

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE INGENIERÍA**

MAESTRÍA EN CIENCIAS



**“DETERMINACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA MEDIANTE EL USO DE
MARCADORES MOLECULARES EN *Fusarium oxysporum* QUE AFECTA AL
AGAVE TEQUILERO”**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Karla Liliana Vega Ramos

DIRECTOR

Dr. Jaime Xavier Uvalle Bueno

CODIRECTOR

Dr. Juan Florencio Gómez Leyva

Mexicali, B. C.

Noviembre, 2010

CONTENIDO

I.	INTRODUCCION.....	1
II.	ANTECEDENTES.....	3
	2.1 <i>Agave tequilana</i> Weber var. azul.....	3
	2.1.1 El cultivo de agave en la historia.....	3
	2.1.2 Descripción botánica del <i>Agave tequilana</i> Weber var.azul.....	4
	2.1.3 Área de cultivo (Denominación de origen).....	5
	2.1.4 Condiciones agroclimáticas del agave tequilero....	6
	2.1.5 Situación económica actual del cultivo de agave.....	6
	2.2 Marchitez vascular en agave tequilero.....	7
	2.2.1 <i>Fusarium oxysporum</i> presunto agente causal de marchitez vascular.....	8
	2.2.2 Ciclo patológico de <i>Fusarium oxysporum</i>	9
	2.2.3 Condiciones óptimas de desarrollo.....	10
	2.2.4 Incidencia y distribución de marchitez en <i>Agave</i> <i>tequilana</i>	10
	2.2.5 Factores que predisponen el desarrollo de la enfermedad.....	11
	2.3 Caracterización molecular del género <i>Fusarium sp.</i>	11
	2.3.1 Estudio del DNA ribosomal.....	12
	2.3.2 Análisis de DNA ribosomal mediante el uso de enzimas de restricción.....	14
	2.3.3 Marcadores moleculares para determinación de variabilidad genética.....	15

III.	HIPOTESIS	17
IV.	OBJETIVOS	17
	4.1 Objetivo General.....	17
	4.2 Objetivos específicos.....	17
V.	METODOLOGIA	18
	5.1 Muestreo.....	18
	5.1.1 Selección de las zonas de muestreo.....	18
	5.1.2 Colecta de muestra de suelo.....	19
	5.1.3 Análisis de fertilidad en muestras de suelo.....	20
	5.1.4 Colecta de muestra de raíz de agave.....	20
	5.2 Obtención de aislados característicos de <i>Fusarium sp.</i>	20
	5.2.1 Técnica de dilución serial.....	21
	5.2.2 Siembra en superficie.....	21
	5.2.3 Empleo de medio selectivo Komada.....	21
	5.2.4 Establecimiento de cultivos monospóricos.....	22
	5.3 Identificación taxonómica mediante el uso de microscopía de aislamientos característicos de <i>Fusarium oxysporum</i>	23
	5.4 Extracción de DNA.....	23
	5.5 Amplificación de DNA ribosomal con primers universales.....	24
	5.6 Análisis de restricción de DNA ribosomal amplificado (ARDRA).....	25
	5.7 Determinación de la variabilidad genética mediante el uso de BOX-PCR.....	25
	5.8 Construcción de dendrogramas	26

VI. RESULTADOS Y DISCUSION.....	27
6.1 Muestreo.....	27
6.1.1 Análisis de fertilidad de suelo.....	29
6.2 Aislamiento e identificación de <i>Fusarium oxysporum</i>	30
6.3 Uso de técnicas moleculares para la determinación de la variabilidad genética.....	33
6.3.1 Extracción de DNA.....	33
6.3.2 Amplificación por PCR del DNA ribosomal.....	34
6.3.3 Análisis de restricción de DNA ribosomal amplificado....	36
6.3.4 Determinación de la variabilidad genética mediante marcadores moleculares BOX PCR.....	41
VII. CONCLUSIONES.....	50
VIII. PERSPECTIVAS.....	52
IX. BIBLIOGRAFIA.....	53

INDICE DE TABLAS

1. Descripción de parcelas con síntomas de marchitez involucradas en el muestreo.....	27
2. Resultados de análisis de fertilidad de muestras de suelo.....	29
3. Origen de los aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> en el estudio.....	44
4. Composición de los grupos formados en el análisis de DNA ribosomal mediante la técnica de BOX-PCR.....	47

INDICE DE FIGURAS

1. Arreglo de los genes de DNA ribosomal en organismos eucariotes.....	12
2. Distribución de la zona de muestreo en el estado de Jalisco y Nayarit.....	19
3. Plantas representativas para la toma de muestra de plantaciones de <i>Agave tequilana</i> Weber var. azul.....	28
4. Presencia de esporas características del género <i>F. oxysporum</i> en aislamientos evaluados.	31
5. Pigmentación producida por los aislamientos con características de <i>F. oxysporum</i> en medio ADP.....	32
6. Geles de agarosa al 0.8% de las extracciones de DNA de <i>F. oxysporum</i> aislados en plantaciones de agave tequilero.....	34
7. Amplificación de DNA ribosomal mediante el uso de primers universales ITS.....	36
8. Productos de digestión de DNA ribosomal con la enzima <i>Hae III</i> separados en un gel al 1.2 %.....	37
9. Productos de digestión de DNA ribosomal con la enzima <i>Hinf I</i> separados en un gel de agarosa al 1.2 %.....	38

10. Dendrograma de productos de digestión de DNA ribosomal con la enzima <i>Hae III</i> e <i>Hinf I</i>	40
11. Patrón de bandas amplificadas con el marcador BOX AR 1.....	42
12. Dendrograma de variabilidad genética de aislamientos de <i>F. oxysporum</i> mediante marcadores BOX-PCR.....	43

RESUMEN

El *Agave tequilana* Weber var. azul, es en la actualidad el cultivo agroindustrial más importante en el estado de Jalisco debido a que representa la materia prima para la producción de “Tequila”, bebida tradicional mexicana que nace a partir de la fermentación del corazón del agave reconocida en México y el mundo. El cultivo de agave tequilero es abundante en el estado de Jalisco y algunos municipios de Nayarit, Guanajuato, Michoacán y Tamaulipas, medio geográfico que incluye la denominación de origen (DOT), otorgada en el año 1974.

En años recientes el agave tequilero se ha visto amenazado por la invasión de diversos patógenos dentro de los cuales el hongo *Fusarium oxysporum* es considerado el posible agente causal de la marchitez vascular, enfermedad de mayor incidencia en el estado de Jalisco, caracterizada por encarrujamiento de hojas, aparición de un color violáceo de estas y pérdida de raíces. Actualmente existen pocos estudios sobre el posible agente causal de la marchitez vascular en agave tequilero, de ahí la importancia de este trabajo, el cual tiene como objetivo obtener aislamientos de *Fusarium oxysporum* proveniente de plantaciones de agave tequilero con síntomas de marchitez vascular y determinar su variabilidad genética utilizando marcadores moleculares.

Mediante el empleo de medio selectivo se obtuvieron 115 aislamientos de *Fusarium oxysporum* provenientes de plantas de *Agave tequilana* Weber var. azul asintomáticas y con síntomas de marchitez vascular. La caracterización genética se determinó mediante la amplificación por PCR del DNA ribosomal y su digestión con diferentes enzimas de restricción, así como el empleo del marcador molecular BOX-PCR. De acuerdo a los resultados del ARDRA se formaron cinco grupos mientras que el marcador BOX nos permitió agrupar 14 grupos de acuerdo al origen y ubicación geográfica de los aislamientos.

Estos resultados permitieron describir genéticamente las poblaciones del hongo *Fusarium oxysporum* presentes en plantaciones de agave tequilero con la finalidad establecer posteriormente estrategias de manejo efectivas.

ABSTRACT

Agave tequilana Weber var. azul is known like “agave tequilero” the most important crop in Jalisco because from its produce “Tequila” traditional Mexican beverage that is done from the hearth fermentation of agave reconigzed in Mexico and around the world. This is a generous crop in Jalisco and others states like Nayarit, Guanajuato, Michoacán and Tamaulipas, all of them included in the original denomination, awarded in 1974.

Recently agave tequilero has been attacked by pathogen plants cause of different diseases, like vascular wilt, which is possibly caused by the fungus *Fusarium oxysporum* it generate the major economical impact in Jalisco, the features produce by the vascular wilt are violaceous leaf, dehydration and soft root rot. Currently don't have much research about the causal agent of vascular wilt, therefore, the aims of this work were obtain *Fusarium oxysporum* isolates from agave tequilero crops and determine the genetic variability of them using molecular markers.

Were obtained 115 *Fusarium oxysporum* isolated from asymptomatic and symptomatic *Agave tequilana* Weber var. azul crops. The genetic characterization was determined using the amplified rDNA by PCR and restriction analysis (ARDRA) .Finally used the PCR product to determine the genetic variability using molecular markers BOX. ARDRA results formed five groups while BOX formed 14 groups according of the origin and location of the isolates

The results of this work allow describing genetically populations of *Fusarium oxysporum* which are present on agave tequilero crops with the purpose of establishment of effective strategies of management in disease.

I. INTRODUCCION

El tequila, bebida alcohólica elaborada a partir de *Agave tequilana* Weber var. azul, originario del estado de Jalisco y cuya producción formal inicio en 1795, cuando se otorgó por parte del rey de España a José María Guadalupe Cuervo la primera concesión para producir Tequila (Luna, 1991).

Esta bebida es considerada como el primer producto con denominación de origen en México, declarada el 22 de Noviembre de 1974 por la Secretaría de Industria y Comercio, la cual comprende los estados de Guanajuato, Jalisco, Michoacán, Nayarit y Tamaulipas. En la actualidad el territorio de plantaciones establecidas comprende una superficie de 89,000 Has que representan 224, 847,356 de plantas con un rendimiento promedio de 30 Kg. Las plantaciones antes mencionadas abastecen 153 empresas de la industria tequilera que exportan sus productos a más de 100 países alrededor del mundo (CRT, 2010). El incremento en la demanda del cultivo de agave ha dado lugar a la exigencia de contar con materia prima de excelente calidad, sin embargo, en las últimas décadas el cultivo de *Agave tequilana* Weber var. azul se ha visto afectado por plagas y enfermedades siendo la marchitez vascular la de mayor incidencia en el estado de Jalisco.

La primera enfermedad fue descrita en 1887 por Pérez, citado por Rodríguez-Garay en 2004, como “gangrena” asociada a microorganismos y no a insectos. Blanco en 1906 y Gándara en 1912 reportaron las primeras enfermedades ocasionadas por hongos. Fue hasta 1996 por Luna-Hernández que se le atribuye a *Fusarium oxysporum* la marchitez vascular del agave tequilero. Esta enfermedad atribuida al hongo *Fusarium oxysporum*, perteneciente a la clase de los

Deuteromicetos y que cuenta con la capacidad de adaptación en climas fríos, templados y subtropicales además que puede sobrevivir a diferentes grados de pH en suelos (Carrillo, 2003), aun en ausencia de planta hospedera, debido a ciertas estructuras de resistencia llamadas “clamidosporas”.

La marchitez vascular caracterizada por el encarrujamiento y aparición de un color violáceo en hojas o pencas y pérdida del anclaje por pudrición de raíces debido a la obstrucción o taponamiento de conductos vasculares que dificulta el paso de nutrimentos y agua (Rubio, 2007). El control de marchitez vascular se ha dificultado debido a la sobrevivencia del agente causal en suelo durante años, en general el manejo de cultivos susceptibles, se ha limitado al uso de cultivos resistentes, sin embargo, se ha enfrentado a la aparición de diferentes razas como consecuencia de la variación evolutiva del hongo (Loera-Quezada, 2000).

Como resultado de la necesidad por conocer el comportamiento genético del posible agente causal se desarrolló el presente trabajo con la finalidad de caracterizar aislados de *Fusarium oxysporum*, obtenidos de plantaciones de agave tequilero con síntomas de marchitez vascular establecidas en distintos municipios del estado de Jalisco y un municipio del estado de Nayarit.

II. ANTECEDENTES

2.1 *Agave tequilana* Weber var. Azul

El *Agave tequilana* Weber var. azul es la especie de mayor importancia de la familia de las agaváceas, debido a que representa la materia prima para la producción del tequila, bebida tradicional mexicana con denominación de origen y aceptación a nivel internacional (Vázquez-García *et al.*, 2005). El género agave cuenta con 200 especies siendo el más rico de los nueve géneros de la familia Agavácea sensu Gentry (1982). Muchas de estas especies importantes desde el punto de vista económico para la obtención de diferentes productos siendo el *Agave tequilana* Weber var. azul el único que cuenta con propiedades específicas para la obtención del tequila, entre estas características es el alto contenido de inulina, bajo contenido de fibra y componentes químicos que le dan el sabor característico al tequila (Diguét, 1902).

El 75 % de las especies se distribuyen en México, considerado centro de origen y diversificación, el mayor número de especies se encuentra en el estado de Oaxaca con un 23 % aunque Jalisco es el estado con mayor riqueza en el occidente de México (García- Mendoza, 2004). En Jalisco las regiones correspondientes a la Sierra Madre de Sur y el Eje Neo volcánico contienen el mayor número de especies.

2.1.1 El cultivo de agave en la historia

El “maguey” término indígena usado para referirse a las primeras especies del género agave vistas por los españoles a su llegada al Caribe en el siglo XV y XVI, cabe mencionar que esta planta es cultivada desde épocas prehispánicas para propósitos curativos y además de la elaboración de la bebida llamada “pulque”,

utilizada en el siglo XIII en cultos religiosos de la diosa Mayahuel , impulsando su fermentación hasta la llegada de los españoles a mitad del siglo XVI, iniciando así la producción del tequila.

A partir de 1940, la industria tequilera comenzó a tomar mayor auge, debido a la escasez del whisky en Estados Unidos a causa de la segunda Guerra Mundial llegando a límites de exportación insospechados (*Muría, 1996*). La demanda de agave a partir de 1996 permitió extender la siembra de agave tequilero de las regiones Valles y Altos a las regiones de la Ciénega, Costa-Sur y Sur, del estado de Jalisco, extendiendo las plantaciones a cuatro estados más (*SAGARPA, 2000*). A la fecha existen 293, 947, 000 plantas de agave establecidas representando así el cultivo de mayor importancia económica en el estado de Jalisco (*CRT, 2010*)

2.1.2 Descripción botánica del *Agave tequilana* Weber var. azul.

Reino	<i>Vegetal</i>
Grupo	<i>Espermatophyta</i>
División	<i>Angiospermeae</i>
Clase	<i>Monocotiledoneae</i>
Orden	<i>Liliales</i>
Familia	<i>Agavaceae</i>
Género	<i>Agave</i>
Sección	<i>Rigidae</i>
Especie	<i>tequilana</i>
Cultivar	<i>Azul</i>

(*Linnéo, 1753*)

El *Agave tequilana* Weber var. azul de altura variable entre 2.2 a 2.8 mts, es una planta fibrosa, cutícula gruesa, hojas rígidas con espinas marginales y una espina

apical, el desenvolvimiento de hojas en forma de roseta, tallo grueso más largo que ancho de 30-50 cm especializado como almacén de polisacáridos como inulina denominado piña ó cabeza (*Valenzuela, 1997*). Planta semélpara, debido a que solo presenta una floración en su ciclo de vida y posteriormente al alcanzar esta etapa la planta muere. (*Gentry, 1982; Granados, 1993*).

La principal forma de reproducción de la planta de agave tequilero es de tipo asexual mediante la formación de rizomas y tallos denominados hijuelos y de uso extensivo en plantaciones comerciales en plantaciones de *Agave tequilana* Weber var. azul; como parte de este mismo tipo de reproducción es la producción de bulbilos que se forman en las yemas axilares de la inflorescencia. (*Binh et al., 1990; Cedeño, 1995*).

La reproducción asexual tiene lugar al presentarse la inflorescencia con la producción de semillas, en la cual puede esperarse la variación genética debido a la acción de polinizadores (*Ornoz et al., 1983*). El agave tequilero es una planta con un metabolismo MAC (Metabolismo del Acido Crasuláceo) es decir fija el CO₂ durante la noche cuando las temperaturas son más bajas, por lo tanto las temperaturas nocturnas se convierten en variable importante para su desarrollo. (*Pimienta-Barrios et al., 1999*)

2.1.3 Área de cultivo (Denominación de origen)

La denominación de origen se describe como un área geográfica del país con factores naturales y humanos que proporcionan calidad y características exclusivas de un producto, es el caso de la bebida tradicional mexicana “Tequila” cuyo nombre proviene del municipio localizado a 56 Km al noroeste de Guadalajara, capital del estado de Jalisco (*CRT, 2010*). El tequila fue el primer producto al que se le otorgó la denominación de origen en México en el año de 1974 y la cual comprende los estados de Guanajuato, Jalisco, Michoacán, Nayarit

y Tamaulipas siendo Jalisco el estado con mayor número de municipios incluidos en la denominación de origen (*CRT 2010*).

2.1.4 Condiciones agroclimáticas del agave tequilero

Actualmente las regiones en las que se encuentran establecidas plantaciones de agave tequilero, presentan condiciones agroclimáticas muy variadas entre sí, y a pesar de esto el cultivo puede adaptarse a regiones semiáridas y sub-húmedas, aunque tiene poca tolerancia a la temperatura especialmente por la noche y prefiere suelos franco-arenosos ó franco-arcillosos.

La temperatura media recomendada para establecimiento de plantaciones oscila entre los 20 a 26°C, evitando temperaturas menores de 2°C y no mayores de 30°C se estima que puede tolerar hasta 55 °C aunque no es muy recomendable pues reduce la acumulación de azúcares en la piña (*Nobel et al., 1998*). Los requerimientos pluviales del cultivo de agave varían entre 700 a 1000 mm con una atmosfera relativamente seca, y un perfil de suelo con textura media que cuente con una buena retención de humedad. El cultivo de agave tequilero requiere un suelo con buen drenaje, con una pendiente mayor del 2% y con una concentración ligera en sales y un rango de pH de 6.0 a 8.0. (*FAO, 1994*)

2.1.5 Situación económica actual del cultivo de agave.

El agave tequilero ha sido cultivado durante más de dos siglos, sin embargo existen muy pocas variantes genéticas dentro de las plantaciones debido a que la propagación del cultivo es mediante el uso de hijuelo lo que ha provocado una uniformidad genética y que ha facilitado la incidencia y proliferación de enfermedades (*Arizaga y Ezcurra, 1995*). Actualmente existen 293, 947, 000 de plantas de agave en el estado de Jalisco (*CRT, 2010*) esto representa la fuente de ingreso para 50,000 familias.

En el año 2002 se reportaba el 12.3 % de plantas con síntomas de enfermedad. (Aceves, 2003) En la actualidad no existe ninguna zona tequilera libre de enfermedades, donde los rangos de severidad van desde 4.5 % de plantas enfermas en la zona más baja (Costa) hasta 35.9 % en la zona más alta (Ciénega). Las zonas de mayor incidencia de enfermedades son la zona Ciénega, Tequila, Altos Sur y Valles con más del 20 % de plantas enfermas. (CRT, 2010)

2.2 Marchitez vascular en agave tequilero

La marchitez vascular es la principal enfermedad en plantaciones de *Agave tequilana* Weber var. azul en zonas de la denominación de origen, la cual se manifiesta a los tres y cuatro años de establecida la plantación, se presenta al terminar la época de lluvias y se ve incrementada durante la época seca del año. El comportamiento de distribución comienza con pequeños manchones, que posteriormente pueden diseminarse hasta afectar predios completos (Uvalle-Bueno, 2006).

Los síntomas de marchitez comienzan con cambio de coloración del azul característico (5.0 BG 6/2) en las pencas de agave a un verde opaco y el enrollamiento y deshidratación de pencas basales e intermedias con presión sobre el cogollo, resultado directo de la destrucción del sistema radical o taponamiento de los haces vasculares. (Rubio, 2007). En la actualidad esta enfermedad es atribuida al hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* el cual se encuentra ampliamente distribuido en todo el mundo e identificado como agente causal de diversos cultivos como jitomate, papa, frijol, chícharo, cebolla, col, rábano, pepino entre otras. (Morales, y Ángel, 2007).

Los primeros trabajos que relacionan al hongo *Fusarium oxysporum* como causante de marchitez vascular del *Agave tequilana* Weber var. azul fueron realizados en el año 1996 por Luna-Hernández el cual atribuye la pudrición de tallo de agave tequilero a la especie *Fusarium oxysporum*, posteriormente en el año

2000 por Loera-Quezada el cual relacionó la marchitez vascular en agave tequilero con las especies de *F. moniliforme*, *F. oxysporum* y *F. solani* con la finalidad de comprobar susceptibilidad en *Agave tequilana*. Actualmente no se han realizado pruebas de patogenicidad que comprueben que *Fusarium oxysporum* como agente causal de marchitez vascular, sin embargo, trabajos recientes demuestran que el organismo aislado con mayor frecuencia en plantaciones con síntomas de esta enfermedad es *Fusarium oxysporum* (INIFAP, 2010).

2.2.1 *Fusarium oxysporum* presunto agente causal de marchitez vascular

El género *Fusarium* introducido por primera vez en 1809 por Link como agente causal de enfermedades en plantas (Link, 1809), según la Sociedad Americana de Fitopatología, el hongo *Fusarium oxysporum* se ve relacionado con al menos un tipo de enfermedad que afecta los principales cultivos de importancia económica del mundo.

Este es un hongo perteneciente a la clase de los Deuteromicetos, orden de *Moniliales*, familia *Tuberculariacea*, del género *Fusarium* y especie *oxysporum*, sus principales características es el desarrollo de conidióforos alargados ó cortos con ramas a intervalos regulares ó verticilado, septados, individuales o agrupados en esporodoquios, produce dos tipos de conidios: microconidios elípticos piriformes, unicelulares y bicelulares, no curvados en cabezuelas o en cadena abundantes en micelio aéreo. Los macroconidios presentan forma de media luna o elipsoides usualmente tres septos con un ápice puntiagudo. Las estructuras de resistencia son llamadas “clamidosporas” abundantes pero de lento crecimiento son de forma globosa, puede encontrarse solas o en acumulo o cadenas cortas apariencia áspera (Leslie y Summerell, 2006). Gracias a estas estructuras el hongo puede permanecer en el suelo durante años y penetrar posteriormente a través de las raíces hasta llegar al sistema vascular.

La diseminación de este patógeno se realiza mediante las labores del suelo, el viento, plantas enfermas o el uso de herramientas contaminadas (*Morales y Ángel, 2007*).

2.2.1 Ciclo patológico de *Fusarium oxysporum*

El ciclo patológico de los aislados obtenidos en *Agave tequilana* aún no ha sido estudiado a detalle pero a continuación se describe el comportamiento general del hongo *Fusarium oxysporum* en otros cultivos. Cuando se establece una nueva plantación en un suelo contaminado los tubos germinales de esporas del hongo penetran en las puntas de las raíces debido a las heridas producidas desde el arranque en este caso de los nuevos hijuelos a plantar, el micelio del hongo se propaga en la misma corteza de la raíz y cuando llega a los vasos del xilema, entra en ellos a través de las punteaduras.

El movimiento del hongo principalmente es ascendente, hacia el tallo y la corona de la planta. Al encontrarse en los vasos el micelio se ramifica y produce microconidios que pueden ser transportados a la parte superior de la planta en la savia. Al terminar el movimiento ascendente de los microconidios comienzan a germinar penetrando el micelio en la parte superior y del vaso, a su vez produciendo más microconidios en el siguiente vaso y los adyacentes. El principal daño ocasionado por la invasión del patógeno es la obstrucción de los vasos, este puede consistir en una invasión por micelio, esporas, geles, gomas y tilosis, así como la presión que ejerce la proliferación de las células parenquimatosas adyacentes ocasionando una alteración en la economía del agua y nutrientes de las plantas infectadas. Este fenómeno produce que los estomas se cierran, las hojas se marchiten, mueran y como consecuencia la muerte del resto de la planta. (*Agrios, 1989*)

2.2.2 Condiciones óptimas de desarrollo

De acuerdo a estudios recientes reportan a *Fusarium oxysporum* como un hongo capaz de adaptarse a diferentes condiciones ambientales debido a la capacidad de producción de estructuras de resistencia que le permite protegerse de condiciones adversas, se ha observado que la incidencia de este patógeno es mayor en suelos arenosos que favorecen su crecimiento.

En el caso de los suelos arcillosos encontramos poca incidencia todo esto puede ser debido al pH característicos de este tipo de suelos. Los rangos de pH que se han reportado como óptimos para la germinación de esporas va de 5.0 a 7.0 los valores superiores e inferiores a estos valores muestran un decremento en la germinación de esporas (*Bernal et al., 2003*) En cuanto la temperatura en la que el hongo se desarrolla va desde los 5°C a los 25°C.

Es importante considerar que el hongo tiene un alto grado de tolerancia a la temperatura, pero no en el caso del pH (*Carrillo, 2003*).

2.2.3 Incidencia y distribución de marchitez en *Agave tequilana*

El grado de incidencia y severidad en todas las zonas agaveras del estado de Jalisco indican que el cultivo de agave tequilero, y por tanto la industria se encuentra actualmente en alto riesgo debido a la capacidad de multiplicación de enfermedades como la marchitez vascular. Estudios realizados por Instituto Nacional de Investigadores Forestales, Agrícolas y Pecuarias, indican que el 55.6% de las zonas agaveras de Jalisco presentan un nivel medio (29.9%) y alto (25.7%) de riesgo fitosanitario por marchitez atribuido a *Fusarium oxysporum*. Se estima que cerca del 35% de las plantas establecidas actualmente presenten algún grado de enfermedad (*CRT, 2010*)

2.2.4 Factores que predisponen el desarrollo de la enfermedad

Los marchitamientos por *Fusarium* se ven favorecidos ampliamente por las condiciones ambientales y del suelo. La diseminación de este patógeno se realiza mediante las labores del suelo, el viento, plantas enfermas o el uso de herramientas contaminadas (Morales y Ángel, 2007).

Otro factor importante en la diseminación de esta enfermedad es sin duda el abandono de plantaciones consecuencia al descenso en el precio del agave tequilero ocasionando la falta de interés de productores.

Dentro de los factores más importantes en el desarrollo de hongos fitopatógenos podemos mencionar factores ambientales óptimos como lo son la temperatura, pH y la disponibilidad agua entre otros, pero cabe mencionar que la disponibilidad de algunos nutrimentos ayudan a la proliferación de organismos patógenos en los suelos tal es el caso de los compuestos nitrogenados importantes en el crecimiento y esporulación de hongos. El nitrógeno es utilizado por los hongos con fines estructurales y funcionales debido a que la mayoría de las especies excepto oomicetos y levaduras contienen quitina en la pared celular que los compone. (Luna-Hernández.1996)

2.3 Caracterización molecular del género *Fusarium*.

En los últimos veinte años investigadores han realizado estudios sobre la estructura genética de diferentes poblaciones de patógenos con la finalidad de generar información que permita establecer estrategias de control más efectivas

En el caso del género *Fusarium* la descripción genética ha sido complicada debido a las mutaciones producidas durante su reproducción ayudada por condiciones ambientales o algunos otros factores ocasionando a su vez un incremento en la virulencia y además de la aparición de formas especiales, definida como la

especificidad de una especie patógena contra una planta hospedera (*Bayraktar y Dolar, 2007.*).

Actualmente se han descrito cerca de 70 formas especiales en el género *Fusarium oxysporum* de origen monofilético y con un particular genotipo patogénico (*Kistler, 1997*). En el caso de agave no se ha establecido la existencia de una forma especial como agente causal de marchitez vascular.

2.3.1 Estudio del DNA ribosomal

El desarrollo de técnicas moleculares como PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) y el diseño de oligonucleótidos ha conducido a la amplificación de varias regiones de DNA ribosomal. Los primeros estudios establecieron relaciones filogenéticas entre hongos conduciendo a el diseño de cebadores elaborados a partir de regiones conservadas que permitían la amplificación de fragmentos de DNA ribosomal dando como resultado el estudio de de secuencias ITS por sus siglas en inglés (Internal Transcribed Spacer) que son generalmente constantes ó poco variables entre especies. El agrupamiento del DNA ribosomal consiste en repeticiones en tándem de tres áreas codificantes (18S, 5.8S y 28S) y dos áreas no codificantes (Internal Transcribed sequence-ITS y Intergenic sequences-IGS) (*Miller y Quezado-Soares, 1999*)

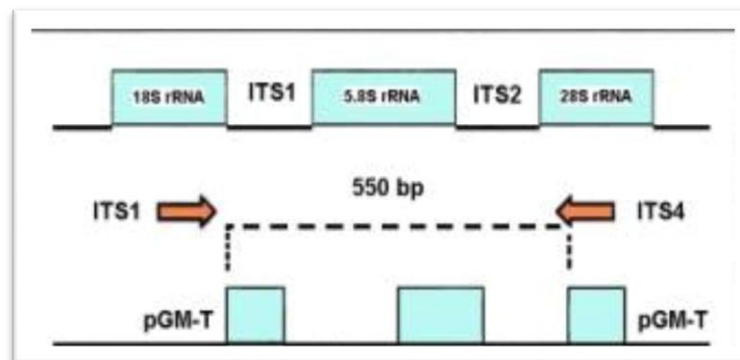


Figura 1. Arreglo de los genes de DNA ribosomal en organismos eucariotes.

En la actualidad los primers ITS1 e ITS 4 son los más utilizados en la amplificación de secuencias específicas de hongos (*Gardes y Bruns, 1993*). El análisis de la región ITS del DNA ribosomal ha sido utilizada en estudios de diferenciación genética de formas especiales del género *Fusarium* con resultados exitosos (*Nagarajan et al., 2004*). Las investigaciones sobre el DNA ribosomal han sido ampliamente aceptadas como parte del estudio taxonómico y en el establecimiento de relaciones filogenéticas entre hongos (*Hibbett, 1992*).

La variada composición de nucleótidos de la región ITS ha hecho posible el desarrollo de un conjunto de primers específicos para la identificación de organismos patógenos en plantas, tal es el caso de los primers desarrollados para la detección del género *Fusarium*, por *Abd-Elsalam et al.*, este trabajo consistió en el estudio de la amplificación de DNA ribosomal por PCR de aislados de *Fusarium oxysporum* que presentaron un tamaño de 550 a 570 pb, posteriormente se realizaron comparaciones entre los productos de amplificación obtenidos lo que permitió el desarrollo de los primers ITS Fu-f e ITS Fu-r los cuales fueron probados en la identificación del género *Fusarium* en diferentes aislamientos. El resultado de este proyecto fue la amplificación de un fragmento de 398 pb en cada uno de los aislamientos pertenecientes al género *Fusarium*, los controles negativos en este proyecto fueron *R. solani* y *M. phaseolina* en los cuales no se produjo la amplificación de este fragmento (*Abd-Elsalam et al., 2003*)

Otra de las ventajas del estudio de las regiones conservadas de DNA ribosomal es su utilización como una herramienta para la diferenciación entre especies patogénicas y no patogénicas del hongo *Fusarium oxysporum* (*Appel y Gordon, 1996*). Aunque se establece que *Fusarium oxysporum* es un organismo fitopatógeno capaz de invadir el xilema en plantas (*Garret, 1970*) también se encuentran poblaciones de este hongo incapaces de producir enfermedad alguna (*Gordon y Okamoto, 1992*) Este estudio realizado con *Fusarium oxysporum* mostró como resultado la alta compatibilidad vegetativa entre aislamientos

patogénicos y no patogénicos los cuales establecen una alta correlación filogenética (Appel y Gordon, 1996).

2.3.2 Análisis de DNA ribosomal mediante el uso de enzimas de restricción

Una alternativa en el estudio del DNA ribosomal de diferentes géneros de hongos es el uso del análisis de restricción del DNA ribosomal amplificado (ARDRA por sus siglas en inglés) el cual es un método rápido y económico utilizado ampliamente en la descripción genética de múltiples patógenos entre los cuales mencionan resultados exitosos en la identificación de *Fusarium oxysporum* (Alves-Santos et al., 1999, Appel y Gordon, 1996) *Pyrenophora graminea* (Pecchia et al., 1998) y otros organismos eucariotes (Clark et al., 1995)

En la actualidad se han realizado estudios de DNA ribosomal mediante el uso de enzimas de restricción (ARDRA) para la diferenciación de especies, tal es el caso del uso de la enzima *Hae III* utilizada en la diferenciación de *F. solani f. sp. phaseoli* y *F. solani f. sp. glycines* (Oliveira et al., 2002). Otras investigaciones que muestran resultados satisfactorios es la utilización de las enzimas *Alu I*, *Eco RI*, *Hae III*, *Hinf I* y *Msp I*, en el análisis de la región 5.8S del DNA ribosomal (590 pb) amplificada con los primers universales ITS 1 e ITS 4 para la diferenciación de *F. solani* agente causal de marchitez en plantaciones de mora en Tailandia (Sutthisa et al., 2010).

Trabajos realizados sobre aislamientos de *Fusarium oxysporum* que afectan cultivos de heliconias en Brasil establecen la utilización de enzimas de restricción como *Hae III*, *XhoI*, *Hind III* y *Eco IV* efectivas en la diferenciación y caracterización de 31 aislamientos obtenidos en distintas regiones donde se establecen estos cultivos. Los resultados obtenidos mostraron la formación de cinco grupos de acuerdo al análisis de restricción del DNA ribosomal, donde, fue importante señalar que los grupos formados estaban constituidos por aislamientos de diferentes municipios por lo tanto se estableció que el agrupamiento no se relaciona con el área geográfica de colecta de los aislamientos. Estos resultados

ponen de manifiesto la alta diversidad genética entre aislamientos obtenidos en regiones cercanas comprobando la complejidad de este hongo (*Silva et al., 2009*) El uso potencial de ARDRA como método de diferenciación entre especies de *Fusarium oxysporum* ha sido probado, pero no ha sido utilizado aún en el largo número de especies del género *Fusarium* (*Sutthisa et al., 2010*).

2.3.3 Marcadores moleculares para determinación de variabilidad genética.

El estudio de la estructura genética de diversos hongos ha sido una herramienta que refleja el potencial evolutivo a través de la historia, el cual según el teorema de Fisher es directamente proporcional al acumulado de la diversidad genética en una población (*Mc Donald, 1997*).

Muchos son los factores que intervienen en la evolución de los organismos patógenos entre ellos están el cambio de climático, el uso de fungicidas y fertilizantes inorgánicos y la poca rotación de cultivos, lo cual contribuye a cambios genéticos en muchas poblaciones ocasionando mutaciones, cambios en los sistemas de apareamiento, tamaño de población entre otros. Debido a estos cambios ha sido necesaria la utilización de marcadores moleculares selectivos, de alta calidad informativa, reproducible y relativamente fácil de utilizar. Tal es el caso de la técnica de BOX-PCR una de las más utilizadas en la identificación de variabilidad genética de colonias bacterianas, debido que representa una técnica simple, eficiente y de bajo costo (*Versalovic et al., 1991*).

El método de BOX-PCR está basado en la amplificación de segmentos de DNA de acuerdo con la distribución de secuencias de tipo BOX del cromosoma y posee una gran capacidad discriminatoria entre los organismos de una comunidad (*Rodríguez, 1998*) Esto es debido a que amplifica regiones de DNA interespecíficas repetitivas altamente conservadas y presentes en múltiples copias a través del genoma. Se basa en la amplificación que se traduce en patrones de bandas cuyo tamaño y número caracterizan a las cepas y las diferencian de otras (*Seurink et al., 2003*)

BOX-PCR ha sido utilizada satisfactoriamente como una técnica discriminatoria en la determinación de diversidad genética entre especies relacionadas a *Bacillus anthracis* (Wonyong et al., 2001) Otro ejemplo del uso de esta técnica es el estudio de la diversidad genética de los *estreptomicetos* aislados de suelos agrícolas en México en el que se muestra una alta diversidad genética de acuerdo al patrón de bandeo presentado en el cual se establecieron 14 grupos indicando una alta diversidad genética (Galindo et al., 2010).

Otras de las ventajas que presenta el uso de esta técnica es que los patrones producidos no son afectados por la edad del cultivo a analizar y también los resultados obtenidos pueden ser analizados por software de asistencia simples (Ni-Tuang, 1999).

III. HIPOTESIS

Existe variabilidad genética en aislamientos de *Fusarium oxysporum* presentes en plantaciones de agave tequilero con síntomas de marchitez vascular.

IV. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Determinar la variabilidad genética de aislamientos de *Fusarium oxysporum* provenientes de plantaciones de agave tequilero del estado de Jalisco y Nayarit mediante el uso de marcadores moleculares.

3.2 Objetivos específicos

Realizar estudio de fertilidad en suelos provenientes de las parcelas involucradas en el muestreo para la obtención de aislamientos de *Fusarium oxysporum*.

Aislar *Fusarium oxysporum* de muestras de raíz y suelo asintomáticos en plantaciones de *Agave tequilana* Weber var. azul con síntomas y asintomáticas para marchitez vascular.

Identificar los aislamientos de *Fusarium oxysporum* mediante el uso de claves taxonómicas específicas.

Caracterizar molecularmente los aislados de *Fusarium oxysporum* mediante el análisis de restricción del DNA ribosomal amplificado.

Determinación de variabilidad genética de *Fusarium oxysporum* en aislamientos de plantaciones de agave tequilero mediante el uso del marcador molecular BOX-PCR.

V. METODOLOGIA

5.1 Muestreo

Dentro del territorio que comprende la denominación de origen se localizaron plantaciones de *Agave tequilana* Weber var. azul con síntomas de marchitez vascular, anteriormente descrita como un cambio de coloración de verde azulado a violáceo, encarrujamiento y deshidratación de hojas medias y basales y la pérdida de anclaje debido a la destrucción de raíces. Se realizó un muestreo dirigido a plantas que presentaron síntomas de marchitez con daño aproximado del 40% así como plantas asintomáticas dentro de las mismas plantaciones.

5.1.1 Selección de las zonas de muestreo.

El muestreo se realizó en cinco municipios del estado de Jalisco y un municipio del Estado de Nayarit durante los meses de Mayo a Agosto de 2009 abarcando así las diferentes zonas de plantación del cultivo de *Agave tequilana* Weber var. azul. La determinación del número de plantas enfermas se realizó mediante el conteo de plantas realizado por encargados de cada parcela.

Los municipios incluidos en el muestreo fueron Acatic, Cocula, Cuquío, La Barca y Zapotlanejo en el estado de Jalisco y el municipio de Ixtlán del Río en el estado de Nayarit, donde, se ubicaron plantaciones de tres, cuatro y cinco años de edad, representando un total de 16 parcelas muestreadas. En cada municipio fueron muestreados tres parcelas a excepción del municipio de La Barca donde se muestreo solo una parcela.(Figura 2)

Distribucion de la Zona de Muestreo

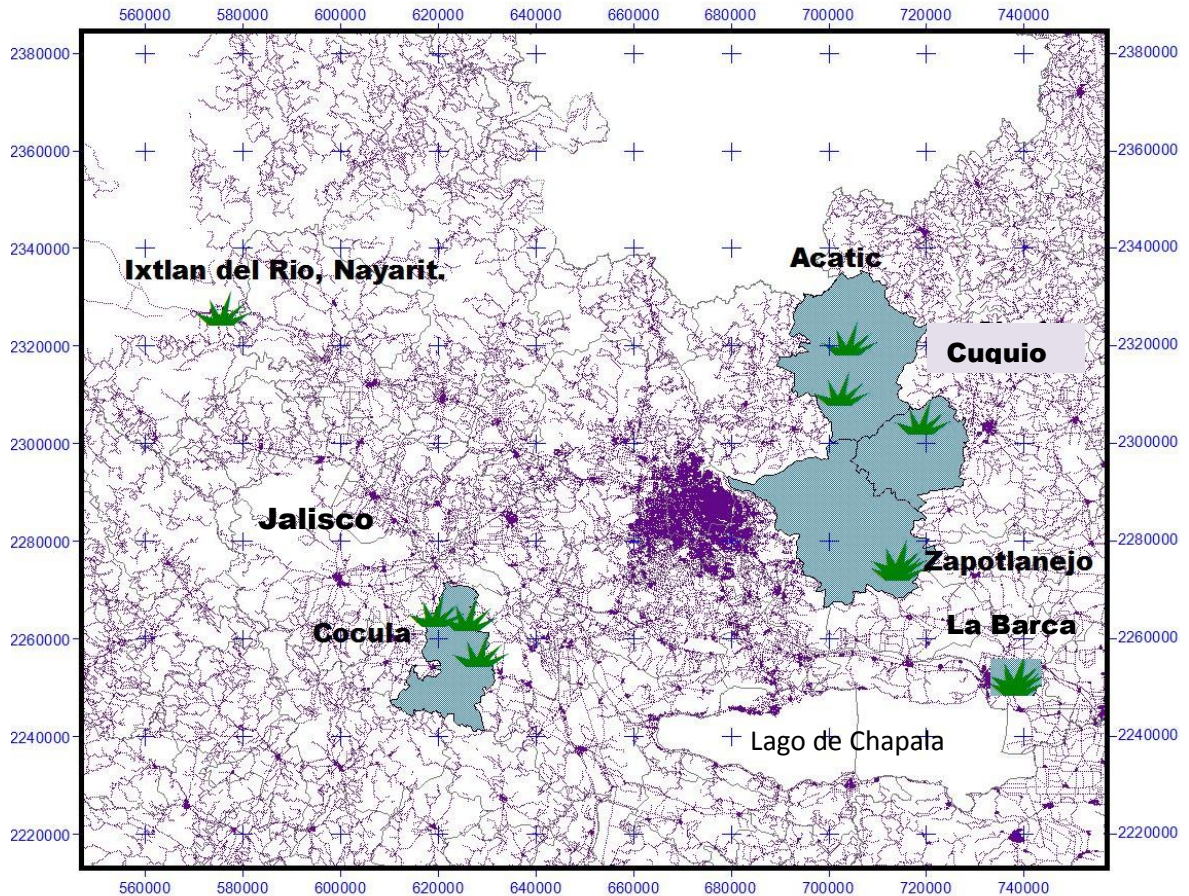


Figura 2. Distribución de la zona de muestreo en el estado de Jalisco y Nayarit.

5.1.2 Colecta de muestra de suelo

En cada parcela se colectaron seis muestras de suelo, el sitio de muestreo fue dirigido al sistema radicular entre dos plantas sobre la zona de plantación (surco), se determinó seleccionar tres muestras ubicadas entre dos plantas asintomáticas denominadas “sanas” y tres muestras ubicadas entre dos plantas con síntomas de marchitez vascular denominadas “enfermas”. Se obtuvieron 500 g. de suelo a una profundidad de 5-20 cm eliminando los primeros 5 cm de la capa superficial. Las

muestras fueron colectadas en bolsas plásticas (polietileno) y las herramientas utilizadas en la toma de muestra fueron desinfectadas entre cada toma con una solución de hipoclorito de sodio en una dilución de 1:10 a partir del producto comercial Clorox (Concentración final de NaClO 0.6%)

5.1.3 Análisis de fertilidad en muestras de suelo.

A partir de las muestras de suelo colectadas en cada zona de muestreo, se realizó el análisis de fertilidad y la determinación de pH. Mediante el uso de espectrofotometría de absorción atómica se determinaron los siguientes minerales Cu, Fe, Mn y Zn como microelementos y Ca, Mg, Na, K como macroelementos ambos indispensables en el crecimiento de cultivos (*NOM-021, 2000*).

5.1.4 Colecta de muestra de raíz de agave

Se colectaron seis muestras de raíz de cada parcela, el sitio de muestreo fue dirigido a tres plantas asintomáticas denominadas “sanas” y tres muestras con síntomas de marchitez vascular denominadas “enfermas” en las que anteriormente se había realizado el muestreo de suelo. La muestra consistió en aproximadamente 100 g de raíz la cual fue colectada en bolsas de papel destreza y las herramientas utilizadas en la toma de muestra fueron desinfectadas entre cada toma con una solución de hipoclorito de sodio en una dilución de 1:10 a partir del producto comercial Clorox (Concentración final de NaClO 0.6%)

5.2 Obtención de aislados característicos de *Fusarium sp.*

Las muestras colectadas fueron sometidas a tratamientos diferentes según el origen de cada muestra, en el caso de suelo se trataron mediante la técnica de dilución serial y de raíz mediante la siembra por superficie para la obtención de aislados característicos del género *Fusarium sp.*

5.2.1 Técnica de dilución serial

El primer paso para el procesamiento de suelos consistió en la eliminación de humedad, por lo tanto se extendieron en charolas plásticas y se sometieron a una temperatura de 28°C por 24 h.

Posteriormente se realizaron sub-muestras de 100 g. de suelo, previamente molido y homogenizado, de las cuales se pesaron 10 g de sub-muestra y se diluyeron en 90 mL de solución salina fisiológica (NaCl 8.5 g/L), a partir de esta primera dilución se tomó 1mL de solución y se diluyo en 9 mL de solución salina fisiológica. En seguida por duplicado se tomaron 0.1 mL y se deposito en caja Petri con medio de cultivo Agar Dextrosa-Papa (Infusión papa 4.0 g, Dextrosa 20 g y Agar 15 g por litro de agua) y se extendió con varillas de vidrio en el medio. Se incubaron durante siete días a una temperatura de 23°C.

5.2.2 Siembra por superficie

De las raíces colectadas para cada muestra se eliminaron las raíces muertas y se seleccionaron raíces funcionales para la planta. El material vegetal se corto en trozos de aproximadamente 1 cm y desinfectadas con una solución de etanol al 70% durante un minuto, una solución de hipoclorito de sodio en una dilución de 1:10 a partir del producto comercial Clorox (Concentración final de NaClO 0.6%) durante un minuto y finalmente doble lavado con agua destilada estéril para eliminar restos de los desinfectantes. Posteriormente se secaron en papel estéril y se colocaron en medio de cultivo Agar-Dextrosa-Papa (Infusión papa 4.0 g, Dextrosa 20 g y Agar 15 g por litro de agua). Se incubaron durante siete días a una temperatura de 23°C.

5.2.3 Empleo de medio selectivo Komada

El medio de Komada (D-Galactosa 20 g, L-Asparagina 2.0 g, KH_2PO_4 1.0 g, KCL 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, PCNB 0.75 g, $\text{Fe}_3\text{Na EDTA}$ 0.01g, Agar 20.0 g, por litro pH 3.8 ± 0.2 ajustar con Ac. Fosfórico 10%) considerado un medio selectivo para el crecimiento del hongo *Fusarium oxysporum* proveniente de muestras de suelo (Burgess, et al. 1989). El medio de Komada contiene en su formulación pentacloro-nitrobenzoceno (PCNB) fungicida efectivo para el control gran diversidad de hongos saprofitos y otras comunidades del género *Fusarium* excepto la especie *Fusarium oxysporum*. Los aislamientos provenientes de muestras de suelo, previamente caracterizados de acuerdo a los criterios de selección, fueron cultivados en medio de Komada por un período de diez a doce días a una temperatura de 23°C para seleccionar los aislamientos pertenecientes al género *Fusarium oxysporum*.

5.2.4 Establecimiento de cultivos monospóricos

A partir de cada aislamiento en medio ADP se realizó un raspado con asa microbiológica en un área de 1 cm^2 del micelio y fue transferido a un tubo de ensayo con 9 mL de solución salina fisiológica, posteriormente se incubó durante 24 h a una temperatura de 23°C .

Después de transcurrida la incubación se realizaron cuatro diluciones en 9 mL de solución salina fisiológica cada una, posteriormente se transfirieron 0.1 mL de la tercera y cuarta dilución a caja Petri con medio ADP y se extendieron con varillas de vidrio sobre la superficie del medio de cultivo. Las placas fueron incubadas a una temperatura de 23°C y se mantuvieron en observación diariamente con el apoyo de microscopio estereoscópico (Fowler objetivo 4x).

Después del tercer y cuarto día de siembra se observó la emergencia de nuevas esporas. Dependiendo el crecimiento de cada placa se determinó realizar el cultivo monospórico a partir de la tercera o cuarta dilución, posteriormente con el apoyo del microscopio estereoscópico y una aguja de picadura se tomo una espora y fue transferida a una nueva caja Petri con medio ADP. Los cultivos monospóricos fueron almacenados por duplicado en medio Spezieller Nährstoffarmer (KH_2PO_4

1.0 g, KNO₃ 1.0 g, MgSO₄ 7H₂O 0.5 g, KCL 0.5 g, Glucosa 0.2 g, Sacarosa 0.2 g, Agar 20 g, pH 6-6.5 para un litro) en tubos con aceite mineral estéril.

5.3 Identificación taxonómica mediante el uso de microscopía de aislamientos característicos de *Fusarium oxysporum*

De acuerdo a las claves taxonómicas descritas por Nelson (1970) tales como crecimiento abundante, micelio blanco algodonoso, pigmentación en medio ADP rosa intenso a violeta se seleccionaron hongos que presentaron estas características aislándolos en nuevas caja Petri de medio ADP e incubados durante siete días a una temperatura de 23°C.

Como parte de la selección de aislados se clasificaron de acuerdo a características taxonómicas descritas de por Leslie y Summerell en 2006 en cuanto a características microscópicas, en cada uno de los aislados de suelo y raíz. Los criterios para la clasificación se basaron en observar la presencia de microconidios y macroconidios además de que en algunos casos fue posible observar la presencia de estructuras de resistencia denominadas clamidosporas.

5.4 Extracción de DNA

Los cultivos monospóricos establecidos fueron incubados por un periodo de siete a diez días hasta obtener un diámetro de crecimiento cercano a los 8 cm a 23 °C para realizar la extracción de DNA de acuerdo al protocolo descrito Lee y Taylor en 1990. El micelio recuperado mediante el raspado con cuchara estéril, fue depositado en mortero frío previamente esterilizado. El tejido colectado fue congelado adicionando nitrógeno líquido y macerado hasta pulverización. Se tomaron 100 mg de tejido pulverizado y transferidos a un tubo estéril de 1.5 mL de capacidad, el tejido fue suspendido en 500 µl de buffer de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 7.2, EDTA 50 mM pH 8.0, SDS 3% y 2-β- Mercapto-etanol 1%) se agitó suavemente y se incubó durante una hora a 65°C en baño María. Posteriormente se añadieron 250 µl de fenol y 250 µl de solución cloroformo-alcohol isoamílico

(24:1) para la separación de ácidos nucleicos y proteínas. Se centrifugó a 14 000 rpm por 10 min a temperatura ambiente.

Luego se transfirieron 400 µl de la fase acuosa formada a un nuevo tubo y se adicionó 40 µl de una solución de acetato de sodio 3M y 400 µl de isopropanol frío (conservado a -20°C), para la precipitación de ácidos nucleicos, se incubó por 15 min a -20°C agitando suavemente. Se centrifugó a 14 000 rpm por 10 min a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante. Se añadieron 500 µl de etanol al 70% (conservado a -20°C), se centrifugó a 14 000 rpm por 5 min a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante, el precipitado formado se secó en el concentrador de DNA por 15 min a 35°C.

Finalmente, el DNA se suspendió en 100 µl de buffer de TE (Tris-HCl 10 mM pH 7.2, EDTA 0.1 mM pH 8.0) agitando suavemente. Se verificó la extracción de DNA usando 10 µl de extracto en un gel de agarosa al 1 % usando buffer SB 1X (Borato de sodio 10 mM) a 150 v durante 30 min, teñidos en bromuro de etidio y visualizados en transiluminador UV. Las muestras se conservaron a -20°C hasta su uso posterior.

5.5 Amplificación DNA ribosomal con primers universales ITS

Con la finalidad de verificar la calidad del DNA extraído se realizó la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) utilizando iniciadores universales ITS 1 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' y ITS 4 5'TCCTCCGCTTAT TGATATGC-3' Lee y Taylor (1990) para la caracterización e identificación de esta especie. Las condiciones del termociclador (Selectcycler) fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C por 2 min, 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, apareamiento a 55°C por 1 min y extensión a 72 °C por 1 min y una extensión final a 72°C por 7 min.

Para la amplificación de DNA ribosomal para la amplificación de DNA ribosomal se realizó en una mezcla de 25 µl, que contiene: 100 ng de DNA: 16.5 µl Agua estéril

MiliQ, 2.5 µl Buffer 10X, 2 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTP, ITS 1 10 pmol, 1.0 µl ITS 4 10 pmol y 2.5 µl Taq DNA polimerasa (Invitrogen).

Los productos de PCR fueron analizados colocando 8 µl de producto de PCR en un gel de agarosa al 1.2 % usando buffer SB 1X (Borato de sodio 10 mM) a 150 v durante una hora, teñidos en bromuro de etidio y visualizados en transiluminador UV. Para el análisis de las muestras se utilizaron 4 µl de marcador de peso molecular, Promega 100 pb. Las muestras se conservaron a -20°C hasta su uso posterior.

5.6 Análisis de restricción de DNA ribosomal amplificado (ARDRA)

El producto de amplificado de la PCR se analizó sin purificar con las enzimas de restricción: *Hae III* e *Hinf I* (Invitrogen 1000 U) bajo las siguientes condiciones: Se realizó la mezcla de reacción por cada enzima conteniendo 5 µl de producto de PCR, 0.1 µl de enzima de restricción (Invitrogen, 1000 unidades), 1.5 µl Buffer enzimático y 8.4 µl agua estéril, completando un volumen final de 15 µl. Ambas enzimas se incubaron a 37°C en baño María, los períodos de incubación de las enzimas *Hae III* e *Hinf I* fueron de 2 y 4 h respectivamente.

Los productos de la digestión fueron amplificados en gel de agarosa al 2% usando buffer SB 1X (Borato de sodio 10 mM) a 150 v durante 1 h y 45 min, teñidos en bromuro de etidio y visualizados en transiluminador UV. Los patrones de bandas fueron analizadas mediante el marcador de peso molecular, Promega 100 pb y su tamaño estimado en pares de bases, con el software DNA Star con la herramienta MapDraw.

5.7 Determinación de la variabilidad genética mediante el uso de BOX-PCR

La amplificación y tipificación de secuencias repetitivas del tipo AR1-5'-CTACGGCAAGGCGACGCT-3' se realizó bajo las siguientes condiciones del

termociclador (Selectcycler): desnaturalización inicial de de 5 minutos a 94 °C, 40 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 2 minuto a 50 °C y 2 minutos a 72 °C, y una extensión final de 7 minutos a 72 °C.

La mezcla de reacción se realizó a partir de 2 µl de una dilución 1:5 de extracto de DNA y agua estéril, 1.25 µl de Buffer, 1.75 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTP, 10 pmol del primer Box AR1 y 2.5 U de Taq DNA polimerasa (Invitrogen) completando un volumen final de 12.5 µl con agua estéril MilliQ.

La separación de los fragmentos amplificados se realizó en gel de agarosa al 1% colocando 8 µl de de producto de BOX-PCR usando buffer SB 1X (Borato de sodio 10 mM) a 150 v durante 2 h 15 min, teñidos en bromuro de etidio y visualizados en transiluminador UV. Para el análisis de las muestras se utilizaron 4 µl de marcador de peso molecular, 1 Kb (Invitrogen).

5.8 Construcción de dendrograma

El análisis de los patrones de bandas, resultado de la digestión de enzimas de restricción de DNA ribosomal se analizó en base a la secuencia con número de acceso AF242876 reportada en el GenBank y al marcador de peso molecular, Promega 100 pb y su tamaño estimado en pares de bases, con el software DNA Star con la herramienta MapDraw.

Los dendrogramas se construyeron a partir de los patrones del análisis de restricción y amplificación por BOX-PCR realizando una matriz binaria de 0 y 1, donde (1) para la presencia de un fragmento y (0) para ausencia. El dendrograma se construyó mediante el método de agrupamiento UPGMA empleado el programa NTSYS 2.0

VI. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1 Muestreo

Se muestrearon 16 parcelas que presentaban síntomas de marchitez, ubicados en cinco municipios del estado Jalisco y un municipio del estado de Nayarit, todos estos considerados en los municipios de alta incidencia de enfermedad. En cada parcela se colectaron seis muestras de raíz y seis muestras de suelo, obteniendo un total de 96 muestras de suelo y 96 muestras de raíz analizadas. Las parcelas muestreadas presentaban porcentajes de población con síntomas de marchitez vascular distintos los cuales son descritos como sigue en la Tabla 1.

Tabla 1. Descripción de parcelas con síntomas de marchitez involucradas en el muestreo.

NÚMERO PARCELA	MUNICIPIO	PLANTAS ENFERMAS (%)	TAMAÑO (HAS)	EDAD PLANTACIÓN (AÑOS)
1	Acatic	3	6.48	3
2	Acatic	15	49.40	3
3	Acatic	50	54.48	5
4	Cocula	0.5	2.56	4
5	Cocula	1	4.87	4
6	Cocula	2	3.67	4
7	Cuquío	2	5.16	4
8	Cuquío	14	65.8	4
9	Cuquío	30	61.17	5
10	Ixtlán	1	11.3	4
11	Ixtlán	10	22.11	5
12	Ixtlán	20		5
13	Zapotlanejo	8	9.32	3
14	Zapotlanejo	22	91.3	3
15	Zapotlanejo	42	9.32	4

El muestreo realizado fue dirigido al sitio que se ha descrito por Gordon y Okamoto, en 1992 como reservorio del hongo *Fusarium* (suelo y raíz) y se realizó en tres plantas con síntomas de marchitez en un 40 % de la planta y tres plantas asintomáticas es decir que presentaban un comportamiento normal de acuerdo a la fase fenológica correspondiente a la edad de la plantación (Figura 3).



Figura 3. Plantas representativas para la toma de muestra de plantaciones de *Agave tequilana* Weber var. azul. Izquierda sanas y derecha planta enfermas. Municipio La Barca (Superior), Acatic (Inferior).

6.1.1 Análisis de fertilidad de suelos

Con la finalidad de establecer una correlación entre las características de los aislamientos y las condiciones del suelo de las parcelas incluidas en el análisis, se realizó el análisis nutrimental mediante el uso de espectrofotometría de absorción atómica y pruebas físicas como la determinación de pH. El análisis realizado en los suelos muestreados arrojó los resultados que se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Resultados de análisis de fertilidad de muestras de suelo.

PARAMETROS	MUNICIPIO						
		<i>Acatic</i>	<i>Cocula</i>	<i>Cuquío</i>	<i>Ixtlán del Río</i>	<i>La barca</i>	<i>Zapotlanejo</i>
PROPIEDADES BASICAS							
pH CaCl₂		5.09	4.12	3.81	4.60	5.02	4.25
pH Buffer		6.13	5.98	5.89	6.03	6.11	5.95
Materia orgánica	%	1.30	1.96	1.26	1.96	1.87	1.84
FERTILIDAD							
Nitrógeno (N-NO₃)	ppm	9.63	91.6	40.04	142.1	12.3	22.43
Fósforo (P)	ppm	7.39	19.76	21.34	3.59	46.56	8.63
Potasio (K)	ppm	435.7	339.0	284.9	2476.0	349.32	263.8
Calcio (Ca)	ppm	1164.0	1693.0	395.3	1246.0	3978.15	1530.0
Magnesio (Mg)	ppm	262.5	304.5	70.87	494.0	485.97	303.3
Sodio (Na)	ppm	14.0	34.1	1.78	13.8	65.11	7.7
Boro (B)	ppm	0.36	1.14	0.74	ND*	1.06	0.24
Cobre (Cu)	ppm	1.27	0.19	0.14	0.20	0.52	1.38
Fierro (Fe)	ppm	11.1	99.32	44.5	32.94	30.13	7.43

Manganeso (Mn)	ppm	77.35	13.87	73.7	66.8	25.25	16.74
Zinc (Zn)	ppm	1.36	0.34	1.0	0.58	0.21	0.81

ND* (No detectable)

De acuerdo con el diagnóstico diferencial integrado descrito por autores como Castellanos y Uvalle (2000) se determinó que las condiciones nutrimentales de las parcelas en estudio presentan condiciones adecuadas para el desarrollo del cultivo de *Agave tequilana* Weber var. azul. Uno de los factores importantes para el desarrollo del hongo *Fusarium oxysporum* es el pH y de acuerdo a lo descrito por Bernal et al 2003, el pH y tipo de suelo de las zonas muestreadas corresponden a condiciones adecuadas para la germinación de este organismo. Por lo tanto se puede establecer que la sintomatología de las plantaciones no son resultados de deficiencias nutrimentales y el daño observado es atribuido al daño a plagas y enfermedades.

6.2 Aislamiento e identificación de *Fusarium oxysporum*

Mediante el uso de técnicas microbiológicas se obtuvieron 115 aislamientos de los cuales 54 provienen de suelo y 61 provienen de raíz. Los aislamientos obtenidos fueron seleccionados inicialmente de acuerdo a las características morfológicas descritas por Nelson en 1970 las cuales describen el crecimiento del género *Fusarium oxysporum* con crecimiento abundante, micelio blanco algodonoso, pigmentación en medio ADP rosa intenso a violeta.

Como parte de la selección los aislamientos provenientes de muestras de suelo, se inocularon en medio de Komada compuesto de pentacloro-nitrobenzoceno (PCNB) potente fungicida que inhibe el crecimiento de hongos saprófitos y especies de *Fusarium sp*, excepto *Fusarium oxysporum* según lo descrito por Burgess, et al., 1989, los resultados de esta siembra mostraron una velocidad de crecimiento más lenta aproximadamente un período de 15 días a una temperatura de 23 °C además de observar menor producción de micelio aéreo y muerte rápida debido a la presencia de productos de desecho. Cabe mencionar que las

características morfológicas en este medio son totalmente diferentes a las descritas en medio ADP por Leslie y Summerell (2006). Por lo tanto este medio solo fue utilizado como medio para obtención de aislamientos resistentes a PCNB provenientes de suelo.

Se elaboraron 115 cultivos monospóricos de los aislamientos obtenidos con la finalidad de trabajar cultivos provenientes de un solo individuo, a partir de estos, se consideró importante tomar como criterio de selección la identificación de esporas características descritas de por Leslie y Summerell en 2006 llamadas microconidios y macroconidios, además, fue posible observar la presencia de las estructuras de resistencia denominadas clamidosporas. Como resultado se observó la presencia de macroconidios de longitud media, ligeramente curvados, de tres a cuatro septos y con extremos terminales punteados. En el caso de microconidios se presentaron estructuras ovales, mayormente sin septos en su estructura y abundantes en el micelio aéreo (Figura 4).

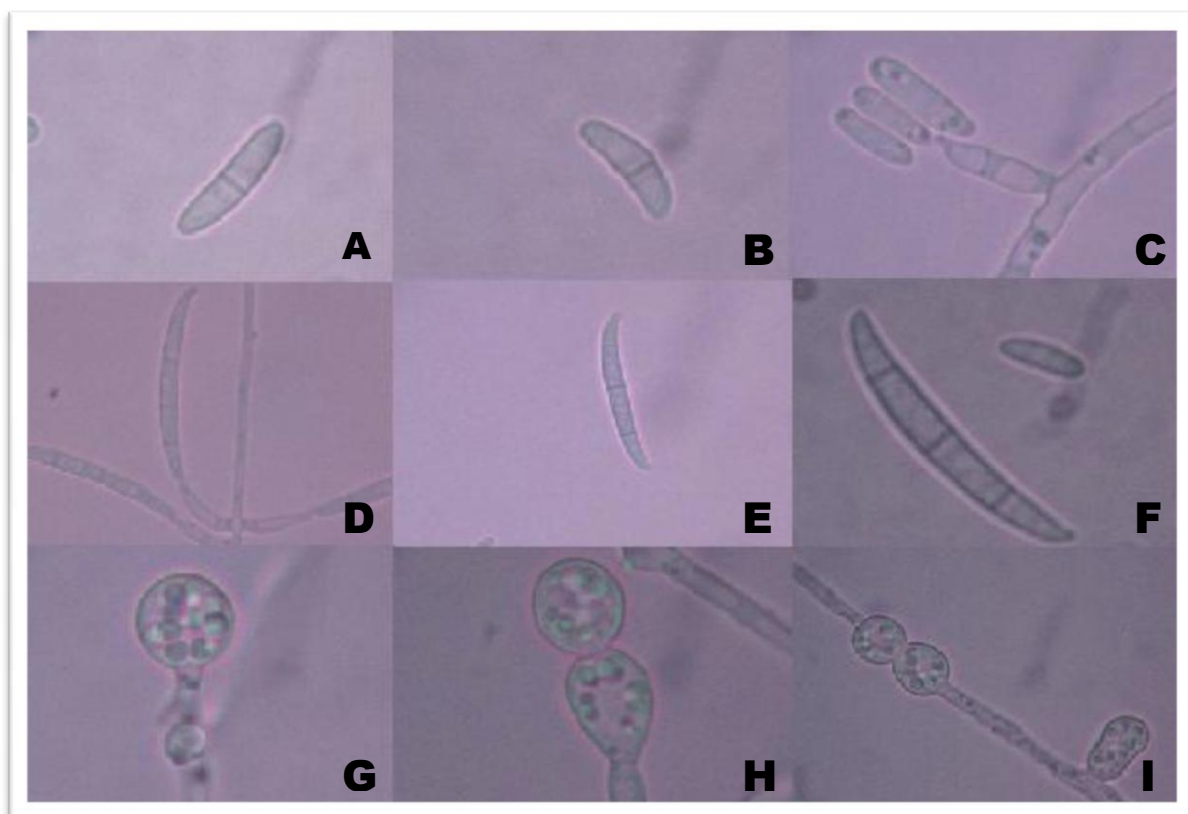


Figura 4. Presencia de esporas características del género *F. oxysporum* en aislamientos

evaluados. **A-C:** Microconidios, **D-F:** Macroconidios, **G-I:** Clamidosporas. Medio de cultivo SNA. Número de aislamiento A,G (27), B(17), C,F,I(31), D(81), E,H, (18).

De acuerdo a la morfología de los aislamientos obtenidos se realizó una escala de pigmentación en medio ADP (Fig.5), por ser un criterio importante en la clasificación de especies del género *Fusarium sp* (Leslie y Summerell, 2006). De acuerdo a lo observado se clasificaron cuatro tonalidades de pigmentación, violeta, salmón, rosa tenue y otros, obteniendo como resultado que el 53 % de los aislados presentaron una pigmentación violeta, el 19% pigmentación salmón, el 19% rosa tenue y solo el 9 % produjeron una variedad de pigmentaciones desde una tonalidad café oscura, hasta algunos que no produjeron pigmentación.

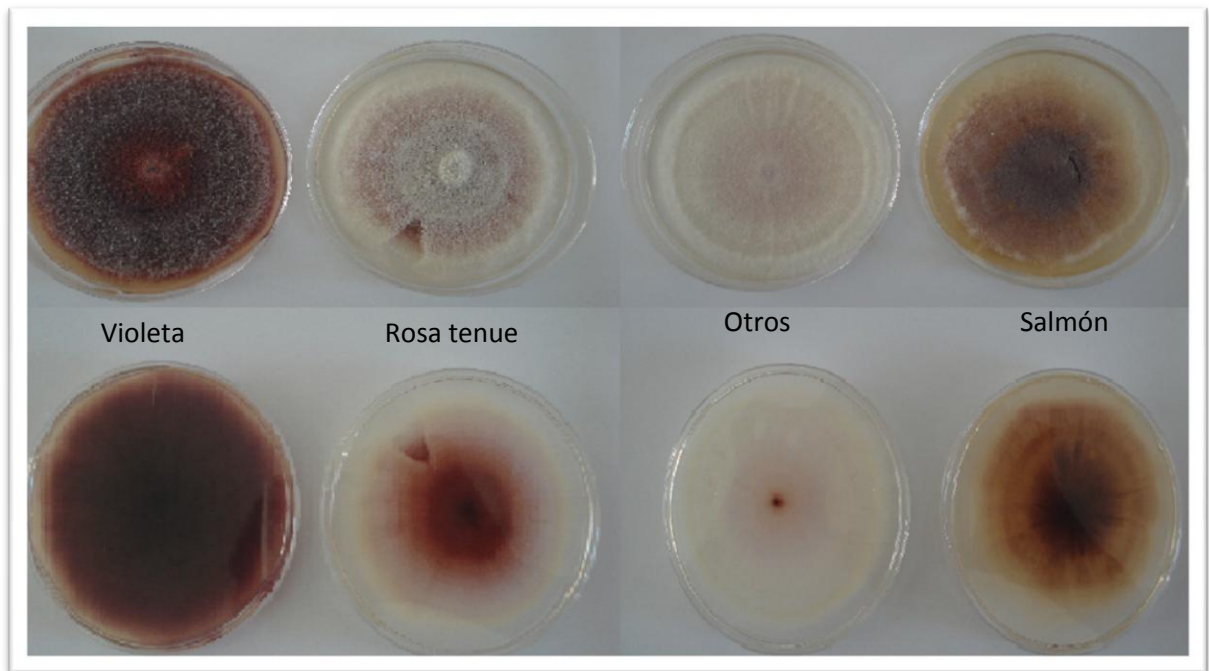


Figura 5. Pigmentación producida por los aislamientos con característica de *F. oxysporum* en medio ADP. No aislamiento: Violeta (68), Rosa tenue (10) Salmón (43) otros (32).

6.3 Uso de técnicas moleculares para la determinación de variabilidad genética.

En la actualidad no existen métodos de control efectivos contra enfermedades en el cultivo de agave; el manejo de enfermedades se ha visto limitado a la creación de cultivos resistentes para el control de marchitez vascular (Aceves, 2003).

El conocer la variación genética entre las poblaciones de *Fusarium oxysporum* en plantaciones de agave tequilero es una herramienta útil para establecer sistemas de manejo de marchitez vascular más efectivos. Este trabajo representa el primer estudio sobre variabilidad genética del que es considerado agente causal de marchitez de agave y los resultados muestran la distribución de la variabilidad genética entre los aislamientos de *Fusarium oxysporum* mediante el uso de técnicas moleculares como PCR y el uso de marcadores moleculares del tipo BOX.

6.3.1 Extracción de DNA

A partir de los cultivos monosporicos obtenidos de los 115 aislamientos caracterizados como *Fusarium oxysporum* se realizó la extracción de DNA mediante el protocolo descrito por Lee y Taylor en 1990, obteniéndose DNA de alta calidad del cual se realizaron posteriormente las técnicas moleculares involucradas en este estudio (Fig 6).

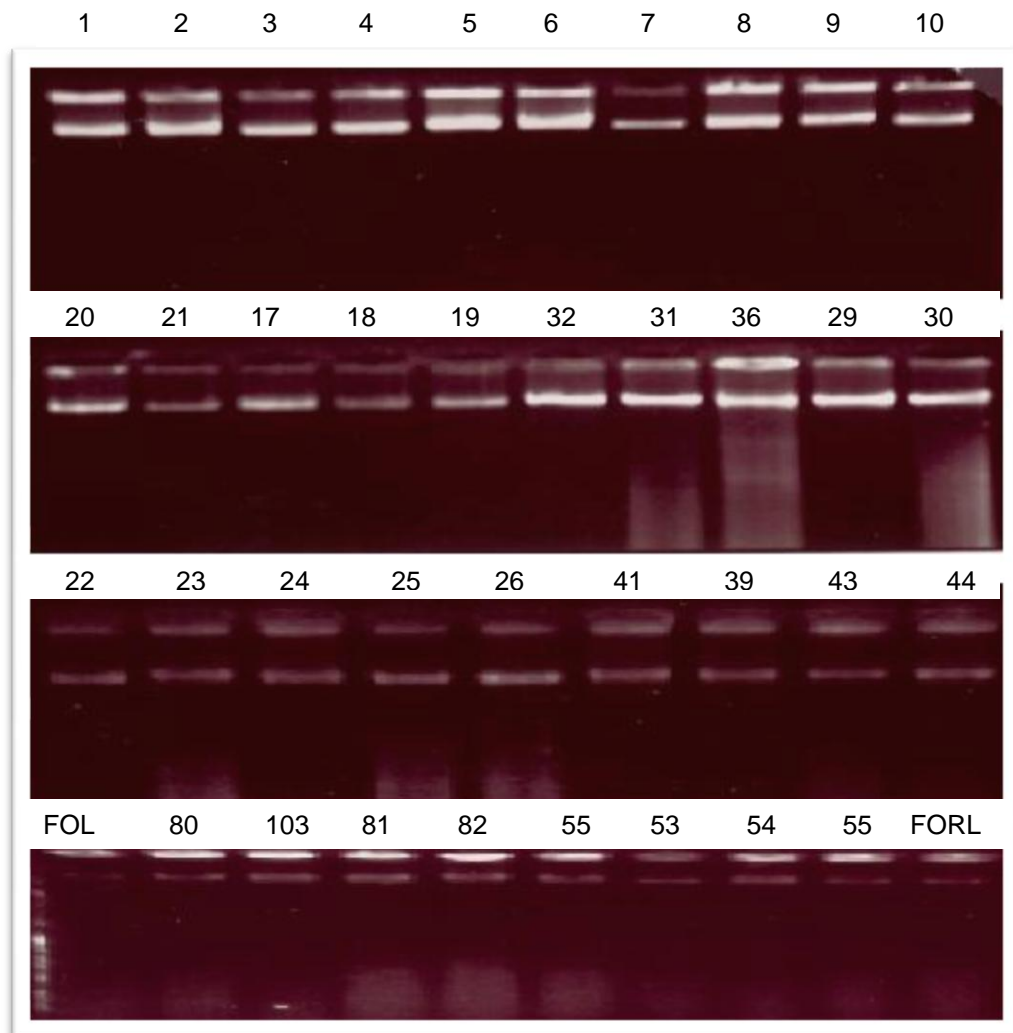


Figura 6. Geles de agarosa al 0.8% de las extracciones de DNA de *F. oxysporum* aislados en plantaciones de agave tequilero. Los aislamientos pertenecientes: 1-10 AC(Acatic), 29-36 CO(Cocula), 23-26 CQ(Cuquío),39-44 IX(Ixtlán del Río), 80-82 y 103 LB(La barca) y 17-21 ZP(Zapotlanejo). FOL y FORL (*Fusarium oxysporum lycopersici* y *F. oxysporum radiscis-lycopersici*.)Muestras control.

6.4 Amplificación por PCR del DNA ribosomal

Algunos trabajos como el trabajo de diversidad genética de Kistler recomiendan el uso de técnicas moleculares reproducibles, de fácil utilización, de bajo costo, estas son algunas de las características de la técnica de PCR utilizada para la amplificación de DNA ribosomal mediante secuencias ITS. Esta técnica arrojó como resultado la amplificación de un producto de aproximadamente 550 pb (Fig 7) El comportamiento de los aislamientos analizados, coincide con estudios

moleculares realizados anteriormente en el género *Fusarium sp* en los cuales manejan un fragmento de un tamaño que oscila entre 550 y 600 pb (*Sutthisa, W. et al., 2010*). Trabajos específicos en *Fusarium oxysporum* mencionan un tamaño de amplificación de DNA ribosomal de 550-570 pb (*Abd-Elsalam et al., 2003*) por lo tanto estos resultados nos ayudan a fortalecer el trabajo de identificación realizado en los aislamientos mediante claves taxonómicas como *Fusarium oxysporum*. La similitud entre el tamaño de amplificación de los productos de PCR obtenidos se asemeja con lo mencionado por Arroyo-García et al., en 2003, donde, al utilizar los primers ITS se obtuvieron amplificaciones de secuencias idénticas en aislamientos de *Fusarium oxysporum* aún cuando se trataba de diferentes formas especiales. Se incluyó el análisis de 2 aislamientos identificados molecularmente como *F. oxysporum lycopersici* y *F. oxysporum radiscis-lycopersici* como controles positivos (FOL y FORL respectivamente) los cuales presentaron un producto de amplificación de igual tamaño a los aislados en estudio y control negativo un aislamiento de *Penicillium sp* (P).

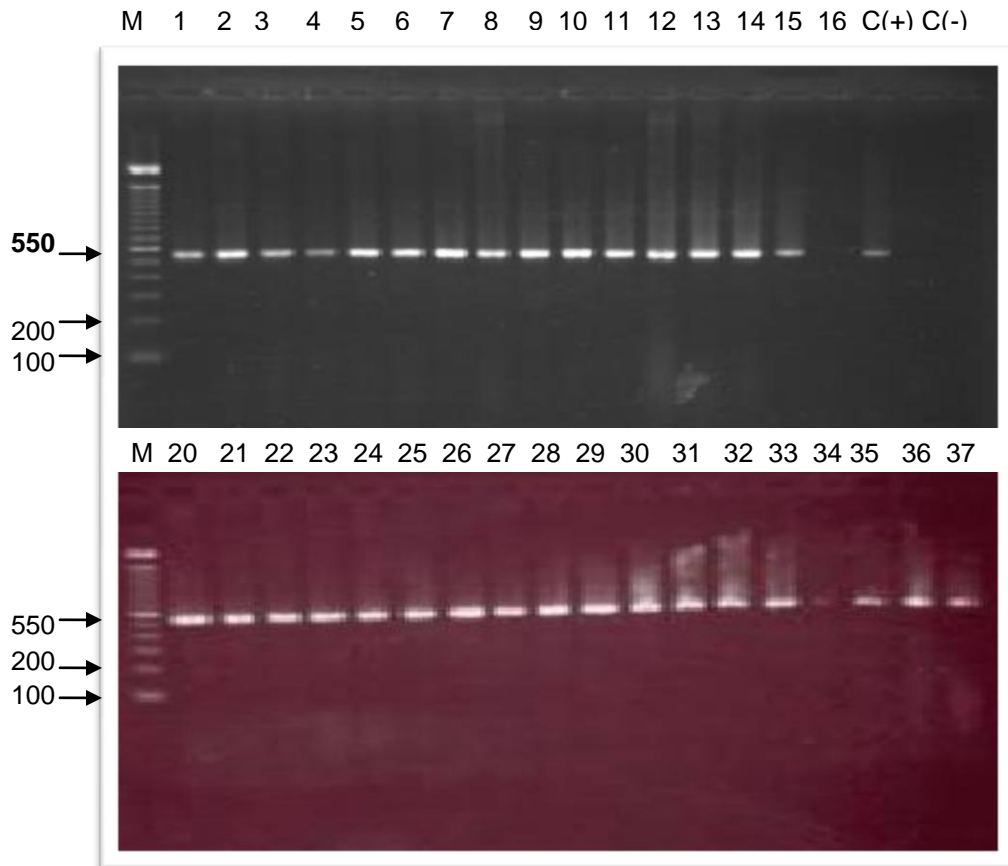


Figura 7. Amplificación de DNA ribosomal mediante el uso de primers universales ITS. El tamaño de la amplificación fue de 550 pb. 1-13, 27-29 (Acatic), 14-16, 22-26 (Cuquío), 20-21 (Zapotlanejo), 30-33 (Ixtlán), 34-37 (Cocula) El marcador de peso molecular marca Promega 100 pb.

6.5 Análisis de restricción en DNA ribosomal amplificado

Los productos de amplificación de las regiones ITS fueron digeridas con dos enzimas de restricción *Hae III* e *Hinf I*. La mayoría de los productos de PCR mostraron de tres a cuatro fragmentos con la enzima *Hae III*, en el caso de la enzima *Hinf I* se obtuvieron de dos a tres fragmentos de digestión. Los fragmentos menores de 50 pb no fueron considerados debido a la poca resolución en el gel de agarosa al 2%. Los resultados de la digestión de productos de PCR se muestran en la Figura 8. El patrón de bandas de los productos de PCR digeridos con la enzima *Hae III* dio lugar a fragmentos de 80, 110, 280 y 350 pb. La digestión con la enzima *Hinf I* mostró un patrón de bandas de 90, 180 y 280 bp (Figura 9). La digestión de DNA ribosomal con ambas enzimas mostró un patrón de bandas

similar en la mayoría de los aislamientos provenientes de raíz y de suelo aún cuando pertenecían al mismo municipio. La comparación entre aislamiento de raíz sana o enferma tuvo el mismo comportamiento en los cortes producidos.

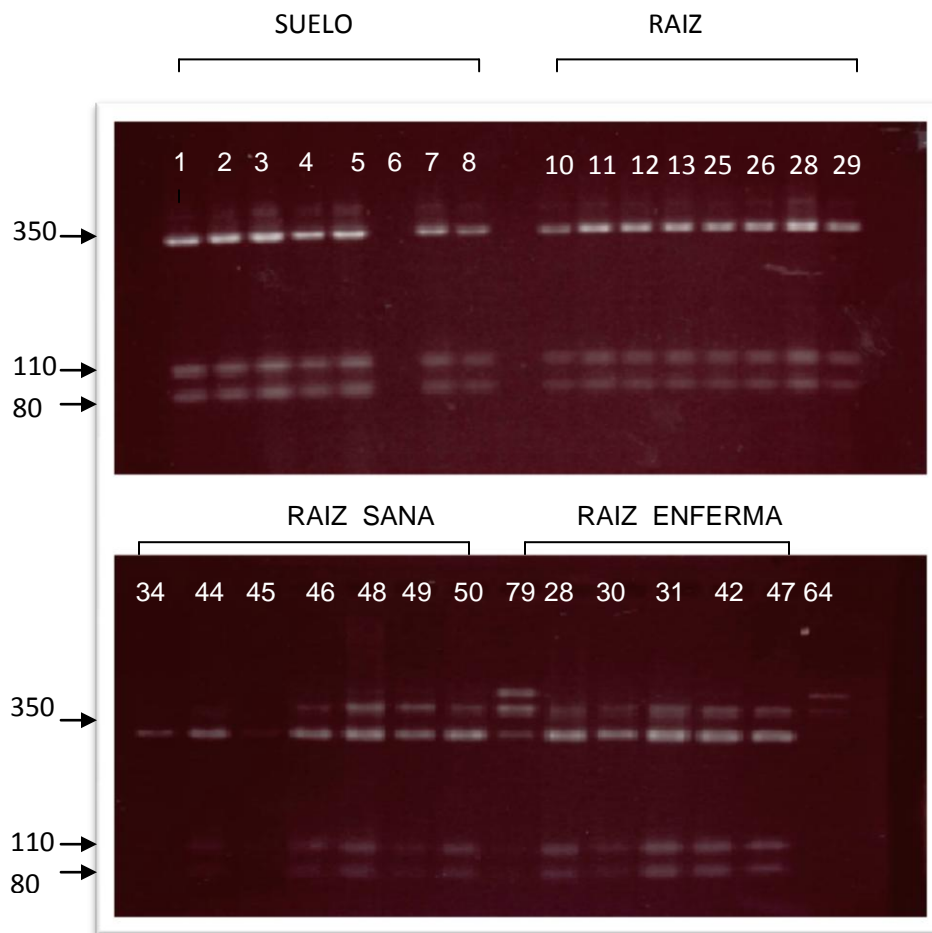


Figura 8. Productos de digestión de DNA ribosomal con la enzima *Hae III* separados en un gel al 1.2 %. 1-13,25,26,28,29 (Acatic), 34, 44-46 48-50 (Ixtlán) 28,30, 31. 42,47, 64, 79 (Cocula).

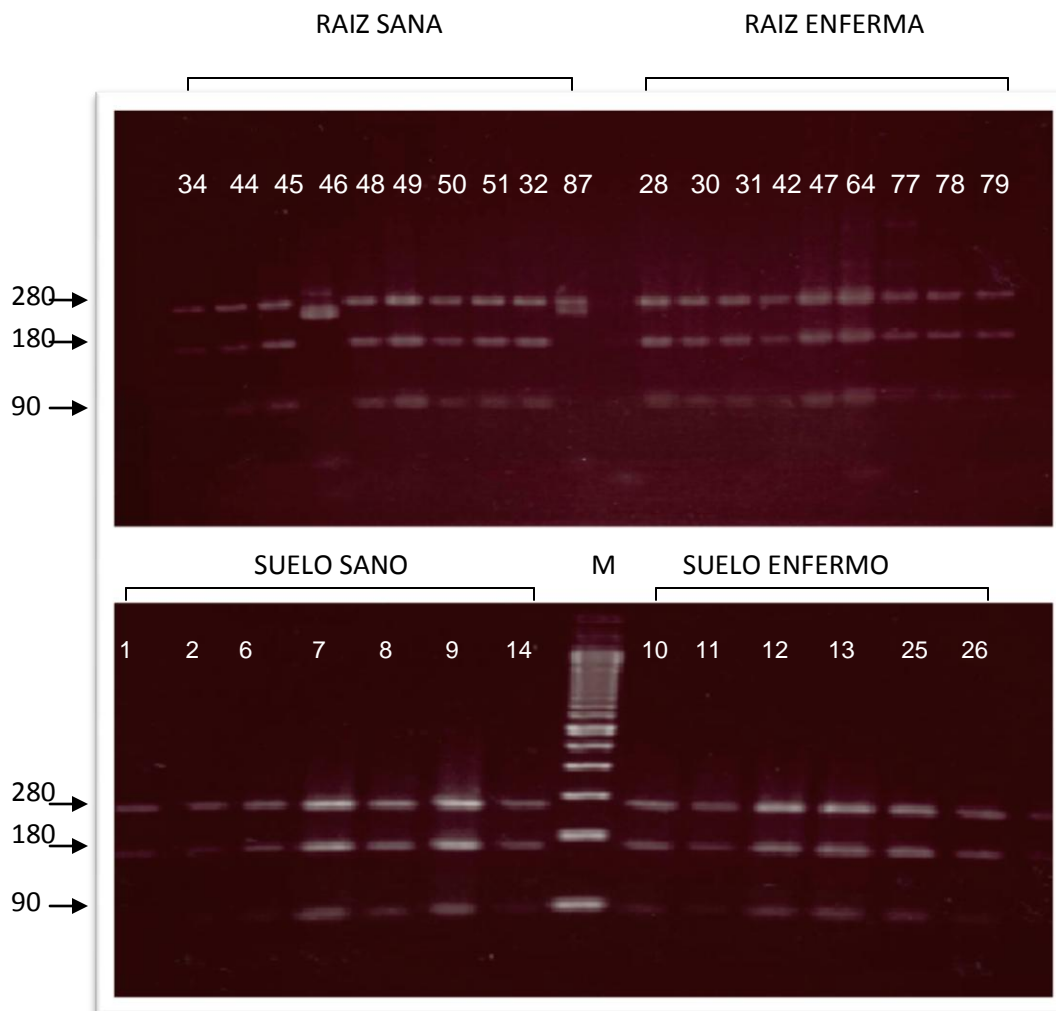


Figura 9. Productos de digestión de DNA ribosomal con la enzima *Hinf I* separados en un gel de agarosa al 1.2 %. Marcador de peso molecular marca Promega 100 pb.

El tamaño de los fragmentos de digestión mostraron un comportamiento similar al analizado con el software DNA star y la herramienta MapDraw de la secuencia de DNA ribosomal reportada en el GenBank con número de acceso AF242876. El dendrograma construido a partir de la matriz binaria muestra como resultado un agrupamiento de los 115 aislamientos en cinco grupos. (Fig 10) El primer grupo constituido por 94 aislamientos, el segundo grupo constituido por 7 aislamientos incluyendo los dos aislamientos de referencia de la forma especial *F. oxysporum lycopersici* y *F. oxysporum radiscis-lycopersici*, el tercero por 4 aislamientos, el cuarto por 3 aislamientos y el quinto constituido por 10 aislamientos en los que

estaba incluido el hongo del género *Penicillium* sp. utilizado como control negativo, el cual no fue digerido por las enzimas de restricción.

La interpretación de estos resultados muestra que el grupo número uno (1) está conformado por el 82 % de los aislamientos obtenidos presentando una alta similitud a *Fusarium oxysporum*. Cabe señalar que los aislamientos de utilizados como control (*F. oxysporum lycopersici* y *F. oxysporum radiscis-lycopersici*), presentaron un comportamiento ligeramente distinto a la mayoría lo que permite comparar lo descrito Oliveira et al., 2002 en donde se establece la diferenciación genética entre especies del género *Fusarium*. La realización de esta técnica permitió corroborar que el comportamiento de la región conservada de DNA es similar al patrón de cortes reportado para otras formas especiales del género *Fusarium*. De acuerdo a lo mencionado por Oliveira et al, (2002) sobre el uso de enzimas de restricción específicamente *Hae III* como marcadores de patogenicidad se sugiere dar continuidad a este estudio con el establecimiento de pruebas de patogenicidad de los aislamientos obtenidos con la finalidad de correlacionar que el agrupamiento de los aislamientos sea probablemente por la tratarse de una forma especial del género *Fusarium oxysporum* y como consecuencia la posible detección de patogenicidad mediante el uso de enzimas de restricción.

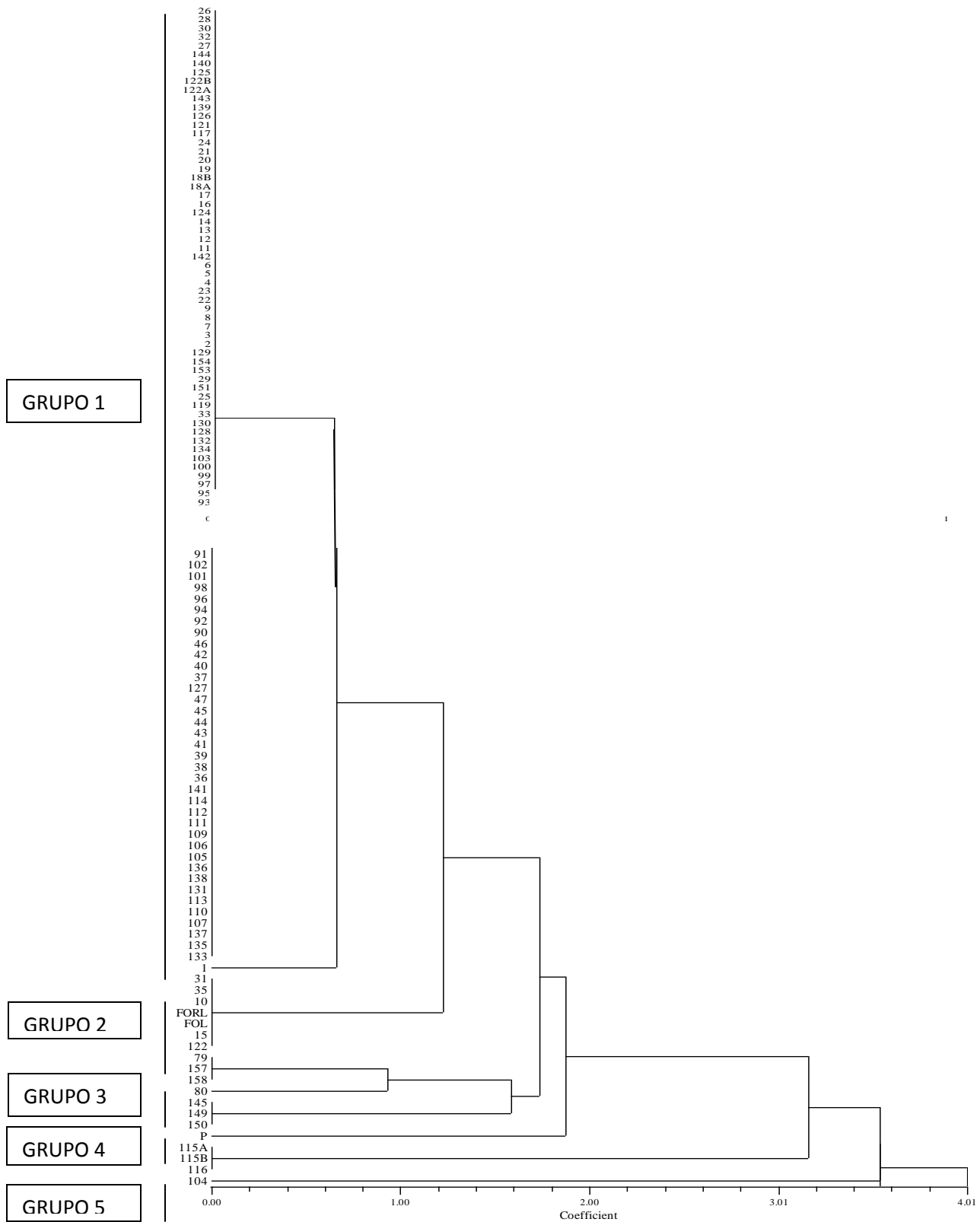


Figura 10 Dendrograma de productos de digestión de DNA ribosomal con la enzima *Hae III* e *Hinf I*

6.6 Determinación de variabilidad genética mediante marcadores moleculares BOX PCR.

Esta técnica ha sido ampliamente utilizada en estudios de variabilidad genética de bacterias, con excelentes resultados como lo descrito en el estudio de diversidad genética del género *Streptomyces* por Lanoot et al., en 2004. El presente estudio produjo patrones de bandas polimórficos que permitieron la caracterización de los aislamientos involucrados en este estudio.

La amplificación de DNA ribosomal de los 115 aislamientos mediante el uso del primer BOX AR 1 mostró un patrón de bandas con un rango de tamaño de 200 a 5000 pb. Al realizar el estudio de la matriz de bandas en el programa NTSYS 2.0 dió como resultado la formación de 14 grupos de acuerdo al patrón de bandas revelando un alto grado de diversidad genética con un 65% de similitud entre los aislamientos componentes de cada grupo. (Fig. 11).

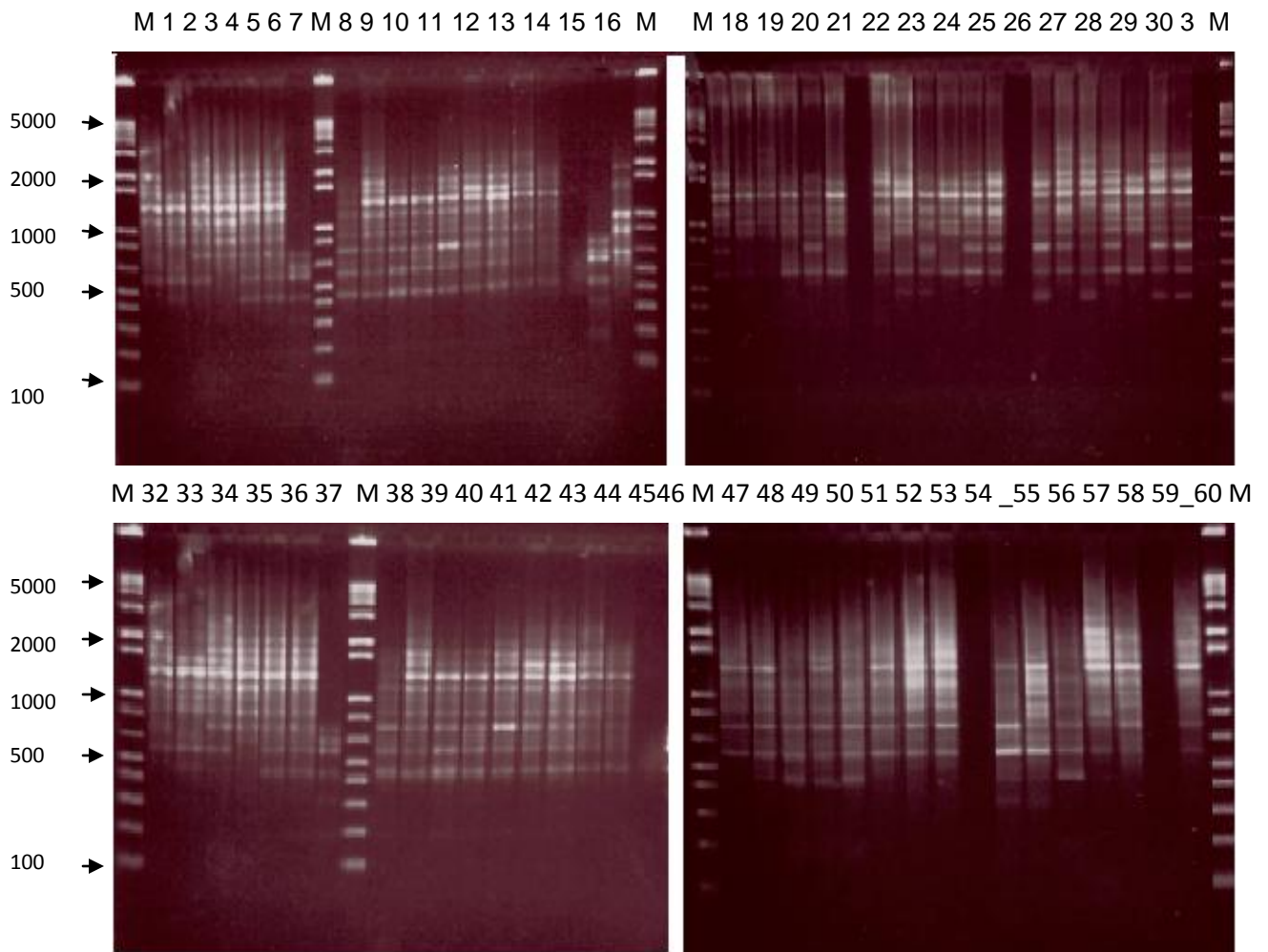


Figura 11. Patrón de bandas amplificadas con el marcador BOX. Se utilizó como referencia el marcador molecular de 1 Kb (Invitrogen). Los números de los aislamientos corresponde a lo descrito en la tabla 3.

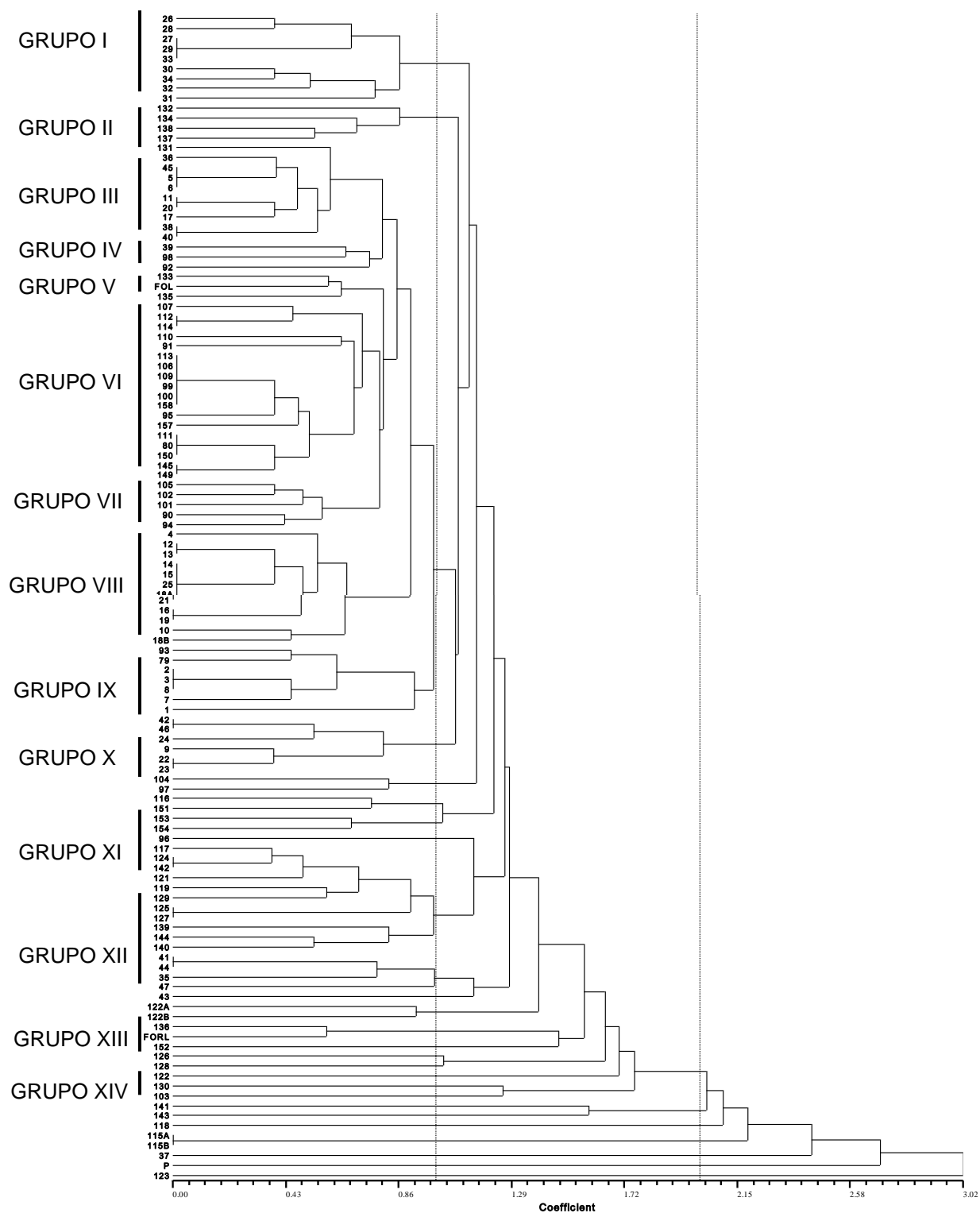


Figura 12. Dendrograma de variabilidad genética de aislamientos de *F. oxysporum* mediante marcadores BOX

Los grupos formados fueron numerados de I al XIV y el número de aislamientos que conforman cada grupo se describen como sigue: I-9, II-4, III-13, IV-3, V-18, VI-5, VII-12, VIII-7, IX-8, X-5, XI-11, XII-5, XIII-2 y XIV-3. Se descartaron 12 aislamientos los cuales presentaban un coeficiente de similitud mayor de 1.0 entre los cuales se encontraba el aislado de *Penicillium sp.* utilizado como control. La distribución de los productos amplificados se muestra en la tabla 3.

Las muestras control FORL y FOL (*F.oxysporum radiscis lycopersici* y *F. oxysporum lycopersici*) utilizadas mostraron una alta variación genética entre ambas debido a que cada uno de los cultivos se encuentra ubicado en grupos diferentes lo cual podemos observar en el dendrograma construido (Fig.12); el aislado de FOL se ubica en el grupo V, mientras que el aislamiento de FORL en el grupo XIII. Este comportamiento había sido descrito anteriormente por Balmas en el año 2005, donde establece una alta variabilidad genética entre ambas especies lo cual fue representado por grupos de compatibilidad vegetativa (VCG) diferentes y poca correlación genética.

Tabla 3. Origen de los aislamientos de *Fusarium oxysporum* en el estudio.

NUMERO	CLAVE	MUNICIPIO	ZONA	GRUPO BOX	ORIGEN DE MUESTRA
1	AC26	Acatic	ALTOS SUR	I	Suelo Sano
2	AC28	Acatic	ALTOS SUR	I	Suelo sano
3	AC27	Acatic	ALTOS SUR	I	Suelo enfermo
4	AC29	Acatic	ALTOS SUR	I	Suelo enfermo
5	AC33	Acatic	ALTOS SUR	I	Suelo enfermo
6	AC30	Acatic	ALTOS SUR	I	Suelo sano
7	AC34	Acatic	ALTOS SUR	I	Suelo sano
8	AC32	Acatic	ALTOS SUR	I	Suelo sano
9	AC31	Acatic	ALTOS SUR	I	Suelo sano
10	AC132	Acatic	ALTOS SUR	II	Raíz sana
11	AC134	Acatic	ALTOS SUR	II	Raíz sana
12	AC138	Acatic	ALTOS SUR	II	Raíz sana
13	AC137	Acatic	ALTOS SUR	II	Raíz sana
14	CQ131	Cuquío	CENTRO	III	Suelo sano
15	CQ36	Cuquío	CENTRO	III	Suelo sano

16	CQ45	Cuquío	CENTRO	III	Suelo sano
17	ZP5	Zapotlanejo	CENTRO	III	Suelo enfermo
18	ZP6	Zapotlanejo	CENTRO	III	Suelo enfermo
19	ZP11	Zapotlanejo	CENTRO	III	Suelo enfermo
20	ZP20	Zapotlanejo	CENTRO	III	Suelo enfermo
21	ZP17	Zapotlanejo	CENTRO	III	Suelo enfermo
22	CQ38	Cuquío	CENTRO	III	Suelo sano
23	CQ40	Cuquío	CENTRO	III	Suelo enfermo
24	CQ39	Cuquío	CENTRO	III	Suelo sano
25	CQ98	Cuquío	CENTRO	III	Raíz sana
26	CQ92	Cuquío	CENTRO	III	Raíz sana
27	AC133	Acatic	ALTOS SUR	IV	Raíz enferma
	FOL			IV	
28	AC135	Acatic	ALTOS SUR	IV	Raíz enferma
29	CO107	Cocula	VALLES	V	Raíz sana
30	CO112	Cocula	VALLES	V	Raíz enferma
31	CO114	Cocula	VALLES	V	Raíz enferma
32	CO110	Cocula	VALLES	V	Raíz sana
33	CQ91	Cuquío	CENTRO	V	Raíz enferma
34	CO113	Cocula	VALLES	V	Raíz sana
35	CO106	Cocula	VALLES	V	Raíz enferma
36	CO109	Cocula	VALLES	V	Raíz enferma
37	CQ99	Cuquío	CENTRO	V	Raíz enferma
38	CQ100	Cuquío	CENTRO	V	Raíz enferma
39	IX158	Ixtlán	NAYARIT	V	Suelo enfermo
40	CQ95	Cuquío	CENTRO	V	Raíz enferma
41	IX157	Ixtlán	NAYARIT	V	Suelo enfermo
42	CO111	Cocula	VALLES	V	Raíz enferma
43	IX80	Ixtlán	NAYARIT	V	Suelo sano
44	IX150	Ixtlán	NAYARIT	V	Raíz sana
45	IX145	Ixtlán	NAYARIT	V	Raíz sana
46	IX149	Ixtlán	NAYARIT	V	Raíz sana
47	CO105	Cocula	VALLES	VI	Raíz enferma
48	CQ102	Cuquío	CENTRO	VI	Raíz sana
49	CQ101	Cuquío	CENTRO	VI	Raíz sana
50	CQ90	Cuquío	CENTRO	VI	Raíz sana
51	CQ94	Cuquío	CENTRO	VI	Raíz sana
52	ZP4	Zapotlanejo	CENTRO	VII	Suelo enfermo
53	ZP12	Zapotlanejo	CENTRO	VII	Suelo enfermo
54	ZP13	Zapotlanejo	CENTRO	VII	Suelo enfermo
55	ZP14	Zapotlanejo	CENTRO	VII	Suelo enfermo
56	ZP15	Zapotlanejo	CENTRO	VII	Suelo enfermo
57	ZP25	Zapotlanejo	CENTRO	VII	Suelo enfermo
58	ZP18A	Zapotlanejo	CENTRO	VII	Suelo enfermo
59	ZP21	Zapotlanejo	CENTRO	VII	Suelo enfermo
60	ZP16	Zapotlanejo	CENTRO	VII	Suelo enfermo
61	ZP19	Zapotlanejo	CENTRO	VII	Suelo enfermo
62	ZP10	Zapotlanejo	CENTRO	VII	Suelo enfermo

63	ZP18B	Zapotlanejo	CENTRO	VII	Suelo enfermo
64	CQ93	Cuquío	CENTRO	VIII	Raíz enferma
65	IX79	Ixtlán	NAYARIT	VIII	Suelo sano
66	ZP2	Zapotlanejo	CENTRO	VIII	Suelo sano
67	ZP3	Zapotlanejo	CENTRO	VIII	Suelo sano
68	ZP8	Zapotlanejo	CENTRO	VIII	Suelo sano
69	ZP7	Zapotlanejo	CENTRO	VIII	Suelo sano
70	ZP1	Zapotlanejo	CENTRO	VIII	Suelo sano
71	CQ42	Cuquío	CENTRO	IX	Suelo enfermo
72	CQ46	Cuquío	CENTRO	IX	Suelo enfermo
73	ZP24	Zapotlanejo	CENTRO	IX	Suelo enfermo
74	ZP9	Zapotlanejo	CENTRO	IX	Suelo sano
75	ZP22	Zapotlanejo	CENTRO	IX	Suelo sano
76	ZP23	Zapotlanejo	CENTRO	IX	Suelo sano
77	CO104	Cocula	VALLES		Raíz enferma
78	CQ97	Cuquío	CENTRO		Raíz enferma
79	CO116	Cocula	VALLES	X	Raíz enferma
80	LB151	La barca	CIENEGA	X	Suelo sano
81	LB153	La barca	CIENEGA	X	Raíz enferma
82	LB154	La barca	CIENEGA	X	Suelo enfermo
83	CQ96	Cuquío	CENTRO		Raíz sana
84	ZP117	Zapotlanejo	CENTRO	XI	Raíz sana
85	ZP124	Zapotlanejo	CENTRO	XI	Raíz enferma
86	ZP142	Zapotlanejo	CENTRO	XI	Raíz enferma
87	ZP121	Zapotlanejo	CENTRO	XI	Raíz sana
88	ZP119	Zapotlanejo	CENTRO	XI	Raíz sana
89	ZP129	Zapotlanejo	CENTRO	XI	Raíz enferma
90	ZP125	Zapotlanejo	CENTRO	XI	Raíz enferma
91	ZP127	Zapotlanejo	CENTRO	XI	Raíz sana
92	ZP139	Zapotlanejo	CENTRO	XI	Raíz sana
93	ZP144	Zapotlanejo	CENTRO	XI	Raíz sana
94	ZP140	Zapotlanejo	CENTRO	XI	Raíz sana
95	CQ41	Cuquío	CENTRO	XII	Suelo sano
96	CQ44	Cuquío	CENTRO	XII	Suelo sano
97	CQ35	Cuquío	CENTRO	XII	Suelo enfermo
98	CQ47	Cuquío	CENTRO	XII	Suelo sano
99	CQ43	Cuquío	CENTRO	XII	Suelo sano
100	ZP122A	Zapotlanejo	CENTRO	XIII	Raíz enferma
101	ZP122B	Zapotlanejo	CENTRO	XIII	Raíz enferma
102	AC136	Acatic	ALTOS SUR	XIV	Raíz sana
	FORL			XIV	
103	IX152	Ixtlán	NAYARIT	XIV	Raíz sana

Tabla 4. Composición de los grupos formados en el análisis de DNA ribosomal mediante la técnica de BOX-PCR

GRUPO ARDRA	GRUPO BOX	No AISLADOS	MUNICIPIO	ORIGEN AISLADO	SUELO ASINTOMÁTICO (%)	SUELO CON SÍNTOMAS (%)	RAÍZ ASINTOMÁTICA (%)	RAÍZ CON SÍNTOMAS (%)
1	I	9	Acatic	Suelo	70	30	-	-
1	II	4	Acatic	Raíz	-	-	75	25
1	III	13	Cuquío	Suelo	30	50	12	8
1	IV	3	Acatic	Raíz	-	-	-	100
1,3,4	V	18	Cocula	Raíz	5	15	30	50
1	VI	5	Cuquío	Raíz	-	-	80	20
1	VII	12	Zapotlanejo	Suelo	-	100	-	-
1	VIII	7	Zapotlanejo	Suelo	85	-	-	15
1	IX	8	Zapotlanejo	Suelo	50	50	-	-
1	X	5	La Barca	Raíz	-	25	25	50
1	XI	11	Zapotlanejo	Raíz	-	-	40	60
1	XII	5	Cuquío	Suelo	80	20	-	-
1	XIII	2	Zapotlanejo	Raíz	-	-	-	100
1	XIV	3	La Barca y Acatic	Raíz	-	-	100	-

La tabla 4 describe la composición de los grupos formados a partir de la amplificación de DNA ribosomal mediante marcadores BOX del cual se obtuvieron 14 grupos los cuales en su mayoría conforman el Grupo 1 del análisis de restricción (ARDRA). En el análisis de variabilidad genética realizado mediante la técnica de BOX-PCR fueron descartados 12 aislamientos los cuales presentaron un comportamiento genético que no permitió un agrupamiento con la mayoría de los aislamientos, este mismo comportamiento se obtuvo como resultado en seis de los aislamientos antes mencionados mediante el análisis de enzimas de restricción ARDRA, los cuales presentaron un coeficiente de similitud cercano al hongo *Penicillium sp* utilizado como control negativo, estos resultados nos indican que estos aislamientos muestran un comportamiento genético distinto al género *Fusarium*.

Dos de los factores asociados a el agrupamiento mostrado por los aislamientos en estudio son el origen de procedencia (Suelo o Raíz) y la ubicación geográfica (Municipio) de donde fueron obtenidos, descrito en la tabla 4, donde se observa que la composición de los grupos I, III, VII, VIII, IX y XII en su mayoría corresponde a aislamientos obtenidos de muestras de suelo, y los grupos II, IV, V, VI, X, XI y XIII fueron aislamientos obtenidos a partir de muestras de raíz. La ubicación geográfica es otro factor determinante en la diferenciación de especies debido a que los grupos están conformados con aislamientos extraídos de un mismo municipio. Los grupos I, II, IV y XIV pertenecen al municipio de Acatic, grupos III, VI y XII municipio de Cuquío, grupos VII, VIII, IX, XI y XIII pertenecen al municipio de Zapotlanejo, el grupo V pertenece al municipio de Cocula y los grupos X y XIV pertenecen al municipio de La Barca, los aislamientos del municipio de Ixtlán del Río no conformaron un grupo definido ya que estos están distribuidos en diferentes grupos y no representan la mayoría. Estos resultados contrastan a lo descrito por Bayraktar y Dólar en 2007 donde al determinar variabilidad genética aislamientos de *Fusarium oxysporum ciceris* obtenidos de

municipios diferentes en Turquía mostraron una diferenciación genética independiente a la ubicación geográfica de la cual fueron extraídos.

La toma de muestra se realizó inicialmente en suelo y plantas tanto asintomáticas como con síntomas de marchitez vascular esta variable resulta de interés al analizar la conformación de cada uno de los grupos debido a que se presenta un agrupamiento indistinto tanto de muestra con síntomas de marchitez vascular y asintomática. Los grupos I, XIII y XII son grupos conformados por muestras de suelo sano en su mayoría mientras que el grupo VII se conforma en un 100% de muestras provenientes de suelo con síntomas de marchitez. En el caso del agrupamiento por raíz se muestra que los grupos II y VI están conformados en su mayoría por aislamientos provenientes de raíces sanas mientras que los grupos IV, X, XI y XIII están conformados por aislamientos provenientes de raíces enfermas.

Los grupos III, V y X presentan una conformación variada en comparación de los otros grupos debido a que están compuestos de aislamientos provenientes de suelo y raíz tanto asintomático como con síntomas de marchitez.

VII. CONCLUSIONES

1. Se determinó la presencia del hongo *Fusarium oxysporum* en plantaciones de agave tequilero en los municipios de Acatic, Cocula, Cuquío, La Barca y Zapotlanejo del estado de Jalisco y el municipio de Ixtlán del Río del estado de Nayarit, tanto en muestras de raíz como de suelo.
2. Los 115 aislamientos obtenidos de *Fusarium oxysporum* presentaron características morfológicas y microscópicas descritas por Nelson (1970) y Leslie-Summerell (2006) respectivamente.
3. Se realizó el análisis de fertilidad en suelos muestreados en los cuales se determinó que presentaron condiciones adecuadas para el establecimiento del cultivo de agave.
4. A partir de las extracciones de DNA y mediante el uso de primers ITS se obtuvieron fragmentos de amplificación de DNA ribosomal de 550 pb en el 100% de los aislamientos evaluados.
5. Se utilizaron enzimas de restricción en la región conservada de 550 pb de DNA en los aislamientos analizados para su identificación taxonómica a nivel de especie. Lo que permitió corroborar la identidad de *Fusarium oxysporum* de los aislados utilizando como referencia lo reportado en la base de datos del GenBank.
6. El 82 % de los aislamientos evaluados presentaron un patrón de digestión de DNA ribosomal similar al reportado por para el género *Fusarium oxysporum*.

7. Existe un alto nivel de variabilidad genética entre los 115 aislamientos obtenidos clasificados por sus características genéticas en 14 grupos con un 65% de similitud de acuerdo a los marcadores BOX.
8. De acuerdo a los resultados del análisis de BOX PCR se establece que el agrupamiento formado está determinado por la ubicación geográfica y el origen de la muestra del que fueron obtenidos los aislamientos.

VIII. PERSPECTIVAS

1. Conforme a los resultados obtenidos se sugiere que la diversidad genética está determinada por las condiciones ambientales y de manejo del cultivo de cada zona de plantación.
2. Como parte del mejor entendimiento de los aislamientos obtenidos se propone la continuidad del proyecto mediante la realización de pruebas de patogenicidad que correlacionen el comportamiento genético del género *Fusarium oxysporum* en diferentes condiciones con la posible virulencia en el cultivo de agave.

IX. BIBLIOGRAFIA.

Abd-Elsalam K. A., Ibrahim N.A., Abdel-Satar M.A., Khalil M.S. y Verreet J.A. 2003. PCR Identification of *Fusarium* genus based on nuclear ribosomal DNA sequence data. African Journal of Biotechnology Vol. 2 (4) pp 82-85

Aceves, J.J. Prevención y Manejo Integral de la Marchitez del *Agave tequilana* Weber var. Azul en Jalisco. INIFAP. 2003: Folleto técnico Num. 1. 9-11

Agrios, G. 1989. Fitopatología. Versión autorizada en español. Ed. Limusa 371-377.

Alcocer A., López Rocha A.J., Martínez Ramírez J.L., Rodríguez Ruvalcaba R., Castro Valera R., Virgen- Calleros G. 2003. Germinación de micro y macroconidios in vitro de *Fusarium oxysporum* aislado de *Agave tequilana* Weber var. azul a diferentes niveles de pH y temperatura. Memorias XVII Congreso nacional de Fitopatología. Puerto Vallarta, Jal.

Alves- Santos, F.M., Benito, E.P., Eslava, A.P., Diaz-Minguez, J.M. 1999. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* strains from common vean fields in Spain. Applied and Environmental Microbiology. Washington, vol 65. No 8 p 3335-3340.

Appel, D.J. y Gordon T.R. 1996. Relationships Among Pathogenic and Nonpathogenic Isolates of *Fusarium oxysporum* Based on the Partial Sequence of the Intergenic Spacer Region of Ribosomal DNA. The American Phytopathological Society. Vol 9, No. 2. Pp125-138.

Arizaga, S. Ezcurra, E.1995. "Insurance against reproductive failure in a semelparous plant: bulbil formation in *Agave macroacantha* flowering stalks " Oecologia, 101: 329-334.

Arroyo-García, R., Cenis, J.L., Tello J.C., Martínez J.M., Cifuentes D.2003.Genetic realtionships among seven specialized forms of *Fusarium oxysporum* determined

by DNA sequencing of the ITS region and AFLPs. Spanish journal of agricultural research, ISSN 1695-971X No3. 55-64

Bayraktar H., Dólar F.S. y Maden S. 2007. Use of RAPD and ISSR Markers in detection of Genetic Variation and Population Structure among *Fusarium Oxysporum f. sp.* Isolates on Chickpea in Turkey. J Pathology 2007:156 146-154

Bernal, A., Lopez, R, Martinez, J. L., Rodriguez, R., Castro, R. Virgen, G. Departamento de Producción Agrícola CUCBA. Universidad de Guadalajara. Apdo Postal 39-82, Las agujas. Zapopan, Jalisco.

Binh, L.T. , Muoi L.T. , Oanh H.T.K y Phong, T.D. 1990. Rapid propagation of agave by in vitro tissue culture. PI. Cell. Tissue Organ Cult. 23: 67-70

Burgess, L. W., P. E. Nelson, y B. A. Summerell. 1989. Variability and stability of morphological characters in *Fusarium oxysporum*. Mycologia 81: 818-822 (2)

Carrillo, L. 2003. Los hongos de los alimentos y forrajes. <http://www.unsa.edu.ar/matbib/hongos/htextocubierta>.

Clark, C.G. Martin, D.S. Diamond, L.S. 1995. Phylogenetic relationships among anuran trypanosomes as revealed by riboprinting. Journal of eukaryotic Microbiology, Lawrence, Vol 42, pp 92-96.

CRT, 2010. Denominazione di Origine Controllata. Reglamento CE No 510/2006 del 20 de Marzo 2006. Art

CRT. 2010. Actualización de la base de datos y diagnostico fitosanitario de Agave tequilana Weber var. azul en la denominación de origen tequila.

Diguet I. 1902. Estudio sobre el maguey del tequila. Generalidades e historia. El proa Mex. 1902: 9 424

FAO. 1994. ECOCROP 1. The adaptability level of the FAO crop environmental requirements data base. Version 1.0. AGLS.FAO. Rome. Italy.

Fisher, R.A. 1930. The Genetical Theory of Natural Selection. 1st ed. Clarendon Press, Oxford.

Galindo H., López M., Maldonado I.E., Maldonado L.A., y Quintana E.T.2010. Evaluación de la diversidad y del potencial biotecnológico de Estreptomicetos aislados de suelos agrícolas de México. Encuentro Nacional de Biotecnología del IPN. <http://www.dcb.rsip.ipn.mx/encuentro/resumenes/vegetal/carteles/Galindo>

García- Mendoza A.J. 2004. Agaváceas. Biodiversidad de Oaxaca. Instituto de Biología, UNAM, Fondo Oaxaqueño para la conservación de la Naturaleza, World Wildlife Fundation, México. 159-169.

Gardes, M., and Bruns, T.D.1993. "ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes: application to the identification of mycorrhiza and rusts". Molecular Ecology. 2 (2): 113–118

Garrett, S.D.1970. Pathogenic Root- Infecting Fungi. Cambridge University Press, London pp.194

Gentry H.S.1982. Agaves of continental North América. University of Arizona Press, Tucson, Arizona.

Gordon, T.R. y Okamoto, D. 1992. Population structure and the relationship between pathogenic and nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. Phytopathology 82: 73-77.

Granados S.D. 1993. Los agaves en México. Universidad Autónoma de Chapingo. México. 252.

Hibbett D.S.1992. Ribosomal RNA and fungal systematics. Trans. Mycol. Soc. 33: 533-556

INIFAP. 2010. Tecnología para la prevención y/o control de la marchitez del agave tequilero. Folleto técnico Núm. 2 ISBN: 978-607-425-313-9: 3-15

Kistler, H.C.1997. Genetic diversity in the plant-pathogenic Fungus *Fusarium oxysporum*. The American Phytopathological Society. Publication No.P-1997-01310-01O.474-479.

Larkin y Fravel, 2002; Flood, 2006; Landa et al., 2001; DeVay et al., 1997; Ploetz, 2006

Leslie, J. F. y Summerell, B. A. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Ed. Blackwell Publishing

Link, H. F. 1809. Observations in ordines plantarum naturalis, Dissetation I. Mag. Ges. Naturf. Freunde, Berlín 3: 3-42 (1,8,9)

Linné C. 1753. *Species Plantarum*.

Loera- Quezada M. M. 2000. Selección in vitro de *Agave tequilana* Weber var. azul para resistencia de *Fusarium oxysporum*. Tesis de Maestría en Ciencias. Posgrado en procesos biotecnológicos. Universidad de Guadalajara.

Luna-Hernandez, G.1996. Pudrición del tallo de *Agave tequilana* Weber, Var. azul en el estado de Jalisco, México. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Chapingo.

Luna, Z.R. 1991. La historia del tequila, de sus regiones y hombres. Ed. Consejo Nacional para la Cultura y las Artes. Mexico. D.F.

McDonald, B.A. 1997. The populations Genetics of fungi: Tools and techniques. The American Phytopathological Society. Publication No. P-1997-0210-01O. 448-453.

Miller, R.N.G.; Quezado-Soares, A.M.; Lopes, C.A. 1999. Molecular comparison of *Fusarium* populations causing eumartii wilt and dry rot of potato in Brazil. *Fitopatol. Bras.*, 24:149-155.

Morales, L., Ángel, M., E.2007. Hongos fitopatógenos de importancia agrícola. Ed. Universidad Michoacana de San Nicolás Hidalgo. 90-97.

Muriá, 1996. J. M. México en el tiempo No. 10
<http://www.mexicodesconocido.com.mx/notas/880-Una-bebida-llamada-Tequila-1996>.

Nagarajan, G., Nam, M.H., Sing, J.Y., Yoo, S.J. and Kim, G.H. 2004. Genetic variation in *Fusarium oxysporum* f.sp. *fagariae* populations based on RAPD and rDNA RFLP analyses. *Plant pathology* 20(4): 264-270.

Ni Tuang F, Rademaker JLW, Alocilja EC, Louws FJ, de Bruijn FJ. 1999. Identification of bacterial rep-PCR genomic fingerprints using a backpropagation neural network. *FEMS Microbiol Lett*, 177:249-256.

NOM-021. 2000. NOM-021-RECNAT-2000. Que establece especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis. Pp 5-71.

Oliveira, V.C. de and Costa, J.L. da S. 2002. Restriction analysis of rDNA (ARDRA) can differentiate *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli* from *F. solani* f.sp. *glycines*. *Fitopatologia Brasileira* 27: 631-634.

Pecchia, S. Mercatelli, E., Vannacci, G. 1998. PCR amplification and characterization of the intergenic spacer region of the ribosomal DNA in *Pyrenophora graminea*. *FEMS Microbiology Letters*. Amsterdam. Vol 166 No. 1pp 21-27

Pimienta-Barrios, E., C. Robles Murguía, J.A. Ruíz-Corral, P.S. Nobel y García Galindo. 1999. Regiones térmicas óptimas y marginales para el cultivo de agave tequilana en el estado de Jalisco. Universidad de Guadalajara. Programa General de apoyo y desarrollo tecnológico a la cadena productiva Agave-Tequila. 47.

Rodríguez-Garay, B. 2004. Efecto de inhibidores de la síntesis de poliaminas bacteriales y fúngicas para el control de microorganismos patógenos en Agave tequilana Weber, var azul. Centro de Investigaciones y Asistencia en Tecnología y

Diseño del Estado de Jalisco, A.C. Informe Técnico para el Programa general de Apoyo a la Cadena Productiva Agave-Tequila.

Rodríguez, C.M. 1998. Diversity of aerobic to luene degrading bacteria from tropical soils. Tesis para obtener el grado de Master. Recinto Universitario de Mayagüez, Universidad de Puerto Rico.

Rubio C., R. 2007. Enfermedades del cultivo de agave. Conocimiento y prácticas agronómicas para la producción de Agave tequilana Weber en la zona con denominación de origen del tequila. Instituto Nacional de Investigadores Forestales y pecuarias. Centro de Investigación Regional Pacífico Centro. Libro técnico Num 4. 169-195.

SAGARPA. (2000). Anuario Estadístico de la Producción Agrícola de los Estados Unidos Mexicanos, 1999. México.

Seurink S., Verstraete W., Siciliano S.D. 2003. Use of 16S-23 S r RNA intergenic spacer region PCR and repetitive extragenic palindromic PCR analysis of *Escherichia coli* isolates to identify non point fecal sources. *Appl Environ-Microbiol.* 69: 4042-50

Silva, D.S. Resende, L.V., Castro, N.R., Coelho, R.S.B., Costa, J.C., Alves, M.X.B. 2009. Diversidade genética de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cúbense* em heliconia utilizando ARDRA. *Summa Phytopathologica.*

Sutthisa, W., Sanoamuang, N., and Chuprayoon, S. 2010. Evaluation of amplified rDNA restriction analysis (ARDRA) for the identification of *Fusarium* species, the causal agent associated with mulberry root rot disease in Northeastern Thailand. *Journal of Agricultural Technology* 2010 Vol.6 (2): 379-390

Uvalle-Bueno, J.X. 2006. Manejo integrado de enfermedades de Agave tequilana Weber var. azul. Documento interno. División agrícola. Casa Cuervo, S.A. de C.V.

Valenzuela Z., A.G. 1997. El agave tequilero: su cultivo e industria. Litteris Editores. Guadalajara, Jal. 204.

Vázquez-García J.A., Chazaro M.J., Hernández-Vera G., Flores-Barrios E., Vargas Rodríguez Y. L. 2005. Agaves de Occidente. Universidad de Guadalajara. 30-31

Versalovic J., Koeuth T., Lupski JR. 1991 Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* 19:6823-6831.

Virgen-Calleros, G. 2000. Epidemiología y manejo integrado de problemas fitosanitarios en Agave tequilana Weber, var. azul. Departamento de producción agrícola. CUCBA. UdeG. Informe técnico para el programa general de apoyo y desarrollo tecnológico a la cadena productiva agave-tequila.

Wonyong K., Yeon-pyo H., Jae-Hyung Y., Won-Bok L., Chul-Soon C., Sang-In. 2001. Genetic relationships of *Bacillus anthracis* and closely related species based on variable number tandem repeat analysis and Box PCR genomic fingerprinting.