis paradoxa*. En el presente trabajo se planteó el introducir plantas de agave tequilero como material propagativo de vivero en nuevas plantaciones, pre-colonizadas con microorganismos benéficos, como parte de un manejo preventivo. Los tratamientos fueron los siguientes: T1: *Trichoderma harzianum* (Th), T2: *T. virens* (Tv), T3: *T. aureoviride* (Ta), T4: *Bacillus subtilis* (Bs), T5: Tv + Bs, T6: Ta + Bs, T7: testigo absoluto (Tabs solo la composta) y T8: testigo regional (Treg: composta más tratamiento con Captan en el área de la raíz). Se establecieron dos experimentos de campo en Ahualulco y Tecalitlán, Jalisco; ambos experimentos se establecieron bajo un diseño en bloques completos al azar, con cuatro repeticiones. La unidad experimental (UE) en Ahualulco consistió de 20 plantas, con una parcela útil (PU) de 6 y un total de 640. En Tecalitlán, la UE consistió de 25 plantas y la PU de 9, con un total de 800. Las variables evaluadas fueron unidades formadoras de colonias (UFC) de *Trichoderma*, *Fusarium* y

Bacillus en suelo de la rizósfera; niveles de clorofila; altura y cobertura de planta. Se realizaron ocho muestreos durante 24 meses con intervalo de 90 días. Se calculó el área bajo la curva (ABC) de las variables anteriores y se estudió la dinámica poblacional de los microorganismos. A estas variables se les aplicó un análisis de varianza y cuando fue necesario se realizó comparación de medias LSD ($\alpha=0.05$). Adicionalmente, en el muestreo final se evaluaron las variables diámetro de piña (DIAP) y número de hijuelos (NHIJ). Los resultados del ABC en Ahualulco solo mostraron diferencias estadísticas entre tratamientos con Bs ($P=<0.0001$). De esta forma, los tratamientos Bs y Tv+Bs tuvieron los mayores niveles de ABC 71.250 y 66.750, respectivamente, seguidos de los tratamiento Ta+Bs 29.625, Tabs 19.875 y Tv 18.00, y al final Th, Ta y Treg, con 4.500, 12.375 y 10.500, respectivamente. Las variables DIAP y NHIJ, del muestreo final no mostraron diferencias estadísticas entre tratamientos. La dinámica poblacional indicó que para esta región productora, los tratamientos Bs y Ta+Tv, son una alternativa viable para mantener bajas a las UFC de *Fusarium* spp., en niveles menores a $\log 2.5$ UFC mL⁻¹ los de la bacteria, soportando las condiciones de sequia prolongada de marzo a junio del 2010 y 2011, con temperaturas de 30 a 33°C y humedades relativas en esos periodos por debajo del 50%. En Tecalitlán, Jalisco, en el ABC no se detectaron diferencias significativas, excepto en los tratamientos Bs ($P=<0.0001$), donde Tv+Bs resultó con 64.500, le siguió Bs con 40.125, Ta con 14.250 y Ta+Bs con 28.500, y otro grupo de Th con 3.50, Tv con 9.000, Tabs con 9.750 y Treg con 1.500. En el muestreo final las variables DIAP Y NHIJ, no manifestaron diferencias significativas entre tratamientos. La dinámica poblacional indica que en Tecalitlán, Jalisco, Tv y Tv + Bs son una excelente opción para reducir las densidades de UFC de *Fusarium* spp., en niveles no mayores a $\log 2.7$ UFC mL⁻¹, las cuales toleran las condiciones ambientales dominantes de la región, con temperaturas máximas de 32 a 34 °C en los meses de marzo a junio y humedad relativa de 60%.

Palabras clave: marchitez del agave, *Fusarium* spp., antagonismo, supresividad.

3.2 ABSTRACT

Agave wilt is the most important plant pathology problem in the agave *Agave tequilana* Weber var. Azul crop has several microorganisms as causal agents. This disease is present mainly in crops that are more than 2 years old. Several species of *Fusarium*, as well as *Thielaviopsis paradoxa* have been associated as the causal agents of this agave wilt. In this study, propagative agave plant material from a greenhouse, inoculated with the beneficial microorganisms was introduced to new agave plantations as a part of a preventive management strategy. Treatments included T1: *Trichoderma harzianum* (Th), T2: *T. virens* (Tv), T3: *T. aureoviride* (Ta), T4: *Bacillus subtilis* (Bs), T5: Tv + Bs, T6: Ta + Bs, T7: Absolute Control (Tabs only composta), and T8: Regional Control (Treg: compost + Captan applied to the root area). Experiments were established in commercial agave plantations in the municipalities of Ahualulco and Tecalitlán, Jalisco. Both experiments were established using a complete randomize block design, with four replications. The experimental unit (EU) was different on each plantation, Ahualulco with 20 plants, the useful block (UB) consisted of six plants, and had a total of 640 plants; while Tecalitlán had 25 EU, nine UB; overall a total of 800 plants were involved. The following variables such as precursor units of colonies (PUC) of *Trichoderma*, *Fusarium* and *Bacillus* form the soil, content of chlorophyll, height and width of the plant were recorded. Eight samples were preformed during 24 months with a 90 day interval. In each variable recorded the area under the disease progress curve (AUDPC) was calculated and the population dynamics for each microorganism was studied. An analysis of variance and mean comparison test LSD ($\alpha=0.05$) were use for each variable recorded. At the end of each experiment other variables such as diameter of the agave piña or bole and numbers of plant sons, were also recorded. There were significant differences only between the *Bacillus* treatments ($P=<0.0001$) at the Ahualulco, Jalisco agave plantation. Treatments Bs and tv+Bs had the heights AUDPC levels with 71.250 and 66.750, respectively, followed by Ta+Bs with 29.625, Tabs with 19.875 and Tv with 18.0; another grouper of Th, Ta and Treg, with 4.50, 12.375 and 10.50, respectively. There were no significance differences between treatments with the variables piña diameter and number of plant sons. The population dynamics of the

microorganisms at the Ahualulco plantation demonstrated that the treatments Bs and Ta+Tv are viable alternative to use in this area in order to maintain the PUC of *Fusarium* spp., at low levels, also *Bacillus* at levels below 2.5 mL⁻¹, considering prolonged wet conditions detected from March to June, 2010 and 2011, with temperatures of 33 to 33°C and relative humidity below 50%. In the agave plantation of Tecalitlán, Jalisco, there were significant differences, but only between the AUDPC of the *Bacillus* treatments ($P < 0.0001$), where Tv+B_s has an AUDPC of 64.50, followed by B_s with 40.125, Ta with 14.250 and Ta+B_s with 28.50; another group of treatments including Th with 3.50, Tv with 9.0, T_{ab}s with 9.75 and T_{reg} with 1.50. For this agave plantations there were no significant differences between treatments with the variables piña diameter and number of plant sons. The population dynamics of the microorganisms at the Tecalitlán, Jalisco plantation show that the Tv and Tv+B_s treatments are an excellence option to applied in order to reduce PUC of *Fusarium* spp., at levels bellow 2.7 mL⁻¹, which may tolerate weather conditions of this region from March to June, with maximum temperatures of 32 to 34°C and relative humidity of 60%.

Key words: Agave wilt, *Fusarium* spp., antagonism, suppressive.

3.3 INTRODUCCIÓN

Actualmente la demanda mundial de la bebida tequila, ha provocado que se extienda la superficie sembrada de este cultivo en México, lo cual representa un fuerte desafío para fisiólogos, biotecnólogos, fitomejoradores y en general, a todas aquellas personas encargadas de mantener el cultivo en buenas condiciones hasta su jima. México es el único país productor de tequila. Hoy día, el agave tequilero se puede plantar para la producción de tequila solo en 181 municipios comprendidos en la zona geográfica de denominación que incluye cinco estados, protegidos dentro de la Denominación de Origen del Tequila (DOT) (NOM-006-SCFI- 2005) (CRT, 2009), con una superficie sembrada para el año 2012 de 118,195 ha y con una producción de 1,420,395 ton (SIAP, 2013). Jalisco es el principal productor, con una superficie plantada para el año 2012 de 82,776 ha (SIAP, 2013) de agave azul tequilero, con una producción de 1,200,136 ton y un total de 253,033,239 plantas (CRT, 2010). La cadena agave-tequila

ha crecido en forma sostenida durante los últimos años y con un potencial mayor de crecimiento, por lo que se requiere de un abasto sostenido y predecible de materia prima para asegurar su producción (Byerly, 2007). Sin embargo, en este cultivo se reportan diversos problemas fitosanitarios, uno de los cuales es la marchitez, síntoma que puede ser provocado por varios microorganismos y las incidencias más elevadas se presentan en plantaciones que superan los 2 años de edad (CRT, 2010). La marchitez que se presenta en cualquier plantación, se debe a una deshidratación de los tejidos y esto se da a su vez porque hay una reducción, muerte o destrucción del sistema radical, o bien porque hay destrucción o taponamiento de haces vasculares (CRT, 2005). Luna-Hernández (1996), Virgen-Calleros (2000) y Fucikovsky-Zak (2000), reportaron a *Fusarium oxysporum* y *Thielaviopsis paradoxa* como agentes causales de la marchitez del agave. *Fusarium oxysporum*, *F. solani* y *F. moniliforme* han sido aislados repetidamente de tallos de plantas de agave tequilero con el mismo síntoma (Loera, 2000; Castañeda-Vázquez, 2002). Esta enfermedad se ha reportado en 11 municipios productores de agave tequilero en los Altos y Centro del Estado de Jalisco (Aceves, 2003). Los censos de planta y condición fitosanitaria de la misma realizados por el CRT durante 2006, 2007 y 2008, reportan a la marchitez del agave como la enfermedad de mayor incidencia en el estado de Jalisco y la de mayor importancia (CRT, 2010). Aunque esta enfermedad fue inicialmente observada en plantaciones de agave mayores de 3 años, actualmente se le encuentra en plantaciones de un año. En plantaciones nuevas el síntoma es el característico “clavo” (Rubio, 2007).

Es importante conocer los factores principales con capacidad para inducir la marchitez en las plantas, para saber qué métodos o prácticas pueden ser considerados en la prevención de la enfermedad, con la finalidad de reducir la incidencia, buscando no eliminar la densidad de propágulos de *Fusarium* spp., de los suelos donde se cultive agave, sino reducirlos a niveles donde los daños no lleguen a provocar la muerte de la planta antes de la jima y el impacto económico en la producción del cultivo no sea trascendental (Rubio, 2007).

La introducción de competidores del suelo es una de las medidas más efectivas reportadas para regular las densidades de población de las especies de fitopatógenos

como *Fusarium* spp., *Thielaviopsis paradoxa*, *Pectobacterium carotoborum*, que afectan las raíces de cultivos (Steinberg *et al.*, 2007). El manejo del sustrato o hábitat proporciona a las plantas ventajas competitivas sobre los patógenos y representa una de las mejores estrategias en la protección vegetal; lo anterior puede involucrar el uso de organismos de control biológico, o sus productos, o la manipulación de algunos aspectos físicos del crecimiento de la planta, tales como luz, temperatura, o la época de plantación (Cortes-Penagos *et al.*, 2007).

Siendo el cultivo del agave la materia prima para la producción de la bebida nacional “el tequila”, el presente trabajo tuvo como objetivos evaluar durante 2 años la dinámica de especies de *Trichoderma* spp., aisladas de las áreas productoras de San Juanito y Ameca (Lote los Pitayos) de agave azul *A. tequilana* var. Azul y de *Bacillus subtilis* comercial (Serenade®), introducidas en material propagativo (plantas de invernadero) en dos localidades de Jalisco, en función de la densidad poblacional de *Fusarium* spp.

3.4 MATERIALES Y MÉTODOS

3.4.1 Localización del área de estudio

El predio Loma alta Chapulimita, que se localiza en el municipio de Ahualulco de Mercado, Jalisco en las coordenadas geográficas latitud 20.700278 y longitud -103.976111 a una altura media de 1,340 msnm. El predio el Paiste, se ubica en el municipio de Tecalitlán, que pertenece a la Región Sureste de Jalisco, en las coordenadas 18.966667 de latitud norte y 102.99583 de longitud oeste, a una altura de 1,600 msnm.

3.4.2 Tratamientos

Los tratamientos considerados fueron tres cepas nativas de *Trichoderma harzianum*, *T. virens* y *T. aureoviride*, aisladas de plantaciones comerciales de agave tequilero de San Juanito y Ameca, Jalisco (Lote los Pitayos): así como una cepa comercial de *Bacillus subtilis* (Serenade®) (Bayer CropScience, México), las mezclas de *T. virens* +

B. subtilis, *T. aureoviride* + *B. subtilis*; y dos testigos un absoluto y uno comercial (Cuadro 6).

Cuadro 6. Tratamientos considerados dentro de la fase experimental de campo para los predios de Ahualulco y Tecalitlan, Jalisco, México.

TRATAMIENTOS	
T1	Sustrato enriquecido con <i>Trichoderma harzianum</i> (Th) (blanco)
T2	Sustrato enriquecido con <i>T. virens</i> (Tv) (rojo)
T3	Sustrato enriquecido con <i>T. aureoviride</i> (Ta) (azul)
T4	<i>Bacillus subtilis</i> (Serenade®) (Bs) (amarillo)
T5	<i>T. virens</i> + <i>B. subtilis</i> (Tv + Bs) (olivo)
T6	<i>T. aureoviride</i> + <i>B. subtilis</i> (Ta + Bs) (rosa)
T7	Sustrato sin enriquecimiento (testigo absoluto) (Tabs) (naranja)
T8	Sustrato comercial + fungicida (testigo regional) (Treg) (verde)

3.4.3 Diseño experimental

Para esta fase se seleccionaron dos plantaciones de agave con condiciones de clima contrastantes, predio Loma Alta Chapulimita en Ahualulco y predio El Paiste en Tecalitlán, Jal. En Ahualulco, Jalisco, la plantación comercial se estableció el 12 de mayo del 2009; mientras que en Tecalitlán, Jalisco, la plantación se estableció el 28 de mayo del 2009, previo al evento de siembra en ambos predios se realizó un muestreo en banda para obtener una muestra de suelo y determinar la flora microbiana fungosa y bacteriana nativa.

En cada una de las plantaciones se establecieron ocho tratamientos bajo un diseño de bloques completos al azar con cuatro repeticiones (Figura 5-8). La unidad experimental (UE) consistió de 20 plantas para Ahualulco (con un total de 640) y 25 plantas para Tecalitlán (con un total de 800); mientras que la parcela útil (PU) fue de 6 y 9 plantas, respectivamente. En ambas plantaciones la distancia entre plantas fue de 1.0m y la distancia entre surcos de 3.5m. Para determinar la ubicación de los bloques se utilizó la ecuación siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \beta_i + T + \epsilon_{ij}$$

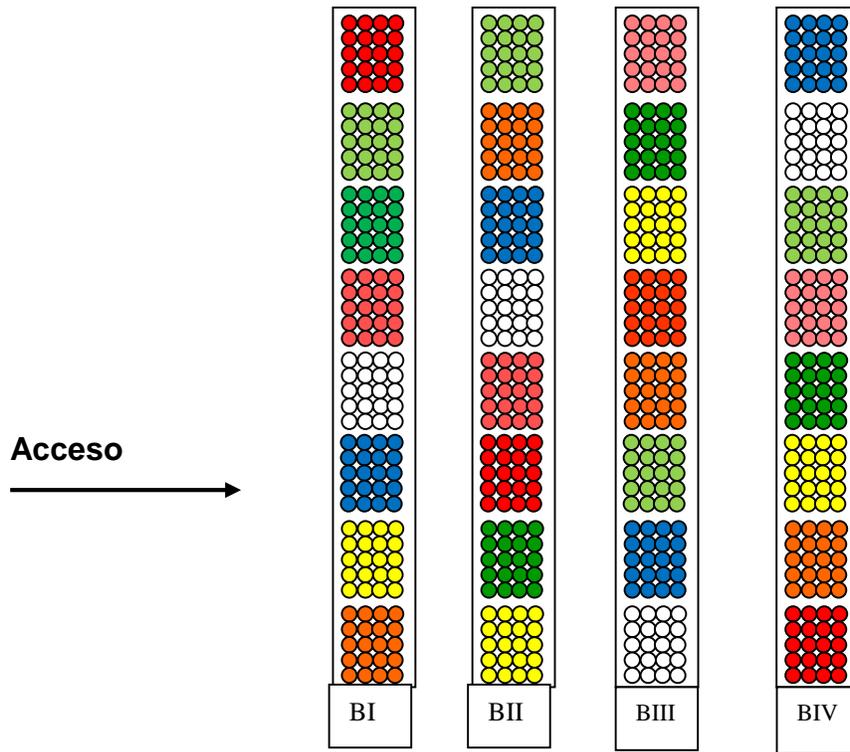


Figura 5. Diagrama del diseño experimental en el predio de agave tequilero Loma Alta Chapulimita en Ahualulco, Jalisco.



Figura 6. Panorámica del predio Loma Alta Chapulimita en Ahualulco, Jalisco.

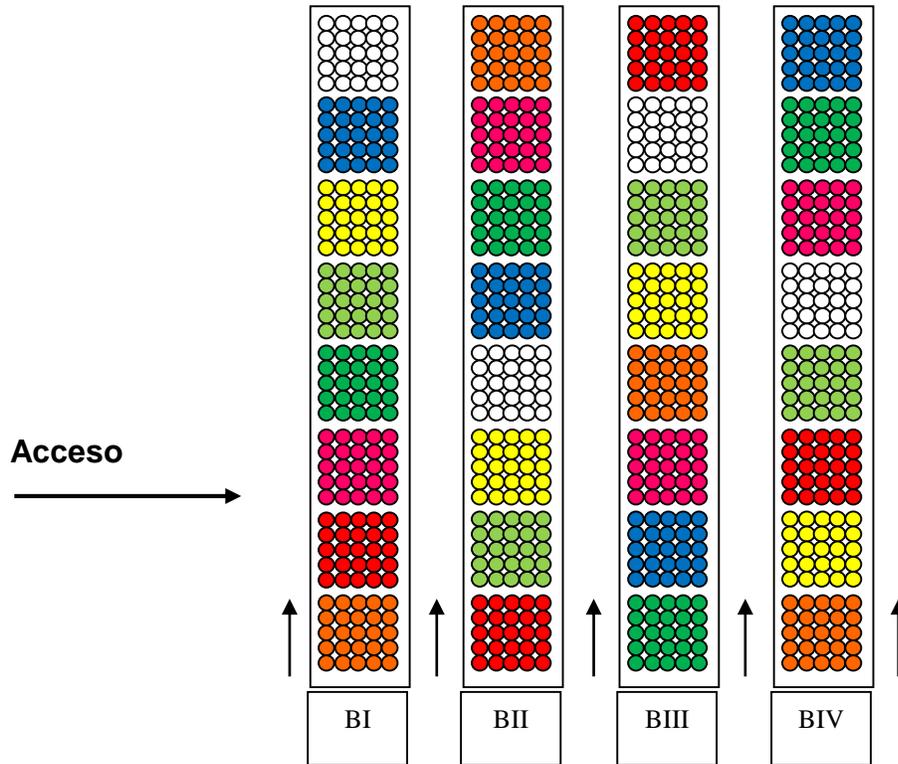


Figura 7. Diagrama del diseño experimental en el predio de agave tequilero Tecalitlan, Jalisco.



Figura 8. Panorámica que muestra los trabajos de campo para el establecimiento del experimento en Tecalitlán.

3.4.4 Muestreo

En cada fecha de muestreo solo se consideraron las plantas de la PU en cada experimento. Para el caso de Ahualulco la PU fue de 6 plantas para un total 192 plantas evaluadas (de septiembre 2009 a julio 2011), mientras que en Tecalitlan la PU fue de 9 y un total de 288 plantas evaluadas; en ambos casos se consideraron las plantas centrales. El intervalo de muestreo fue de 90 días. Se realizaron 8 muestreos de septiembre 2009 a julio 2011.

Las variables evaluadas fueron altura de planta y cobertura (cm), unidades formadoras de colonias (UFC) de *Trichoderma*, *Fusarium* y *Bacillus* en suelo de la rizosfera; contenido de clorofila. Para la evaluación final se consideraron las variables diámetro de piña (DIAMP) (cm) y número de hijuelos (HIJU).

Se tomaron en cuenta las condiciones ambientales de temperatura y humedad relativa de cada una de las localidades donde se desarrollaron los experimentos.

3.4.5 Cuantificación de UFC

Para *Trichoderma* spp. y *Fusarium* spp., la cuantificación de las UFC provenientes de suelo de la rizosfera, se hizo a través del procedimiento siguiente: 1) se pesaron 10g de una muestra del sustrato y se agregaron en 90mL de agua destilada estéril en un matraz de 125mL; de esta solución se hicieron diluciones hasta 10^{-3} . Se empleó el medio de cultivo Papa Destroza Agar Tergitol Estreptomina (PDA-TS) con 0.5mL del surfactante comercial Penetrex® en sustitución de tergitol, 0.01g de estreptomina y 0.0075g de clorhidrato de tetraciclina y este medio se agitó suavemente para no formar burbujas. De la dilución 10^{-3} se tomó 1mL seccionado en 10 cajas de Petri, de tal forma que en cada caja se agregaron 0.1mL de dilución y posteriormente se agregó el medio PDA-TS. El material se incubó por 7 días a temperatura ambiente de laboratorio de 22 a 24°C. Para la determinación de UFC de *Bacillus subtilis* se realizó el procedimiento anterior, solo que se empleó la dilución 10^{-8} en medio de cultivo agar nutritivo (AN).

3.4.6 Determinación de clorofila

Se tomaron al azar 10g de hojas de agave por tratamiento y se introdujeron individualmente en frascos de vidrio de 250 mL de capacidad con 80mL de acetona al 70%, se dejaron reposar por 24h en oscuridad y posteriormente se llevaron al espectrofotómetro para su cuantificación.

3.4.7 Altura, cobertura, diámetro de piña y número de hijuelos

Se realizó la medición directa con un flexómetro de 2m de longitud para las tres primeras variables. El número de hijuelos se hizo a través del conteo visual de cada planta de la PU en cada tratamiento.

3.4.8 Análisis estadístico

En cada una de las variables se determinó el área bajo la curva (ABC), usando la siguiente ecuación sugerida por Madden *et al.* (2007):

$$ABCPE = \sum_i^{n-1} \left(\frac{y_i + y_{i+1}}{2} \right) * (t_{i+1} - t_i)$$

Donde, n es el número de mediciones, y_i es la variable evaluada, y t_i es el número de días desde el inicio del experimento a la fecha de medición i .

Para los datos de ABC de cada tratamiento se realizó análisis de varianza (ANOVA) y cuando fue necesario también se realizó prueba de comparación de medias LSD ($\alpha=0.05$) con el paquete estadístico SAS (ver. 9.0 para computadoras, TS MO, 2002). Para las variables DIAMP y HIJU en la evaluación final también se realizó ANOVA y cuando fue necesario también se realizó prueba de comparación de medias LSD ($\alpha=0.05$).

3.5 RESULTADOS

3.5.1 Experimento Ahualulco, Jalisco

3.5.1.1 Flora microbiana nativa

Se detectaron UFC gr⁻¹ de suelo de *Trichoderma* 0.25 (x1000), *Penicillium* 3.8 (x1000) y *Mucor* 0.5 (x1000). No se detectó *Bacillus*.

3.5.1.2 Área bajo la curva

En el ABC de las variables UFC *Trichoderma* y *Fusarium*, así como en la concentración de clorofila, altura y cobertura de las plantas, no se detectaron diferencias significativas entre tratamientos, excepto para UFC de *Bacillus* ($P < 0.0001$) (Cuadro 7). De esta forma, los tratamientos Bs y Tv+Bs alcanzaron los niveles más sobresalientes de UFC con 71.250 y 66.750, respectivamente; les siguió el tratamiento Ta+Bs con 26.625 UFC; Tv y Tabs con 18.00 y 19.875 UFC, respectivamente; Th, Ta y Treg con 4.500, 12.375 y 10.500 UFC, respectivamente.

A pesar de no existir diferencias significativas en la variable UFC de *Trichoderma*, se encontraron tratamientos como Tv, Bs y Ta+Bs, donde las diferencias fueron de más de 10 puntos con el resto de tratamientos (Cuadro 7). Un comportamiento similar se tuvo con las UFC de *Fusarium* donde se puede apreciar que el tratamiento Ta+Bs resultó con 13.388 UFC, casi el doble del resto de tratamientos.

De igual forma, las variables DIAP e HIJU, no mostraron diferencias significativas entre tratamientos (Cuadro 8).

3.5.1.3 Dinámica de UFC de *Trichoderma*, *Fusarium* y *Bacillus*, en el tiempo

La Figura 9 ilustra la dinámica de los diferentes tratamientos y las variables que se evaluaron, en ella se aprecia que las UFC de *Trichoderma* son muy sensibles a la temperatura ambiental que predomine, ya que cuando se presentaron las épocas de sequía y mayor temperatura 30 a 34°C de marzo a junio de 2010 y 2011, las

densidades de esta variable bajaron drásticamente a niveles incluso de cero como Th y Ta en mayo de 2010. Lo mismo ocurrió en Tv, Tv+Bs y Ta+Bs en la misma época solo que los niveles fueron cercanos a Log 1 y 0.5 mL⁻¹. En el tratamiento Bs las UFC de *Trichoderma* descendieron en las épocas frías de enero a febrero de 2010 y 2011. En los tratamientos Tabs y Treg se mantuvo constante oscilando de Log 1.5 a 2.5 mL⁻¹ excepto en el último muestreo de 2011 que descendieron hasta Log 0.5 mL⁻¹. En los periodos de descenso de UFC de *Trichoderma* se incrementaron las UFC de *Fusarium*.

Cuadro 7. Área bajo la curva de las variables UFC de *Trichoderma*, *Fusarium* y *Bacillus*; así como las variables clorofila, altura y cobertura de la planta. Prueba de comparación de medias LSD ($\alpha=0.05$), en Ahualulco, Jalisco.

Tratamiento	ABC (área bajo la curva)					
	<i>Trichoderma</i> (*P=0.5915)	<i>Fusarium</i> (*P=0.9738)	<i>Bacillus</i> (*P=<0.0001)	Clorofilas (*P=0.8694)	Altura (*P=0.2883)	Cobertura (*P=0.3223)
T1 Th	13.275 a**	5.400 a	3.750 d	5.0908 a	1436.49 ba	1511.43 ba
T2 Tv	15.750 a	6.600 a	9.000 d	4.9956 a	1418.87 ba	1599.92 ba
T3 Ta	16.388 a	5.325 a	14.250 cd	4.8756 a	1404.96 ba	1531.32 ba
T4 Bs	18.713 a	5.925 a	40.125 b	4.8684 a	1425.41 ba	1545.19 ba
T5 Tv + Bs	14.325 a	5.550 a	64.500 a	5.1998 a	1405.97 ba	1490.15 b
T6 Ta + Bs	12.000 a	5.775 a	28.500 cb	5.0777 a	1398.31 ba	1547.13 ba
T7 Tabs	21.825 a	4.763 a	9.750 d	4.9476 a	1374.93 b	1492.63 ba
T8 Treg	16.425 a	6.488 a	1.500 d	4.9239 a	1471.80 a	1610.30 a

*Probabilidad resultado del ANAVA para esa variable; **tratamientos con la misma letra son estadísticamente iguales.

Las UFC de *Bacillus* en los tratamientos Bs y Tv+Bs, tuvieron un comportamiento estable durante el tiempo de evaluación, lo que indica que las condiciones climáticas de temperatura y sequía, no fueron factor limitante para su establecimiento, lograron tolerar las temperaturas máximas de 30 a 34°C de los meses de marzo a junio de 2010 y 2011, con humedades relativas bajas de menos de 50% en 2010 y menos a 40% en

2011. En el tratamiento Ta+Bs el comportamiento de *Bacillus* fue similar al de *Trichoderma*. En los tratamientos Th, Tv, Ta, Tabs y Treg, *Bacillus* tuvo un comportamiento discreto, sin embargo se observó que a partir de los 18 meses después de establecido en campo inicia un claro ascenso de su densidad poblacional.

Cuadro 8. Análisis de varianza (ANAVA) y prueba de comparación de medias LSD ($\alpha=0.05$) para las variables DIAMP e HIJU en la evaluación final en Ahualulco, Jal.

TRAT	DIAP *(P=0.3178)	NHIJ *(P=0.2300)
T1 Th	12.213 b	5.995 a
T2 Tv	12.473 b	5.805 ba
T3 Ta	12.705 b	4.5775 ba
T4 Bs	13.123 ba	5.205 ba
T5 Tv + Bs	12.663 b	5.205 ba
T6 Ta + Bs	12.455 b	5.7375 ba
T7 Tabs	17.623 a	4.265 b
T8 Treg	13.163 ba	5.915 a

* Probabilidad resultado del ANAVA para esa variable; **tratamientos con la misma letra son estadísticamente iguales.

3.5.2 Experimento Tecalitlán, Jalisco

3.5.2.1 Flora microbiana nativa

En suelo del predio de agave tequilero de Tecalitlán se obtuvieron UFC gr⁻¹ de *Trichoderma* en 1.0 (x1000), *Fusarium* 0.5 (x1000), *Penicillium* 7.5 (x1000) y *Aspergillus* 1.5 (x1000). No se detectaron UFC de *Bacillus*.

3.5.2.2 Área bajo la curva

El ABC de las variables UFC de *Trichoderma* y *Fusarium*, así como clorofilas, altura y cobertura de la planta, no mostró diferencia significativas entre tratamientos, excepto para UFC de *Bacillus* ($P=<0.0001$) (Cuadro 4). De este modo, el tratamiento Tv+Bs alcanzó el nivel más sobresalientes de UFC con 64.500, le siguió Bs con 40.125; Ta+Bs y Ta, con 28.500 y 14.250 UFC, respectivamente; Th con 3.750; Ta con 9.000; Tabs con 9.750 y Treg con 1.500 UFC. No obstante que no se detectaron diferencias

significativas en *Trichoderma*, se encontraron tratamientos como Tabs con niveles de UFC de 21.825, lo que significó más de 6 puntos por arriba del resto de los tratamientos (Cuadro 9).

En las variables DIAP e HIJU, no se detectaron diferencias significativas entre tratamientos (Cuadro 10).

Cuadro 9. Área bajo la curva de las variables UFC de *Trichoderma*, *Fusarium* y *Bacillus*; así como las variables clorofila, altura y cobertura. Prueba de comparación de medias LSD ($\alpha=0.05$), en Tecalitlán, Jalisco.

Tratamiento	ABC (área bajo la curva) (LSD)					
	<i>Trichoderma</i> (P=0.5915)	<i>Fusarium</i> (P=0.9738)	<i>Bacillus</i> (P=<0.0001)	Clorofilas (P=0.8694)	Altura (P=0.2883)	Cobertura (P=0.3223)
T1 Th	13.275 a	5.400 a	3.750 d	5.0908 a	1436.49 ba	1511.43 ba
T2 Tv	15.750 a	6.600 a	9.000 d	4.9956 a	1418.87 ba	1599.92 ba
T3 Ta	16.388 a	5.325 a	14.250 cd	4.8756 a	1404.96 ba	1531.32 ba
T4 Bs	18.713 a	5.925 a	40.125 b	4.8684 a	1425.41 ba	1545.19 ba
T5 Tv + Bs	14.325 a	5.550 a	64.500 a	5.1998 a	1405.97 ba	1490.15 b
T6 Ta + Bs	12.000 a	5.775 a	28.500 cb	5.0777 a	1398.31 ba	1547.13 ba
T7 Tabs	21.825 a	4.763 a	9.750 d	4.9476 a	1374.93 b	1492.63 ba
T8 Treg	16.425 a	6.488 a	1.500 d	4.9239 a	1471.80 a	1610.30 a

Cuadro 10. Análisis de varianza (ANAVA) y prueba de comparación de medias LSD ($\alpha=0.05$) para las variables DIAMP e HIJU en la evaluación final en Tecalitlán, Jalisco.

TRAT	DIAP (*P=0.8312)	NHIJ (*P=0.2727)
T1 Th	16.7725 a	4.6625 ba
T2 Tv	16.41 a	4.6925 ba
T3 Ta	16.5888 a	4.7713 ba
T4 Bs	16.55 a	4.0825 b
T5 Tv + Bs	15.775 a	4.8 ba
T6 Ta + Bs	15.8025 a	5.3 ba
T7 Tabs	16.08 a	5.3575 ba
T8 Treg	16.77 a	5.8575 a

* Probabilidad resultado del ANAVA para esa variable; **tratamientos con la misma letra son estadísticamente iguales.

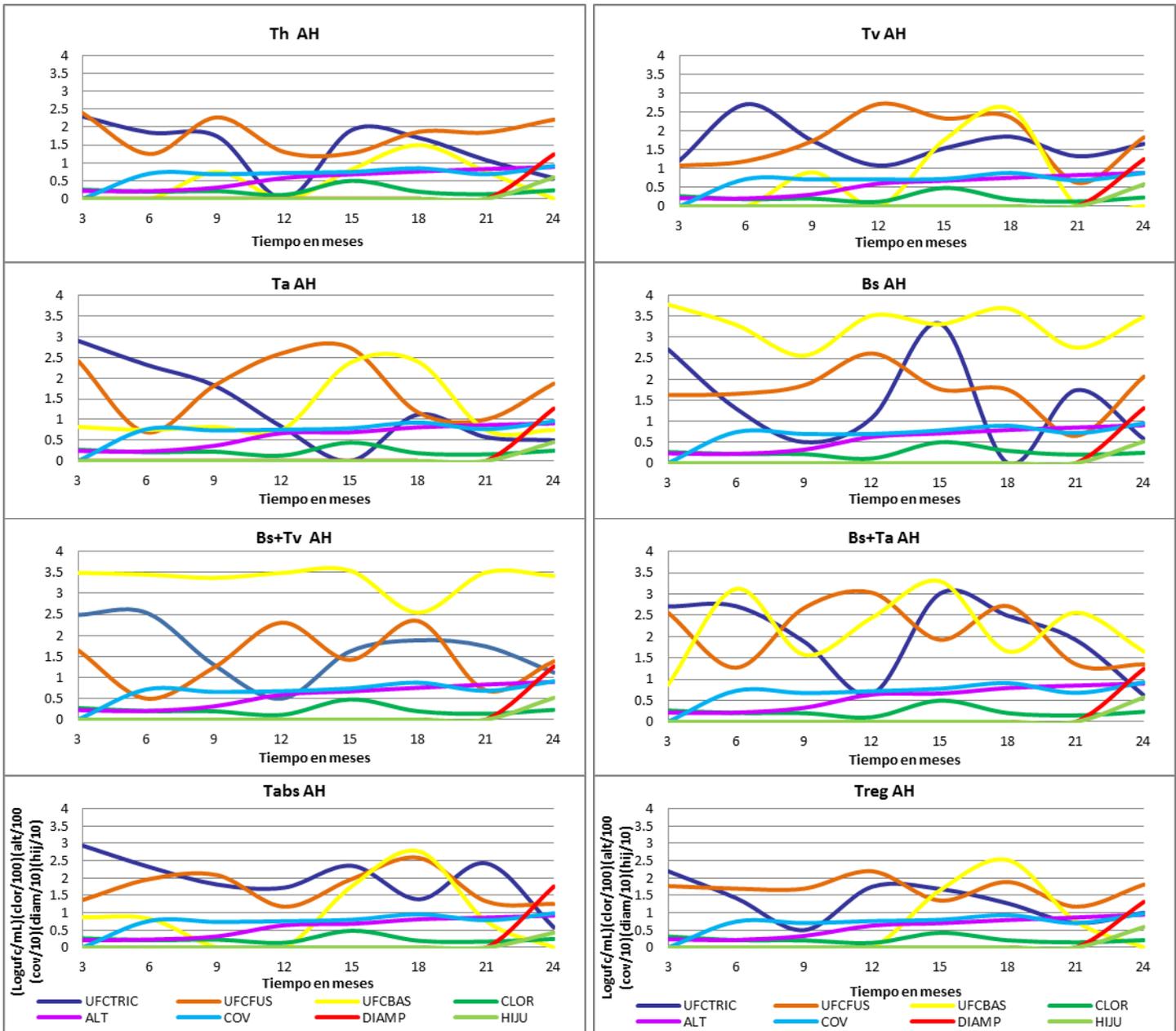


Figura 9. Dinámica poblacional de UFC de *Trichoderma*, *Bacillus* y *Fusarium*, así como de las variables clorofila, altura, cobertura, diámetro de piña y número de hijuelos de septiembre de 2009 a julio de 2011, en los diferentes tratamientos (Th *T. harzianum*; Tv *T. virens*; Ta *T. aureoviride*; Bs *B. subtilis*; Tabs Testigo absoluto; Treg Testigo regional) establecidos en el predio de agave tequilero en Ahualulco (AH), Jalisco.

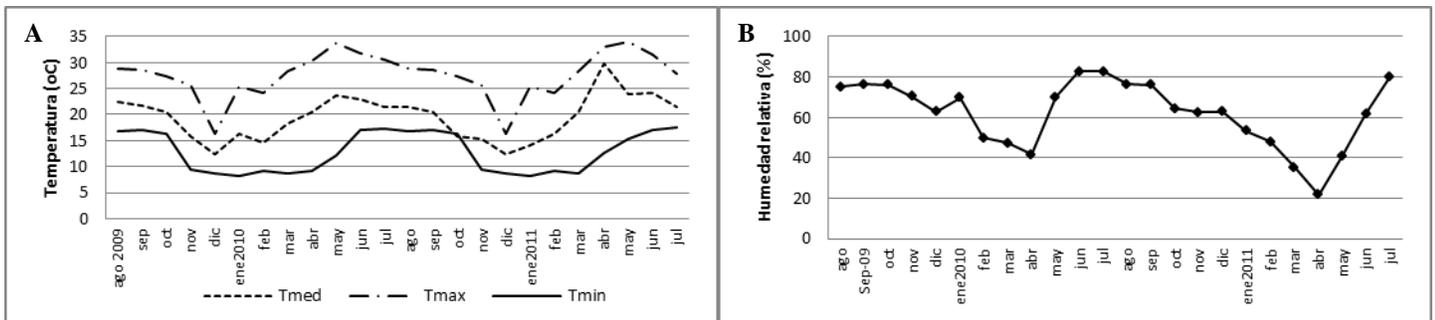


Figura 10. Temperatura (A) y humedad realtiva (B) en Ahualulco, Jalisco, de agosto de 2009 a julio de 2011. Nota: en Materiales y Métodos describir como se tomaron estos datos climáticos.

3.5.2.3 Dinámica de UFC de *Trichoderma*, *Fusarium* y *Bacillus*, Predio El Paiste, Tecalitlán

En esta localidad las UFC de *Trichoderma* son las que prevalecen más estables, sobre todo en los tratamientos Th, Tv, Tabs y Treb, con densidades que oscilaron entre Log 2.0 a 2.5 mL⁻¹, sin embargo se vieron alteradas por la temperatura en el periodo de seca de marzo a junio de 2010 y 2011, donde se tuvieron temperaturas de 32 a 34°C y humedades del 60% en 2010 y por debajo de 60% en 2011 (Figura 7 y 8). En los tratamientos Ta, Tv+B_s y Ta+B_s, las UFC de *Trichoderma* descendieron por debajo de Log 2.0 mL⁻¹. La dinámica de UFC de *Bacillus* se vio favorecida únicamente en los periodos de lluvia de septiembre a octubre de 2010 y 2011, principalmente en los tratamientos Ta, Bs, Tv+B_s y Ta+B_s, los rangos fueron de Log 1.5 a 2.5 mL⁻¹ en Ta, de Log 3.5 a 3.7 mL⁻¹ en Tv+B_s y Log 2.5 a 3.5 mL⁻¹ en Ta+B_s; sin embargo en los tratamientos Th, Tv, Tabs y Treg, las densidades de UFC de *Bacillus* estuvieron por debajo de las de *Trichoderma*. Th reporto Log 0.5 a 1.0 mL⁻¹ en el periodo de septiembre 2010 a julio de 2010; Tv estuvo con Log 0.75 a 1.0 mL⁻¹ de diciembre 2009 a marzo de 2011; y Tabs y Treg oscilaron de Log 1.0 a 1.5 mL⁻¹. En todos los tratamientos las densidades de UFC de *Fusarium* se encontraron por debajo de las de *Trichoderma*, que oscilaron de Log 1.5 a 2.5 mL⁻¹. También es claro que cuando bajaron las densidades de UFC de *Trichoderma* se disparaban las de *Fusarium* (Figura 11 y 12).

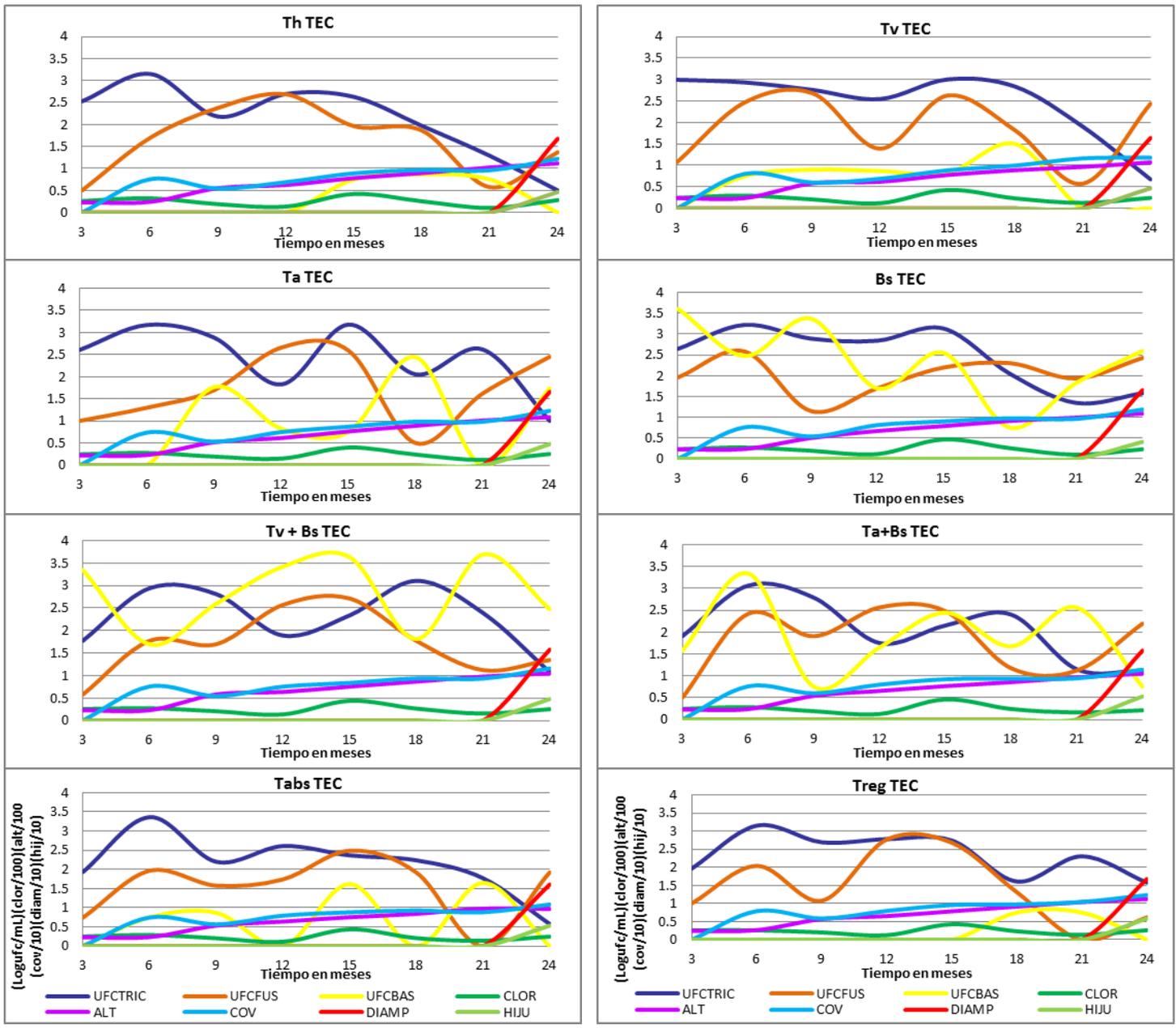


Figura 11. Dinámica poblacional de UFC de *Trichoderma*, *Bacillus* y *Fusarium*, así como de las variables clorofila, altura, cobertura de la planta, diámetro de piña y número de hijuelos, de agosto de 2009 a julio de 2011, en los diferentes tratamientos (Th *T. harzianum*; Tv *T. virens*; Ta *T. aureoviride*; Bs *B. subtilis*; Tabs Testigo absoluto; Treg Testigo regional) establecidos en el predio de agave tequilero en Tecalitlán (TEC), Jalisco.

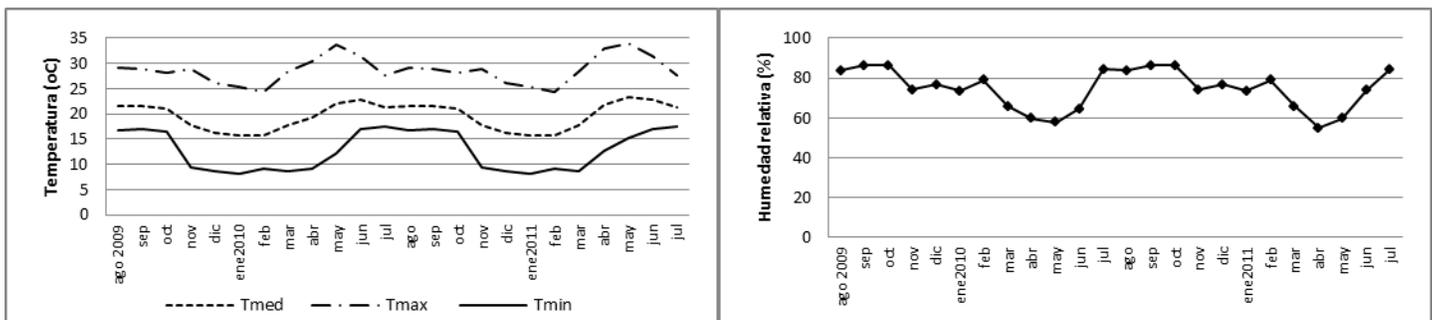


Figura 12. Temperatura (A) y humedad realtiva (B) en Tecatitlán, Jalisco, de agosto de 2009 a julio de 2011.

3.6 DISCUSIÓN

El comportamiento de *Bacillus* en las dos localidades fue diferente. En Ahualulco las condiciones de temperatura de 30 a 34°C y humedades relativas de 40% en 2010 y menores en 2011, de los meses de sequia de marzo a junio, no tuvieron efecto en la dinámica poblacional de esta bacteria que se mantuvo en niveles superiores a *Trichoderma* y su densidad supero a la de *Fusarium* spp. cuando se agregó sola o en mezcla con *Trichoderma virens*; pese a que las UFC de *Fusarium* fueron elevadas en los tratamientos que se indican como sobresalientes, lo que puede explicarse porque *Bacillus* también esta reportada como un agente que promueve el crecimiento de raíces y al existir *Fusarium* también se incrementa ya que su presencia se ve estimulada por los exudados radicales (Paulitz and Bélanger, 2001; Kloepper *et al.*, 1991). Los exudados, se cree son específicos de la planta y esta especificidad puede reflejar la evolución o adaptación fisiológica específica a las condiciones de un determinado hábitat del suelo (Crowley y Rengel 1999). El tipo de exudados de las raíces es fundamental para la distribución de los ecosistemas y del nicho específico de ciertas plantas. La composición de los exudados de las raíces dependerá de la especie de planta y la etapa de crecimiento de misma (Jaeger *et al.*, 1999). Al mismo tiempo, la planta influirá en estructura de las rizobacterias nativas así como de la dinámica poblacional de los agentes de biocontrol que se introduzcan. Bajo ciertas condiciones,

muchos exudados presentes en la raíz (azúcares, aminoácidos, o ácidos orgánicos) estimularan una respuesta de quimiotaxia favorable a bacterias respuesta en bacterias (Somers *et al.*, 2004).

Voelker *et al.* (1995, 1996) reportaron al factor secundario σ^B de *B. subtilis*, como el responsable de activar y dirigir la transcripción de un grupo de genes cuando se detiene el crecimiento exponencial de la bacteria en un medio que suprime el crecimiento o está sujeto a diversas condiciones de estrés ambiental (por ejemplo calor, sales, etanol o peróxidos). Su activación y transcripción dependen del mismo factor y se reporta que es regulado por cuatro proteínas (RsbV, RsbW, RsbX, RsbU). No es de sorprender que debido a su excelente respuesta al estrés, en la localidad de Ahualulco mantuviera densidades de *Fusarium* menores a ella. Cao *et al.* (2012) indicaron que *B. subtilis* tuvo la capacidad de suprimir a la marchitez del pepino ocasionada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum* debido a la producción de lipopeptidos que actuaron en su contra.

Bacillus es un productor de antibióticos con características antifúngicas, además de que el género está considerado como promotor del crecimiento con potencial para incrementar el rendimiento en las plantas. Varias especies de *Bacillus* han sido objeto de investigaciones para su implementación como agentes de control biológico debido a sus características de alta capacidad de colonización de la raíz y de supervivencia que le confieren las esporas. Actualmente *Bacillus subtilis* se distribuye comercialmente como agente de control de hongos fitopatógenos (Kloepper *et al.*, 1992; Van Veen *et al.*, 1997); además, es un grupo de bacterias que se encuentran en diversos nichos ecológicos incluyendo el suelo, agua y aire (Pang *et al.*, 1998). Estas bacterias producen endosporas, las cuales permiten ser resistente a condiciones ambientales desfavorables y sobrevivir por periodos prolongados en un rango amplio de temperatura, lo que ha hecho posible el desarrollo de formulaciones y su liberación comercial (Zhang *et al.*, 2009; Collins y Jacobsen, 2003).

En diversos estudios se ha demostrado la eficacia de *Bacillus* spp., en el control de pudriciones de raíz, como las ocasionadas por *Phoma* sp. en chícharo (Ryder *et al.*, 1999), marchitez por *Fusarium* spp., en tomate y la pudrición de raíces de trigo por

Rhizoctonia (Zhang *et al.*, 2009). Algunos de los estudios también reportaron a razas de *B. subtilis* como promotoras de crecimiento (Zhang *et al.*, 2009; Ryder *et al.*, 1999).

Hasta 1990 había más de 4 millones de hectáreas de algodón tratadas con este producto. Actualmente existen otros productos comerciales a base de esta especie *B. subtilis* que se utilizan en el control de bacterias y hongos en los cultivos de papa, maíz, algunas legumbres y plantas de ornato (Lara, 2000). También se sugirió que el tratamiento con *B. subtilis* tiene un efecto en los mecanismos de resistencia de la plántula, ya que en semillas de chícharo infectadas con *Fusarium udum* y tratadas con la bacterias se incrementó la cantidad de PAL (fenil alanina amonio liasa) y la actividad de la peroxidasa los cuales actúan como inductores de mecanismos de resistencia que estimulan el sistema de defensa de la planta a través de la ruta del etileno o la del ácido jasmónico (Podile y Laxmi, 1998).

Sin embargo, en la localidad de Tecatitlán su dinámica fue inestable y superada por *Trichoderma*, bajo condiciones de temperatura similares pero con una mayor humedad 60% en la etapa de sequía y 300 msnm más que en Aqualulco.

Los resultados de la localidad de Tecatitlán, ponen de manifiesto que el manejo de problemas fitosanitarios debe ser regionalizado (Madden *et al.*, 2007), ya que en este lugar *Trichoderma* tuvo un mejor comportamiento en la dinámica poblacional en el tiempo al mantener su dinámica poblacional en una densidad superior a la de *Bacillus*. Este resultado se debe en gran medida a la existencia previa de una población nativa del género que pone de manifiesto la existencia de una cepa adaptada a las condiciones de suelo y del ambiente prevalente. Esta sugerencia surge con el comportamiento que tuvieron los tratamientos testigo, Tabs y Treg, que fue similar al de Th y Tv; en los tratamientos con *Bacillus* como fueron el Bs, Tv+B_s y Ta+ B_s, el comportamiento de *Trichoderma* pudo alterarse por la presencia de esta bacteria. Las condiciones de humedad fueron más benignas ya que no descienden por debajo del 60% como en la localidad de Aqualulco. Klein y Eveleigh (1998) reportaron que las temperaturas óptimas de crecimiento de la mayoría de las especies de *Trichoderma* spp., va de 25 a 30°C. Las temperaturas pueden ser de importancia en la reactivación de especies de *Trichoderma* spp. De acuerdo con lo anterior, Roiger *et al.* (1991)

recuperaron a *T. virens*, *T. harzianum*, *T. koningii* y *T. hamatum*, a través de la incubación de 8 a 24°C y con un bajo nivel de formación de UFC a 8°C. *Trichoderma virens* se recuperó a 8 y 16°C. *Trichoderma hamatum* y *T. koningii* crecen más rápido a 25°C y desplazan a otras especies, mientras que *T. virens* y *T. polysporum* han mostrado mayor competitividad a temperaturas más bajas.

Existe correlación entre la distribución de especies de *Trichoderma* y las condiciones ambientales. *Trichoderma polysporum* y *T. virens* se presentan en regiones de temperaturas frías, mientras que *T. harzianum* es característico de climas cálidos (Danielson and Davey, 1973b). En general las especies de *Trichoderma* prevalecen en suelos ácidos, por ejemplo *T. viride* se ha encontrado en suelos ácidos de las regiones frías de Perú (Gochernaur, 1970). *Trichoderma hamatum* y *T. pseudokoningii* son más tolerantes a condiciones de humedad excesiva. En general *Trichoderma* spp., son relativamente intolerantes a niveles de humedad baja, lo que sugiere la baja cantidad de *Trichoderma* en lugares secos (Danielson and Davey, 1973a).

El potencial de las especies de *Trichoderma* spp., como agentes de control biológico de enfermedades en plantas se reconoció a principios de 1930 y en los siguientes años, se siguió reportando en el control de varias enfermedades (Howell, 2002; Metcalf and Wilson, 2001; Harman, 2000; Kapat *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1996; Chet, 1987). Esto culminó con la producción comercial de diversas especies de *Trichoderma* para mejorar la protección y crecimiento de varios cultivos en Estados Unidos de América (MsSpadden and Fravel, 2002), así como en la India, Israel, Nueva Zelanda y Suecia (Howell, 2002).

Las enfermedades causadas por hongos fitopatógenos con origen en el suelo plantean amenazas graves al rendimiento de varios cultivos en todo el mundo (Punja, 1988; Willetts and Wong, 1980). El uso de microorganismos específicos que interfieren con patógenos de las plantas, es un enfoque amigable y ecológico con la naturaleza, con lo que se disminuyen los problemas causados por los métodos químicos convencionales en la protección de las plantas (Harman *et al.*, 2004). Las especies de *Trichoderma* spp., son hongos que están presentes en casi todos los suelos agrícolas y otros entornos. Muchos mecanismos están involucrados en la actividad de biocontrol de

Trichoderma spp., como son la competencia por espacio y nutrientes, la producción de antibióticos difusible y/o volátiles; así como enzimas hidrolíticas como quitinasa y β -1, 3- glucanasa. Estas enzimas hidrolíticas degradan parcialmente la pared celular del patógeno y permiten su parasitación (Kubicek *et al.*, 2001). Este proceso de micoparasitismo limita el crecimiento y la actividad de los hongos patógenos de las plantas. Las diferentes especies de *Trichoderma* tienen el potencial para controlar patógenos con origen en el suelo más eficaz que los productos químicos (Papavizas, 1985) y también exhiben actividad como promotores de crecimiento de las plantas (Harman and Bjorkman, 1988; Duffy *et al.*, 1996).

En el presente estudio fue evidente el efecto que tienen las condiciones ambientales en el comportamiento de las poblaciones microbianas. Agrios (2005) indicó que la temperatura y humedad son factores que pueden condicionar las densidades de población de hongos y bacterias. Handelsman y Stabb (1996) señalaron la complejidad que involucran las poblaciones microbianas en el suelo entre patógenos y agentes de biocontrol en la dinámica ambiental que ocurre en la interface de la raíz y suelo conocida como rizósfera, la cual es definida por la región que la rodea. La rizósfera se caracteriza por cambios rápidos, donde se lleva a cabo una actividad microbiana intensa, y las poblaciones elevadas de bacterias sobresalen en comparación con suelo que no es de la rizósfera; en la rizósfera ocurren cambios dramáticos en periodos cortos, en donde eventos como la lluvia o épocas de sequia pueden provocar cambios en la fluctuación de la concentración de sales, pH, potencial osmótico, potencial del agua y estructura de las partículas del suelo. Si los periodos adversos se prolongan, la rizósfera puede cambiar el crecimiento de la raíz, las interacciones con otra biota del suelo y los procesos ambientales (Handelsman y Stabb, 1996).

Nuestros resultados ponen de manifiesto lo reportado por Handelsman y Stabb (1996), ya que las condiciones de baja humedad y temperaturas elevadas favorecieron el establecimiento de *Bacillus* en la localidad de Aqualulco, dado que no se encontró en la flora nativa.

3.7 CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo indican que *Bacillus* es una alternativa viable después de 2 años de monitoreo en campo para inducir supresividad y reducir las densidades de población de *Fusarium* spp., en la plantación de agave tequilero de Ahualulco, Jalisco. Para la plantación de Tecalitlán, la población nativa de *Trichoderma* sp. se encuentra establecida y posiblemente mantiene las densidades de población de *Fusarium* spp., en niveles inferiores.

3.8 LITERATURA CONSULTADA

- Aceves, R.J.J.2003. Prevención y Manejo Integral de la Marchitez de Agave Tequila Weber. Var. Azul en Jalisco. Folleto Técnico No. 1. Campo Experimentales Centro Altos de Jalisco, INIFAP. 62 p.
- Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology. Fifth Edition. Elsevier Academic Press. London, U.k 919p.
- Byerly, M. K. F. 2007. Prologo. P 7-8 in Pérez y Del Real (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 Centro. Tepatitlán, Jalisco. Libro Técnico No. 4.
- Cao, Y., Xu, Z., Ling, N., Yuan, Y., Yang, X., Chen, L., Shen, B., and Shen, Q. 2012. Isolation and identification of lipopeptides produced by *B. subtilis* SQR9 for suppressing *Fusarium* wilt of cucumber. *Scientia Horticulturae* 135:32-39.
- Castañeda-Vázquez, H. 2002. Aislamiento e identificación de los microorganismos responsables de la marchitez de agave tequilero. pp 21-24. In Flores López, H. E. (ed). Análisis agroecológico del *Agave tequilana* Weber var. Azul con énfasis en problemas en problemas fitosanitarios en Jalisco, INIFAP-CIRPAC. E. Altos de Jalisco, Publicación especial No. Tepatitlán, Jalisco, México.

- Chet, I. 1987. *Trichoderma*-Application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soilborne pathogenic fungi. Pages 137-160 in: Innovative Approaches to Plant Disease Control. I. Chet, ed. John Wiley & Sons, New York.
- Collins, D. P., and Jacobsen, B. J. 2003. Optimizing a *Bacillus subtilis* isolate for biocontrol of sugar beet cercospora leaf spot. Biol. Control 26:153-161
- CRT (Consejo Regulador del Tequila). 2005. Plagas y enfermedades del *Agave tequilana* Weber var Azul. Ed. Pandora. Impreso en México. 123 p.
- CRT (Consejo Regulador del Tequila). 2009. Innovación y Desarrollo Tecnológico para el Crecimiento Sustentable de la Cadena Productiva Agave-Tequila. Seminario Internacional sobre Indicaciones Geográficas. Noviembre 5 - 6, 2009 Zapopan, Jalisco, Méx. Disponible en: <http://www.crt.org.mx>. Consulta: 26 de febrero de 2013.
- CRT (Consejo Regulador del Tequila). 2010. Actualización de la base de datos y diagnóstico fitosanitario: *Agave tequilana* Weber Var. Azul. Comité técnico agronómico-Subcomite de fitosanidad. Consejo Regulador del Tequila (CRT). 10p.
- Crowley, D. E., and Rengel, Z. 1999. Biology and chemistry of rhizosphere influencing nutrient availability. In: Rengel Z (ed) Mineral nutrition of crops: fundamental mechanisms and implications. The Haworth, New York, pp 1–40.
- Danielson, R.M. and Davey, C.B. 1973a. The abundance of *Trichoderma* propagules and distribution of species in forest soil. Soil Biol. Biochem. 5:485-494.
- Danielson, R.M. and Davey, C.B. 1973b. Nonnutritional factors affecting the growth of *Trichoderma* in culture. Soil Biol. Biochem. 5:495-504.
- Duffy, B.K., Simon, A., and Weller, D.M. 1996. Combination of *Trichoderma koningii* with *fluorescens* pseudomonads for control of take-all on wheat. Phytopathology 86:188-194.
- Fucikovsky-Zack, L. 2000. La tristeza y muerte de *Agave tequilana* Weber var. Azul (TMA) y los microorganismos e insectos importantes relacionados. pp: 90. In: Memorias del XXVII Congreso Nacional de Ftopatología. Puerto Vallarta, Jalisco, México. Del 9 al 13 de julio del 2000.
- Gochenaur, S. E. 1970. Soil microflora of Peru. Mycopath. Mycol. Appl. 42:259-272.

- Handelsman, J. and Stann, E.V. 1996. Biocontrol of soilborne plant pathogens. *The Plant Cell* 8:1855-1869.
- Harman, G.E. 2000. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derive from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Dis* 84: 393
- Harman, G.E., Lorito, M., and Lynch, J.M. 2004. Uses of *Trichoderma* spp., to remediate soil and water pollution. *Adv. Appl. Microbiol.* 56:313-330
- Harman, G.E. and Bjorkman, T.1998. Potential and existing uses of *Trichoderma* and *Gliocladium* for plant disease control and plant growth enhancement. *Trichoderma and Gliocladium*. Taylor and Francis, London, United Kingdom.
- Howell, C.R. 2002. Cotton seedling pre-emergence damping-off incited by *Rhizopus oryzae* and *Pythium* spp. and its biological control with *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 92:177-180.
- Jaeger, C.H. III, Lindow, S.E., Miller, W., Clark, E., and Firestone, M. K. 1999. Mapping of sugar and aminoacids availability in soil around roots with bacterial sensors of sucrose and tryptophan. *Appl Environ Microbiol* 65:2685–2690.
- Kapat, A., Zimand, G., and Elad, Y. 1998. Effect of two isolates of *Trichoderma harzianum* on the activity of hydrolytic enzymes produced by *Botrytis cinerea*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 52:127-137.
- Klein, D. and Eveleigh, D.E. 1998. Ecology of *Trichoderma*. In: *Trichoderma & Gliocladium*. Vol. I. Basic biology, taxonomy and genetics. Edit. Kubicek, Ch. P. and Harman, E. G. Taylor & Francis. 57-74p.
- Kloepper, J.W, Tuzun S., Kuc, J. 1992. Proposed definitions related to induced disease resistance. *Biocontrol Sci. Technol* 2:349–351.
- Kloepper, J.W., R. Rodriguez-Ubana, G.W. Zehnder, J.F. Murphy, E. Sikora, and C. Fernandez. 1999. Plant root-bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases. *Austral. Plant Pathol.* 28:21–26.
- Kubicek, C.P., Mach, R.L., Peterbauer, C.R. and Lorito, M. 2001. *Trichoderma*: from genes to biocontrol. *J. Plant Pathol.* 83: 11-23.

- Lara R.J. 2000. Marcaje por recombinación ilegítima con un plásmido integrativo de cepas de *Bacillus subtilis* nativas de la rizosfera y detección por PCR en suelo. Tesis de Doctorado. CINVESTAV-Irapuato, Gto.
- Loera, Q.M.M. 2000. Selección *in Vitro* de *Agave tequilana* Weber var. azul para resistencia a *Fusarium oxysporum*. Tesis de Maestría en Ciencias. Posgrado en Procesos Biotecnológicos. Universidad de Guadalajara.
- Luna-Hernández, G.1996. Pudrición de tallo de *Agave tequila* Weber, var.azul en el estado de Jalisco, México. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Chapingo.
- Madden, L.V., Hughes, G., and van den Bosch, F.2007. The study of plant disease epidemics. APS Press, The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota U.S.A. 421 p.
- McSpadden Gardener, B.B., and Fravel, D.R. 2002. Biological control of plant pathogens: Research, commercialization, and application in the USA. Plant Health Progress. Online, publication doi:10.1094/PHP-2002- 0510-01-RV.
- Metcalf, D.D., and Wilson, C.R. 2001. The process of antagonism of *Sclerotium cepivorum* in white rot affected onion roots by *Trichoderma koningii*. Plant Pathol. 50:249-257.
- Pang, L., Close,M., Noonan, M., and Rhodamine, W.T. 1998. *B. subtilis* transport through an alluvial gravel aquifer. Ground Water 36:112-122.
- Papavizas, G. C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology and potential for biocontrol. Ann Rev Phytopathol 23: 23-54.
- Paulitz, C.T. and Belanger, R.R. 2001. Biological control in greenhouse systems. Annu. Rev. Phytopathology 39:103-133.
- Punja, Z. K. 1988. *Sclerotium (Athelia) rolfsii*, a pathogen of many plant species. Advances in Plant Pathology. Academic Press, San Diego, CA, USA.
- Roiger, D.J., Jeffers, S.N., and Caldwell, R.W. 1991. Occurrence of *Trichoderma* species in apple orchard and woodland soils. Soil Biol. Biochem. 23:353-359.
- Rubio, C.R. 2007. Enfermedades del cultivo del agave. Pp. 169-195. *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. *Libro Técnico* No. 4. Tepatitlán de Morelos, Jal.
- Ryder, M. H., Zhinong, Y., Terrace, T.E., Rovira, R.D., Wunhua, T., Carrell, R. L., Yan, Z., and Tang, W. 1999. Use of strains of *Bacillus* isolate in China to suppress take-all and *Rhizoctonia* root rot, and promote seedling growth of glasshouse-grown wheat in Australian soils. *Soil Biol. Biochem.* 31:19-29.
- SIAP, 2013. Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera. Cierre de producción agrícola por estado. SAGARPA. http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=351. Fecha de consulta: 2 de septiembre de 2013.
- Somers, E., Vanderleyden, J. and Srinivasan, M. 2004. Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet. *Crit Rev Microbiol* 304:205–240.
- Steinberg, Ch., Edel-Hermann V., Alabouvette C. and Lemanceau Ph. 2007. Soil suppressiveness to plant diseases. In: *Modern soil microbiology*. Edited by Van Elsas, J.D., Jansson, J.K. and Trevors, J. T. Second edition. CRPress, New York. 455-477.
- Van Veen, J. A., Van Oberbeek, L. S. and Van Elsas, J.D. 1997. Fate and activity of microorganisms introduced into soil. *Microbiology Molecular Review* 61:121-135.
- Virgen–Calleros, G. 2000. Epidemiología y manejo integrado de problemas fitosanitarios en *Agave tequilana* Weber, var. azul. Departamento de producción agrícola. CUCBA. U de G. Informe técnico para el programa general de apoyo y desarrollo tecnológico a la cadena productiva agave – tequila.
- Voelker, U., Voelker, A., Maul, B., Hecker, M., Dufour, A., and Haldenwang, W.G. 1995. Separate mechanisms activate σ^B of *Bacillus subtilis* in response to environmental and metabolic stresses. *Journal of Bacteriology* 177(13):3771-3780.
- Willetts, H.J. and Wong, J. A.L. 1980. The biology of *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. Trifolium*, *S. Minor*, with emphasis on specific nomenclature. *Bot Rev* 46: 101–165.

Zhang, J.X., Xue, A.G., Tambong, J.T. 2009. Evaluation of seed and soil treatments with novel *Bacillus subtilis* strains for control of soybean root rots caused by *Fusarium oxysporum* and *F. graminearum*. *Plant Disease*, 93(12) 1317-1323.

CAPITULO CUATRO

DISCUSIÓN GENERAL

México tiene la denominación de origen del cultivo del agave tequilero, por lo que la investigación en el mismo debe ser liderada aquí. Existe poca investigación respecto al uso de organismos benéficos para el control de fitopatógenos en agave tequilero, y de aquellas que existen son a nivel de vivero y no van más allá, que es estudiar el comportamiento de estos microorganismos en el tiempo y espacio en el lugar de destino final de la planta. Los trabajos realizados en la presente investigación demuestran que los organismos benéficos como *Trichoderma* spp., y *Bacillus subtilis* pueden inducir supresividad en agaves en estado de plántula y colonizar en forma rápida el sustrato y como una medida preventiva pueden mantener y afectar la incidencia y severidad de *Fusarium* spp. El control biológico de fitopatógenos involucra el mejorar o aumentar el antagonismo alrededor de las plantas o en el suelo hacia poblaciones bajas de los fitopatógenos para permitan un adecuado control. Las estrategias de este tipo preventivo son herramientas que permitan la protección contra infecciones por patógenos que pudieran establecerse. La protección del material propagativo es vía raíces, suelo o en semilla. Gnanamanickan *et al.* (2002) reportaron el éxito de tratamiento de la semilla en millones de hectáreas de algodón en china con *Streptomyces* 5406 en la protección de cultivos desde el punto de vista preventivo (Gnanamanickan, 2002). Howell (2002) y Harman *et al.* (2004) señalan que varias de las especies de *Trichoderma* tienen la capacidad de poder colonizar el área del sistema de raíces de plantas donde se aplica, con la finalidad de conferir protección y estos pueden actuar contra los fitopatógenos a través de la producción o liberación de varios compuestos que pueden inducir respuestas de resistencia sistémica adquirida o localizada en las plantas. Dicha asociación microorganismo-raíz causa cambios sustanciales en el metabolismo y proteoma de la planta. El que estos organismos puedan establecerse en suelo, también trae como beneficio que las especies puedan actuar a través de competencia por espacio o por micoparasitismo, mecanismos que se han reportado desde la década de 1970 para algunas de las especies de *Trichoderma*

(Harman, 2006; Harman *et al.*, 2004 y Howell, 2002). Respecto a el género *Bacillus* se le considera como promotor del crecimiento y con potencial para incrementar el rendimiento en las plantas. Varias especies de *Bacillus* se han estudiado para determinar su potencial como agentes de control biológico debido a sus características de alta capacidad de colonización de la raíz y de supervivencia que le confieren las esporas (Kloepper *et al.*, 1992; Van Veen *et al.*, 1997). Es un grupo de bacterias que se encuentran en diversos nichos ecológicos incluyendo el suelo, agua y aire (Pang *et al.*, 1998). Jacobsen *et al.* (2004) señalan que *Bacillus* spp., son agentes de control biológico que tienen un gran potencial como estrategia viable en un sistema de manejo integrado de fitopatógenos con tendencias hacia un manejo sustentable.

Los trabajos de campo del presente estudio demostraron que el comportamiento de los organismos benéficos en campo se puede ver afectado por las condiciones climáticas y características propias de cada nicho ecológico que se encuentra en la rizósfera y que comparte la planta con flora microbiana nativa y condiciones físicas de suelo. En este estudio se encontró que *Bacillus subtilis* puede tolerar temperaturas de 32 a 34°C y periodos de sequia con humedad relativa por debajo del 40%; mientras que *Trichoderma* spp., se ven afectadas y disminuidas en estos periodos críticos. Sin embargo, en localidades con temperaturas similares pero con humedad relativa cercana al 60% en esos periodos de secas *Trichoderma* spp., se adaptan fácilmente, no obstante que ya existen cepas nativas de estos organismos benéficos bien establecidas y las cuales pueden desplazara poco a poco a las cepas introducidas, debido a su ventaja coevolutiva con el ambiente en relación al hospedante. Con ambos organismos *Trichoderma* spp., y *B. subtilis* y en las dos localidades de estudio (Ahualulco y Tecalitlán, Jalisco), *Fusarium* spp., se mantuvo con densidades menores a las de los organismos benéficos.

Voelker *et al.* (1995) reportaron al factor secundario σ^B de *B. subtilis*, como el responsable de activar y dirigir la transcripción de un grupo de genes cuando se detiene el crecimiento exponencial de la bacteria en un medio que suprime el crecimiento o está sujeto a diversas condiciones de estrés ambiental, por ejemplo,

calor, sales, etanol o peróxidos. Su activación y transcripción dependen del mismo factor y se reporta que es regulado por cuatro proteínas (RsbV, RsbW, RsbX, RsbU). No es de sorprender que debido a su excelente respuesta al estrés, en la plantación de agave de Aqualulco ésta mantuviera densidades de *Fusarium* spp., menores a ella misma. Cao *et al.* (2012) indican que *B. subtilis* tiene la capacidad de suprimir a la marchitez del pepino ocasionada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum* debido a la producción de lipopeptidos que actúan en su contra. *Bacillus* es un productor de antibióticos con características antifúngicas. Actualmente *Bacillus subtilis* se distribuye comercialmente como agente de control de hongos fitopatógenos (Kloepper *et al.*, 1992; Van Veen *et al.*, 1997). Estas bacterias producen endosporas, las cuales permiten ser resistente a condiciones ambientales desfavorables y sobrevivir por periodos prolongados en un amplio rango de temperatura, lo que ha hecho posible el desarrollo de formulaciones y su liberación comercial (Zhang *et al.*, 2009; Collins y Jacobsen, 2003).

Klein y Eveleigh (1998) reportan que las temperaturas óptimas de crecimiento de la mayoría de las especies de *Trichoderma* spp., es de 25 a 30°C. Las temperaturas también pueden ser de importancia en la reactivación de especies de *Trichoderma* spp. De acuerdo con lo anterior, Roiger *et al.* (1991) recuperaron a *T. virens*, *T. harzianum*, *T. koningii* y *T. hamatum*, a través de la incubación de 8 a 24°C y con un bajo nivel de formación de UFC (Unidades Formadoras de Colonias) a 8°C. *Trichoderma virens* se recuperó entre los 8 y 16°C. *Trichoderma hamatum* y *T. koningii* crecen más rápido a 25°C y pueden desplazar a otras especies; mientras que *T. virens* y *T. polysporum* han mostrado mayor competitividad a temperaturas más bajas.

En otros estudios se ha observado una correlación entre la distribución de especies de *Trichoderma* y las condiciones ambientales. *Trichoderma polysporum* y *T. virens* se presentan en regiones de temperaturas frías: mientras que *T. harzianum* es característica de climas cálidos (Danielson y Davey, 1973b). En general, las especies de *Trichoderma* prevalecen en suelos ácidos, por ejemplo, *T. viride* se ha encontrado en suelos ácidos de las regiones frías de Perú (Gochernaur, 1970). *Trichoderma*

hamatum y *T. pseudokoningii* son más tolerantes a condiciones de humedad excesiva. En general *Trichoderma* spp., son relativamente intolerantes a niveles de baja humedad, lo que sugiere la baja cantidad de *Trichoderma* en lugares secos (Danielson and Davey, 1973a).

Los resultados de los experimentos del presente trabajo son una aportación hacia la posible utilidad de *Trichoderma* spp., y *B. subtilis* en la implementación de programas de control biológico como una estrategia viable dentro del manejo integrado del cultivo del agave tequilero y de manera regionalizada, que como lo demostraron los trabajos de campo, no se pueden esperar los mismos resultados en las diferentes regiones productoras de agave tequilero, con diferentes condiciones climáticas y tipos de suelos.

4.2 LITERATURA CONSULTADA

- Cao, Y., Xu, Z., Ling, N., Yuan, Y., Yang, X., Chen, L., Shen, B., and Shen, Q. 2012. Isolation and identification of lipopeptides produced by *B. subtilis* SQR9 for suppressing *Fusarium* wilt of cucumber. *Scientia Horticulturae* 135:32-39.
- Collins , D.P., and Jacobsen, B.J. 2003. Optimizing a *Bacillus subtilis* isolate for biocontrol of sugar beet cercospora leaf spot. *Biol. Control* 26:153-161
- Danielson, R.M. and Davey, C.B. 1973a. The abundance of *Trichoderma* propagules and distribution of species in forest soil. *Soil Biol. Biochem.* 5:485-494.
- Danielson, R.M. and Davey, C.B. 1973b. Nonnutritional factors affecting the growth of *Trichoderma* in culture. *Soil. Biol. Biochem.* 5:495-504.
- Gnanamanickan, S.S. 2002. Biological control of crop diseases. Marcel Dekker, Inc. USA. 468p.
- Gochernaur, S.E. 1970. Soil microflora of Peru. *Mycopath. Mycol. Appl.* 42:259-272.
- Harman, G.E. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 96:190-194
- Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M., 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev.* 2:43-56.

- Howell, C.R. 2002. Cotton seedling pre-emergence damping-off incited by *Rhizopus oryzae* and *Pythium* spp. and its biological control with *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 92:177-180.
- Jacobsen, B.J., Zidack, N.K., and Larson, B.J. 2004. The role of *Bacillus*-based biological control agents in integrated pest management systems: Plant diseases. *Phytopathology* 94:1272-1275.
- Klein, D. and Eveleigh, D.E. 1998. Ecology of *Trichoderma*. In: *Trichoderma & Gliocladium*. Vol. I. Basic biology, taxonomy and genetics. Edit. Kubicek, Ch. P. and Harman, E. G. Taylor & Francis. 57-74p.
- Kloepper J.W, Tuzun S, Kuc J. 1992. Proposed definitions related to induced disease resistance. *Biocontrol Sci. Technol.* 2:349–351.
- Pang, L., Close, M., Noonan, M., and Rhodamine, W.T. 1998. *B. subtilis* transport through an alluvial gravel aquifer. *Ground Water* 36:112-122.
- Roiger, D.J., Jeffers, S.N., and Caldwell, R.W. 1991. Occurrence of *Trichoderma* species in apple orchard and woodland soils. *Soil Biol. Biochem.* 23:353-359.
- Van Veen , J.A., Van Oberbeek, L.S., and Van Elsas, J.D.1997. Fate and activity of microorganisms introduced into soil. *Microbiology Molecular Review* 61:121-135.
- Voelker, U., Voelker, A., Maul, B., Hecker, M., Dufour, A., and Haldenwang, W. G. 1995. Separate mechanisms activate σ^B of *Bacillus subtilis* in response to environmental and metabolic stresses. *Journal of Bacteriology* 177(13):3771-3780.
- Zhang, J.X., Xue, A.G., Tambong, J.T. 2009. Evaluation of seed and soil treatments with novel *Bacillus subtilis* strains for control of soybean root rots caused by *Fusarium oxysporum* and *F. graminearum*. *Plant Disease* 93(12):1317-1323.