



COLEGIO DE POSTGRADUADOS
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

**DETERMINACIÓN DEL AGENTE CAUSAL DE LA
PUDRICIÓN DEL COGOLLO DEL *Agave tequilana* Weber var.
Azul EN EL ESTADO DE JALISCO**

JULIO CÉSAR CEN CAAMAL

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2012

La presente tesis titulada “**DETERMINACIÓN DEL AGENTE CAUSAL DE LA PUDRICIÓN DEL COGOLLO DEL *Agave Tequilana* Weber Var. Azul EN EL ESTADO DE JALISCO**” realizada por el alumno: **Julio César Cen Caamal** bajo la dirección del consejo particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

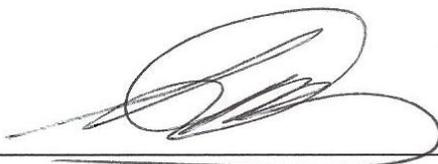
MAESTRO EN CIENCIAS

FITOSANIDAD

FITOPATOLOGIA

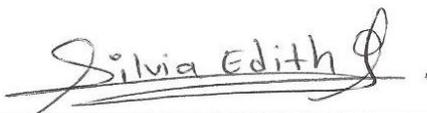
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



DR. GUILLERMO CARRILLO CASTAÑEDA

ASESOR



M.C. SILVIA EDITH GARCÍA DÍAZ

ASESOR



DR. JAVIER HERNÁNDEZ MORALES

Montecillo, Texcoco. Estado de México, octubre 2012

RESUMEN

DETERMINACIÓN DEL AGENTE CAUSAL DE LA PUDRICIÓN DEL COGOLLO DEL *Agave tequilana* Weber var. Azul EN EL ESTADO DE JALISCO.

Julio César Cen Caamal

Colegio de Postgraduados, 2012

En los últimos años la superficie cultivada de *Agave tequilana* Weber var. Azul en el estado de Jalisco ha disminuido, debido a la presencia de una enfermedad cuyos síntomas se manifiestan como pudrición blanda del cogollo y muerte de la planta. El objetivo principal fue determinar el agente causal de esta enfermedad. Para ello se realizaron aislamientos, pruebas bioquímicas y moleculares mediante la amplificación del fragmento 16S DNAr y pruebas de patogenicidad con resultados positivos. El patógeno purificado fue una bacteria Gram positiva; en microscopia electrónica se observaron células en forma de bacilo, con presencia de endosporas en la parte terminal y flagelos peritricos. Creció hasta 50°C en medio de agar nutritivo (AN). Este organismo, se encontró responsable de la pudrición blanda del cogollo en agave y mostró una patogenicidad a temperaturas de 29-32°C en invernadero. Los resultados mediante pruebas bioquímicas y el análisis de la amplificación del fragmento 16S DNAr indicó que el microorganismo implicado como el causante de la pudrición del cogollo en agave fue *Bacillus pumilus*. De acuerdo con la revisión de literatura, este es el primer informe sobre la ocurrencia de *B. pumilus* como agente causal de dicha pudrición en el cogollo del *Agave tequilana* Weber var. Azul en el estado de Jalisco.

Palabras clave: patogenicidad, prueba molecular, microscopia electrónica.

ABSTRACT

DETERMINACIÓN OF THE AGENT OF THE BUT ROT *Agave tequilana* Weber var. Azul IN THE STATE OF JALISCO.

Julio César Cen Caamal

Colegio de Postgraduados, 2012

In recent years, the area under *Agave tequilana* Weber var. Azul in the state of Jalisco has decreased, due to the presence of a disease whose symptoms bud as soft rot and plant death. The primary objective was to determine the causative agent of this disease. This isolates were performed, biochemical and molecular fragment by amplifying the 16S rDNA and pathogenicity tests with positive results. The pathogen was purified Gram positive bacteria; electron microscopy were observed bacillus shaped cells, endospores in the presence of the terminal and peritrichous flagella. He grew up to 50 ° C on nutrient agar (NA). This organism was found responsible for soft rot in agave heart and showed pathogenicity at temperatures of 29-32 ° C in the greenhouse. The results of biochemical tests and analyzing the amplification of 16S rDNA fragment indicated that the microorganism involved, as causing bud rot in agave was *Bacillus pumilus*. According to the literature review, this is the first report on the occurrence of *B. pumilus* as the causative agent of the rot at the heart of *Agave tequilana* Weber var. Azul in the state of Jalisco.

Key words: pathogenicity, molecular testing, electron microscopy.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgar la beca durante los estudios de maestría.

Al Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, y al Instituto de Fitosanidad en especial al programa de Fitopatología por fomentar mi creatividad académica y desarrollo profesional.

Al Dr. Leopold Fucikovsky Zak (†), por su humilde amistad, apoyo y consejos. Además de dirigir la planeación completa y la culminación de esta investigación. Siempre se le recordará con gran respeto y admiración. Descanse en Paz.

A la M.C. Silvia Edith García Díaz, por sus valiosas y acertadas sugerencias para mejorar este trabajo de investigación.

Al Dr. Guillermo Carrillo Castañeda, por su apoyo incondicional y sus grandes aportaciones que enriquecieron este trabajo de investigación.

Al Dr. Javier Hernández Morales, por su valiosa participación y ayuda en esta investigación.

Al Ing. Santo Angel Ortega Acosta, por su sincera amistad, apoyo incondicional y los buenos consejos otorgados durante mi estancia en el Colegio de Postgraduados.

DEDICATORIAS

A **DIOS**, que me sustentó durante mi estancia en el Colegio de Postgraduados Campus Montecillo.

A mi madre Fabiana, por su comprensión, cariño, dedicación, preocupación y apoyo incondicional.

A mi padre Isidro, por compartirme su gran experiencia y por sacarme adelante con sus grandes consejos para conseguir el éxito en la vida.

A mi hermano José Antonio, por estar pendiente de mis estudios y ser un gran ejemplo de superación personal.

A mi familia en general, Jaime Fernando, Yeny, Maribel, Lía, Ismael, Soemy, Yeny Guadalupe, Mayra, Isaí, Mateo, Isaac por su preocupación y los ánimos que me daban durante mi estancia en el Colegio, ellos al igual fueron mi motivación para salir adelante en mi carrera profesional.

A mis sobrinos: Damián, Valeria, Daniel, Josvín, Naydelin, Danitza, Amí, todos ellos fueron una gran inspiración durante mi carrera profesional.

ÍNDICE

PÁG

RESUMEN	iii
ABSTRAC	iv
AGRADECIMIENTOS	v
DEDICATORIAS	vi
ÍNDICE DE CUADROS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. Agave tequilero.....	3
2.1.1. Importancia del cultivo.....	4
2.1.1.1. Importancia nacional.....	4
2.1.1.1.1. Proceso de producción del tequila.....	5
2.1.1.2. Importancia estatal.....	5
2.1.1.3. Importancia económica.....	7
2.1.1.4. Exportación.....	8
2.1.1.5. Impacto social.....	9
2.1.1.6. Generalidades del cultivo.....	9
2.2. Requerimientos agroecológicos.....	10
2.2.1. Distribución y adaptación climática.....	10
2.2.2. Suelo.....	10
2.2.3. Temperatura.....	11
2.2.4. Precipitación, humedad ambiental y del suelo.....	11
2.2.5. Altitud.....	12
2.2.6. Luz.....	12
2.3. Limitaciones fitopatológicas.....	13
2.3.1. Enfermedades de importancia.....	14
2.3.1.1. Mancha gris (<i>Cercospora agavicola</i>).....	14
2.3.1.2. Anillo rojo (<i>Pantoea ananatis</i>).....	14
2.3.1.3. Pudrición del cogollo.....	14

2.4. <i>Bacillus</i> sp.....	15
2.5. Distribución geográfica de las enfermedades.....	16
III. MATERIALES Y METODOS.....	18
3.1. Colecta del material.....	18
3.2. Aislamiento y purificación del microorganismo.....	18
3.2.1. Selección del microorganismo para prueba de patogenicidad.....	19
3.3. Pruebas de patogenicidad.....	19
3.3.1. Pruebas de patogenicidad sobre fragmentos de agave.....	19
3.3.1.1. Tipo de inoculación.....	19
3.3.2. Pruebas de patogenicidad en incubadora.....	20
3.3.3. Pruebas de patogenicidad en invernadero.....	20
3.3.3.1. Técnicas de inoculación.....	21
3.4. Reaislamiento.....	22
3.5. Identificación de la bacteria causante de la pudrición del cogollo.....	22
3.5.1. Identificación fenotípica.....	22
3.5.1.1. Características morfológicas.....	22
3.6. Microscopia electrónica.....	23
3.7. Pruebas bioquímicas.....	23
3.8. Caracterización molecular.....	23
3.8.1. Extracción del DNA.....	23
3.8.2. Amplificación del fragmento 16S DNAr.....	23
3.8.3. Secuenciación.....	24
3.8.4. Análisis de datos.....	24
IV. RESULTADOS.....	25
4.1. Observación de plantas enfermas en el campo.....	25
4.2. Características de la cepa bacteriana.....	25
4.3. Pruebas de patogenicidad con tejidos.....	26
4.3.1. Evaluación de patogenicidad de <i>Bacillus pumilus</i> en fragmentos de agave.....	26
4.3.2. Efecto de temperatura de incubación.....	26
4.4. Pruebas de patogenicidad de <i>Bacillus pumilus</i> en incubadora a 30° C.....	27
4.5. Pruebas de patogenicidad con <i>Bacillus pumilus</i> en el cogollo de plantas de agave.....	27

4.6. Caracterización morfológica.....	30
4.7. Microscopia electrónica.....	30
4.8. Pruebas bioquímicas.....	31
4.9. Amplificación del gen ribosomal 16S por PCR.....	33
4.9.1. Análisis filogenético de la región ITS 16S.....	33
4.9.1.1. Secuencia depurada.....	34
V. DISCUSION.....	35
VI. CONCLUSIONES.....	38
VII. LITERATURA CITADA.....	39
VIII. ANEXOS.....	48

ÍNDICE DE CUADROS

PÁG

Cuadro 1.	Superficie plantada con <i>Agave tequilana</i>, en junio de 2005.....	7
Cuadro 2.	Exportaciones de tequila por año, por país en 2000-2006.....	9
Cuadro 3.	Localidades y fechas de muestreo.....	18
Cuadro 4.	Componentes para la mezcla de master-mix.....	24
Cuadro 5.	Caracterización fisiológica y bioquímica de <i>Bacillus pumilus</i>.....	32

ÍNDICE DE FIGURAS		PÁG
Figura 1	Plantas de <i>Agave tequilana</i> en campo con síntomas de pudrición de cogollo.....	25
Figura 2	Síntomas de necrosis y ablandamiento del tejido causado por <i>Bacillus pumilus</i>.....	26
Figura 3	Pruebas de patogenicidad en incubadora a 30° C.....	27
Figura 4	Síntomas causados por <i>Bacillus pumilus</i> con el uso de palillos.....	28
Figura 5	Síntomas causados por <i>Bacillus pumilus</i>, generando heridas en la parte central del cogollo.....	28
Figura 6	Síntomas causados por <i>Bacillus pumilus</i>, por inyección (suspensión bacteriana.....	29
Figura 7	Identificación morfológica y microscopia electrónica de <i>Bacillus pumilus</i>.....	31
Figura 8	Gel de agarosa.....	33
Figura 9	Árbol filogenético.....	34

I. INTRODUCCIÓN GENERAL.

El cultivo del agave (*Agave tequilana* Weber var. Azul) ocupa una superficie de más de 50,000 ha en el estado de Jalisco distribuido principalmente en tres zonas: altos, sur y centro. En los últimos años, el cultivo del agave se ha visto afectado por una serie de problemas fitosanitarios, destacando entre estos, aquellos causados por fitopatógenos. Sin embargo, es poca la información existente con respecto a esta problemática en agave (Valenzuela, 1994).

El agave azul está considerado como uno de los cultivos de mayor importancia en el estado de Jalisco desde 1995, debido a la creciente demanda de tequila que se derivó de la denominación de origen y la certificación de calidad; la promoción en los mercados internacionales por el Consejo Regulador del Tequila (CRT) y la proliferación de nuevas empresas. La demanda de materia prima para la industria del tequila aumentó la superficie del cultivo del agave tequilero en Jalisco de 20 350 ha en 1969, a 62 000 ha en 1998. En consecuencia, también han crecido sus problemas fitosanitarios, causados por hongos, bacterias y nematodos (Consejo Regulador del Tequila, 2000).

El Consejo Regulador del Tequila detectó en 1997, mediante un inventario en la zona de denominación de origen, el 22% de plantas enfermas por ataque de hongos y/o bacterias de un total de 203 millones de plantas cultivadas. En los años posteriores a pesar de no haberse realizado nuevas contabilizaciones, el problema persistió y el agricultor encontró dificultades para satisfacer la demanda que requería la industria (Consejo Regulador del Tequila 2000). Sin embargo, la manera asexual de propagar el agave tequilero durante años, condujo a la clonación de diversos genotipos seleccionados y, por lo tanto, a encontrar nuevas variantes fenotípicas dentro de las poblaciones cultivadas, lo anterior facilitó la incidencia y proliferación de enfermedades causadas por fitopatógenos (Fucikovsky, 2004). Estos fitopatógenos han provocado un incremento considerable en el desarrollo de las enfermedades, lo cual puede ocurrir debido a que existe poca variabilidad genética en esta planta y son monocultivo (Fucikovsky, 1995).

Actualmente la pudrición del cogollo del *A. tequilana* en el estado de Jalisco, es la enfermedad de mayor relevancia, la cual ha sido asociada a una bacteria, provocando grandes pérdidas a los productores.

Es necesario realizar investigaciones que permitan conocer al patógeno causante de esta enfermedad, para desarrollar estrategias de, prevención y control e implementar medidas fitosanitarias que eviten pérdidas económicas a los agricultores y a las industrias tequileras.

El objetivo de esta investigación fue: identificar y caracterizar mediante pruebas bioquímicas y moleculares, al organismo causante de la pudrición del cogollo del *Agave tequilana* Weber var. Azul en el estado de Jalisco.

II. REVISIÓN DE LITURATURA

2.1. Agave tequilero (*Agave tequilana* Weber var. Azul)

Fue nombrado por el botánico alemán Franz Weber en 1902, y es la única variedad permitida para la producción de tequila por el gobierno mexicano y ha sido propagada vegetativamente a través de los últimos 200 años. Se sabe que las plantas de agave son vulnerables a los patógenos, insectos y a condiciones ambientales adversas. Es una planta monocárpica perenne, que presenta el metabolismo ácido de las crasuláceas (planta CAM) (Nobel, 1994; Valenzuela, 1994). Estas plantas fijan el CO₂ durante la noche (cuando las temperaturas son más bajas), reduciendo la pérdida de agua por transpiración. Debido a su mayor eficiencia en el uso del agua, las plantas CAM como el agave azul, toleran periodos prolongados de sequía (Nobel *et al.*, 1995).

El género *Agave* se caracterizan por ser monocotiledóneas, económicamente muy importante y cuenta con 136 especies. Algunas de ellas eran consumidas por los antiguos habitantes de México siendo apetecible por su alto contenido de azúcar (Nobel, 1998). El *A. tequilana* es una planta xerófila (que crece en zonas áridas y cálidas) de hojas de color azul- verdoso, delgadas y casi planas; miden aproximadamente 1.25 m de largo y 10 cm de ancho y tienen una espina terminal de color rojo oscuro de 2 cm (Granados, 1993).

Su reproducción puede ser sexual por semillas, o asexual por ramas de los rizomas o bulbillos de la inflorescencia (Valenzuela, 1997). Hay muy poca diversidad genética como consecuencia de la utilización exclusiva de la propagación vegetativa. La falta de variabilidad genética ha generado plantas clonadas, que son vulnerables a nuevos y muy destructivos agentes patógenos que podría dar lugar a enfermedades con gran intensidad en grandes áreas geográficas (Gil-Vega *et al.*, 2001).

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

2.1.1. Importancia del cultivo

El cultivo del agave ha adquirido una mayor importancia debido a su creciente demanda. Esto aunado a que el cultivo se encuentra protegido bajo la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-1994, la cual establece como única especie admitida para la producción de tequila a *A. tequilana*, que haya sido cultivada dentro de territorio protegido por la Denominación de Origen del Tequila (DOT), que abarca todo el estado de Jalisco (124 municipios), siete municipios de Guanajuato, ocho de Nayarit, once de Tamaulipas y treinta de Michoacán.

Esta norma no prohíbe el cultivo de *A. tequilana* en otras zonas, si no que señala aquellas de las cuales se podrá extraer para que el producto sea considerado como tequila, que es lo que respalda la calidad del producto en México y el exterior (Yoldi, 2000).

2.1.1.1. Importancia nacional

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

El agave se cultiva de forma tradicional a través de hijuelos, que se arrancan de la planta madre de cuatro y hasta cinco años de edad, estos son plantados antes que empiecen las lluvias. Sin embargo, el avance tecnológico ha generado que a través de la micropropagación de plantas seleccionadas se pueda tener plantas casi libres de enfermedades, vigorosas y con una mayor producción de fructano (agavina), que es el polímero que se almacena en la planta y sirve en el proceso de hidrólisis y fermentación para la producción de tequila (Cedeño, 2007), que es el producto de la destilación de mosto (jugo fermentado) y que al menos contiene el 51% de jugo de agave azul cultivado en la región protegida, la cual se emite por primera vez, el 22 de noviembre de 1974.

En México, para 1988 el 96% de la superficie cultivada con agave, se ubicó en el estado de Jalisco, cambiando posteriormente en el año 2000 al 92% debido a la extensión del cultivo hacia otros estados (Núñez y Vázquez, 2003). Para el año 2007, el 85% del inventario de plantas de agave sembradas en el territorio de la Denominación de Origen correspondía a Jalisco (CRT,

2008). La importancia relativa del estado de Jalisco es menor, sin embargo, en valores absolutos el inventario de la producción de agave en la región de la DOT va en aumento al tener para el 2007 cerca de 504 millones de plantas sembradas.

2.1.1.1.1. Proceso de producción del tequila

Se inicia desde que el agave es jimado y llevado a la destilería. El primer proceso es el cocido de piñas, en este se produce la hidrólisis de la inulina mediante el cocimiento en vapor en horno a 95° C hasta autoclaves de 125° C para obtener azúcares libres para la fermentación.

El siguiente proceso es el molido, a través de diferentes métodos con el que se obtiene el jugo. Este es fermentado con levaduras naturales o alguna otra cepa seleccionada. En esta etapa es donde se pueden adicionar el azúcar sin sobrepasar el 49% permitido por la NOM-006-SCFI-2005. El proceso puede variar desde 18 hasta 76 horas.

El proceso final es la destilación mediante alambiques de olla, en donde en la primera destilación, el mosto es destilado para nombrar un líquido nombrado ordinario, con un 20% de alcohol por volumen. Se requiere de una segunda destilación para obtener un 55% de alcohol por volumen, para obtener el tequila que estará listo previa dilución, para ser envasada, o bien, si se requiere maduración, se someterá a un proceso de reposo o añejamiento (Cedeño, 2007).

Con la finalidad de certificar el cumplimiento de la NOM del tequila, garantizar al consumidor la autenticidad del producto y salvaguardar la DOT surge el 16 de diciembre de 1993 el Consejo Regulador del Tequila, CRT, A.C. que es una organización de carácter privado, sin fines de lucro y personalidad jurídica propia. Se reúnen todos los actores y agentes productivos ligados a la elaboración del tequila, con el fin de promover la cultura y calidad de esta bebida que se ha ganado un lugar importante entre los símbolos de identidad nacional.

2.1.1.2. Importancia estatal

Dentro del estado de Jalisco se consideran tres zonas productoras de agave, perfectamente delimitadas de acuerdo a la superficie sembradas, integradas por los siguientes municipios (Macías y Valenzuela 2007).

Zonas altos: Acatic, Arandas, Atotonilco el Alto, Ayotlán, Jesús María, La Barca, Acotlán, Tepatitlán de Morelos, Tetotlán, Zapotlán del Rey y Zapotlanejo.

Zona centro (Valles): Amatitlán, Antonio Escobedo, Arenal, Magdalena, Tala, Tequila y Zapopan.

Zona sur: Autlán de Navarro, Ejutla, Quitupan, Jecotepec, Zacoalco de Torres, Sayula, El Grullo, El Limón, Tonaya, Tuxcacuesco, Toliman y San Gabriel.

En 2007, el estado de Jalisco reportó cerca de 430 millones de plantas de agave azul; 220 millones (51%) se encontraban en tan sólo diez municipios de Jalisco registrados ante el Consejo Regulador del Tequila: Arandas, Tepatitlán, Atotonilco el Alto, Ayotlán, Jesús María y Zapotlanejo en la región los altos; Tequila, Amatitán y Ameca en la región Valles y Zacoalco de Torres en la región Sur (CRT, 2008).

En relación a la superficie agrícola, según datos del Servicio de Información Agroalimentaria (SIAP) en el 2006 la plantación de agave fue de 122 mil ha, siendo el tercer cultivo de mayor superficie sembrada en el estado de Jalisco, solo después del cultivo del maíz (531 mil ha) y de los pastos y praderas (364 mil ha). Representaba el 20% de la superficie destinada a cultivos perennes y el 61% de los cultivos industriales (SIAP, 2006).

El 70% de empleos generados en México en el ramo de bebidas destiladas de agave, se localizan en Jalisco. El 97% de la producción de tequila u otros destilados de agave, son de origen jalisciense. Esta industria en Jalisco aporta aproximadamente el 4% de toda la producción manufacturera de la entidad, siendo la segunda industria más importante del estado (INEGI, 2004). De un total de 77 empresas establecidas en Jalisco, 70 han implantado sus fábricas fuera de la zona conurbada de Guadalajara. De esta, el 54.5% en los Altos Sur, incluyendo Zapotlanejo, 44.5% en la región Valles y el 1% en el sur de estado (CNIT, 2007).

En 2006 se produjeron 80 millones de litro de tequila 100% agave y 160 millones de litro de tequila combinado con otros azúcares, siendo nueve los principales municipios productores, destacando los municipios de Zapotlanejo y Tequila que aglutinan 57% de la producción de tequila.

2.1.1.3. Importancia económica

Existen alrededor de 200 especies de Agave registradas a nivel mundial, 150 se encuentran en México (Granados, 1993). De estas el *Agave tequilana* var. Azul es la especie con mayor importancia en México debido a la producción de tequila.

Al incrementarse la demanda del tequila, el agave azul requirió plantarse en otras áreas geográficas, ubicadas en la región protegida por la Denominación del Origen del Tequila (DOT), a pesar de que en muchas áreas no existían antecedentes del cultivo (Bowen *et al.*, 2004). La DOT fue declarada en el Diario Oficial de la Federación el 9 de diciembre de 1974, modificada el 13 de octubre de 1977 y 12 junio del 2000. Desde el 13 de abril de 1978 fue certificada por el Registro Internacional des appellations D'origine de la Organización Mundial de la Propiedad Intelectual (Génova, Suiza), con el propósito de proteger el nombre *Tequila* y obtener su exclusividad.

El Consejo Regulador del Tequila (CRT, 2007) reporta que a pesar de que la siembra de agave para producción de tequila se encuentra restringido a cinco estados bajo la DOT, el 85 % de la producción es del estado de Jalisco, en donde en 2005 se sembraron 66,785 ha (Cuadro 1).

Cuadro 1. Superficie plantada con *A. tequilana* por estado dentro de la DOT en Junio de 2005 (CRT, 2007).

Estado	Superficie plantada (h)	% dentro de DOT
Jalisco	66,785.08	85.63
Nayarit	6,710.78	8.6
Guanajuato	1,087.32	1.39
Tamaulipas	1,770.35	2.27
Michoacán	1,640.38	2.1

Algunas empresas tequileras como Sauza y Cuervos (líderes de la producción) así como productores independientes de la región de estudio con experiencia en otros cultivos, plantaron esta especie, ocupando el 13% de la superficie agrícola regional a finales de la década de 1990 y principios del año 2000. La mayoría de los productores independientes cultivaron sin asesoría

técnica especializada, sin una planeación técnica-económica y con altas expectativas económicas provocadas por el efecto del precio del agave.

En el periodo 2006-2009, el agave saturó el mercado de la región en la DOT. Como consecuencia, los pocos productores que vendieron alguna parte de su producción en el año 2009 lo hicieron a precios de 70 centavos (M.N) por Kg (5 centavos de dólar) puesto a pie de fábricas regionales. Para la mayoría de los productores independientes representó una pérdida total de la inversión.

Por otro lado, también existen factores ambientales provocados por el uso indiscriminado de herbicidas en los agroecosistemas intensivos de agave (insumo principal en el paquete tecnológico de las empresas tequileras) lo cual provocó problemas de erosión de suelo al eliminar en más del 90% la cubierta vegetal durante siete años del cultivo, aunado a esto, también se presentó la pérdida de biodiversidad (vegetación circundante y fauna silvestre).

2.1.1.4. Exportación

Las exportaciones de tequila han crecido a razón del 9% promedio anual de 1995 a 2006. En el último año de ese periodo se exportaron 140 millones de litros de tequila, que significó el 57% de la producción total (CNIT, 2007 y CRT, 2007). La Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), a través del SIAP (2007) reportó que de 1996 a 2006 el volumen creció a una tasa media anual del 5.6%, al ubicarse en 101 163, 000 miles de litros de tequila. En 2004 se registraron más exportaciones al venderse 104 060,000 miles de litros (Cuadro 2).

Cuadro 2. Exportaciones de tequila por año, por país de destino 2000-2006 (Miles de litros)

Concepto	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	Promedio	%
EUA	73,021	55,011	53,033	65,907	89,462	58,474	65,514	60,821	79.3
España	583	1,561	463	957	1,261	1,669	1,790	878	1.1
Grecia	235	97	198	1,252	1,208	1,358	1,487	597	0.8
Francia	813	831	1,328	1,266	1,463	1,534	1,337	1,152	1.5
R. Unido	1,328	634	746	1,105	1,664	1,874	857	1,259	1.6
Subtotal	75,980	58,135	55,770	70,487	95,058	64,909	70,985	64,707	84.3
Resto	11,618	12,732	13,618	6,873	9,002	6,178	30,178	12,006	15.7
Total	87,598	70,867	69,388	77,360	104,060	71,087	101,163	76,713	100

Fuente: Programa Sistema-Producto del SIAP (2007).

2.1.1.5. Impacto social

En el estado de Jalisco se concentran 8, 391 productores, en Michoacán 771, en Nayarit 497, en Guanajuato 276 y en Tamaulipas 35. Esta industria genera empleo a más de 36 mil familias en el campo, 5,000 obreros, 3,000 empleados y 1,000 técnicos (empleos directos) y un gran número de empleos indirectos como comercializadores, envasadores, publicistas, fabricantes de etiquetas, tapones, botellas y cartón (CRT, 2005). En total más de 300,000 mexicanos dependen directa o indirectamente de la industria tequilera (Scheiman, 2005).

2.1.1.6. Generalidades del cultivo

Los propágulos para la plantación en *A. tequilana* son generalmente los brotes o hijuelos que son separados de la planta madre de cuatro años de edad, se seleccionan y posteriormente son plantados de acuerdo al proceso tradicional. Esta metodología crea un problema de uniformidad genética, fomentando una mayor susceptibilidad a las plagas y enfermedades (Gil-Vega *et al.*, 2001).

La planta requiere de un período aproximado de ocho a diez años para lograr una producción óptima de azúcares necesarios para la elaboración del tequila. La parte vegetal que se utiliza en el proceso es el tallo reducido conocido como “piña” o “corazón”. Estos se cosechan antes de la época de floración de la planta, ya que esta especie es monocárpica (Valenzuela-Zapata, 2003).

2.2. Requerimientos agroecológicos

2.2.1. Distribución y adaptación climática

El *A. tequilana*, es una planta perteneciente a la familia *Agavaceae* y originaria de América del norte (Gentry, 1982). Se encuentra distribuida entre los 5 y 25° de latitud norte y se adapta a regiones subtropicales semiáridas y subhúmedas con régimen térmico templado, semicálido o cálido (Ruiz *et al.*, 1999). El término semiárido implica un ambiente con 30 a 119 días en los que la precipitación pluvial es igual o superior a la evapotranspiración potencial, mientras que el término subhúmedo significa de 120 a 180 días con esta condición. En tanto, los regímenes templado, semicálido y cálido se refieren a una temperatura media anual entre 5 y 18 °C, entre 18 y 22 °C y >22 °C, respectivamente (Ruiz *et al.*, 1997; Medina *et al.*, 1998; López *et al.*, 2005).

El agave es una planta semiperenne y en cuanto a tipo fotosintético pertenece a las plantas CAM (metabolismo del ácido crasuláceo), por lo que la temperatura nocturna se convierte en una variable clave para la adaptación y productividad de esta especie (Pimienta *et al.*, 2000; Ruiz *et al.*, 2002) y para la identificación de áreas con potencial para su cultivo (Vargas, 2004).

2.2.2. Suelo

Los agaves prefieren suelos de textura media, por ejemplo suelos francos, franco-arenosos o franco-arcillosos. Aunque en zonas con baja precipitación, los agaves prefieren suelos con mayor retención de humedad, es decir suelos de textura pesada, como arcillosos o limo-arcillosos, pero pueden desarrollarse adecuadamente en suelos delgados o profundos. Además, el género *Agave* presenta tolerancia de ligera a intermedia a sales y prospera mejor en un rango de pH de 6.0 a 8.0 no son recomendables suelos con problemas de acidez o alcalinidad para su cultivo (FAO, 1994).

El agave puede desarrollarse en terrenos con alto grado de pendiente, con drenaje superficial muy eficiente, considerados no aptos para la agricultura tradicional. Sin embargo, bajo esas condiciones, es necesario realizar prácticas de conservación de suelo y agua para asegurar un ambiente favorable para el cultivo. En la actualidad, dentro de los requisitos para cultivar agave que fijan las compañías tequileras, se establece un límite máximo de pendiente del suelo de 8 %, para facilitar el manejo de este cultivo. En cuanto al límite inferior de pendiente, cabe mencionar que en terrenos planos se corre el riesgo de tener problemas de encharcamiento, lo cual es perjudicial para el cultivo. Los agaves requieren suelos con drenaje de bueno a excelente, de ahí

que no es conveniente cultivar agave en terrenos con pendiente inferior a 2 por ciento (FAO, 1994).

Con esto además, se evitaría que el agave desplace de manera significativa otros cultivos que actualmente ocupan las tierras de primera calidad en las diversas regiones agrícolas de las zonas de denominación de origen del país. Dado que el agave frecuentemente se cultiva en terrenos con declive, es conveniente procurar no plantar en terrenos con declinación norte, sobre todo en regiones donde las heladas son frecuentes. En regiones con altitud superior a 1800-2000 msnm, no se recomienda plantar agave en las partes bajas de las laderas, donde comúnmente, se presentan asentamientos de aire muy frío (Ruiz *et al.*, 1999).

2.2.3. Temperatura

El *A. tequilana* es una planta que presenta pobre tolerancia a las bajas temperaturas, en comparación con la mayoría de especies de la familia Agavaceae (Nobel y Smith; 1983, Nobel, 1988). La absorción celular se reduce a la mitad cuando las temperaturas descienden al nivel de -6 °C. Por esta razón el *A. tequilana* probablemente no puede cultivarse en regiones donde, aún ocasionalmente, se presenten temperaturas de -7 °C o inferiores. Por otro lado, la hoja de esta especie puede tolerar temperaturas hasta de 55 °C (Nobel *et al.*, 1998). Dado que es una planta CAM, el agave es muy sensible a las temperaturas nocturnas.

2.2.4. Precipitación, humedad ambiental y del suelo

El agave prospera bajo un régimen de precipitación anual de 700 a 1000 mm y una atmósfera de seca a moderadamente seca la mayor parte del año (Ruiz *et al.*, 1999). Sin embargo, Vargas (2004) señala un intervalo óptimo de lluvia acumulada anual de 600 a 1 800 mm.

Las regiones productoras de agave más importantes, localizadas en el Estado de Jalisco, presentan una precipitación anual que va de 700 a 1 100 mm (Ruiz *et al.*, 1997; Ruiz *et al.*, 1998; Flores *et al.*, 2003; Ruiz *et al.*, 2003).

A. tequilana, mantiene la ganancia de carbono durante el invierno, no obstante que en esas fechas la humedad en el suelo es normalmente baja. Las ganancias de carbono durante el periodo seco en plantas CAM como los agaves, nopales y pitayos, entre otras, se atribuyen a la succulencia de sus órganos fotosintéticos, que permite mantener turgente el tejido fotosintético

durante periodos de baja disponibilidad de agua (Gibson y Nobel, 1986; Nobel, 1994; Pimienta *et al.*, 2000).

De acuerdo con Flores *et al.* (2002) las características ambientales asociadas con un riesgo de presencia de marchitez en agave son: una humedad relativa promedio mensual de 60 % o más alta y una temperatura promedio anual de 20 a 23.9 °C.

2.2.5. Altitud

Aunque el *A. tequilana* se adapta a un amplio rango altitudinal, parece favorecerle el intervalo que va de 1 000 a 2 200 msnm (Ruiz *et al.*, 1999; Vargas, 2004). En altitudes inferiores a 1 000 m, el desarrollo inicial del cultivo es rápido y prometedor, por lo que sitios con estas características tienen potencial para la producción de planta, no así para la producción de «piña», ya que ésta, aunque puede adquirir un volumen considerable, generalmente y bajo un manejo convencional, no adquiere las características deseables y requeridas por la industria del tequila, sobre todo en cuanto a la concentración de azúcares se refiere. En altitudes superiores a 2 200 msnm, la velocidad de desarrollo del cultivo se reduce significativamente y el riesgo de daño por bajas temperaturas y/o heladas se incrementa de manera drástica (Ruiz *et al.*, 2003; Vargas, 2004).

2.2.6. Luz

El *A. tequilana* es una especie que se comporta mejor cuando se presentan días soleados la mayor parte del año, por lo que en una localidad en la que se pretenda introducir este cultivo, el periodo de lluvias no deberá ser muy prolongado. Aunque la cantidad de luz, expresada en flujo de fotones fotosintéticos, constituye un factor ambiental limitante para la fotosíntesis en plantas CAM (Gibson y Nobel, 1986), como en el caso Nopal (*Opuntia ficus-indica*) y del Pitayo (*Stenocereus queretaroensis*) (Nobel y Hartsock, 1984; Pimienta-Barrios y Nobel, 1998; Nobel *et al.*, 2002;); la evaluación estacional de la actividad fotosintética de *A. tequilana*, ha revelado que la obtención de valores fotosintéticos altos depende más de la temperatura nocturna que de la disponibilidad de luz (Pimienta *et al.*, 1999).

2.3. Limitantes fitopatológicas

El *A. tequilana* se considera en la actualidad un monocultivo, que presenta el riesgo de contraer enfermedades cuando se establece de manera prolongada en el mismo lugar, donde las plagas y enfermedades pueden proliferar en el sitio y colonizar el cultivo. Es importante considerar que un factor que favorece la aparición de enfermedades en el agave es la gran concentración de azúcares que se almacena en el tallo, componente muy importante para el desarrollo de ciertos microorganismos, incluidos los patógenos (Fucikovsky, 2004). No obstante, presenta cierta resistencia a plagas y enfermedades y ésta radica principalmente en las características de sus hojas, como son la cutícula gruesa y cerosa y el alto porcentaje de fibra que posee (Gil-Vega *et al.*, 2001).

Cuando las condiciones climáticas no son las adecuadas para el cultivo, la entrada de patógenos es relativamente fácil. Los cambios fisiológicos de la planta pueden favorecer las enfermedades (Loera-Quesada, 2000; Agrios, 2005).

Venezuela-Zapata (2003) presenta algunos antecedentes del género *Agave* con relación a las enfermedades. En el año 1887 Pérez hace uno de los primeros reportes referentes a enfermedades en agave, donde describe una enfermedad que ataca al maguey mezcalero; esta comienza con un amarillamiento de la planta, produciendo su muerte al cabo de un año, con las raíces y el tallo en completo estado de descomposición. La mancha negra (*Asterina mexicana* Ell. y Eu.), la antracnosis (*Colletotrichum agaves*) y la pudrición bacteriana (*Erwinia* spp.) son reportadas por Pérez-Serrato (1980) y por Granados (1993) como las enfermedades más importantes que atacan al agave pulquero (*Agave atrovirens* Kart) en la Mesa Central de México.

López (1989) señaló que el agave espadín (*Agave angustifolia*) es atacado por diferentes enfermedades, tales como la mancha cebrá (*Alternaria* sp.), punta seca (*Fusarium* sp.), fumagina (*Capnodium* sp.) y la secazón (*Erwinia* sp.).

Otras enfermedades detectadas en agave, de menor importancia económica son: el tizón de las pencas (*Alternaria* sp. y *Stagonospora gigantea*), pudriciones de la raíz (*Armillaria mellea*, *Fusarium* sp., *Phytophthora agaves*, *Rhizoctonia* sp. y *Rosellina* sp.), la pudrición roja de las pencas (*Chalariopsis* sp.), pudrición de la corona (*Bacillus* sp.), mancha circular de las pencas o

algodoncillo (*Coniothyrium concentricum*) y pudrición de las pencas (*Diplodia* sp.) (Granados, 1993).

2.3.1. Enfermedades de importancia

Las enfermedades causadas por microorganismos afectan considerablemente la producción agrícola. Para que estas ocurran los requisitos básicos son:

- a) Hospedante o planta susceptible
- b) Patógeno virulento presente
- c) Condiciones ambientales favorables (Agrios, 2005).

A continuación se presentan las enfermedades que más daño han ocasionado en *A. tequilana* en todas las áreas de origen:

2.3.1.1. Mancha Gris (*Cercospora agavicola*)

Esta enfermedad, tiene requerimientos de alta humedad relativa. Se caracteriza por provocar manchas ovaladas y secas de color gris en las hojas cercanas al cogollo, luego alcanza las hojas del cogollo y avanza hacia el centro del mismo y hacia la piña. También es característico que la planta manifiesta una clorosis generalizada (Fucikovsky, 2004).

2.3.1.2. Anillo rojo (*Pantoea ananatis*)

A pesar de que esta enfermedad se ha detectado frecuentemente en el cultivo, no causa muerte; sin embargo, su importancia radica en la reducción de crecimiento y la falta de su cosecha, ya que la piña debido a su tamaño pequeño no se cosecha. Los síntomas de anillo rojo inician con la presencia de una coloración rojiza en todas las hojas formando un anillo y constricción. Este síntoma está acompañado a veces de exudaciones de un líquido rojizo gomoso. Las hojas que se desprenden del cogollo quedan marcadas y adelgazadas en la zona dañada (Valenzuela-Zapata, 2003; CRT, 2004).

2.3.1.3. Pudrición del cogollo

En la pudrición del cogollo se han encontrado diversas bacterias sin definir cuál es el causante. Esta enfermedad se caracteriza por presentar pudrición blanda y junto con la marchitez

es una de las más agresivas en el cultivo, y puede darse la infección en plantas con estrés, o bien, en plantas que hayan sufrido alguna herida (Luna, 1998).

Las lesiones avanzan hacia el centro de las hojas, cuya lámina se puede apreciar arrugada y presentar un color violeta, el centro del cogollo se macera y produce un olor fétido; la pudrición llega incluso a la piña hasta ocasionar la muerte de la planta (Vélez- Gutiérrez, 1997). Se han aislado diferentes especies de bacterias asociadas a la pudrición del cogollo; la más común parece ser *Erwinia carotovora* según Vélez-Gutiérrez, (1997); Monroy-Sánchez, (1999), y Virgen-Calleros *et al.*, (2000).

En el año 2000 Fucikovsky-Zak, reportó por primera vez una bacteria Gram positiva, coryneforme, pectinolítica como causante de una pudrición blanda del cogollo y la punta de hojas jóvenes, y se descartó de esta manera a *E. carotovora* el principal agente causal de la pudrición, llegando a ocasionar la muerte de los hijuelos. Estos resultados fueron comprobados mediante pruebas de patogenicidad preliminares, por lo que en esta investigación se realizó la caracterización con el uso de métodos polifásicos y pruebas de patogenicidad para verificar la virulencia de este microorganismo.

Por otro lado Granados (1993) hace mención de *Bacillus* sp. como agente causal de una enfermedad a la que nombra “pudrición de la corona” y la señala como de menor importancia en las zonas magueyeras.

2.4. *Bacillus* sp.

Los *Bacillus* en general están clasificados dentro de los microorganismos aerobios o anaerobios facultativos y productores de catalasa. Las células vegetativas de *Bacillus* son de bordes rectos con extremos cuadrados o redondos. Pueden agruparse en cadenas o encontrarse solas. La ubicación de la espora puede ser central, terminal y subterminal; cilíndricas, ovales o redondas. La mayoría de los *Bacillus* son móviles (Holt *et al.*, 1994).

El género *Bacillus* tiene una amplia distribución en diferentes tipos de ambientes como el suelo (Aslim *et al.*, 2002), los ecosistemas de agua dulce (Mandal, 2005).

Los *Bacillus* tienen la ventaja de poseer varios mecanismos para asegurar su supervivencia ante condiciones físicas desfavorables. Bajo estas condiciones, *Bacillus* spp. para poder

mantenerse en estado vegetativo se induce la esporulación (Petersohn *et al.*, 2001). La habilidad de las especies de *Bacillus* de formar esporas altamente resistentes les da una ventaja competitiva muy importante en un ambiente como el suelo (Stephens, 1998). Así mismo, *Bacillus* spp. también se debe adaptar a cambios bruscos de temperatura, para esto cuentan con genes de shock térmico que inducen proteínas chaperonas o proteasas (Petersohn *et al.*, 2001). Esta capacidad de ser metabólicamente muy diversos les permite tener una colonización exitosa en el ambiente rizosférico. Entre algunos mecanismos promotores de crecimiento identificado por el género *Bacillus*, se encuentra la solubilización del fosfato (Chatli *et al.*, 2008), y la síntesis de fitohormonas como el ácido indol acético (Vessey, 2003).

2.5. Distribución geográfica de las enfermedades

La incidencia de las enfermedades con respecto al espacio y el tiempo se ha determinado de una manera empírica. Tan solo en la zona sur de Jalisco se reporta el 64% de plantas de agave con síntomas de pudrición de cogollo, observándose Cocula como el municipio con mayor incidencia con un 80% y Autlán de Navarro con un 54%. Otra enfermedad de gran importancia es la marchitez que se reporta con una incidencia del 40% de plantas con síntomas, siendo Cocula el más afectado con el 60% y San Gabriel con un 21%. La pudrición de cogollo y la marchitez son enfermedades que causan daños severos en plantaciones de cuatro años (Castro-Valera, 2003).

En la zona norte de Jalisco la enfermedad que se presenta con mayor frecuencia es la pudrición del cogollo, en donde Tepatitlán es uno de los municipios más afectados. Atotonilco es el municipio menos afectado con un 75% de plantas sanas (Ibarra-Nava, 2001).

Las zonas Altos y Acatic, presentan la mayor incidencia de pudrición del tallo, pudrición del cogollo y amarillamiento; ésta última enfermedad se desarrolla con tradición en las zonas sur y Tequila.

Los factores que han influido en la diseminación de material con problemas fitopatológicos incluyen los siguientes: a) El impulso de los diferentes estados del país a realizar plantaciones de agave tequilero en sus estados, como estrategia de desarrollo; b) Falta de reglamentación fitosanitaria para movilizar los hijuelos dentro y fuera de la DOT; c) Plantar hijuelos de mala calidad, extraídos de plantas madres con síntomas de enfermedades; b) Falta de plantaciones

madre de calidad entre tres y cinco años para extraer los hijuelos; e) Por los productores de agave tequilero (Rubio-Cortés y Cervantes-Díaz, 2006).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Bacterias Fitopatogenas ubicada en el Instituto de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados, y en el invernadero de la misma institución.

3.1. Colecta de material

Se realizaron 4 muestreos durante el año 2011 en diferentes fechas en las siguientes localidades: Arandas, Tequila, Acatic y Nopal ubicadas en el Estado de Jalisco (Cuadro 3). Se colectaron cinco muestras en cada localidad con los síntomas característicos: pudrición blanda con necrosis en el cogollo del *A. tequilana* y con diferentes grados de severidad. Se colocaron en bolsas de polietileno etiquetadas con fecha, localidad y número de muestra.

Cuadro 3. Localidades y fechas de muestreo

Localidad	Fecha
Arandas	Febrero 2011, Agosto 2011
Acatic	Febrero 2011
Tequila	Febrero 2011, Agosto 2011
Nopal	Noviembre 2011

3.2. Aislamiento y purificación del organismo

Las muestras colectadas se procesaron en medio de cultivo B de King (BK). Para ello se cortaron trozos de 0.5 cm de diámetro en la zona de avance de la enfermedad. Los fragmentos resultantes fueron lavados con agua corriente, posteriormente fueron desinfectados con una solución de hipoclorito de sodio al 1.5% durante 2 minutos, enjuagándose después tres veces con agua destilada estéril. Estos fragmentos se dejaron secar a temperatura ambiente. Los trozos de tejido desinfectados fueron colocados en placas de Petri con medio de cultivo BK.

Las placas sembradas, se incubaron a 28°C durante 48 horas y con la ayuda de un microscopio estereoscópico, se determinó la presencia de colonias y se seleccionaron las más frecuentes. Posteriormente fueron purificadas y resembradas en medios BK.

3.2.1. Selección del microorganismo para pruebas de patogenicidad

De las colonias de bacterias purificadas se seleccionaron como posibles patógenas aquellas que dieron como resultado positivo en la pudrición de rodajas de tubérculo de papa y/o generar reacción de hipersensibilidad en hojas de tabaco (*Nicotina tabacum*) (Klement *et al.*, 1990).

La identificación del microorganismo se llevó acabo considerando las características morfológicas del agente causal de la pudrición de cogollo del *A. tequilana*. Para la caracterización morfológica de las colonias se tomaron en cuenta, el color, forma y crecimiento. Esta caracterización se hizo con la ayuda de un microscopio estereoscopio (Schaad *et al.*, 2001).

3.3. Pruebas de patogenicidad

Con el objetivo de cumplir con los postulados de Koch, se utilizaron plantas sanas de agave de un año de edad ubicadas en el invernadero.

3.3.1. Prueba de patogenicidad sobre fragmentos de agave

Estas pruebas se realizaron inoculando el aislamiento bacteriano en estudio, y que ocasionó previamente la pudrición en papa. Fragmentos de tejidos sanos de agave se lavaron primeramente con agua corriente, seguido de una desinfestación con una solución comercial de hipoclorito de sodio al 1.5% durante 2 minutos, luego, cada uno se sometió a tres enjuagues continuos en un recipiente conteniendo agua destilada estéril y se secó con un papel absorbente estéril y los fragmentos se inocularon con el aislamiento en estudio, posteriormente se colocaron dentro de cámaras húmedas (cajas Petri, papel filtro y agua destilada estéril). Se evaluó el tipo de inoculación más eficaz.

3.3.1.1. Tipo de inoculación

Edad de la hoja. Se evaluó la inoculación en la primera y la tercera hoja del cogollo. Los tejidos utilizados procedían de plantas de un año de edad, estos se incubaron a 28°C durante 7 días realizando observaciones diarias.

Sin lesión. Se cortaron fragmentos de tejidos de agave sanos de 5 cm. Se colocaron en cámaras húmedas, y con la ayuda de un asa bacteriana se tomaron las colonias contenidas en medio BK, y estas se colocaron en la parte externa del tejido sin generar ningún tipo de lesión. Respecto al testigo solo se le aplico agua destilada estéril en la parte externa del tejido sin generar lesión.

Heridas. Estas fueron realizadas en fragmentos de tejidos de agave sanos, este tipo de inoculación fue realizada con una aguja de disección, con la cual se hizo una herida de 1 cm de largo sobre el tejido; tomando y colocando directamente asadas de colonias bacterianas del medios solido (BK) sobre el tejido. El testigo solo le fue aplicado agua destilada estéril sobre la herida. Los tejidos fueron colocados en cámaras húmedas.

Inyección. Esta técnica consistió en realizar cortes de fragmentos de tejidos sanos de 5 cm de largo de la primera, hasta la tercera hoja, estas fueron inoculadas con una aguja hipotérmica, con una concentración de 1×10^8 células por mililitro, mientras que el testigo se inoculó con agua destilada estéril.

3.3.2. Pruebas de patogenicidad en incubadora

Esta parte de la investigación consistió en evaluar la capacidad que tiene la bacteria en estudio para poder ocasionar pudrición en el tejido de agave bajo condiciones de estrés constante, en estas pruebas las inoculaciones se realizaron sobre plantas sanas. Este experimento se evaluó mediante la ausencia o presencia de lesiones. El método de inoculación usado en esta prueba fue la de inyección que anteriormente ya fue descrita.

La planta evaluada se inoculó mediante el método de infiltración. Posteriormente se cubrió con una bolsa de polietileno. Se colocó dentro de la incubadora a 30°C.

3.3.3. Pruebas de patogenicidad en invernadero

Con el propósito de comprobar si la bacteria aislada en cultivo puro se encontraba en estado patogénico y si la planta era susceptible a dicha bacteria, se realizó la prueba de patogenicidad sobre plantas jóvenes sanas ubicadas en el invernadero. La inoculación se realizó en cuatro ocasiones utilizando dos plantas por cada inoculación, incluyendo la planta testigo que únicamente fue inoculada con agua destilada estéril sobre plantas sanas. Todo ello se llevó acabo

en dos niveles de la planta, parte media y base del cogollo. Después de inoculadas las plantas se cubrieron con bolsas de plástico para favorecer el desarrollo de la pudrición. La evaluación se tomó como el número de días en que aparecieron las lesiones iniciales.

3.3.3.1. Técnicas de inoculación

Previo a las inoculaciones, el cogollo fue desinfectado con una solución de hipoclorito al 70%, seguidamente se enjuagó con agua destilada estéril y se secó con sanita estéril. En total se utilizaron ocho plantas, dos por cada técnica de inoculación empleada.

Método de contacto (sin daño mecánico)

Se realizó la inoculación por contacto en la superficie adaxial de las hojas, ya que esta superficie presenta una densidad estomática mayor (25%) en comparación con la superficie abaxial (Nobel, 1988).

Algodón. Este método consistió en humedecer el algodón estéril previamente con una dilución bacteriana de 1×10^8 células por mililitro, posteriormente se colocó en la punta del cogollo. Por otra parte se tomaron colonias bacterianas de forma directa en los medios BK, y estas fueron impregnadas en la parte central del cogollo y fueron cubiertas con algodón estéril, en ambos casos el algodón fue sujetado con una cinta adhesiva

Método por herida (daño mecánico)

Palillo. Este método consistió en esterilizar los palillos, con estos se tomaron las colonias bacterianas directas del medio BK y se colocaron en la parte central y base del cogollo del agave, posteriormente se cubrieron las plantas con bolsas de plástico para favorecer una temperatura alta.

Heridas. Este método consistió en hacer pequeños piquetes en todo el diámetro de la parte central del cogollo, con la ayuda de una jeringa. Posteriormente, con un palillo estéril se tomó la masa bacteriana y se impregnó en la parte del cogollo donde se ocasionó la lesión, se cubrió con algodón y se sujetó con una cinta adhesiva para evitar una rápida deshidratación. Las plantas de agave inoculados se cubrieron con una bolsa de plástico, esto fue en todos los casos. A los tres días de inoculación se retiró el algodón y se inició la evaluación de síntomas.

Inyección. Este método consistió en preparar una suspensión bacteriana con una dilución de 1×10^8 células por mililitros y con la ayuda de una jeringa se inoculó 0.5 mL en la parte central del cogollo, hasta abarcar la tercera hoja.

Durante la evaluación de estos ensayos las temperaturas mínimas registradas fueron de 15 a 16°C y la máxima se registró entre 26, 29 y 33°C. Durante el experimento las plantas inoculadas se mantuvieron siempre húmedas.

3.4. Reaislamiento

Una vez lograda la replicación de los síntomas se realizaron reaislamientos, para lo cual se tomaron tejidos de la zona de avance de la enfermedad de cada una de las plantas inoculadas y se realizó la misma metodología que se siguió para el aislamiento, después se colocaron cuatro explantes por cada caja Petri con medios B de King, para reproducir el microorganismo a una temperatura de 28°C durante 48 horas. Lograda la reproducción, se observaron en un microscopio, para corroborar la pureza del reaislamiento del microorganismo inoculado en el cogollo del agave.

3.5. Identificación de la bacteria causante de la pudrición del cogollo

Se realizó la caracterización del aislamiento inoculado y reaislado en las pruebas de patogenicidad.

3.5.1. Identificación fenotípica

Para determinar las características morfológicas y culturales de la colonia y de las células cultivadas en BK se realizaron observaciones en el microscopio estereoscópico. Para precisar el género se utilizó el manual de Schaad (Schaad *et al.*, 2001).

3.5.1.1. Características morfológicas

Fueron sembradas las bacterias en medios BK y se evaluó la morfología de la colonia, borde, opacidad, elevación, superficie, y consistencia. Se realizó tinción de Gram y fue complementado con la prueba de Ryu (Suslow *et al.*, 1982). De igual manera se realizó tinción de endosporas (Schaad *et al.*, 2001).

3.6. Microscopia electrónica

La bacteria fue sembrada en medio AN (Agar nutritivo) y crecida durante 5 días a temperatura de 28°C, la bacteria fue conservada en tubos que contenían agua destilada estéril, y fue llevada a analizar al Laboratorio de Microscopia Electrónica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas de la UNAM mediante la técnica de tinción negativa (González-Gallardo *et al.*, 2003).

3.7. Pruebas bioquímicas

El organismo aislado se caracterizó de acuerdo a las pruebas que fueron seleccionadas según Buchanan and Gibbons (1974), Bradbury (1988), Holt *et al.* (1994) y Schaad *et al.* (2001). Se determinó la tinción de Gram, prueba de Ryu (Schaad *et al.* 2001, Suslow *et al.* 1982), prueba de oxidación y fermentación (O/F) (Hugh and Leifson 1953), la presencia de oxidasa, catalasa (Kovacs 1956 and Bradbury, 1988), producción de esporas (Schaad *et al.* 2001), la morfología celular (Holt *et al.* 1994), hidrólisis de almidón (Fahy and Persley 1983), reducción de nitrato, producción de ácido a partir de D-glucosa, D-manitol y D-xilosa (Lelliott and Stead 1987), Crecimiento en NaCl y en diferentes pH en medios AN (agar nutritivo), indol (Schaad *et al.* 2001; Priest, 1989; Cowan, 1974; Claus and Berkeley, 1986). Todas las pruebas se realizaron en triplicado.

3.8. Caracterización molecular

La caracterización molecular del aislamiento se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de Semillas del Posgrado en Recursos Genéticos y Productividad del Colegio de Postgraduados, *Campus* Montecillo.

3.8.1. Extracción del DNA. Se extrajo el DNA bacteriano por medio de la técnica de lisis enzimática. Se colocó una asada de colonia bacteriana en un tubo Eppendorf, enseguida la muestra se sometió a un tratamiento térmico (baño maría) a 95°C durante 9 minutos. Posteriormente se centrifugó durante 6 minutos 30 segundos a 10000 r.p.m (revoluciones por minuto) (Querol *et al.*, 1992).

3.8.2. Amplificación del fragmento 16S DNAr. Una vez obtenido el DNA extraído de las muestras, por la técnica de extracción antes mencionada se procedió a una amplificación del

segmento buscado por medio de la reacción de cadena de la polimerasa (PCR) para esto se emplearon los iniciadores específicos para genes ribosomales DNAr 8F (5´AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3´) y 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT) (Flores-Gallegos, 2009). Las muestras amplificadas se fraccionaron y visualizaron por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, y se utilizó un marcador molecular (M), que da una escala de bandas desde 250 hasta 10000 pb como referencia para el tamaño de fragmentos amplificadas. La solución master-mix de PCR, cuyas concentraciones finales de los componentes de esta reacción se observan en el cuadro 4.

Cuadro 4. Componentes para la mezcla master-mix

COMPONENTES	CANTIDADES
Buffer	25 µL
dNTP's	10 µL
Primers 8F	10 µL
Primers 1492R	10 µL
Taq polimerasa	1.5 µL
H2O	43.5 µL

A esta mezcla se le agregó un volumen final de 5 µL de DNA bacteriano. Terminada la reacción se colocaron las muestras en un gel de agarosa preparado al 1.5% y se corrió una electroforesis, el gel fue teñido con una solución Gel Red (4 µL, para 200ml de agarosa); se colocaron en cada pozo 5µL del DNA de las muestras. Se hizo pasar una corriente de 120 voltios por 1 hora. Posteriormente se observó el gel en un transluminador de luz ultravioleta.

3.8.3. Secuenciación. La secuenciación del material amplificado, se realizó en un equipo Applied Biosystems modelo 3130 Genetic Analyzer por el método de SANGER en el Laboratorio de Biotecnología de Semillas del Posgrado en Recursos Genéticos y Productividad del Colegio de Postgraduados, *Campus Montecillo* .

3.8.4. Análisis de datos. Las secuencias obtenidas se compararon con la base de datos del GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information) mediante la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), para secuencias altamente similares.

IV. RESULTADOS

4.1. Observación de plantas enfermas en el campo

En las localidades de Arandas, Tequila, Acatic y Nopal en el Estado de Jalisco se observaron los síntomas de pudrición en el cogollo del *A. tequilana* (Fig. 1 A, B.). Se obtuvieron un total de 20 plantas con los síntomas mencionados.

La pudrición se observó únicamente en el cogollo, donde inicia desde la punta y avanza de manera descendente. Los tejidos presentan una consistencia blanda con secreción de exudados. Posteriormente la pudrición se extiende en todo el cogollo secándolo y dándole un aspecto papeloso color marrón. Las plantas con síntomas de pudrición del cogollo, presentaron amarillamiento en las pencas más maduras y pudrición de la piña desde la punta de crecimiento.

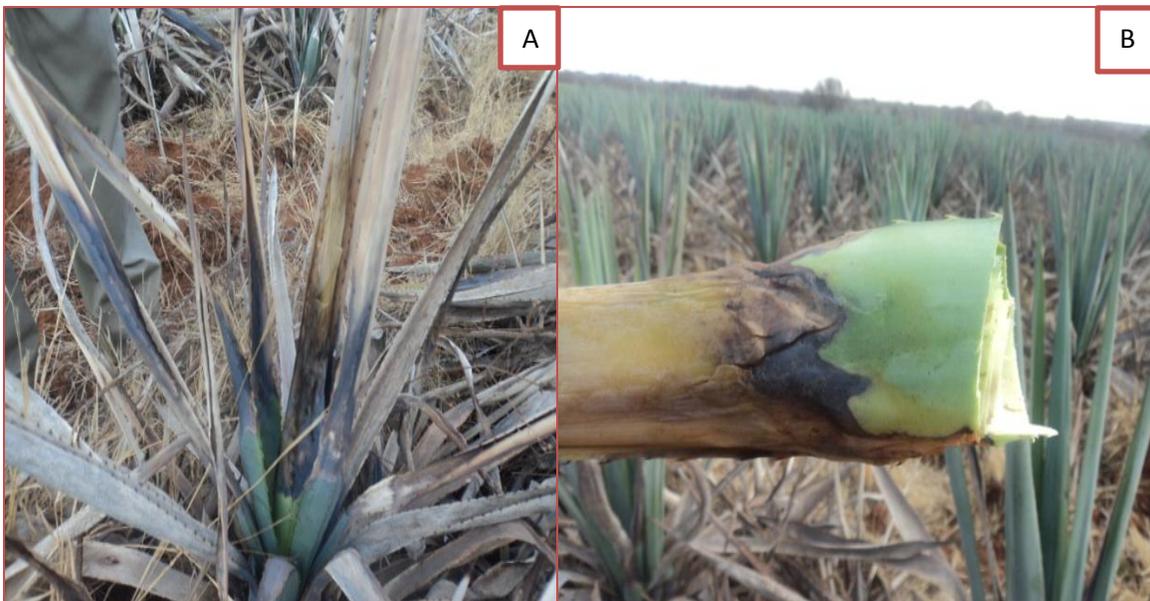


Fig. 1. A-B) Plantas de *Agave tequilana* en campo con síntomas de pudrición de cogollo y necrosamiento.

4.2. Características de la cepa bacteriana

Después de aislar las bacteria de los tejidos afectados, sembrados en medio BK, se observó una uniformidad de las colonias, la mayoría de las colonias se parecieron entre si. De las diferentes localidades se aislaron bacterias Gram positivas, con capacidad de podrir papa,

flagelos peritricos, presencia de endospora en la parte terminal, móvil, oxidasa negativa, forma de varilla, catalasa positiva, crecimiento elevado y ondulado en la superficie. Estas características coincidieron con la cepa de *Bacillus pumilus*.

4.3. Pruebas de patogenicidad con tejidos

4.3.1. Evaluación de patogenicidad de *B. pumilus* en fragmentos de agave

Las pruebas de patogenicidad realizadas sobre fragmentos de tejidos de penca sanas sin heridas (puestas las bacterias solamente en la superficie), no se observó ningún indicio de infección por parte de *B. pumilus*. Sin embargo, las pruebas realizadas sobre los tejidos sanos, en los que previamente se hicieron heridas, se observaron síntomas que consistieron en una pudrición blanda con necrosis (Fig. 2 A) y pudrición de aspecto papeloso (Fig. 2 B). La pudrición se observó en tejidos inmaduros del cogollo.

4.3.2. Efecto de temperaturas de incubación

En este trabajo se realizaron observaciones de la evolución de los síntomas a una temperatura de 28°C durante siete días. No obstante, los primeros síntomas de la enfermedad a esta temperatura se manifestaron al segundo día después de la inoculación (ddi), la pudrición completa se dio al séptimo ddi. En el fragmento del tejido testigo, no se observó ningún síntoma, con indicio de pudrición blanda o necrosis (Fig. 2 A). En esta prueba los tejidos permanecieron en la incubadora hasta el último día de la evaluación de síntomas.

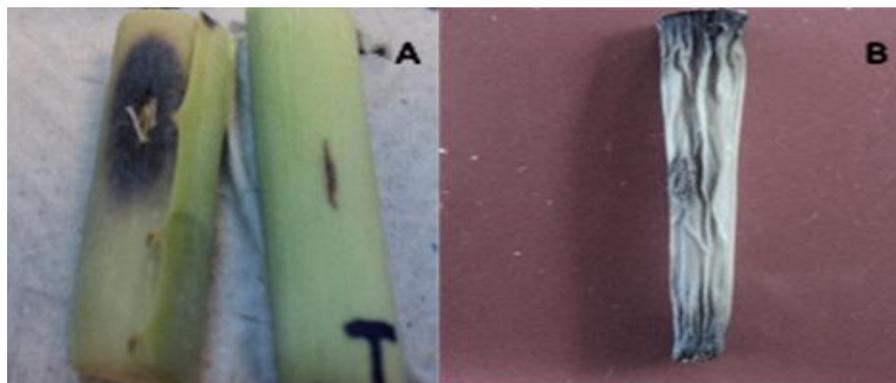


Fig. 2. A) Síntomas de necrosis y ablandamiento del tejido causado por *B. pumilus* al segundo día después de la inoculación, B) Pudrición de aspecto papeloso al séptimo ddi.

4.4. Pruebas de patogenicidad con la bacteria *Bacillus pumilus* en incubadora a 30° C

Bajo estas condiciones, al segundo ddi, se observó una pudrición blanda que comenzó a desarrollarse con un inicio de necrosis (Fig. 3 A). Esta lesión se necrosó y la pudrición fue avanzando de manera lenta hasta el último día de evaluación ddi (Fig. 3 B).

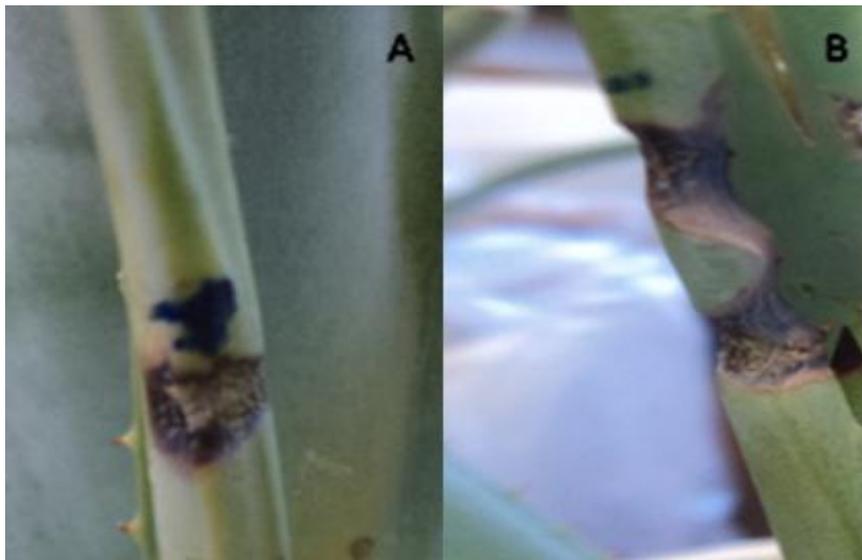


Fig. 3. Prueba de patogenicidad con *B. pumilus* en incubadora a 30°C, A) Pudrición blanda con necrosis, B) Avance lento de la pudrición.

4.5. Patogenicidad de *Bacillus pumilus* en el cogollo de plantas de agave ubicadas en el invernadero

Los resultados obtenidos con las diferentes técnicas de inoculaciones, realizadas con *B. pumilus*, fueron la presencia de necrosis y pudrición blanda, estos síntomas se hacían más notables según transcurrían los días (Fig. 4, 5 y 6). En la inoculación realizada por el método de palillo (fig. 4), la pudrición blanda y necrosis fue generándose de manera progresiva y muy notable, esto podría deberse a que durante esta parte de la investigación se registraron temperaturas máximas de 32°C; temperatura que podría haber permitido la reproducción de esta bacteria de manera rápida, de tal forma que la pudrición completa ocurrió a los seis ddi (Fig. 4 B).



Fig. 4. Síntomas causados por *B. pumilus* con el uso de palillos, A) Testigo, B) Presencia de necrosis y pudrición blanda en todo el cogollo al sexto ddi.

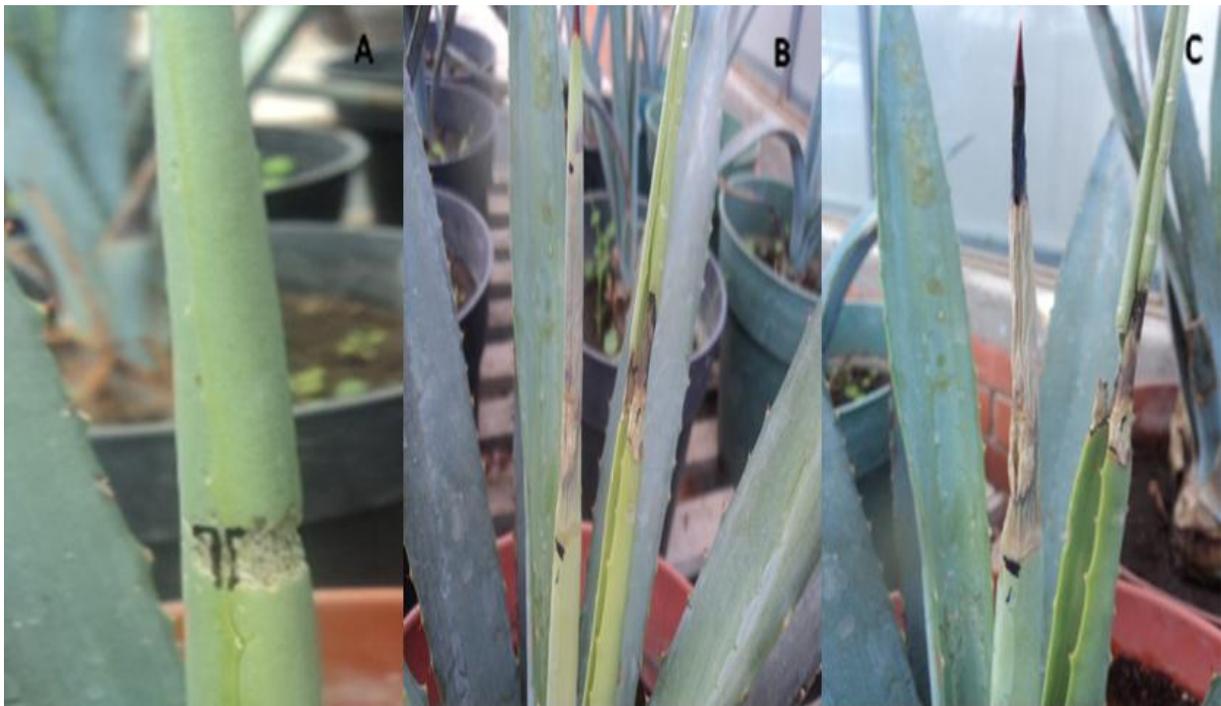


Fig. 5. Síntomas causados por *B. pumilus*, generando heridas en la parte central del cogollo, A) Testigo, B) Pudrición blanda C) Pudrición del cogollo con aspecto papeloso.



Fig. 6. Síntomas causados por *B. pumilus*, por medio de inyección (suspensión bacteriana), A) Testigo, B) Pudrición blanda y necrosis en el cogollo.

En los diferentes métodos de inoculación empleados se analizó el tipo de tejido (parte central del cogollo, base del cogollo). Los síntomas que se produjeron en las plantas inoculadas en la base del cogollo fueron una necrosis y una leve pudrición blanda alrededor del sitio de la inoculación; por lo tanto no se logró ver más el avance de la enfermedad, esto podría deberse al tipo de tejido y por las condiciones ambientales.

Sin embargo, las inoculaciones efectuadas en la parte central del cogollo, los síntomas de la enfermedad fue dándose de manera progresiva, desde un día después de la inoculación. Las inoculaciones realizadas con *B. pumilus* resultaron en el desarrollo de una lesión necrótica y una pudrición blanda tornándose de aspecto papeloso semejante a aquellas que ocurre en el campo, esto ocurrió tanto en tratamientos con heridas como las realizadas por inyección (suspensión bacteriana) (Fig. 5 y 6).

Inoculaciones por heridas. Los síntomas de la enfermedad se manifestaron a los cuatro ddi con un tamaño inicial de lesión de aproximadamente 1 cm, la evolución de los síntomas fue de manera progresiva, esta lesión se observó primeramente como una pudrición blanda en todo el

cogollo desde el sitio de la inoculación hasta la punta del cogollo (Fig. 5 B), mas tarde esta pudrición, se observó de forma papeloso, esto ocurrió a los nueve ddi (Fig. 5 C).

Inoculación por el método de inyección (suspensión bacteriana). Los síntomas ocurrieron a los seis ddi. No obstante, a los 17 ddi se observó una pudrición blanda en todo el cogollo con presencia de necrosis (Fig. 6 B).

En las plantas testigo no se observó ningún tipo de síntomas; determinando con ello que la bacteria *B. pumilus* es la responsable de la pudrición del cogollo. Con este estudio, según las pruebas de patogenicidad realizadas con los diferentes métodos antes descritos, indicó que *B. pumilus* se reproduce en tejidos inmaduros suculentos de forma inicial, hasta ocurrir una pudrición completa en todo el cogollo del agave. Esto fue lo que se observó en las pruebas de patogenicidad realizadas en el invernadero.

El avance de la reproducción de *B. pumilus* en el cogollo podría deberse a la película de humedad que se forma sobre las hojas, ya que durante la realización de este trabajo, el suelo de las macetas donde se encontraban las plantas se mantuvo siempre húmedo. El reisolamiento de la bacteria se dio de manera exitosa en todos los caso, comprobando de esta manera los postulados de Koch.

4.6. Caracterización morfológica

La caracterización se inició a los tres días después de crecidas las colonias bacterianas en medios BK, las características comunes observadas fueron: forma irregular, color amarillo oro, superficie rugosa, la apariencia del borde varia, entre acerrada y ondulada, la elevación de la colonia se observó de forma convexa, presentaron el centro más elevado en forma de anillo, el tamaño se dio de forma variable (Fig. 7 A). Estas características se observaron después de 48 h de incubación a una temperatura de 28°C. La bacteria fue Gram positiva (Fig. 7 B).

4.7. Microscopia electrónica

A través de microscopio electrónico de transmisión, mediante la técnica de tinción negativa, se observaron células bacterianas de forma bacilar con flagelos peritricos y formadoras de endosporas (Fig. 7 C)

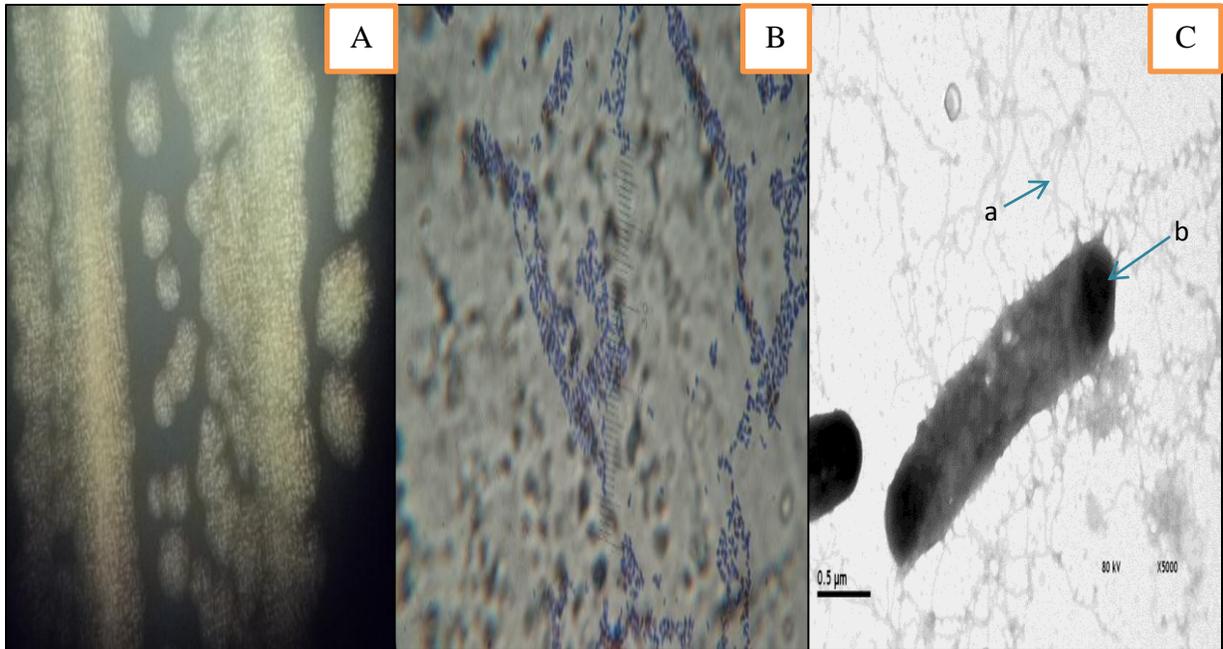


Fig. 7. Identificación morfológica de *Bacillus pumilus*: A) Morfología de la bacteria; B) Tinción de Gram (+), C) Célula bacilar; a) flagelos peritricos, b) endospora terminal (5000X).

4.8. Pruebas bioquímicas

Las características bioquímicas de la bacteria utilizada en las pruebas de patogenicidad se muestran en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Características fisiológicas y bioquímicas de la bacteria *Bacillus pumilus* en estudio y *Bacillus pumilus* conocido.

Prueba	Bacteria en estudio	<i>Bacillus pumilus</i>*
Tinción de Gram	+	+
Prueba Ryu	-	-
Motilidad	+	+
Producción de endosporas	+	+
Catalasa	+	+
Hidrolisis de almidón	-	-
Reducción de nitratos	-	-
Formación de indol	-	-
Crecimiento medio Hugh y Leifson:		
Aerobio	+	+
Anaerobio	-	-
Crecimiento en medio AN a:		
45°C	+	+
50°C	+	+
Crecimiento a pH 5.7	+	+
Crecimiento en 7% NaCl	+	+
Utilización de:		
Glucosa	+	+
Arabinosa	-	-
Manitol	+	+
Xilosa	+	+

* (Colin, 1989; Galal, 2006; Mikiciński, 2010; Bathily, 2010)

Las características morfológicas, bioquímicas y microscopia electrónica de la bacteria en estudio, coinciden con la cepa de *Bacillus pumilus*.

4.9. Amplificación del gen ribosomal 16S por PCR

En la amplificación se observó la presencia de bandas intensas no degradadas, con un tamaño aproximado de 1600 pb (Fig. 8). Estas se cortaron y se purificaron para su secuenciación.

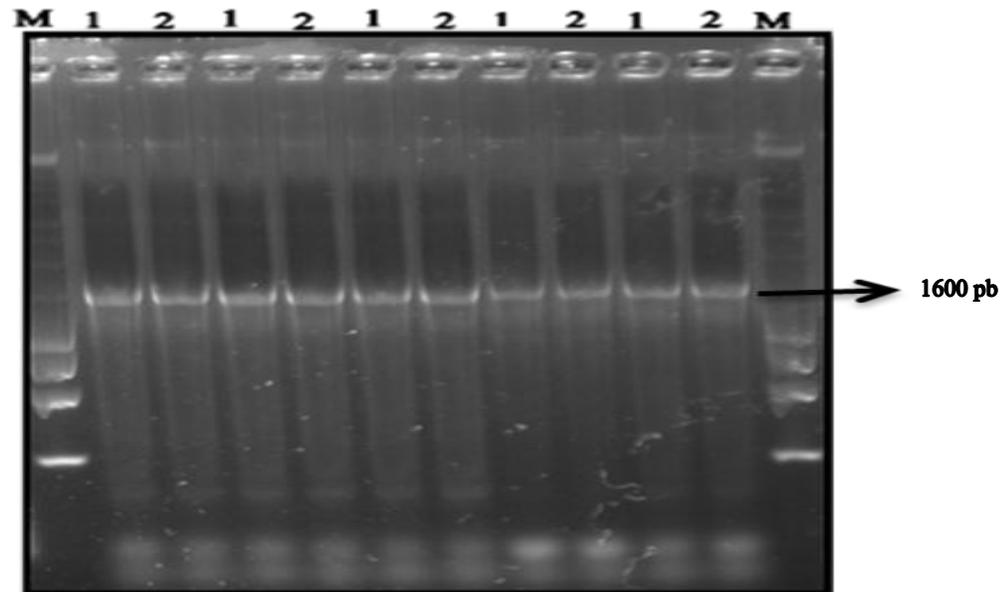


Fig. 8. Gel de agarosa que indica el fragmento amplificado de los genes ribosomales 16S. Pozos 1 y 2 bacteria, M-marcador de peso molecular.

4.9.1. Análisis filogenético de la región ITS 16S

Una vez obtenidos los resultados de la secuenciación, se compararon con las depositadas en el GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI), mediante la opción BLAST (Zhang *et al.*, 2000). Estos mostraron una máxima identidad en un 99-100% con secuencias de *Bacillus pumilus* conocido y una cobertura del 100% de la secuencia total mostrada en la que se comparó. Estos resultados coinciden con las pruebas bioquímicas realizadas, confirmando de esta manera a *Bacillus pumilus* como patógeno, causando pudrición blanda en el cogollo del *Agave tequilana* Weber var. Azul en las localidades muestreadas del estado de Jalisco.

Esta bacteria causante de la pudrición del cogollo bajo los métodos de inoculación empleados en esta investigación fue depositada en el banco de genes del GenBank y tiene como numero de acceso el siguiente: JX844625.

4.9.1.1. Secuencia depurada

GCGGGTCTATACATGCAGTCGAGCGGACAGAAGGGAGCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGCGGACGGGT
 GAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGAT
 AGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTCGGCTGTCACCTACAGATGGACCCGCGG
 CGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGAT
 CGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAA
 TGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGT
 TAGGGAAGAACAAGTGCAGAGTAAGTCTGCTCGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTA
 ACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGG
 CTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTG
 GGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGA
 GGAACACCAGTGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGC
 GAACAGGATTAG

Para corroborar la distancia filogenética existente con otras especies se construyó un árbol filogenético mediante el método de Máxima Parsimonia (Tamura *et al.*, 2007), para ello se tomaron como referencia las cepas de *Bacillus subtilis*, *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *Pectobacterium carotovorum* (antes *Erwinia*) (Fig. 9).

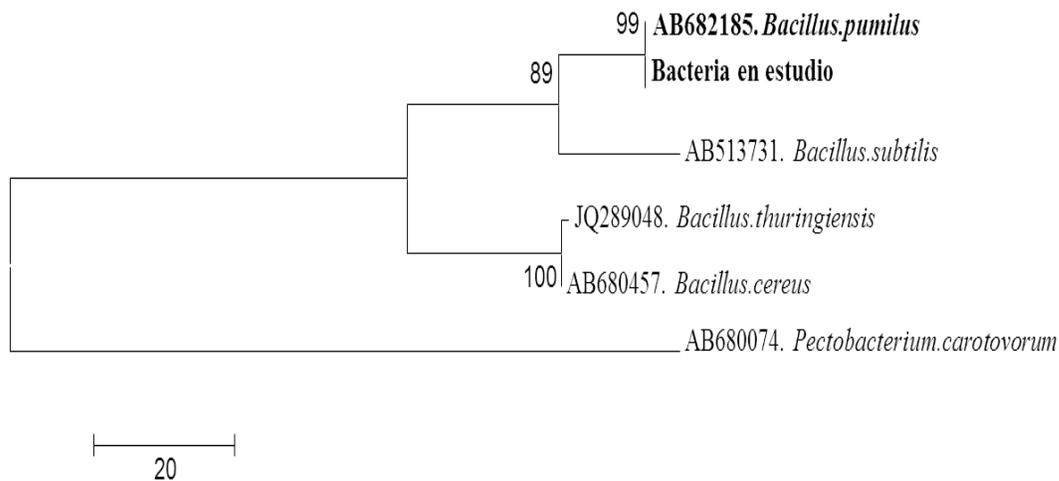


Fig. 9. Árbol filogenético construido mediante el método de Máxima Parsimonia.

V. DISCUSIÓN

En el campo donde fueron colectadas las plantas enfermas, los síntomas observados fueron pudrición blanda y necrosis, mas tarde esta pudrición se torna de aspecto papeloso, estos síntomas concuerdan con lo reportado por otros autores (CRT, 2004).

En las localidades muestreadas las planta de *A. tequilana*, además de presentar pudrición en el cogollo, se observaron diferentes grados de marchitez, esto puede haberse debido a la pudrición del tallo (Virgen-Calleros *et al.*, 2000; CRT, 2004; Fucikovsky, 2004). Entre otros trabajos se reporta la presencia simultánea de enfermedades similares en predios con mal manejo fitosanitario y la incorrecta o excesiva nutrición (Fucikovsky, 2003).

Los tejidos procesados de las cuatro localidades muestreadas, se aislaron con mayor frecuencia la bacteria *Bacillus pumilus*. En ninguna de las muestras se encontró *Erwinia* spp. como se podría suponer de algunas publicaciones, ya que según Velez *et al.* (1996) no asocia a la bacteria directamente con la pudrición del cogollo, por lo tanto se podría suponer que algunas investigaciones son equivocadas con respecto al genero de bacterias.

En este trabajo, la bacteria *B. pumilus*, se aisló sembrando los tejidos enfermos en medios BK y AN (agar nutritivo) para permitir su desarrollo.

Para cumplir con los postulados de Koch fueron seleccionaron los aislamientos más frecuentes de cada muestra procesada. El segundo criterio de selección fue por su capacidad de crecimiento y pectinolíticas en rodajas de tubérculos de papa, ya que una de las principales características de las bacterias fitopatógenas generadoras de pudriciones blandas, es la secreción de enzimas pectinolíticas (Zucker *et al.*, 1972), a pesar de que, esta capacidad no se encuentra limitada a estos patógenos en particular (Cuppels and Kelman, 1974). También se evaluaron estos aislamientos sospechosos por su capacidad de generar reacción de hipersensibilidad en tabaco, la desventaja de la prueba de reacción de hipersensibilidad en tabaco es que muchas, de las bacterias fitopatógenas pueden inducir la reacción de hipersensibilidad (Klement, 1990).

Los resultados de pruebas de patogenicidad con *B. pumilus* fue notable en los diferentes métodos de inoculación empleados y los síntomas de la enfermedad observados en el invernadero fue generándose desde el punto de la inoculación hasta el ápice del cogollo, esto

podría deberse a los factores de virulencia, susceptibilidad del huésped, humedad y a las altas temperaturas según Klement, 1990. Los métodos de inoculación generados por palillos, heridas (piquetes en todo el diámetro de la parte central del cogollo), y suspensión bacteriana empleado en este trabajo de investigación, favoreció la presencia de síntomas de pudrición blanda en el cogollo del *A. tequilana*. Lo anterior concuerda con lo reportado por Gabr y Gazar (1983) y Saleh *et al.* (1997), en el que señalan que *B. pumilus* necesita de una herida para poder infectar. Por eso es tan importante no lesionar los tejidos jóvenes de agave, costumbre bastante común en los campos.

Referente al tipo de inoculación y al tejido, se puede mencionar que la epidermis del agave representa un factor importante para que los síntomas puedan reproducirse, ya que posee una cutícula gruesa, revestimiento ceroso y estomas complejos (Nobel, 1988). Sin embargo, las propiedades físicas y químicas de las superficies cerosas, tienen la función de brindar resistencia vegetal a diversos factores del estrés ambiental como protección al ataque de bacterias. Por otro lado, la densidad estomática de este género es comparativamente inferior a la densidad presentada en otras especies de plantas superiores (Nobel, 1983; Hernández-Valencia *et al.*, 2003).

Para que la pudrición se manifieste; el tipo de tejido requerido por *B. pumilus* forma parte importante, esto es lo que se observó durante la evaluación de síntomas en esta investigación. Lo anterior recalca que para que este patógeno se reproduzca y por consiguiente cause enfermedad requiere de tejidos suculentos en un inicio, esto se debe a que el contenido de agua del tejido vegetal del género *Agave* es mayor en el tejido joven, pues este tipo de tejido tiene entre el 90-95% de contenido de agua, mientras que las hojas ya maduras o viejas tienen 75-85% (Mengel and Kirkby, 1978). Esto podría ser la causa de que en los tejidos maduros no se observaran síntomas severos.

Especies de *Bacillus* son comúnmente encontradas en el suelo, y algunos pueden estar involucrados en la postcosecha de los tejidos vegetales, como son los tubérculos de papa. Se han mencionado *B. pumilus*, y otras especies de *Bacillus* spp. causan pudriciones blandas en los cultivos cuando se almacenan (Ciampi *et al.*, 1976 y Ciampi y Huguelet, 1979).

A pesar de que existe una gran cantidad de bacterias productoras de enzimas con la capacidad de maceración de tejido, solo algunas de ellas han sido asociadas constantemente al daño de tejido vegetal y entre ellos se encuentra *B. pumilus*. Así Chiu *et al.* (1964) mencionan que *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. polymyxa*, causan pudrición blanda en las hortalizas. *B. pumilus* puede actuar como un patógeno (Gabr y Gazar, 1983), citado por (Rudolph, 1990).

Reportes anteriores del género *Bacillus* en agave han sido realizados por Granados (1993), quien lo asocia como causante de la “pudrición de la corona”. Uvalle-Bueno *et al.* (2006) también mencionó la presencia del género *Bacillus* causante de la enfermedad bacteriosis en tejidos de agave. Así mismo Gabr y Gazar (1983), señalan que, *B. pumilus* y *Bacillus polymyxa*, son causantes de la pudrición de la cabeza en el cultivo de col. Saleh *et al.* (1997), señala que *Bacillus pumilus* es causante de las manchas marrones en las hojas y frutos del melocotón. Lo anterior señala que *B. pumilus* es un patógeno capaz de inducir pudriciones blandas y manchas foliares en varios cultivos, incluyendo el agave, como se pudo notar en este trabajo.

Galal. (2006), reporta en Egipto a *B. pumilus* como un nuevo patógeno causante del tizón en hojas de mango (*Mangifera indica* L.). No obstante, resalta que las cepas de *B. pumilus* pueden infectar a varios cultivos, como la hoja del repollo, melocotón, manzana, pepino, calabaza, coliflor, ajo y cebolla.

Otros reportes en el mundo de *Bacillus pumilus* como nuevo patógeno en diferentes cultivos son los reportados por los siguiente autores: Hseu *et al.* (2010), lo reporta en el cultivo de Ñame (*Dioscorea* spp.) como causante de la mancha foliar; en el frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) causante de los síntomas de mancha en las hojas (Font *et al.*, 2010); muerte regresiva de hojas y ramas de la Pera asiática (*Pyrus pyrifolia*) (Li *et al.*, 2009).

Las características morfológicas, bioquímicas y moleculares de *B. pumilus* concuerdan con los descritos en la literatura para *B. pumilus* (Logan and Berkeley, 1984; Claus and Berkeley, 1986).

Bacillus pumilus se encontró como patógeno causando pudrición blanda en el cogollo en cultivo de agave. Esto es un primer informe afectando *Agave tequilana* en México. Por lo tanto es necesario que se realicen más estudios sobre la patogenicidad de *B. pumilus* en el cultivo, para buscar un control adecuado.

VI. CONCLUSIONES

Los resultados de la presente investigación permiten concluir lo siguiente:

En las cuatro localidades muestreadas, y a partir de tejidos provenientes de plantas de agave con síntomas de pudrición de cogollo, el organismo aislado con mayor frecuencia fue la bacteria *Bacillus pumilus*, con evidencia bioquímica y molecular.

La bacteria *B. pumilus* fue patógena bajo las pruebas establecidas en este trabajo de investigación, por lo que se considera el agente causal de la pudrición del cogollo.

El desarrollo de *B. pumilus* como agente causal de la pudrición del cogollo en *A. tequilana* requiere de la presencia de una herida para producir una enfermedad.

VII. LITERATURA CITADA

- Agrios, G. N. 2005. Fitopatología 2ª edición. Editorial Limusa, México. 838 p.
- ASLIM. 2002. Determination of some properties of *Bacillus* isolated from soil. Turk J Biol. Vol. 26. 41-48 pp.
- Ayala, E. V. y Yáñez, M. M. J. 2004. *Cercospora agavicola* sp. nov. causante de una nueva enfermedad foliar en agave (*Agave tequilana* Weber. var. Azul) en Pénjamo, Guanajuato, México Memorias del XXXI Congreso Nacional de Fitopatología. Veracruz, Ver. 25 al 28 de Julio de 2004. Resumen L-42.
- Bathily, H. 2010. *Bacillus pumilus*, a new pathogen on potato tubers in storage in Mali. Microbiology 4(20) 2067-2071.
- Bowen, S., Duran, A. L. y Gerritsen, R. W. 2004. Análisis cuantitativo del agave en los municipios de Autlán, El Grullo, El Limon, Tonaya y Tuxcacuesco. Universidad de Guadalajara. Centro Universitario de la Costa Sur (CUCSUR). División de Desarrollo Regional. Departamento de Ecología y Recursos Naturales. 3-24 pp.
- Bradbury, J. F. 1988. Identification of cultivable bacteria from plants and plant tissue cultures by use of simple classical methods. Acta Hort. 225: 27-37.
- Buchanan, R. E., Gibbons, N. E. 1974. Bergey's manual of determinative bacteriology. Williams y Wilkins, Baltimore, M. D, USA.
- Cámara Nacional de la Industria Tequilera (CNIT). 2007. Estadísticas de Producción y Exportación. (Consulta: 29 de abril del 2012).
- Castro-Valera. 2003. Incidencia y distribución de marchitez y pudrición del cogollo del agave (*Agave tequilana* Weber variedad azul) en la zona sur de Jalisco. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias. Universidad de Guadalajara. 97 p.
- Cedeño, C. M. 2007. La planeación estratégica y el desarrollo tecnológico como alternativa para romper los ciclos de abundancia y escasez de *Agave tequilana* Weber. En: Colunga, P., Larque, A., Eguiarte, L. E. y Zizumbo, D (Eds.). En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C. 255- 263 pp.
- Chatli, A. S., Beri, V. y Sidhu, B. S. 2008. Isolation and characterization of phosphate solubilizing microorganisms from the cold desert habitat of *Salix alba* Linn. in trans Himalayan region of Himachal Pradesh. Indian Journal of Microbiology 48: 267-273.
- Chiu, W. F., Di, Y. P., Choue, Y.Y. and Sie, F. J. 1964. Some bacteria causing decay of Chinese cabbage in storage. Acta Phytopathol. 7: 127-134.

- Ciampi, L. R., Dubin, H. J. and Jofre, C. 1976. Vascular bacteria flora of potato tubers of southern Chile. *Fitopatología* 11: 57-61.
- Ciampi, L. R. and Huguelet, J. E. 1979. Internal bacterial in healthy potato tubers. *Fitopatología* 14: 22-28.
- Claus, D. and Berkeley, R. C. W. 1986. *Genus Bacillus* Cohn 1872. 1105-1139 pp. In: Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharper, M. E. and Holt, J. G. (Eds.) Section 13 Endospore forming gram-positive rods and cocci. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Vol. 2. Williams y Wilkins. Baltimore, EUA. 965-1600 pp.
- Colin. 1989. *Bacillus*. Ed. Division of Plenum Publishing Corporation. 44 p.
- Cowan, S. T. 1974. Cowan y Steel's manual for the identification of medical bacteria. 2ª edición. Cambridge University Press. Cambridge, UK. 238 p.
- CRT. 2000. Anuario estadístico de producción del sistema *Agave tequila*. Guadalajara, Jalisco, México. 70 p.
- CRT. 2000. Estadísticas de producción, exportación y consumo de materias primas para la elaboración de tequila. Guadalajara, Jalisco, México. Disponible: <http://www.crt.org.mx> (Consulta: 20 abril 2012)
- CRT. 2004. Establecimiento de un sistema de monitoreo de enfermedades por muestreo en *Agave tequilana* Weber variedad azul, dentro de la Denominación de Origen Tequila. Guadalajara, México. 15 p.
- CRT. 2005. Inventario de *Agave tequilana* Weber var. Azul dentro de la Denominación de Origen del Tequila. Comité Técnico Agronómico. Guadalajara, México. 38 p.
- CRT. 2007. *Agave tequilana* Weber var. Azul. Disponible: www.crt.org.mx (Consulta: 20 abril 2012)
- CRT. 2008. Acerca del CRT. Disponible: <http://www.crt.org.mx/> (Consulta: 20 abril 2012).
- Cuppels, D., Kelman, A. 1974. Evaluation of selective media for isolation of soft rot bacteria from soil and plant tissue. *Phytopathology* 64: 468-475.
- Fahy, P. C., Persley, G. J. 1983. Plant bacterial disease. A diagnostic guide. Academic Press, San Diego, California, USA. 393 p.
- FAO. 1994. The adaptability level of the FAO crop environmental requirements database. Versión 1.0. AGLS. FAO. Rome, Italy.
- Flores, L. H. E., Ruiz, C. J. A., Martínez, P. R. A., González, E. D. R. y Nava, V. L. 2003. Determinación del potencial productivo de especies vegetales para el estado de Jalisco.

- Distrito de Desarrollo Rural 066 Lagos de Moreno. Folleto Técnico Núm. 2. INIFAP-CIRPAC-C.E. Altos de Jalisco. Tepatitlán, Jal. México. 54 p.
- Flores, L. H. E., Byerly, M. K. F., Aceves, R. J. J. y Ruiz, C. J. A. 2002. Diagnóstico del sistema de producción de agave con énfasis en problemas fitosanitarios. 63-95 pp. En: Análisis agroecológico de *Agave tequilana* Weber var. Azul con énfasis en problemas fitosanitarios en Jalisco. Publicación Especial Núm. 1. INIFAP CIRPAC-Campo Exp. Altos de Jalisco. Tepatitlán, Jalisco, México.
- Flores-Gallegos, A. C. 2009. Tesis Aislamiento e identificación de cepas nativas del suelo mexicano del genero *Azotobacter*. Universidad Autónoma de Coahuila, Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Investigación en Alimentos.
- Font, M. I., Bassimba, D. D. M., Cebrian, M. C., Molina, L. M. and Jorda, C. 2010. First report of *Bacillus pumilus* on *Phaseolus vulgaris* in Spain. *Plant Pathology* 59: 400.
- Fucikovsky, Z. L. 2004. *Agave tequilana* Weber var. Azul y sus principales problemas fitosanitarios. En: Avances de la investigación en el agave tequilero. Consejo Regulador del Tequila A. C. Guadalajara, México. 147-178 pp.
- Fucikovsky, Z. L. 2003. Plagas y enfermedades del agave. En: Memoria 1er Simposio Nacional de Agave, Tequila y Mezcal. CIDEFRUTA, Cd. Victoria, Tamaulipas. 91-96 pp.
- Fucikovsky-Zak, L. 2000. Estudio de la fitosanidad de *Agave tequilana* Weber var. Azul. Informe técnico para el Programa General de Apoyo y Desarrollo Tecnológico a la Cadena Productiva Agave-Tequila. Guadalajara, México. 38 p.
- Gabr, M. R. and Gazar, A. A. 1983. Cabbage head rot due to spore-forming bacteria. *Ann. Agric. Sci., Ani Shams, Cairo* 28: 1163-1185.
- Galal, A. 2006. *Bacillus pumilus* a new pathogen on mango plants. *Plant Pathol. Dept. Fac. Agric. Minia Univ. Minia-Egypt*. 34: 17-29.
- Gentry, H. S. 1982. *Agaves of Continental North America*. The University of Arizona Press. USA. 670 p.
- Gibson, A. C. and Nobel, P. S. 1986. *The Cactus Primer*. Harvard University Press. Cambridge. 286 p.
- Gil-Vega, K., Chavira, M. G., Martínez, O., Simpson, J. and Vandemark, G. 2001. Analysis of genetic diversity in *Agave tequilana* var. Azul using RAPD markers. *Euphytica* 119: 335-341.
- González-Gallardo, S., Ruiz-Venegas, M. R. y Hernández-Baumgarten, E. M. 2003. Guía de Microscopía electrónica. UNAM, Facultad de Estudios Superiores, Cuautitlán, México. 67 p.

- Granados, S. D. 1993. Los agaves en México. Universidad Autónoma de Chapingo. México. 252 p.
- Hernández-Valencia, R. E. M., López-Franco, R. y Benavides-Mendoza, A. 2003. Micromorfología de la epidermis foliar de *Agave tequilana* (Weber). *AgroFaz* 3: 387- 396.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., Williams, S. T. 1994. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore, MD, USA.
- Hseu, S. H., Lai, W. C., Hung, Y. H. and Deng, T. C. 2010. Yam bacterial leaf spot caused by *Bacillus pumilus*. *Plant Pathol. Bull.* 19: 213-224.
- Hugh, R., Leifson, E. 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 80: 24–26.
- Ibarra-Nava, M. A. 2001. Distribución e incidencia de marchitez del Agave (*Agave tequilana* Weber) en los Altos de Jalisco. Tesis de licenciatura. Universidad de Guadalajara. 95 p.
- INEGI (Instituto de Estadística, Geografía e Informática). 2004. Censos Económicos 2004, México.
- Klement, Z. 1990. Introduction and general instructions. 96-103 pp. In: Klement, Z., Rudolph, K. and Sands D. C. (Eds.) *Methods in Phyto bacteriology*. Akadémiai Kiadó, Budapest. 568 p.
- Kovacs, N. 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature (Lond.)* 178: 703.
- Lelliott, R. A., Stead, D. E. 1987. *Method in Plant Pathology. Method for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants*. Blackwell Scientific Publication, Oxford, London, Edinburg. 1-216 pp.
- Li, B., Qiu, W., Tan, Q. M., Su, T., Fang, Y. and Xie, G. L. 2009. Association of a *Bacillus* Species with Leaf and Twig Dieback of Asian Pear (*Pyrus pyrifolia*) in china. *Plant Pathology* 91 (3) 705-708.
- Loera-Quezada, M. M. 2000. Selección *in vitro* de *Agave tequilana* Weber var. Azul para resistencia a *Fusarium oxysporum*. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad de Guadalajara. 114 p.
- Logan, N. A. and Berkeley, C. W. 1984. Identification of *Bacillus* strains using the API System. *Journal of General Microbiology* 130: 1871-1882.
- López, R. S. 2005. Multi-scale sustainability evaluation of natural resources Management Systems. Quantifying indicators for different scales of analysis and their trade-offs using

- linear programming. *International Journal of Sustainable Development and World Ecology*. 12: 81-97 pp.
- López, S. C. 1989. Principales enfermedades que afectan a *Agave angustifolia* Hawy *americana* L. en el distrito de Tlaxcala, Oaxaca. Tesis de Biología. UNAM-ENEP Iztacala. 91 p.
- Luna, H. G. 1998. Pudrición del tallo de *Agave tequilana* Weber en el Estado de Jalisco, México. Tesis profesional. Parasitología agrícola. Universidad Autónoma de Chapingo, México. 85 p.
- Macías, A. y Valenzuela, A. 2007. El campo económico del tequila en tiempos de globalización. En memorias del primer seminario internacional del tequila: ambiente, cultura y sociedad, Autlán, Jalisco. 55-72 pp.
- Mandal, M. 2005. Plasmid-Mediated dimethoate degradation by *Bacillus licheniformis* isolated from a fresh water fish labeo rohita. *J. Biomed. Biotechnol.* Vol. 3. 280 p.
- Martinez, L. E. F., Calderwood, M. y Monsivais, C. 2004. Tequila tradición y destino. 2ª edición. Editorial. Revimundo. 181 p.
- Medina, G. G., Ruiz, C. J. A. y Martínez, P. R. A. 1998. Los Climas de México. Libro Técnico Núm. 1. INIFAP. Ed. Conexión Gráfica. Guadalajara, Jalisco, México. 103 p.
- Mengel, K. and Kirkby, A. 1978. Principles of Plant Nutrition. International Potash Institute. Worblaufen-Bern, Suiza. 593 p.
- Mikićiński. 2010. Pectolytic bacteria associated with soft rot of dieffenbachia (*Dieffenbachia maculata*). *Phytopathologia* 58: 21-32.
- Monroy-Sánchez, M. 1999. Selección celular de *Agave tequilana* Weber var Azul para resistencia a bacterias, Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad de Guadalajara. 98 p.
- Nobel, P. S. 1983. Biophysical Plant Physiology and Ecology. Freeman, W. H. Sn Francisco /NY, USA. 608 p.
- Nobel, P. S. and Smith, S. D. 1983. High and low temperature tolerance and their relationships to distribution of agaves. *Plant Cell and Environment* 6: 711-719.
- Nobel, P. S. and Hartsock, T. I. 1984. Physiological responses of *Opuntia ficusindica* to growth temperatures. *Physiologia Plantarum* 60: 98-105.
- Nobel, P. S. 1988. Environmental Biology of Agaves and Cacti Cambridge University Press, NY, USA. 270 p.
- Nobel, P. S. 1994. Remarkable Agaves and Cacti. Cambridge University Press. NY. 166 p.

- Nobel, P. S. 1995. Environmental Biology. In: Barbera, G., Inglese, P., Pimienta-Barrios, E (Eds). Agroecology, Cultivation, and Uses of Cactus Pear. FAO. Plant Production and Protection Paper, Roma, Italia. 216 p.
- Nóbel, P. S. 1998. Los incomparables agaves y cactus. Trillas, México, D.F. 211 p.
- Nobel, P. S., Castañeda, M., North, G., Pimienta-Barrios, E. y Ruiz-Corral, J. A. 1998. Temperature influences on leaf CO₂ exchange, cell viability and cultivation range for Agave tequilana. J. Arid Env. 39: 1–9.
- Nobel, P. S., Pimienta-Barrios, E., Zañudo-Hernández, J. y Ramírez-Hernández, B. C. 2002. Historical aspects and net CO₂ uptake for cultivated crassulacean acid metabolism plants in Mexico. Ann. Appl. Biol. 140: 133–142.
- Núñez, G. S., Vázquez, J. L. 2003. Proyecto: Agave tequilero; generación e innovación tecnológica para incrementar su producción y mantener su alta rentabilidad. INIFAP, Jalisco. México. 3-4 pp.
- Pérez-Serrato, P. 1980. Principales problemas fitosanitarios del maguey pulquero (*Agave atrovirens* Kar.) en la Mesa Central de México. Revista Chapingo. No 23-24: 69-75.
- Petersohn, A., Brigulla, M., Haas, S., Hoheisel, J., Lker, U. and Hecker, M. 2001. Global analysis of the general stress response of *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology 183: 5617–5631.
- Pimienta-Barrios, E. and Nobel, P. S. 1998. Vegetative, Productive and physiological adaptation to aridity of pitayo (*Stenocereus queretaroensis*). Cactaceae. Economic Botany 52 (4): 401-411.
- Pimienta-Barrios, E., Robles, M. C., Ruiz, C. J. A., Nobel, P. S. y García, G. J. 1999. Regiones térmicas óptimas y marginales para el cultivo de *Agave tequilana* en el Estado de Jalisco. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jalisco, México. 47 p.
- Pimienta-Barrios, E., Zañudo, E. J., Yopez, E. and Nobel, P. S. 2000. Seasonal variation of net CO₂ uptake for cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) and pitayo (*Stenocereus queretaroensis*) in a semiarid environment. Journal of Arid Environments 44: 73-83.
- Priest, F. G. 1989. Isolation and identification of aerobic endospore-forming bacteria. In: Harwood, C.R. (Ed.) *Bacillus*. Biotechnology handbooks Vol. 2. Plenum Press. New Cork, USA. 27-56 p.
- Querol, A., Barrio, E., Ramón, D. 1992. A comparative study of different methods of yeast strain characterization. Systematics of applied microbiology 15: 439-446.

- Rubio-Cortés, R. y Cervantes-Díaz, L. 2006. Manejo de plagas y enfermedades del agave tequilero en Jalisco y Nayarit. Simposio prioridades fitosanitarias actuales en el cultivo de *Agave tequilana* Weber var. Azul Manzanillo, Colima. 74-105 pp.
- Rudolph, K. 1990. Difficulties encountered with inoculation experiments. 118-121 pp. In: Klement, Z., Rudolph, K. and Sands D. C. (Eds.) *Methods in Phytobacteriology*. Akadémiai Kiadó, Budapest. 568 p.
- Ruiz, C. J. A., Medina, G. G. y Martínez, P. R. A. 1997. Estratificación ambiental del Estado de Jalisco. En *Memorias del Simposio Ciencia y Tecnología Jalisco 1997*. CONACyT. Guadalajara, Jalisco. 95-96 pp.
- Ruiz, C. J. A., Flores, L. H. E., Martínez, P. R. A., González, E. D. R. y Nava, V. L. 1998. Determinación del potencial productivo de especies vegetales para el Distrito de Desarrollo Rural de Colotlan, Jalisco. Folleto técnico Núm.7. INIFAB-CIRPAC-C.E. Centro de Jalisco. Tlajomulco de Zúñiga, Jal. México. 60 p.
- Ruiz-Corral, J. A., Medina, G., González, I. J., Ortiz, C., Flores, H. E., Martínez, R. A. y Byerly, K. F. 1999. Requerimientos agroecológicos de cultivos. Libro Técnico Núm. 3. INIFAP-CIRPAC. Ed. Conexión gráfica. Guadalajara, México. 362 p.
- Ruiz, C. J. A., Pimienta, B. E. y Zañudo, H. J. 2002. Regiones térmicas óptimas y marginales para el cultivo de *Agave tequilana* en el Estado de Jalisco. *Agrociencia* 36 (1): 41-53.
- Ruiz-Corral, J. A., Pimienta, B. E. y Zañudo-Hernández, J. 2003. Regiones térmicas óptimas y marginales para el cultivo de *Agave tequilana* en el estado de Jalisco. *Agrociencia* 36: 41-53.
- Saleh, O. I., Huang, P. Y. and Huang, J. S. 1997. *Bacillus pumilus*, the cause of bacterial blotch of immature peach. *J. Phytopathol.* 145: 447-453.
- Schaad, N. W., Jones, J. B. and Chun, W. 2001. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. Third Edition. APS Press. St. Paul, USA. 373 p.
- Scheiman, M. N. 2005. Blue agave Recovery. *Business México*. 15: 34-41.
- Servicio de Información Alimentaria y Pesquera (SIAP-SAGARPA). 2006. Anuario de agricultura. Disponible: <http://www.siap.gb.mx/> (Consulta: 30 de abril).
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2007. Disponible: <http://www.siap.gob.mx/>
- Stephens, C. 1998. Bacterial sporulation: A question of commitment? *Current Biology*. 8: 45-48.

- Suslow, T. V., Schroth, M. N. and Isaka, M. 1982. Application of a rapid method for Gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. *Phytopathology* 72: 917-118.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 10.1093/molbev/msm092.
- Uvalle-Bueno, J. X., Vélez-Gutiérrez, C., Ramírez-Figueroa, A., Carrillo-González, R. E., Balcazar-Arizaga, A. y Valenzuela-Buetimea, L. 2006. R. Enfermedades fitopatológicas del agave tequilero *Agave tequilana* Weber var. Azul. Simposio prioridades fitosanitarias actuales en el cultivo de *Agave tequilana* Weber var. Azul. Manzanillo, Colima. 26-38 p.
- Valenzuela-Zapata, A. G. 1994. El agave tequilero: su cultivo e industrialización. Editorial Agata. 119 p.
- Valenzuela-Zapata, A. G. 1997. El Agave Tequilero: su Cultivo e Industria. 2ª edición. Litteris Editores y Monsanto. Guadalajara, Jalisco, México. 204 p.
- Valenzuela-Zapata, A. G. 2003. El Agave tequilero, cultivo e industria de México. Editorial Mundi Prensa. México. 215 p.
- Vargas, T. V. M. 2004. Evaluación del potencial agroecológico del cultivo de *Agave tequilana* Weber en el Estado de Jalisco. Tesis de Licenciatura. Universidad de Guadalajara, Facultad de Agronomía. Zapopan, Jalisco. 46 p.
- Vélez-Gutiérrez, C. 1997. Selección celular para resistencia a filtrados microbianos en *Agave tequilana* Weber. Tesis de Maestría. Universidad de Guadalajara. 97 p.
- Vessey, J. K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil* 255: 571-586.
- Virgen-Calleros, G., Martínez-Ramírez, J. L., Rodríguez-Ruvalcaba, R., Bernal, F. J., Vázquez-García, M. y Pimienta-Barrios, E. 2000. Epidemiología y manejo integrado de problemas fitosanitarios en *Agave tequilana* Weber var. Azul. Universidad de Guadalajara. Informe técnico para el Programa General de Apoyo y Desarrollo Tecnológico a la Cadena Productiva Agave-Tequila. Guadalajara, México. 50 p.
- Yoldi, M. 2000. El agave tequilero; pencas que abrazan al mundo. Claridades Agropecuarias, SAGAR. México. 48 p.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L. and Miller, W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology* 7:203-214.

Zucker, M., Hankin, L. and Sands, D. 1972. Factors governing pectate lyase synthesis in soft rot and non-soft rot bacteria. *Physiological Plant Pathology* 2: 59-67.

VIII. ANEXOS

Anexos A

Medios de cultivo empleados

Medios B de King

1.5 g MgSO₄*7H₂O
1.5 g K₂HPO₄
20 g Polipeptona
15 g Glicerina
15 g Agar
Aforar a 1 litro de agua destilada

Mezclar los reactivos y esterilizar a 15 libras por 15 minutos, dejar enfriar a 50°C y vaciar en cajas Petri.

Agar nutritivo

3 g Extracto de Carne
5 g Peptona
15 g Agar
Aforar a un litro de agua destilada

Mezclar los reactivos en el orden en el que aparecen, esterilizar a 15 libras por 15 minutos. Dejar enfriar a 50°C y distribuir en cajas Petri.

Anexo B

Pruebas en hospedantes alternos

Pudrición de papa

Procedimientos:

1. Colocar en una caja Petri un pedazo de sanita y humedecerlo con agua destilada estéril.
2. Lavar con agua y jabón la superficie de una papa secarla y cortarla en rodajas.
3. Colocar dos rodajas de papa en la caja Petri (un testigo y la rodaja inoculada).
4. Flamear una aguja de disección al rojo vivo y dejarla enfriar. Con esta aguja tomar colonias de la bacteria en estudio y hacer una incisión sobre una rodaja de papa.
5. Serrar la caja y dejar incubar a 48 h a 28°C.

Las bacterias pectinolíticas son aquellas que causan pudriciones blandas en los tejidos de las plantas, en un lapso de 48 h se muestra el tejido infectado acuoso, con rejillas y de color marrón, lo que significa que la bacteria estudiada produce enzimas capaces de colapsar los tejidos de la planta degradando la lámina media.

Reacción de hipersensibilidad

Procedimiento:

Las bacterias se suspenden en agua destiladas estéril en una concentración de aproximadamente de 107-108 células por mililitro.

La suspensión es inyectada con una jeringa hipotérmica en el espacio intercelular de la entrevena de una hoja intacta de tabaco.

Se observa al día siguiente, si hay una reacción positiva el tejido se necrosa y se vuelve papeloso.

Anexo C

Tinciones

Tinción de Gram

1. Usar cultivo joven de (24 a 48 h). realizar un frotis en un portaobjetos de una suspensión bacteriana, dejar secar a temperatura ambiente y fijarlo al calor de una flama.
2. Adicionar solución cristal violeta y dejar actuar durante 1 minuto.
3. Decantar el excedente y adicionar la solución lugol, dejar actuar durante 1 minuto.
4. Decantar con agua la solución lugol.
5. Adicionar etanol hasta que no se observe escurrimiento del complejo cristal violeta.
6. Adicionar safranina al 1% y dejar actuar por 30 segundos.

Bacterias Gram positivas se tiñen de color morado con el primer colorante (cristal violeta), mientras que las bacterias Gram negativas pierden el primer colorante y se tiñen de rojo con el colorante de contraste (safranina).

Método de Ryu

1. Agregar una gota de KOH 3% a una colonia de bacterias sobre un porta objetos.
2. Mover con la asa por 10 segundos con movimientos circulares.

Las colonias Gram negativas se vuelven viscosas y forman un hilo al levantar el asa, a diferencia de las bacterias Gram positivas. Esto es debido a la estructura de la pared celular. En el caso de las bacterias Gram positivas la pared es más resistente y no es fácilmente degradada, en comparación con la pared de las bacterias Gram negativas que son fácilmente degradadas, formándose un hilo compuesto por DNA y fragmentos celulares.

Tinción de endosporas

Procedimiento:

1. Suspender una colonia bacteriana en una gota de agua sobre el portaobjetos. Dejar secar a temperatura ambiente.
2. Agregar una gota de verde malaquita 5.0% (w/v) fijar con calor del mechero y/o dejar actuar 10 minutos.
3. Lavar con agua corriente, secar brevemente.
4. Adicionar una gota de safranina acuosa 0.5 % (w/v) y dejar actuar durante 15 segundos.

5. Lavar con mucho cuidado con agua corriente y dejar secar.

Observar las células en el microscopio a 100X y aceite de inmersión, las células bacterianas se observan rojas y las endosporas de color verde.