

IDENTIFICACIÓN MORFOLOGICA DE HONGOS FILAMENTOSOS AISLADOS DE DIFERENTES SINTOMAS ASOCIADOS A AGAVE TEQUILERO EN LOS ALTOS DE JALISCO

MORPHOLOGICAL IDENTIFICATION OF ISOLATED FILAMENT FUNGI OF DIFFERENT SYMPTOMS ASSOCIATED WITH AGAVE TEQUILERO IN THE HIGHLANDS OF JALISCO

Allison Ceballos-Alvarez¹; Ismael F. Chávez-Díaz²; Lily X. Zelaya-Molina²; Carlos I. Cruz-Cárdenas²; Teresita de J. Mercado-Vargas³; Zoe Resendiz-Venado⁴

¹Centro Universitario del Sur, Universidad de Guadalajara, Av. Enrique Arreola Silva #883, Colonia Centro, Ciudad Guzmán, C.P. 49000, Jalisco, México.

²Laboratorio de Recursos Genéticos Microbianos, Centro Nacional de Recursos Genéticos, Boulevard de la Biodiversidad # 400, Rancho las Cruces, Tepatitlán de Morelos, C.P. 47600, Jalisco, México. ³Universidad Abierta y a Distancia de México, Av. Universidad #1200 piso 1 Cuadrante 1-21, Col. Xoco, Alcaldía Benito Juárez, C.P. 03330, Ciudad de México, México. ⁴Universidad del Valle de México, Campus Chapultepec, Av. Observatorio # 400, Col. 16 de Septiembre, De. Miguel Hidalgo, C.P. 11810, Ciudad de México, México. Autor por correspondencia: cruz.ivan@inifap.gob.mx

Recibido: 27 febrero, aceptado 2 abril 2022

Artículo científico

RESUMEN

En el año 2020 se reportó un incremento sustancial en la producción de agave tequilero debido a la alta demanda de esta bebida en el extranjero. La región de los Altos de Jalisco se ha destacado por ser una de las principales zonas productoras de este cultivo en México. A pesar del manejo integrado aplicado por los productores, año con año se observa una mayor incidencia de diversas enfermedades de origen fungoso en este cultivo. Con la finalidad de aportar información básica sobre la morfología e identidad de los hongos asociados a dichas enfermedades, en el presente estudio se aisló, caracterizó e identificó a los diferentes hongos fitopatógenos asociados a cada una de las enfermedades y síntomas observados en el cultivo de agave tequilero en los campos productivos de los Altos de Jalisco.

Palabras clave: *mancha marginal del agave, pudrición roja del agave, tizón foliar del agave, mancha en hoja del agave, Rhizoctonia.*

SUMMARY

The year 2020 reported a substantial increase in the production of agave tequilero due to the high demand for this beverage abroad. The Altos de Jalisco region has stood out for being one of the main producing areas of this crop in Mexico. Despite producers' integrated management, there is a higher incidence of various fungal diseases in this crop year after year. In order to provide basic information on the morphology and identity of the fungi associated

with these diseases, in the present research, the different phytopathogenic fungi associated with each of the diseases and symptoms of the tequila agave crop in the productive fields of the Altos de Jalisco.

Keywords: *Agave marginal spot, agave red rot, agave grey spot, agave red spot, agave leaf spot, Rhizoctonia.*

INTRODUCCIÓN

El agave azul tequilero (*Agave tequilana* Weber) es uno de los productos agrícolas con mayor crecimiento en los últimos años. En el 2020 se registró una producción total de 1'128,634.71 ton de agave, lo que generó \$24'649,678.⁰⁴ de pesos (SIAP, 2021). La principal zona productora de agave en México es el denominado "triángulo de oro", zona en la que el cultivo de agave se adoptó como una de las principales actividades económicas a finales del siglo XIX, esta región se encuentra situada en una meseta entre los municipios de Atotonilco, Tepatitlán de Morelos, San Ignacio Cerro Gordo, Arandas y Jesús María (Valenzuela-Zapata, 2006). En la actualidad, este cultivo aún es una de las principales actividades económicas, pues la industria tequilera genera empleo para 70,000 personas y aporta 4,200 millones de pesos anuales de recursos ficiales a través de IEPS y 1,300 millones de dólares por las exportaciones (Navarro-del Toro, 2021). Las principales limitantes del rendimiento de este cultivo se deben a los hongos filamentosos que causan enfermedades en la planta, mermando así la ganancia de peso. Por lo que en el presente estudio tuvo como objetivo aislar y caracterizar de forma morfológica los hongos asociados a los diferentes síntomas del cultivo de agave en la zona a nivel de género, con la finalidad de contribuir al acervo de conocimientos referente a las enfermedades de este cultivo y así facilitar la toma de decisiones en cuanto al manejo sanitario del mismo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo. Se colectó material vegetal de una zona agavera de los Altos de Jalisco, los cuales mostraban un problema fitosanitario especial con alta complejidad de control, en el sitio las plantas de agave tequilero variedad Azul mostraban síntomas diversos. Se realizó un muestreo aleatorio simple de cinco puntos colectando el material vegetal fresco, tomando un total de 30 de muestras. El tejido vegetal se dividió en 6 posibles síntomas, las muestras fueron enviadas al Centro Nacional de Recursos Genéticos del INIFAP para determinar los fitopatógenos asociados al problema fitosanitario.

Procesamiento de la muestra. El material vegetal fue cortado en trozos de 1 mm por 1 mm, conteniendo tejido vivo de la zona circundante a las lesiones necróticas, se desinfecto con hipoclorito de sodio al 3% por 5 min, etanol

al 70% por 1 min y se enjuaga con agua destilada estéril, se retiró el exceso de agua. Posteriormente, se colocaron 10 trozos de material vegetal por cada caja Petri y se sembraron en medios rosa bengala (RB) y papa-dextrosa-agar-acidificado (PDAa) para el aislamiento de fitopatógenos fúngicos. Las cajas Petri se incubaron a 28 °C hasta obtener micelio fúngico.

Aislamiento y purificación. Una vez obtenidos los aislamientos fúngicos, se purificaron mediante cultivo de punta de hifa y se sembraron en medio agar-papa-dextrosa (PDA), se incubaron a 28 °C hasta obtener esporas. A partir del crecimiento se hicieron diluciones seriadas, de la dilución 10^{-4} se pasaron 100 μ L a una caja Petri con medio PDA esparciendo con un asa Digrafsky en forma de L, se incubaron a 28 °C hasta obtener esporas individuales para obtener cultivos monospóricos con colonias uniformes.

Caracterización morfológica. Se calculó el índice de crecimiento promedio. Una vez obtenidos los aislamientos fúngicos puros se sembraron por punción en medio PDA, se midieron después de tres días y se aplicó la fórmula ICP: CT/Nd , en donde CT representa el crecimiento total de los hongos y Nd el número total de días de crecimiento. Posteriormente se describió la morfología colonial. Se tomó un cuadro de 1 mm por 1mm de micelio maduro de cada hongo, estos se sembraron en los medios PDA, agar-papa-zanahoria (PCA) y jugo de verduras (V8) y se dejó crecer por 15 días a 28 °C. Después se observaron sus características macroscópicas. La morfología microscópica e identificación se realizó creciendo los aislamientos fúngicos en medio PDA a 28 °C. Éstos fueron sometido a dos tipos de estrés; choque térmico y estrés por luz. Para el coque térmico, las cepas se expusieron a 4 °C por 20 min y 28 °C por 20 min. Para el estrés por luz las cepas se irradiaron con dos lámparas por 5 horas. Terminada la exposición a los factores de estrés las cepas se incubaron nuevamente por 24 h a 28 °C. Finalizado el tiempo se realizaron tinciones con solución azul de lactofenol, las laminillas se observaron al microscopio y se asignó el género según la guía de géneros de hongos imperfectos ilustrados de Barnett y Hunter (2006). La descripción de los síntomas asociados a cada hongo se realizó desde el campo describiendo los patrones observados en los agaves y mediante observaciones en el laboratorio.

Análisis de los datos. Los datos se obtuvieron a partir del diseño bloques completos al azar. Se realizaron dos experimentos por cada ensayo con 4 repeticiones cada uno, las ocho observaciones resultantes fueron analizadas en conjunto. Los datos obtenidos del crecimiento de las cepas en diferentes medios se procesaron mediante el \log_{10} antes de ser analizados, la tabla presenta los datos reales. Antes de ejecutar el ANOVA seguido de la prueba de Tukey $P \leq 0.05$ se corroboró la homocedasticidad y la normalidad de los datos ($P < 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Síntomas observados. Uno de los síntomas observados fue la presencia de daños severos en las hojas, color oscuro tanto en el haz como en el envés (Figura 1D), las lesiones necróticas provocaban una pudrición semi-seca descendente (Figura 1A). Este síntoma coincide con la sintomatología reportada por Florencio-Anastasio *et al.* (2018), causadas por hongos del género *Phoma* sp. al causar la enfermedad mancha marginal. Sobre las mismas plantas, también se observó la pudrición de las hojas presentando secreciones rojizas (Figura 1C). Estos síntomas fueron similares a los reportados en *Agave sisalana* en Brasil, causado por un hongo del género *Botryodiplodia* sp. agente causal de la enfermedad pudrición roja (Ferreira-Lima *et al.*, 1998). Otro síntoma fue la presencia de lesiones necróticas rígidas, provocando lesiones que se extienden en la hoja desde la punta de forma descendente (Figura 1B). Esta sintomatología coincide con las lesiones reconocidas en la enfermedad tizón foliar durante la infección causada por el hongo del género *Cercospora* sp. reportadas por Ayala y Yáñez (2005). En otras plantas se reconocieron lesiones en las hojas, las cuales constaron de manchas provocando lesiones necróticas hundidas (Figura 1E). Se han observado síntomas similares en *Agave americana* en Iran, al presentar la enfermedad mancha en hoja causados por hongos del género *Alternaria* sp. (Mirhosseini, 2015). Finalmente, se observó un síntoma que presentaba lesiones corchosas de color café-rojizo en las hojas, se presentaban tanto en los márgenes como en el haz y el envés (Figura 1F). Este síntoma se identificó microscópicamente a un hongo del género *Rhizoctonia* sp., como el agente causal más probable, sin embargo, no existen reportes en agave. Son necesarios mayores estudios fitopatológicos para determinar la asociación de estos agentes causales con los síntomas asociados en campo, no obstante, las lesiones y síntomas observados corresponden a lo reportado previamente por otros autores.



Figura 1. Síntomas en agave causados por fitopatógenos en los Altos de Jalisco. A) y D) Mancha marginal del agave, *Phoma* sp. agente causal más probable; B) Tizón foliar del agave, *Cercospora* sp. agente causal más probable; C) Pudrición roja del agave, *Botryodiplodia* sp. agente causal más probable; E) Mancha roja del agave, *Alternaria* sp. agente causal más probable; F) *Rhizoctonia* sp. agente causal más probable.

Índice de crecimiento promedio. Los resultados de la figura 2 permiten observar que el hongo *Botryodiplodia* sp. tiene un índice de crecimiento promedio significativamente más elevado, seguido por *Alternaria* sp. y *Cercospora* sp. lo cual podría estar relacionado con una aptitud parasítica mayor a la de los otros hongos, aunque son necesarios mayores estudios sobre planta de agave para corroborar dicho supuesto.

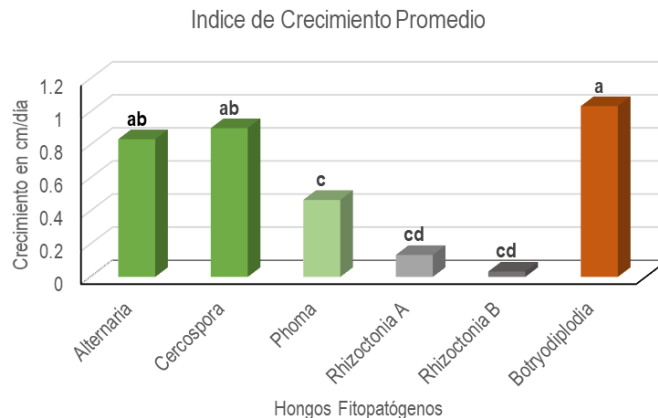


Figura 2. Índice de Crecimiento Promedio de hongos fitopatógenos asociados a diversos síntomas en los Altos de Jalisco. Los valores de las barras representan un total de 8 observaciones. Las barras con letras similares no representan una diferencia estadística (Tukey $P \leq 0.05$).

Crecimiento sobre diferentes medios. En general, el medio V8 favoreció el crecimiento de los hongos aislados de agave, seguido por el medio PDA, aunque el medio PCA registró un medio significativamente menor al de los otros en la mayoría de los casos, con excepción del hongo *Rhizoctonia* sp., también representa un medio óptimo para el cultivo de los demás hongos. Los tres medios probados son óptimos para el crecimiento de los hongos que fueron aislados del agave, por lo que, es factible su utilización en pruebas diagnósticas de enfermedades de agave asociadas a hongos filamentosos cultivables (Cuadro 1).

Identificación a través de morfología colonial y microscópica. La cepa identificada como *Alternaria* sp. en PDA (Figura 3C) presentó una textura algodonosa color verde militar, superficie elevada con micelio aéreo color blanco. En PCA (Figura 3D) presentó una textura polvorienta, superficie plana, color café-claro con exterior café-oscuro, con halos concéntricos negros, borde lobulado y en V8 (Figura 3E) presentó una textura algodonosa, superficie elevada, color verde militar con elevaciones blancas, borde regular. Para la identificación microscópica se observaron estructuras reproductivas características de *Alternaria* sp. se presentaron conidias fuertemente atenuadas en el ápice, desarrollo conidial acropétalo, conidióforos oscuros, en su mayoría simples, conidia (porosporas) oscura, típicamente con septos transversales y longitudinales, como los reportan Barnett y Hunter (2006) (Figura 3B).

Cuadro 1. ANOVA realizado mediante una transformación \log_{10} . Se muestran los datos reales de los diámetros de las colonias en cm. Los valores representan un total de 8 observaciones. Las letras seguidas por la misma letra no representan una diferencia significativa (Tukey ≤ 0.05). Crecimiento de hongos fitopatógenos asociados a agave sobre diferentes medios de cultivo.

Cepa	Medios					
	PDA		PCA		V8	
<i>Alternaria</i> sp.	8.10	b	7.23	c	8.50	a
<i>Cercospora</i> sp.	8.50	a	7.33	b	8.50	a
<i>Phoma</i> sp.	8.07	a	7.30	b	8.37	a
<i>Rhizoctonia</i> sp. A	7.67	a	7.50	a	6.97	b
<i>Rhizoctonia</i> sp. B	7.50	b	7.40	b	7.97	a
<i>Botryodiplodia</i> sp.	8.24	b	8.12	c	8.50	a

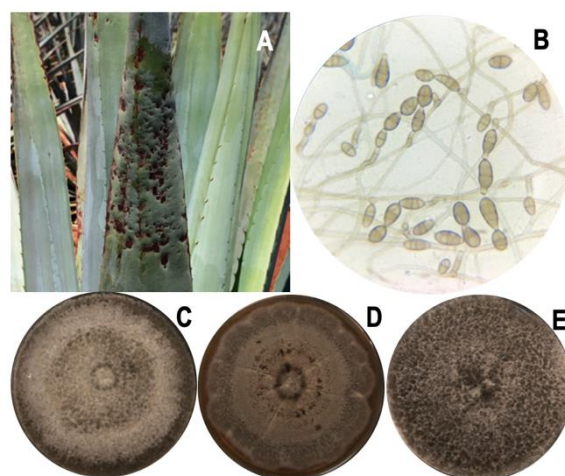


Figura 3. Mancha roja del agave, posiblemente causada por *Alternaria* sp. A) manchas rojas circulares sobre hoja de agave; B) morfología microscópica de *Alternaria* sp. aislada del síntoma; C) morfología colonial de *Alternaria* sp. sobre PDA; D) morfología colonial sobre PCA; E) morfología colonial sobre V8.

La textura de la cepa *Cercospora* sp. fue diferente según el medio de cultivo, en PDA (Figura 4C) presento una textura polvorienta color blanco, con conglomeraciones de micelio en color negro, en PCA (Figura 4D) presento una textura polvorienta color beige, con picnidios color negro, borde uniforme y en V8 (Figura 4E) presento una forma filamentosa color beige, sin elevación y superficie lisa y mate. Para la identificación microscópica se observaron grupos de conidióforos, que surgen en racimos, como los reportan Barnett y Hunter (2006) (Figura 4B).

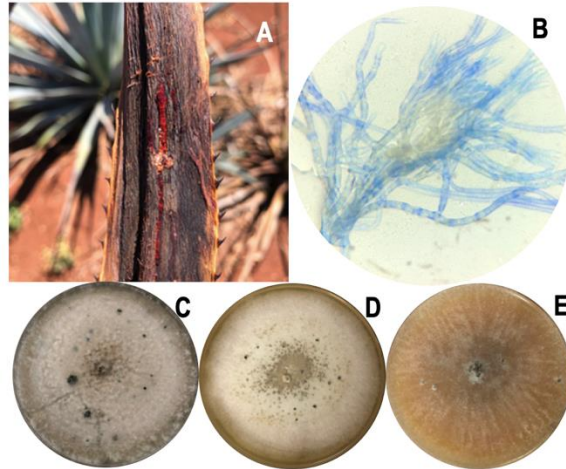


Figura 4. Tizón foliar del agave posiblemente causado por *Cercospora* sp. A) tizón foliar sobre hoja de agave; B) morfología microscópica de *Cercospora* sp. aislada del síntoma; C) morfología colonial de *Cercospora* sp. sobre PDA; D) morfología colonial sobre PCA; E) morfología colonial sobre V8.

La cepa identificada como *Phoma* sp. en PDA (Figura 5C) presento una textura polvorienta, borde entero, elevación crateriforme color verde-oscuro con conglomeraciones de micelio en color blanco, en PCA (Figura 5D) presento una forma irregular color gris con halos concéntricos cafés y borde café-oscuro, superficie seca y en V8 (Figura 5E) presento una textura polvorienta, sin elevación y superficie mate. Para la identificación microscópica se observaron conidióforos cortos, simples, no ramificados, como los reportan Barnett y Hunter (2006) (Figura 5B).

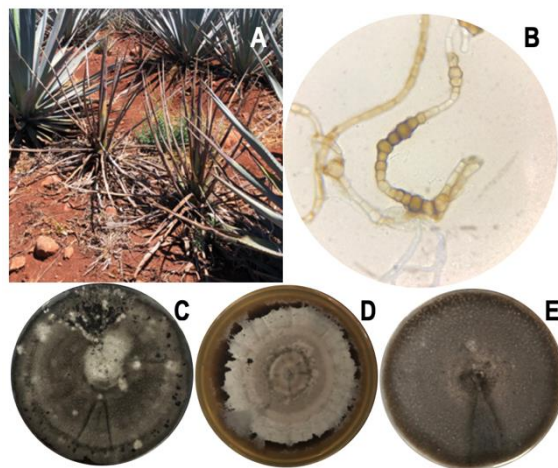


Figura 5. Mancha marginal del agave posiblemente causada por *Phoma* sp. A) mancha marginal en plantas de agave; B) morfología microscópica de *Phoma* sp. aislada del síntoma; C) morfología colonial de *Phoma* sp. sobre PDA; D) morfología colonial sobre PCA; E) morfología colonial sobre V8.

La cepa identificada como *Rhizoctonia* sp. A. en PDA (Figura 6D) presento superficie lisa-brillante color café-oscuro, halo irregular color exterior café-claro, sin elevación, en PCA (Figura 6E) presento textura polvorienta, sin elevación y en V8 (Figura 6F) presento una textura polvorienta color verde-oscuro con superficie seca color beige. Para la identificación microscópica se observaron células de micelio generalmente largas, como lo reportan Barnett y Hunter (2006) (Figura 6B). Además, la cepa identificada como *Rhizoctonia* sp. B en PDA (Figura 6G) y en PCA (Figura 6H) presentaron características similares a la cepa anterior y en V8 (Figura 6I) presento una elevación convexa, borde irregular, superficie rugosa, mate color café-claro. Para la identificación microscópica se observaron células de micelio generalmente largas, como lo reportan Barnett y Hunter (2006) (Figura 6C).

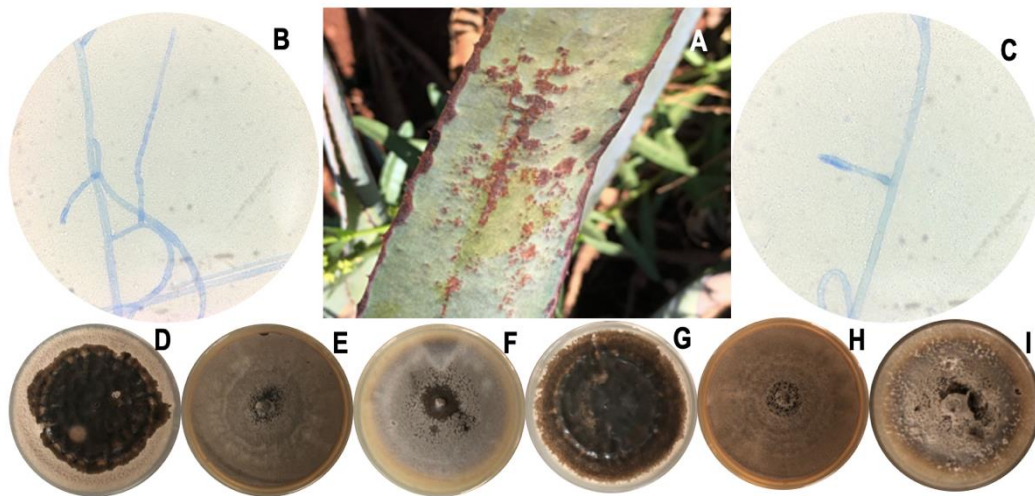


Figura 6. Pudrición del agave posiblemente causado por *Rhizoctonia* sp. A) lesión causada por *Rhizoctonia* sp en hojas de agave; B) morfología microscópica de *Rhizoctonia* sp. A aislada del síntoma; C) morfología microscópica de *Rhizoctonia* sp. B aislada del síntoma; D) morfología colonial de *Rhizoctonia* sp. A sobre PDA; E) morfología colonial de *Rhizoctonia* sp. A sobre PCA; F) morfología colonial de *Rhizoctonia* sp. A sobre V8; G) morfología colonial de *Rhizoctonia* sp. B sobre PDA; H) morfología colonial de *Rhizoctonia* sp. B sobre PCA; I) morfología colonial de *Rhizoctonia* sp. B sobre V8.

La cepa identificada como *Botryodiplodia* sp. se caracterizó en PDA (Figura 7C) presentando textura algodonosa lisa, picnidios negros, en PCA (Figura 7D) presento textura polvorienta, color beige, con picnidios negros y en V8 (Figura 7E) presento una forma filamentososa color beige, sin elevación y superficie lisa y mate. Para la identificación microscópica se observaron picnidios, los cuales en mayoría se encontraron cerrados, solo en algunos se distinguieron conidios hialinos inmaduros, como lo reportan Ferreira-Lima et al. (1998) (Figura 7B).

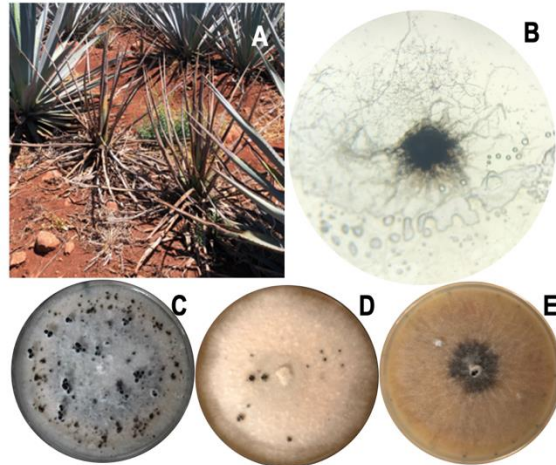


Figura 7. Pudrición roja del agave posiblemente causado por *Botryodiplodia* sp. A) pudrición roja en plantas de agave; B) morfología microscópica de *Botryodiplodia* sp. aislada del síntoma; C) morfología colonial de *Botryodiplodia* sp. sobre PDA; D) morfología colonial sobre PCA; E) morfología colonial sobre V8.

CONCLUSIONES

Las enfermedades y síntomas en agave tequilero observadas en los Altos de Jalisco que afectan al rendimiento del cultivo se asocian a los siguientes hongos fitopatógenos: mancha roja del agave asociada a *Alternaria* sp. como agente causal más probable, pudrición roja del agave asociada a *Botryodiplodia* sp. como agente causal más probable, tizón foliar del agave asociada a *Cercospora* sp. como agente causal más probable, mancha marginal del agave asociada a *Phoma* sp. como agente causal más probable y *Rhizoctonia* sp. como agente causal más probable.

Financiamiento

El presente estudio fue financiado por el proyecto 1437735328 "Alternativas al glifosato para el control de maleza en México".

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ayala-Escobar V; Yañez-Morales MDJ; Braun U; Groenewald JZ; Crous PW (2005) *Cercospora agavicola*-a new foliar pathogen of *Agave tequilana* var. Azul from Mexico. Mycotaxon. 93: 115-121.
- Barnett HL; Hunter BB (2006). Illustrated genera of imperfect fungi. Snt. Paul Minesota, USA, The American Phytopathological Society.
- Ferreira-Lima E; Nunes-Moreira JA; Souto-Batista FA; Ferreira Da-Silva OR; Correia-Farias FJ; Emídio-Araújo A; (1998). Podridão vermelha do tronco do sisal (*Agave sisalana* Perr.) causada por *Botryodiplodia theobromae* Pat.'. RBOF. 2: 109-112.
- Florencio-Anastasio JG; Quezada-Salinas A; Moreno-Velázquez M; Preuss-Angeles AK; Valenzuela-Tirado GA; Garcia-Avila CJ; Ruiz-Galván I; Bravo-Pérez D; Pineda-Ríos J (2018). Hongos asociados a la Mancha Anillada del Maguey Pulquero *Agave salmiana* en Mexico. Rev. Mex. Fitopatol. 36: 69-70.
- Mirhosseini HA; Babaeizad V; Hashemi L; Basavand E; Heidari-Nezhad AM (2015). First record of agave leaf spot caused by *Alternaria alternata* in Iran. J. Plant Pathol., 97: 217.
- Navarro-del Toro GJ (2021). El tequila para consumo nacional como una ventana de oportunidades para el pequeño productor agavero. RICEA, 10: 22-41.
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (2021). Anuario estadístico de la producción agrícola. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural.
- Valenzuela-Zapata AG (2006). Agave azul. Historia por venir. Itinerarios culturales y rutas del patrimonio, Patrimonio cultural y turismo No. 15. Conaculta, Cd. de México.