



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales



**Determinación de los patógenos más relevantes asociados a
Agave montana Villarreal, en una localidad de Cadereyta de
Montes, Querétaro.**

Tesis individual

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de:

Licenciada en **Horticultura Ambiental**

PRESENTA

Carolina Hurtado Torres

DIRIGIDO POR:

Dr. Santiago Vergara Pineda

Querétaro, Qro. Junio del 2025

La presente obra está bajo la licencia:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



SinDerivadas — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ciencias Naturales



**Determinación de los patógenos más relevantes asociados a *Agave montana*
Villarreal, en una localidad de Cadereyta de Montes, Querétaro.**

Tesis individual

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de:

Licenciada en **Horticultura Ambiental**

PRESENTA

Carolina Hurtado Torres

DIRIGIDO POR:

Dr. Santiago Vergara Pineda

SINODALES

FIRMA

Dr. Santiago Vergara Pineda

Presidente

Dra. Emma Fabiola Magallán Hernández

Secretaria

Dr. Juan Antonio Valencia Hernández

Vocal

Dr. Fidel Landeros Jaime

Vocal

Dr. José Antonio Cervantes Chávez

Vocal

Querétaro, Qro.
Junio del 2025
México

Resumen

Agave montana Villarreal es una especie nativa de México y con distribución restringida en los estados de Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas y Querétaro. Se le da una variedad de usos, entre los que destaca la obtención de mezcal, bebida etílica derivada de diversas especies de agave, cuya demanda se ha ido incrementando en los últimos años, tanto en México como a nivel mundial. Sin embargo, ante la creciente demanda, la alta tasa de extracción de esta materia prima ha suscitado la pérdida de poblaciones y por ende la degradación de los ecosistemas. Al ser *Agave montana* una especie muy poco estudiada, es necesario generar información que ayude a los productores a un mejor aprovechamiento, por tanto, se requiere conocer las enfermedades que se encuentran presentes para su futuro manejo durante su producción *in situ*. El objetivo de esta investigación fue determinar los patógenos más frecuentes que causan enfermedad en *A. montana* encontrados en ejemplares de la localidad de Chavarrías en la Sierra El Doctor, perteneciente al municipio de Cadereyta en el estado de Querétaro. Se utilizaron técnicas de laboratorio como medios de cultivo selectivos e identificación morfológica, así como extracción de DNA y secuenciación de los agentes patogénicos, por otro lado, se elaboró la descripción de la sintomatología encontrada. Los resultados arrojaron el aislamiento de dos especies de bacterias que ocasionan pudrición blanda en agave, *Raoultella terrigena* y *Chryseobacterium* sp. cuya patogenicidad fue corroborada por medio de postulados de Koch. Además, se determinó al hongo *Dothistroma septosporum* como el agente causal del Tizón de la penca de agave, mientras que la combinación de humedad, temperatura y sombra son variables ambientales importantes en la incidencia de la enfermedad en el sitio de colecta. Este es el primer acercamiento a las enfermedades que afecta a *Agave montana* y representa su primer registro para México.

Palabras clave: *Agave montana*, patógenos, Querétaro.

Summary

Agave montana Villarreal is a native species of Mexico with a restricted distribution in the states of Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas and Querétaro. It is used for various purposes, including the production of mezcal, an ethyl beverage derived from various species of agave, which has been in increasing demand in recent years, both in Mexico and worldwide. However, given the growing demand, the high rate of extraction of this raw material has led to the loss of populations and, consequently, the degradation of ecosystems. Since *Agave montana* is a poorly studied specie, it is necessary to generate information that will help producers to make better use of it; therefore, it is necessary to know the diseases that are present for its future management during its production *in situ*. The objective of this research was to determine the most frequent pathogens that cause disease in *A. montana* found in specimens from the locality of Chavarrías at Sierra El Doctor, belonging to the municipality of Cadereyta in the state of Querétaro. Laboratory techniques such as selective culture media and morphological identification, as well as DNA extraction and sequencing of pathogenic agents were used, and a description of the symptomatology found was developed. The results showed the isolation of two species of soft rot bacteria in agave, *Raoultella terrigena* and *Chryseobacterium* sp. whose pathogenicity was corroborated by Koch's postulates. In addition, the fungus *Dothistroma septosporum* was determined as the causal agent of agave leaf blight, while the combination of humidity, temperature and shadow are important environmental variables in the incidence of the disease at the collection site. This is the first approach to the diseases affecting *Agave montana* and represents its first record for Mexico.

Key words: *Agave montana*, pathogens, Querétaro.

Dedicatoria

*Con inmenso amor a mis padres,
sin ustedes nada de esto hubiese sido posible.*

*Con admiración y ternura,
a la Carolina de 17 años que empezó esto,
fuiste valiente y hoy todo esto es por ti, para mí.*

Agradecimientos

Este trabajo fue posible gracias al proyecto 319061 "Auge Mezcalero y deudas de extinción: investigación interdisciplinaria hacia la sustentabilidad" financiado por el CONAHCYT en el periodo 2022-2024, y al responsable técnico Alfonso Valiente Banuet, investigador de la UNAM.

A la localidad de Chavarrías, en especial a los comuneros José Fidel Fortanell Muñoz, Dionisio Reséndiz Fortanell y Baltazar Martínez Fortanell, que nos acompañaron y ayudaron en la colecta del material vegetal. Gracias por compartir sus conocimientos, y por enorme interés en conocer, aprovechar y preservar el bosque y a *Agave montana*.

A mi director de tesis, por aceptar dirigir este trabajo, por el tiempo invertido y su apoyo para la culminación del mismo; a mis asesores, por sus comentarios, aportaciones y recursos que sirvieron de mucho para la realización de esta investigación; y a la Mtra. Paola Puga, por la atención y apoyo en la parte estadística.

A mis padres, Javier Hurtado e Irma Torres, por estar en mi presente, por su infinito amor y paciencia hacia mi persona. Nunca me alcanzara la existencia para agradecerles por tanto.

A mis hermanos, Gabriela, Paulina y Javier porque son parte indeleble de mi vida, por su apoyo, cariño y comprensión en esta etapa de mi viaje, y a mi sobrina Ana, por unirse a esta travesía.

A mi amiga Yareni, por las risas que seguimos compartiendo aún a la distancia y que a pesar de los ecosistemas tan distintos del que provenimos, el bosque de niebla, el amor por la ciencia y la naturaleza nos hicieron coincidir.

A los amigos que formé en mi transitar en la universidad, Ana, Yamilet e Ixchel, por compartir esta montaña rusa; a Moni, Bullfran, Martín, Magy, y Chava, mis

presis de la era dorada, gracias por el trabajo realizado en equipo y la amistad que se formó. Por el tiempo vivido.

Al director de la Facultad de Ciencias Naturales, Dr. José Gómez, por sus atenciones y cariño sincero, por siempre hacer la diferencia y ser una inspiración para todo aquel que lo conoce.

A mis profesoras de licenciatura, Dra. Kruskaia Caltzonzin por despertar mi interés en el mundo de los microorganismos, y la Dra. Fabiola Magallán, por ser mi tutora académica, por la vocación que le pone a sus clases y por sus consejos.

A los investigadores con los que tuve la oportunidad de trabajar, Dr. Juan Ramiro Pacheco, Dra. Rosalinda Gonzales, Dra. Susana Olimpia Mendoza de la UAQ y a la Dra. Susana Alcántara del ENECuSaV, por las enseñanzas y consejos que me han permitido creer en mí y afianzar mi vocación, gracias por permitirme ser partícipe en sus proyectos que sigo recordando con mucho cariño.

A mis compañeros de laboratorio, Paty, Frida y Pablo, aunque la convivencia fue efímera, la tesis y las salidas de campo se hicieron un poco más llevaderas.

A todo lo que me antecedió, a las plantas y a la vida que en sí que me permite existir

Gracias.

Índice

1. Introducción.....	1
2. Marco teórico.....	2
2.1 <i>Generalidades de las enfermedades en plantas.....</i>	2
2.2 <i>Diagnostico e identificación de enfermedades vegetales.....</i>	4
3. Especie de estudio.....	6
3.1 <i>Género Agave.....</i>	6
3.2 <i>Agave montana.....</i>	8
3.2.1 <i>Distribución y descripción botánica.....</i>	8
3.2.2 <i>Importancia ecológica, cultural y económica.....</i>	9
4. Antecedentes.....	9
4.1 <i>Enfermedades en agaves.....</i>	9
5. Justificación.....	13
6. Hipótesis.....	14
7. Objetivo general.....	15
8. Metodología.....	15
8.1 <i>Sitio de colecta.....</i>	15
8.2 <i>Colecta y almacenamiento.....</i>	16
8.3 <i>Reconocimiento de microorganismos y determinación taxonómica.....</i>	17
8.3.1 <i>Reconocimiento de microorganismos: Pruebas de laboratorio.....</i>	17
8.3.2 <i>Determinación taxonómica: Caracterización molecular.....</i>	20
8.3.3 <i>Determinación taxonómica: Caracterización morfológica.....</i>	22
8.4 <i>Descripción de sintomatología.....</i>	22
8.5 <i>Pruebas de hipersensibilidad y patogenicidad bacteriana.....</i>	22

8.6 Evaluación de la variable sombra	24
8.7 Análisis estadístico.....	24
9. Resultados y discusión	25
9.1 Reconocimiento de microorganismos y determinación taxonómica.....	25
9.1.1 Reconocimiento de microorganismos: Pruebas de laboratorio.....	25
9.1.2 Determinación taxonómica: Caracterización molecular	34
9.1.3 Determinación taxonómica: Caracterización morfológica	35
9.2 Descripción de sintomatología	37
Pudrición blanda en <i>Agave montana</i>	37
Tizón de la penca de agave en <i>Agave montana</i>	39
9.3 Pruebas de hipersensibilidad y patogenicidad bacteriana	41
9.4 Evaluación de la variable sombra en la incidencia de <i>Dothistroma</i> <i>septosporum</i>	50
10. Conclusiones.....	52
11. Literatura consultada.....	53
12. Anexos	65

Índice de cuadros y figuras

Cuadro 1. Cebadores o primers utilizados para la amplificación de las secuencias.	20
Cuadro 2. Resultados de las pruebas realizadas a las bacterias aisladas.	31
Cuadro 3. Resultados de la búsqueda en BLASTn para secuencia parcial del gen 16S rRNA para bacterias y la región del gen LSU rRNA para el hongo, aislados obtenidos de <i>A. montana</i>	34
Figura 1. Colecta del material enfermo. a, b) E1 con pudrición, c) E2 lesiones cloróticas con protuberancias rojizas.	16
Figura 2. Arreglo de cámaras húmedas E1	18
Figura 3. Ruta seguida para la caracterización de las bacterias aisladas. Tomado de Schaad et al. (2001).	19
Figura 4. Representación de cámaras húmedas con y sin recubrimiento, a) temperatura ambiente de laboratorio, b) temperatura de refrigerador.	20
Figura 5. Ejemplificación de a) 10 plantas inoculadas y 1 testigo en bolsa plástica haciendo la función de cámara húmeda, b) forma de medición de la lesión.	244
Figura 6. <i>Scyphophorus acupunctatus</i> en agave, a) Galerías en cogollo de <i>A. montana</i> (G), adulto de <i>Scyphophorus acupunctatus</i> sobre material vegetal (S); b) ejemplares del picudo in situ, entre pencas con pudrición; c) Montaje de <i>S. acunpunctatus</i>	26
Figura 7. E. Fluido bacteriano presente sobre material vegetal en cámara húmeda, observado bajo microscopio de disección.	27
Figura 8. Colonias de las bacterias aisladas en agar nutritivo después de 24 horas, a,b) E1ID B1 ; c) E1ID B2	28
Figura 9. Tinción Gram en la bacteria E1ID B1 . Bacilos rosados, Gram (–), observado bajo microscopio a 100X.	29
Figura 10. Reacción de E1ID B2 , positivo a KOH 2%.	29

Figura 11. Resultados de la prueba en medio OF. De izquierda a derecha: control, con tapón de algodón, sellado con parafina.	30
Figura 12. Bacterias aisladas en medio YDC.	31
Figura 13. a) Picnidios agrupados en estroma, b) masa de conidios hialinos aglomerados dentro del picnidio, c) masa de conidios rosados sobre estromas maduros, d) setas oscuras en corte transversal de picnidio.	33
Figura 14. Ejemplares adultos de más de 5 años de edad de <i>A. montana</i> con síntomas de pudrición bacteriana, a) encontrado en campo, totalmente muerto con presencia del picudo del agave, b) con pudrición basal en hojas.. ... ¡Error!	
Marcador no definido.	
Figura 15. a) Sintomatología del Tizón de la penca por <i>D. septosporum</i> en <i>A. montana</i> , b) Estromas rojizos en halo clorótico, de 4 cm de diámetro.....	40
Figura 16. Prueba de hipersensibilidad en <i>A. vera</i> . a, b) Punciones con exudado en el exterior de la hoja por la bacteria y actividad bacteriana dentro de la lesión por la bacteria E1ID B1	42
Figura 17. Respuesta hipersensibilidad en <i>A. tequilana</i> . Bacteria E1ID B1 , a) arrugamiento en el envés de la hoja, b) hundimiento y escurrimiento en haz de la hoja; bacteria E1ID B2 c) arrugamiento en envés de la hoja, d) escurrimiento en haz de la hoja.....	43
Figura 18. Evolución de los síntomas a los 7 días después de la inoculación en <i>A. tequilana</i> . a, b) envés y haz de la hoja con necrosamiento con la bacteria E1ID B1 ; c, d) envés con deformación y haz de la hoja escurrimiento con bacteria E1ID B2	43
Figura 19. Punción negruzca en hoja de <i>A. montana</i> causada por la bacteria E1ID B1 Chr	44
Figura 20. Punción con bacteria E1ID B1 Chr en hoja de <i>A. tequilana</i> , a) envés con halo clorótico, b) haz con ligera supuración.	45
Figura 21. a) Punción con bacteria E1ID B1 Chr en hoja de <i>A. angustifolia</i> , supuración y halo clorótico, b) hoja de testigo con punción, herida casi cicatrizada.....	45

Figura 22. Grado de patogenicidad de *Chryseobacterium* sp. entre las tres especies de agave. Las letras indican las diferencias entre medias usando la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p \leq 0.05$). 46

Figura 23. Vista interna de lesión en corte transversal. Hoja de *A. montana*, a) lesión en hoja control; b) crecimiento vertical de la lesión y necrosamiento con **E1ID B1 Chr.**; c) crecimiento alrededor de la punción en hoja de *A. angustifolia* con **E1ID B1 Chr.**; d) crecimiento vertical y horizontal además de notoria coloración rojiza en la lesión, en hoja de *A. tequilana* con **E1ID B1 Chr.**..... 47

Figura 24. Vista interna de lesión en corte transversal en hoja con **E1ID B2 Rao.** a) *A. montana*; b) *A. angustifolia*; c) *A. tequilana*..... 47

1. Introducción

Las especies de *Agave* en México, se han utilizado desde tiempos ancestrales para diferentes fines, aunque en la actualidad, debido a la alta cantidad de azúcares que contiene, el uso más popular que se les da es para elaborar bebidas alcohólicas tales como el pulque, el tequila y el mezcal (López et al., 2003; CONABIO, 2020).

Agave montana Villarreal que es una planta arrosetada, caracterizada por no presentar hijuelos rizomáticos, nativa de México que habita en bosques de pino-encino de la Sierra Madre Oriental. Coloquialmente se le conoce como “magüey chino” y sus usos van desde ornamental a alimenticios con un fuerte potencial como bebida destilada de agave (mezcal) (Obregón & Obregón, 2016; Vargas-Cruz, 2022). Por tanto, ante la creciente demanda del mezcal, tanto en México como en el extranjero, es de suma importancia la generación de conocimiento de la fisiología, fenología e inclusive de las plagas y enfermedades que inciden en el *Agave montana* para un eficiente manejo de cultivo.

Las plagas como el picudo del agave (*Scyphophorus acupunctatus*), el escarabajo rinoceronte (*Strategus aloeus*) (Langarica Rivera et al., 2024), y enfermedades causadas por *Erwinia* spp. en *Agave tequilana* o *Nectrina miltina* en *Agave cupreata*, por mencionar algunas, suelen cobrar relevancia cuando impiden el desarrollo óptimo de la planta y por ende generan cambios en los ecosistemas además de pérdidas cuantitativas significativas en el sector económico agrícola. Por tanto, es de esperarse que con los cambios derivados del antropoceno, tales como el cambio climático y las propias características de los microorganismos, las enfermedades, en estas y en otras tantas plantas, cambien la manera en la que se dispersan, los huéspedes que infectan y la severidad con la que atacan según la región geográfica y el ecosistema en cuestión (Cox-Tamay & Heredia-Campos, 2020).

Actualmente en la localidad de Chavarrías de la Sierra El Doctor en el municipio de Cadereyta, Querétaro, el interés por las plantas nativas, en especial *Agave*

montana, ha ido creciendo. Sin embargo, la información sobre dicha especie es muy poca y no existe ningún trabajo que documente patógenos presentes en maguey chino por lo cual la presente investigación, al ser la primera de su tipo, contribuye significativamente a la generación de conocimiento sobre *A. montana*.

2. Marco teórico

2.1 Generalidades de las enfermedades en plantas

La enfermedad en las plantas es la serie de respuestas invisibles y visibles de las células y tejidos vegetales en respuesta a un organismo patógeno o factor ambiental que resultan en cambios adversos en la forma, función o integridad de la planta y pueden conducir a una alteración parcial de la misma, deterioro, e incluso muerte total o de algunas de sus partes (Oliver, 2024).

Por su presencia, las enfermedades en plantas destinadas a la alimentación impiden el crecimiento y desarrollo óptimo, e incluso reducen gran parte de su producción; bajan la calidad del producto, limitan la disponibilidad de alimentos y materias primas, además, los productos vegetales enfermos a veces pueden ser tóxicos y no aptos para el consumo. Por otra parte, algunas enfermedades pueden acabar con especies enteras de plantas que llegan a alterar la belleza y el paisaje de nuestro entorno (SIAP, 2016; Oliver, 2024).

Las plantas, ya sean cultivadas o silvestres, crecen y se desarrollan correctamente siempre y cuando el suelo les proporcione suficientes nutrientes y humedad, tengan cantidad suficiente de luz en sus hojas y la temperatura se mantenga dentro de un cierto rango “normal”. Sin embargo, las plantas al igual que nosotros los seres humanos, también se enferman. Dichas enfermedades suelen ser por factores que incluyen microorganismos patógenos tales como virus, bacterias, hongos, protozoos y nematodos, además de condiciones ambientales

desfavorables, como falta o exceso de nutrientes, humedad y luz, y la presencia de sustancias químicas tóxicas en el aire o el suelo (Oliver, 2024).

Estas enfermedades, por lo regular presentan sintomatologías muy variadas que se pueden clasificar en base a las características que se observen. Por ejemplo, la presencia de protuberancias anormales en alguna parte de la planta se le da el nombre de agallas; a las manchas oscuras con lesiones hundidas se le conoce como antracnosis; a la muerte de la planta que va desde lo apical a lo basal se le denomina muerte regresiva; a la producción y acumulación de savia en superficies de la planta se le documenta como gomosis; a la maceración y colapso de los tejidos vegetales se le llama pudrición blanda o seca (Oliver, 2024; Ormeño-Villajos, 2023).

También se les suele clasificar según el órgano de la planta que afectan (enfermedades de la raíz, enfermedades del tallo, enfermedades del follaje) o según los tipos de plantas afectados (enfermedades de los cultivos, enfermedades de los vegetales, enfermedades del césped, etc.). Otro criterio útil para agrupar enfermedades de origen microbiano es el tipo de patógeno que causa la enfermedad, pues el conocerlo nos puede indicar la causa del origen de la enfermedad y por consiguiente el probable desarrollo y propagación de esta, además de posibles medidas de control (Oliver, 2024; Ormeño-Villajos, 2023).

Los patógenos microbianos de las plantas pueden causar signos macroscópicos distintos que pueden observarse a simple vista, tanto internos como externos en la mayoría de los casos y, por tanto, estas enfermedades pueden separarse de los problemas causados por plagas de insectos o condiciones ambientales adversas o contaminantes industriales inyectados en la atmósfera (Narayanasamy, 2011; Butter, 2018).

La diseminación de los patógenos, causantes de enfermedades en plantas, se produce a través de procesos tanto naturales como antropogénicos. Sin embargo estos últimos han facilitado su diseminación en gran medida durante las últimas décadas con el rápido crecimiento demográfico, la globalización, la importación de productos vegetales, la introducción de especies exóticas e incluso el cambio

climático con aumentos en la temperatura, precipitación y gases de efecto invernadero, que han provocado una afectación enorme en la manera en la que inciden las enfermedades, la especificidad del huésped y la severidad con la que atacan en las plantas según el patosistema y la región geográfica (CIPF, 2021; Cox-Tamay y Heredia-Campos, 2020; Jiménez- Díaz, 2008; Hamada y Ghini, 2011; Jiménez-Díaz, 2017; Elad & Pertot, 2014).

El conocimiento de los patógenos que inciden en especies silvestres, es de suma importancia para entender a mayor profundidad las dinámicas y/o interacciones existentes dentro de una población e incluso la sanidad de un ecosistema.

Las enfermedades, los insectos plaga y las malezas en conjunto interfieren anualmente con la producción o destruyen entre el 31 y el 42% de todos los cultivos producidos en todo el mundo. Se ha calculado que del promedio de 36,5% de las pérdidas totales, el 14,1% son causados por enfermedades, el 10,2% por insectos y el 12,2% por malezas (Oliver, 2024).

Los principales problemas fitosanitarios y epidemiológicos en México son los insectos, siendo estos los principales vectores portadores de enfermedades, mientras que las bacterias, hongos, virus y malezas son potencialmente un riesgo para la agricultura nacional (Galindo-Mendoza, 2011).

2.2 Diagnostico e identificación de enfermedades vegetales

La detección de patógenos de plantas y el diagnóstico de enfermedades son procesos inseparables, los efectos de un proceso complementan al otro y dan como resultado una identificación confiable del agente causante de la enfermedad.

El diagnóstico de la enfermedad se basa en una serie de pasos que incluyen examinación visual en busca de síntomas y signos en el material enfermo; revisión de bibliografía en relación con la planta huésped y posibles enfermedades; análisis de la muestra en busca de la presencia de esporas o formación de cuerpos fructíferos, exudado (color, consistencia), presencia de insectos e incluso daño

mecánico; montaje para observación bajo microscopio óptico en el cual se puede hacer uso de técnicas específicas como tinciones; además, ensayos más especializados como incubación del material vegetal en cámaras húmedas que promueve la expresión de los signos; aislamiento en medios de cultivos generales, selectivos o diferenciales; utilización de técnicas serológicas como ELISA; identificación del ADN (ácido desoxirribonucleico) con la técnica de PCR; pruebas de patogenicidad siguiendo los postulados enunciados por Robert Koch en el siglo XIX, que sirve esencialmente para reconocer el patógeno primario causante de la enfermedad, método que involucra la inoculación de plantas sanas con el organismo aislado, importante para aceptar los resultados del diagnóstico de nuevas enfermedades y probar la patogenicidad de los microorganismos aislados de los tejidos infectados, especialmente si el organismo no ha sido documentado previamente como fitopatógeno de un huésped determinado (Ormeño Villajos, 2023; Riley et al., 2002; Heard & West, 2014).

Los hongos tienen características estructurales más elaboradas y fueron los primeros en demostrarse como causantes de enfermedades en plantas. Los hongos patógenos tienen talos bien desarrollados que consisten en hifas, además de estructuras reproductivas asexuales y sexuales. Los métodos convencionales para su detección dependen del aislamiento del patógeno fúngico putativo o de un medio nutritivo adecuado, el examen microscópico de las esporas y las estructuras portadoras de las mismas pues son características morfológicas importantes en la identificación de categorías taxonómicas (Strange, 2003; Narayanasamy, 2011).

Los patógenos bacterianos, pueden infectar varias estructuras vegetales, desde plántulas hasta etapas maduras en condiciones de campo, así como también después de la cosecha y postcosecha. El diagnóstico de estas puede basarse, en un inicio, en el cuadro general de síntomas que difiere de las enfermedades causadas por patógenos virales y fúngicos. La ausencia de cualquier tipo de esporas o estructuras portadoras de esporas en la superficie de la planta y la falla en la esporulación cuando los tejidos infectados se incuban en una cámara

húmeda pueden indicar que la enfermedad bajo investigación puede no deberse a un hongo patógeno (Narayanasamy, 2011).

La presencia de áreas empapadas de agua alrededor de las lesiones en las hojas y tallos infectados y el exudado bacteriano de los extremos cortados de los tallos o pecíolos de las plantas infectadas es una característica común de las enfermedades bacterianas. La ausencia de las características antes mencionadas puede constituir la base para pensar en un virus/viroide como posible causante de la enfermedad (Narayanasamy, 2011).

Se determina la morfología de las colonias de los cultivos bacterianos aislados en los medios nutritivos y las características de las células bacterianas y, en dado caso, se registran las variaciones. Sin embargo, estas características suelen no ser muy variables dentro de una especie morfológica y, por tanto, la identificación de especies, variedades o cepas debe lograrse mediante el empleo de técnicas bioquímicas/fisiológicas así como las pruebas basadas en las características inmunológicas y genómicas de los ácidos nucleicos ya que son más eficientes y fiables para la detección e identificación de variedades y cepas dentro de una especie bacteriana (Strange, 2003; Narayanasamy, 2011).

3. Especie de estudio

3.1 Género *Agave*

Las plantas del genero *Agave*, coloquialmente llamados magueyes, pertenecen a la familia botánica Asparagaceae, subfamilia Agavoideae (APG, 2016) que es endémica de América y la cual se distribuye desde el sur de Canadá, México, Centroamérica, norte de Sudamérica (siguiendo principalmente la cadena montañosa de los Andes hasta Bolivia y Paraguay) e islas del Caribe (García-Mendoza & Galván-Villanueva, 1995). Esta familia está formada por un grupo de plantas con o sin tallos aparentes, con hojas suculentas, coriáceas o herbáceas,

en rosetas, con flores bisexuales y semillas de color negro (Magallán-Hernández & Hernández-Sandoval, 2000).

Se ha determinado la presencia de cerca de 261 especies en la subfamilia Agavoideae en México, correspondientes a nueve géneros, y que, entre ellos, se encuentra *Agave* (García-Mendoza, 2011) el cual se distribuye desde el nivel del mar hasta los 3400 msnm y se caracteriza por resistir a condiciones climáticas adversas que van desde climas secos y cálidos a húmedos y fríos. Estas plantas pueden ser perenes o multianuales de hojas fibrosas o carnosas con una sola espina terminal y están dispuestas en forma de roseta. Se han descrito cerca de 226 especies y de las cuales 159 son nativas a México (Vázquez-García et al., 2022; García-Mendoza, 2011).

Los agaves son especies consideradas de suma importancia en muchas de las regiones de México por su abundancia y servicios que ofrecen a otras especies. Su domesticación y diversificación fueron claves para que el maguey se convirtiera en un emblema cultural en nuestro país, pues su aprovechamiento data desde tiempos ancestrales y ha trascendido hasta la actualidad por su versatilidad de usos como, por ejemplo, por su porte de gran tamaño para cercas vivas y de ornato (*Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck o *Agave americana* L.); como fuente de fibra y material de construcción (*Agave fourcroydes* Lem., *Agave lechuguilla* Tor. y *Agave funkiana* K. Koch & C. D. Bouché), para forraje (*A. salmiana*); como fuente de alimento haciendo uso del escapo floral, las flores mismas y los frutos (*Agave* spp.) (García-Mendoza, 2007; Jacques-Hernández & Salazar Bravo, 2009; Colunga-GarcíaMarín et al., 2017).

Los magueyes al ser ricos en azúcares, toman más relevancia al ser la materia prima de derivados como el tequila, el mezcal y el pulque, bebidas alcohólicas que se distinguen por sus sabores y aromas. En la producción del tequila únicamente se utiliza la especie *Agave tequilana* Weber var. azul mientras que, para la elaboración del pulque o mezcal, va cambiando la especie de *Agave* utilizada dependiendo de la región geográfica del país. Un ejemplo es en Oaxaca, estado donde se trabaja en mayor escala el mezcal, se utiliza con más frecuencia el

“maguey espadín” *Agave angustifolia* Haw. y en menor medida *A. potatorum* Zucc. En estados como Guerrero o Michoacán es prevalente *A. cupreata* Trel. & A. Berger, mientras que en comunidades del sur de Jalisco los destilados de mezcal son preparados con diferentes variedades locales de *A. angustifolia* y *A. rhodacantha* Trel. (Cházaro, 2007; Zizumbo-Villarreal et al., 2012; Nápoles Álvarez et al., 2015; Martínez-Palacios et al., 2015). En Tamaulipas los productores de mezcal utilizan especies silvestres propias de la región como *Agave montium sancticaroli*, *A. funkiana* y *A. lophantha*, sin embargo, el uso de especies como *A. angustifolia* y *A. potatorum* también es frecuente (Hoz-Zavala & Nava-Diguero, 2017; Jacques-Hernández et al., 2007).

3.2 *Agave montana*

3.2.1 Distribución y descripción botánica

Agave montana, comúnmente conocido como maguey chino, es una planta arrosetada nativa de México que habita en bosques de pino-encino de la Sierra Madre Oriental y se distribuye en los estados de Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas y en el municipio de Cadereyta, Querétaro (Villarreal, 1996; Com. Pers. Magallán, 2024).

Se diferencia de otras especies por sus rosetas de aproximadamente 1.5 m de diámetro; numerosas hojas, de 85 a 115 por planta, de color verde amarillento con limbo casi aplanado; panículas ovadas más anchas cerca de la base, flores pequeñas con brácteas de borde dentado. Esta especie de agave no produce hijuelos rizomáticos (Villarreal, 1996).

3.2.2 Importancia ecológica, cultural y económica

Es muy probable que esta especie juegue un papel ecológico muy importante dentro de su ecosistema al igual que otras especies de *Agave* en donde su relación con otras especies, como los murciélagos es muy estrecha y sirven de alimentación y refugio para esta y otras especies. Por otra parte, el maguey chino, ha sido utilizada como ornamental por su simetría y contrastes de colores llamativos además de su adaptabilidad a veranos frescos e inviernos fríos y húmedos (Vargas Cruz, 2022; Treviño-Carreón et al., 2011).

En Rayones, municipio de Nuevo León, se ha documentado el uso de sus fibras (Salcedo-Martínez et al., 2010) y en la zona de la Sierra El Doctor en Cadereyta, aprovechan las flores tiernas del escapo como alimento. Al igual que otras especies de *Agave*, el maguey chino, se ha utilizado para la elaboración de pulque o aguamiel aunque en una escala muy local. Sin embargo, no fue hasta el año 2016 que se sacó al mercado un mezcal artesanal blanco 100% *Agave montana* considerada una edición limitada denominada “Mezcales únicos”. Dicho mezcal se caracterizó por su peculiar aroma y sabor único (Obregón & Obregón, 2016).

4. Antecedentes

4.1 Enfermedades en agaves

Diferentes enfermedades bacterianas y fúngicas han sido documentadas por afectar a especies del género *Agave* alrededor del mundo. Wang y colaboradores (2018), en una región de China donde se cultiva *Agave sisilana* para la extracción de fibra, aislaron e identificaron por características morfológicas los patógenos presentes en las plantaciones de sisal, dando como resultado la pudrición del tallo por *Aspergillus niger*, la antracnosis por *Colletotrichum gloeosporioides* y la

mancha foliar por *Alternaria alternata*; patógenos que afectan la productividad y la calidad en las zonas productoras.

Araujo et al. (2021), aislaron en medio de cultivo PDA, fragmentos de hojas de *Agave angustifolia* con manchas color marrón a marrón pálido en el margen de la hoja, durante seis días a 26°C con fotoperiodo de 12 horas; y, en base a la identificación molecular, el patógeno aislado fue *Colletotrichum agaves*, siendo esta la primera vez que se documenta en Brasil como causante de antracnosis en *A. angustifolia*, planta frecuentemente utilizada como ornamental.

Se han documentado diversos patógenos causantes de enfermedad para ciertas especies del género *Agave* en México que, al ser plantas con muchas implicaciones sociales, económicas y culturales en el país, han sido ampliamente estudiadas.

Díaz-Plaza (1984), hizo colectas de las enfermedades más importantes para el henequén en el estado de Yucatán, en donde obtuvieron muestras de hojas con un aparente daño. Para probar la patogenicidad del microorganismo aislado se siguieron los postulados de Koch y el método de inoculación fue por inyección, asperjado de esporas y colocación del cultivo con el patógeno sobre el tejido vegetal. Los resultados enuncian a *Cercospora* sp. como la responsable de la secadera del varejón y la mancha concéntrica en la hoja; *Erwinia* sp. como la causante de la punta seca o gomosis, y *Fusarium* sp. como responsable de la pudrición el cogollo, siendo todas estas las enfermedades que más causan daño al cultivo del *Agave fourcroydes*.

Se han documentado diversos patógenos importantes para distintas enfermedades de interés agrícola en *A. tequilana* var. azul. Jiménez-Hidalgo et al. (2004) probaron la patogenicidad de los microorganismos aislados de hojas de *A. tequilana* que presentaban pudrición blanda, en diversos cultivos como chile morrón, jitomate, papa y pepino en los que después de las 72 horas de inoculación la bacteria identificada como *Erwinia cacticida*, fue capaz de ocasionar pudrición blanda. Estos autores sugieren que *E. cacticida* es la bacteria más virulenta, pero no la única, causante de la enfermedad en agave azul.

Ayala-Escobar et al. (2005), por medio de ensayos de patogenicidad en plantas de seis meses de edad, demostró a *Cercospora agavicola* como la causante de la mancha foliar y necrosis en Pénjamo, Guanajuato. Se inocularon 10 hojas, a cinco de ellas se les hizo una herida con un palillo estéril y las otras cinco sin herida, en un total de 6 plantas. Se dejaron en un invernadero hasta que los signos de mancha foliar y necrosis se desarrollaron.

Ibarra-Medina (2005), encontró a *Aspergillus* sp. como el agente causal de anillo rojo a través de la prueba de patogenicidad en planta de *A. tequilana*, la cual consistió en la realización de 5 tratamientos. Cada tratamiento contenía un patógeno previamente aislado y agua bidestilada estéril que fueron inoculados por medio de aspersión manual en toda la planta para luego tapar con bolsa plástica húmeda durante 72 horas bajo invernadero. Los resultados demostraron que el anillo rojo no es causado por bacterias del género *Erwinia* sino por el hongo *Aspergillus* sp. quien mostro síntomas más parecidos a los encontrados.

Robles-Gómez (2006), confirmó mediante postulados de Koch lo dicho por Fucikovsky en 1999, que el agente causal de la pudrición negra en *A. tequilana* es el hongo *Thielaviopsis paradoxa*.

Cen-Caamal (2012), realizó un muestreo de plantas enfermas de *A. tequilana* con sintomatología de pudrición blanda y necrosis en cuatro localidades de Jalisco. Dichas plantas fueron procesadas en medio de cultivo B de King y se seleccionaron las bacterias que dieron positivo a hipersensibilidad en hojas de tabaco y/o pudrición en rodajas de papas. Posteriormente se realizaron pruebas de patogenicidad que resultaron positivas a la bacteria probada, de esta manera se comprobó que *Bacillus pumilus* es el agente causal de la pudrición del cogollo bajo las pruebas establecidas en dicho trabajo.

Morales-García et al. (2015) observaron la presencia de síntomas como lesiones errumpentes y roña, pencas rojizas y pudrición del cogollo en agave mezcalero (*Agave cupreata*) en una localidad de Michoacán. Además, determinaron el agente causal de dichos síntomas, siendo así la roña una antracnosis causada por *Nectria miltina*; las lesiones errumpentes a causa de *Alternaria tenuisissima*; de las pencas

que se tornaron rojizas se aisló *Fusarium oxysporum*, además de que en el síntoma de pudrición de cogollo se aislaron dos agentes causales, al hongo *Fusarium proliferatum* y a la bacteria *Erwinia carotovora*. Lo anterior se obtuvo mediante siembras en medios de cultivo seleccionados como PDA, además de la ayuda de claves taxonómicas y análisis de ADN.

Cabrera-Huerta et al. (2019), documentó por primera vez a *Dickeya chrysanthemi* como agente causal de la marchitez bacteriana en *A. cupreata*; aislada de plantas de entre 4 y 8 meses de edad en viveros comerciales del estado de Guerrero, dichas plantas presentaban pudrición blanda en hojas. Se realizaron inoculaciones en hojas que a las 24 horas empezaron a aparecer los síntomas y a las 72 horas la muerte total por pudrición blanda.

Palemón-Alberto et al. (2021), observaron en el estado de Guerrero una enfermedad que afecta seriamente a *A. angustifolia* la cual consiste en síntomas iniciales como pudrición blanda de la yema y aparición de un exudado abundante desde la parte apical hasta la base de la planta. Además, en infecciones más severas mostraron maceración de la yema y por consiguiente la muerte.

Se hicieron aislamientos en medio nutritivo en donde después de 48 horas de incubación se mostraron colonias amarillentas siendo estas Gram-negativas. Los aislados bacterianos fueron identificados por amplificación de PCR y secuenciación del gen 16S rRNA parcial. Las secuencias fueron depositadas en GenBank donde el microorganismo mostró ser *Pantoea dispersa* siendo así el primer reporte para *A. angustifolia* en México.

Hernández-José et al. (2023), muestrearon plantas de *A. salmiana* en el estado de Hidalgo que presentaban “negrilla”, manchas foliares negras que se asemeja al hollín. Los resultados arrojaron el aislamiento e identificación de *Curvularia lunata*, hongo fitopatógeno atípico para *A. salmiana*.

Bailón-Ortiz & Amábilis-Sánchez (2024), realizaron un diagnóstico fitosanitario de la pudrición seca de *A. potatorum* en la etapa de vivero en una localidad del estado de Oaxaca, e identificaron los patógenos aislados en el material colectado

con bases morfológicas siendo así *Fusarium* spp. y *Alternaria* spp. como los agentes causales asociados a la enfermedad.

5. Justificación

La producción nacional de mezcal ha ido en aumento en los últimos 10 años, pasando de menos de 1 millón de litros a casi 13 millones de litros al año. Este incremento en la producción es debido al interés tanto nacional como mundial, en donde, los consumidores buscan productos con diversidad organoléptica, artesanales, que frecuentemente provienen de agave silvestre (COMERCAM, 2024).

Los procesos actuales de producción de mezcal artesanal y ancestral requieren de enormes cantidades de agave para producir pequeños volúmenes, debido a las pérdidas en cada etapa del proceso de producción. Esto ejerce una presión excesiva sobre las poblaciones silvestres de agave que fragiliza la biodiversidad, y al estar sobreexplotados, su disponibilidad ha disminuido paulatinamente en algunas regiones. A esto se suma la extracción de madera que se utiliza en la cadena de producción, fomentando la deforestación a gran escala en diferentes zonas de México (Valiente-Banuet, 2023; Arellano-Plaza et al., 2022).

Este fenómeno parece asemejarse en lo ocurrido con la expansión y modernización de la producción del tequila que inició en el siglo XIX, promoviendo los monocultivos y destruyendo por completo extensas áreas de bosque natural (Llamada-Ibarra, 2024).

La sobreexplotación de los agaves, ante la demanda, terminó extinguiendo las poblaciones silvestres de *A. tequilana*, por lo que la producción se tuvo que llevar a cabo a través de clones, hijuelos obtenidos de plantas madre y mediante técnicas de cultivo *in vitro* en condiciones de laboratorio. Se utilizaron aquellos clones con alto rendimiento agronómico para plantar monocultivos, lo que redujo en gran medida la diversidad genética, mermando la capacidad para tolerar

cambios ambientales y el ataque de patógenos. Con el tiempo, el agotamiento de la fertilidad en los suelos y el aumento de plagas y enfermedades, fomentaron el uso exacerbado de agroquímicos que modificaron las interacciones ecológicas existentes (Valiente-Banuet, 2023).

Es importante generar alternativas sostenibles en la cadena productiva, empezando por el cultivo, que permita la regeneración de los ecosistemas, la fertilidad de los suelos, fomente la diversidad genética y las interacciones naturales con otras especies como polinizadores, evitando así incidir en monocultivos que propician la baja capacidad de tolerancia ante los cambios ambientales, los ataques por patógenos y la degradación de los suelos.

Esta investigación cobra relevancia al ser *Agave montana* una especie de interés y relativamente nueva en el sector. Hoy en día no existe ningún registro de enfermedades o patógenos aislados que afecten a *A. montana* y mucho menos en la zona de estudio, en donde, los lugareños han mostrado un fuerte interés por preservar y aprovechar de una manera más eficiente este recurso natural.

El conocimiento de los patógenos que inciden en *Agave*, o plantas silvestres, es importante para conocer a mayor profundidad las dinámicas y/o interacciones existentes dentro de una población o ecosistema. Además, con esta información, se pueden tomar mejores decisiones en el manejo de cultivo.

6. Hipótesis

Los agentes patógenos asociados a *Agave montana* en la Sierra El Doctor, Querétaro, serán distintas a las documentadas para otras especies de agaves mezcaleros debido a su estado silvestre y a sus condiciones ecológicas específicas.

7. Objetivo general

Determinar la identidad de los agentes causales de las principales enfermedades encontradas en *Agave montana* en la localidad de Chavarrías, Cadereyta, Querétaro.

Objetivos específicos

- Reconocer la presencia de hongos o bacterias en el material vegetal colectado y determinar su identidad taxonómica de los patógenos de más relevancia en *Agave montana* colectado en la localidad de Chavarrías en la Sierra El Doctor, Cadereyta, Qro.
- Describir la sintomatología presente en plantas enfermas colectadas.
- Realizar prueba de hipersensibilidad y patogenicidad bacteriana.
- Evaluar la variable sombra en el agente fúngico encontrado.

8. Metodología

8.1 Sitio de colecta

El sitio de colecta se encuentra en la localidad de Chavarrías la cual se ubica en la Sierra El Doctor, al noroeste de la cabecera municipal de Cadereyta de Montes del estado de Querétaro. Presenta temperaturas que van desde los 30°C como máximas y 6°C como mínimas, además, precipitaciones promedio de los 68 mm anuales. Los tipos de vegetación predominantes son bosque de *Juniperus*, bosque mixto (*Pinus-Quercus* o *Quercus-Pinus*) y bosque de *Abies*.

Las colectas del material enfermo se efectuaron en marzo del 2023, cerca del poblado de Chavarrías en un predio con coordenadas 20° 47' 44.65" N 99° 34' 04.50" W, a 2854 msnm (Garmin®). El material vegetal se encontraba mayormente

sombreado por especies arbóreas, suelo rocoso con hojarasca y humedad alta en bosque conservado con cultivo de *A. salmiana* en zonas aledañas al bosque.

8.2 Colecta y almacenamiento

Se observaron y colectaron síntomas de pudrición blanda en dos ejemplares adultos con fuste que se encontraban contiguos en un claro de bosque, a la colecta se le denominó E1. Los ejemplares presentaban pudrición con necrosis en hojas basales y tallo floral, con secciones aparentemente sanas y se observó presencia de insectos conocidos como picudos, de color negro sobre las hojas. Por otra parte, se colectaron un total de 3 hojas con sintomatología completamente diferente a las anteriores el cual se identificó como E2 (Figura 1).



Figura 2. Colecta del material enfermo. a, b) E1 con pudrición, c) E2 lesiones cloróticas con protuberancias rojizas.

El material vegetal obtenido fue colectado con navaja previamente desinfectada entre cada ejemplar, asimismo, se resguardaron individualmente en bolsa de papel estraza y bolsa de plástico negra para su transporte al laboratorio de Patología Vegetal de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro, para su procesamiento.

8.3 Reconocimiento de microorganismos y determinación taxonómica

8.3.1 Pruebas de laboratorio

Se llevaron a cabo dos metodologías diferentes con base a lo observado en campo para las muestras colectadas, dado que las muestras E1 presentaban pudrición blanda, mientras que E2 presentaba lesiones errumpentes en las hojas.

El material vegetal E1 se revisó en laboratorio con guantes de látex para evitar alguna contaminación, se tomó nota sobre la sintomatología y se cortó en rodajas con una navaja previamente esterilizada. Se observaron cavidades que presentaron insectos picudos negros semejantes a los vistos en campo sobre uno de los ejemplares con pudrición. Se colocó cinco individuos en tubos de microcentrífuga individuales de 2 ml, estériles con agua destilada estéril; se lavaron un total de 3 veces para luego inocular 1 μ l, del último enjuague, en placas de agar nutritivo. Se dejó en incubación a temperatura ambiente durante 48 horas, y se les identificó como ID. Los insectos restantes se resguardaron en alcohol al 70% para su montaje e identificación.

Posteriormente, en las rodajas realizadas se seleccionaron aquellas zonas de coloración rojiza y café cobrizo con transición a tejido aparentemente sano, para luego cortarlas en 15 trozos de no más de 3 cm que fueron desinfectados con hipoclorito al 2% durante 5 minutos y se lavaron con agua destilada estéril dos veces.

Las muestras se utilizaron para armar cámaras húmedas (Muñoz et al., 2020) y de esta manera inducir los signos, por lo que se requirió de papel filtro, agua destilada y cajas Petri de vidrio, todo previamente estéril antes de su uso. Se colocaron 5 trozos por cámara húmeda, obteniendo un total de 3 cámaras (Figura 2). Posteriormente se dejaron sellados con Parafilm® durante 5 días a temperatura ambiente).



Figura 2. Arreglo de cámaras húmedas E1.

Se revisaron las placas bajo microscopio de disección para observar la aparición de signos sobre las piezas. A partir de los fluidos bacterianos se tomó la muestra con asa bacteriológica y se estrió a un campo en placas con agar nutritivo (AN). Dichas placas se incubaron a temperatura ambiente durante 24 y 48 horas. Se seleccionaron las colonias con morfología similar y repetitivas en las placas de AN provenientes de CH E1, CH E2 e Insecto ID, para luego caracterizarlas mediante pruebas fisiológicas las cuales fueron seleccionadas según la guía de identificación de bacterias patogénicas en plantas de Schaad et al. (2001) como se muestra en la Figura 3; tinción Gram, prueba KOH, producción de pigmento fluorescente, prueba de oxidación/fermentación y medio no selectivo (YDC). La preparación de los medios y pruebas seleccionadas se encuentra en Anexo 1.

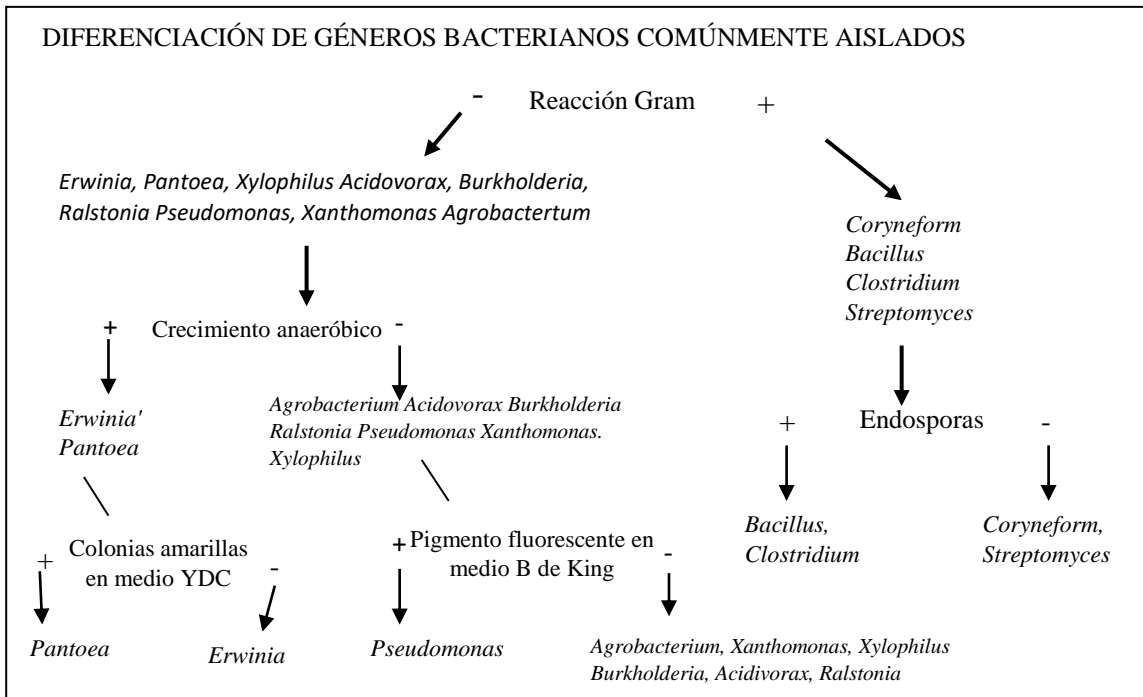


Figura 3. Ruta seguida para la caracterización de las bacterias aisladas. Tomado de Schaad et al., (2001).

Así también, con el material vegetal colectado de E2 se escogió la penca más completa para su herborización y preservación de las estructuras. Del material sobrante se analizaron las lesiones en microscopio de disección y se prepararon laminillas con medio de fijación semipermanentes CMCP9, que se analizaron bajo microscopio compuesto Leica® DM500, en los campos 40x y 100x. Por consecuencia, se prepararon placas con medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) en el cual se colocaron lesiones previamente desinfectadas con hipoclorito al 2%. Además, se realizaron cámaras húmedas aplicando tres variantes: oscuridad, humedad y temperatura para así tomar el tiempo que se tarda en inducir la esporulación de las estructuras reproductivas.

A una de las cámaras húmedas se envolvió en hoja de papel de tal manera que se impidiera cualquier paso de luz y a otra se le dejó libre de envoltorio, ambas se resguardaron a temperatura ambiente (26°C). Se hizo el mismo procedimiento para el otro par de cámara húmedas (con y sin envoltorio) y estas se mantuvieron

a una temperatura de 7°C (Figura 4). Se observaron bajo microscopio de disección cada 24 horas. El material que no se utilizó se resguardo bajo refrigeración para posteriores usos.

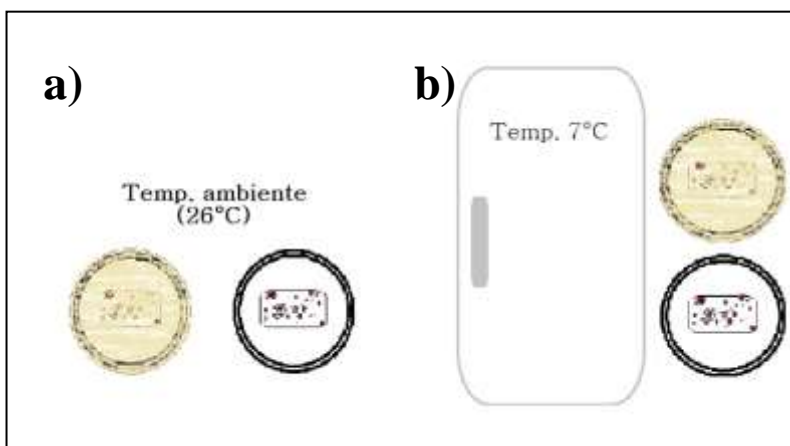


Figura 4. Representación de cámaras húmedas con y sin recubrimiento, a) temperatura ambiente de laboratorio, b) temperatura de refrigerador.

8.3.2 Caracterización molecular

Los aislamientos seleccionados, tanto de bacterias como del hongo, se mandaron al Laboratorio de microbiología para extracción de ADN y su posterior secuenciación por medio de la técnica PCR punto final para complementar la identificación de la identidad del patógeno en cuestión. Se utilizaron cebadores universales para cada caso (Cuadro 1).

Cuadro 1. Cebadores o primers utilizados para la amplificación de las secuencias.

Microorganismo	Primer	Región	Secuencia (5´-3´)
Bacteria	27F	16S	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG
	1492R	16S	TACGGYTACCTTGTTACGACTT
Hongo	LROR	LSU	ACCCGCTGAACTTAAGC
	LR5	LSU	TCCTGAGGGAACTTCG

Los productos amplificados se secuenciaron en el Laboratorio de Servicios Genómicos del LANGEBIO-CINVESTAV Irapuato. Una vez que se obtuvieron las secuencias depuradas, se compararon mediante el programa BLASTn (Zhang et al., 2000) con la base de datos GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI) para determinar identidad de taxones con base en similitud comparativa de secuencias, expresado en porcentaje de identidad. Se tomaron aquellos valores más altos para la aceptación del taxón.

Para la extracción de ADN de todos los aislados, se empleó el siguiente protocolo.

A un tubo con la muestra se le adicionó un volumen de 200 μL de TSNTE (Tritón x-100 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris pH=8 10 mM, EDTA 1mM), se añadieron perlas de vidrio estériles aproximadamente un volumen de 200 μL . Enseguida se adicionó un volumen de 300 μL de fenol-cloroformo (1:1) y se agitó en vortex por 3-4 min, posteriormente se adicionaron 200 μL de buffer TE (Tris pH=8 10 mM, EDTA 1 mM) y se mezcló por inversión con la mano. Se centrifugó en la microcentrífuga modelo Thermo SCIENTIFIC a 13,000 rpm por 8 min, se recuperó la fase acuosa y se añadió 1 mL de etanol frío al 100%, se mezcló por inversión el tubo y se incubó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 h. Pasado el tiempo de incubación se centrifugó a 13,000 rpm por 8 minutos y se descartó el sobrenadante.

La pastilla obtenida se suspendió en 400 μL de agua grado biología molecular (H_2O GBM), se agregaron 5 μL de RNAsa A (10 mg/mL^{-1}) y se incubó por 20 min a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Enseguida se adicionaron 10 μL de una solución de acetato de amonio 4 M, 1 mL de etanol al 100% y se mezcló por inversión, se incubó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos. Se centrifugó a 12,000 rpm por 8 min y se descartó nuevamente el sobrenadante. Se agregaron 400 μL de etanol al 70%, y se golpeteó el tubo para liberar la pastilla formada, se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min y se descartó el sobrenadante (Hoffman y Wiston, 1987).

El tubo se colocó invertido sobre una sanita para permitir que la pastilla de DNA se seque (10 min). Finalmente se adicionó (H_2O GBM) aproximadamente 80 μL . Una vez solubilizado el DNA se cuantificó en el Nanodrop[®] 2000 spectrophotometer con 2 μL para determinar su concentración y pureza. Se preparó una solución de

DNA a 25 ng/μL. Se realizó una electroforesis con 5 μL de muestra de DNA en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (50 μg) Lotfi & Soleimani, 2022).

8.3.3 Caracterización morfológica

Se hizo uso de los resultados obtenidos de las pruebas de laboratorio, de las claves taxonómicas de identificación morfológica para hongos imperfectos de Barnett & Hunter (1998), de la guía de identificación de bacterias patogénicas en plantas de Schaad et al. (2001) y de literatura especializada.

8.4 Descripción de sintomatología

Lo que se observó en campo junto con lo examinado en laboratorio y la literatura consultada, se llevó a cabo una descripción completa de la sintomatología presentada en el material de colecta.

8.5 Pruebas de hipersensibilidad y patogenicidad bacteriana

Se realizó una prueba de pudrición en tubérculo de papa con las bacterias aisladas de E1 para determinar la presencia de enzimas pectolíticas. Se utilizó tubérculo de papa en buenas condiciones fitosanitarias que se cortó en rodajas de aproximadamente 5 mm de ancho y se dejó un testigo. Se siguió el procedimiento de acuerdo con SENASICA (2020). Además, se utilizó planta de chile, *Aloe vera* y *Agave tequilana* para pruebas de susceptibilidad, en ese mismo orden. Para los tres casos se utilizaron plantas sanas y de buen porte, así también, las hojas a utilizar se limpiaron con hipoclorito al 0.5% y agua antes de la inoculación con

bacteria. En tanto a la inoculación, la aguja de disección que se empleó siempre se esterilizó bajo flama entre cada punción.

El caso de la planta de chile, las punciones fueron en hojas diferentes y sobre la nervadura principal del envés de la hoja. Para *Aloe vera* únicamente se utilizó una hoja en la cual se permitió un espacio de 1.5 cm aproximadamente entre cada punción. En ambos casos las plantas permanecieron en observación durante dos semanas bajo temperatura ambiente para luego ser examinadas.

Se realizaron punciones en el mes de julio en *Agave tequilana*, sobre el haz de las hojas intermedias de la roseta, independiente para cada inoculo. En un primer momento, la planta se dejó a temperatura y humedad ambiente y en un segundo momento se volvió a inocular en hojas diferentes y en esta ocasión se colocó una bolsa plástica transparente sobre la planta después de la inoculación para incidir temperatura y humedad.

Posteriormente se llevó a cabo la prueba de patogenicidad de la bacteria más representativa, una vez que se obtuvieron los ejemplares de *Agave montana*, además se escogieron dos especies más, *A. tequilana* y *A. angustifolia*, al ser de fácil acceso y de importancia agronómica. Se utilizaron 11 plantas visiblemente sanas de cada especie, en las cuales se efectuó una punción con inoculo en una sola hoja, a excepción del testigo el cual se realizó la punción sin inoculo. Se cubrieron todas las plantas con bolsa plástica transparente individualmente, antes del riego y luego de la inoculación. La toma de datos se realizó semanalmente durante un mes en donde se midió con vernier el tamaño de lesión en milímetros para posteriormente efectuar un análisis estadístico (Figura 5).

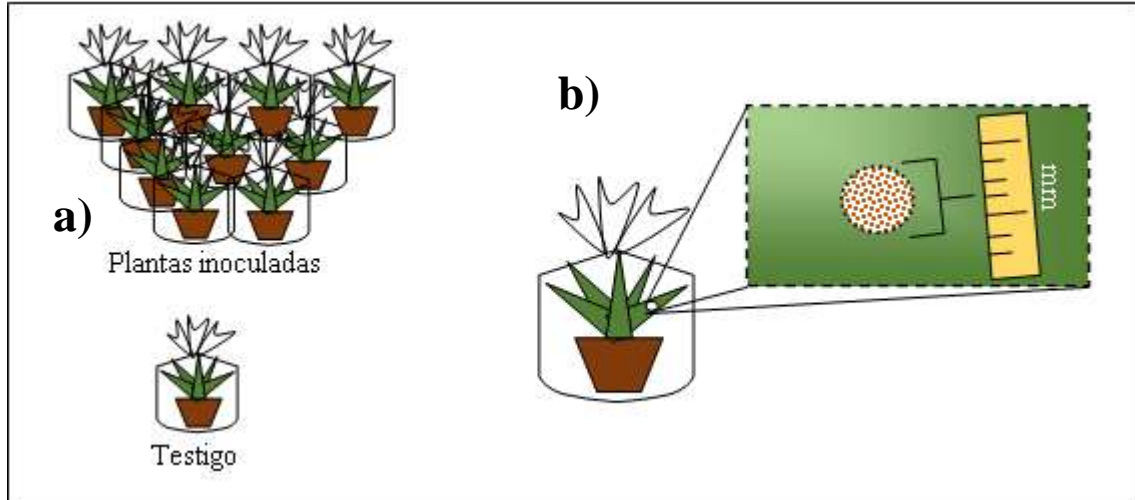


Figura 5. Ejemplificación de a) 10 plantas inoculadas y 1 testigo en bolsa plástica haciendo la función de cámara húmeda, b) forma de medición de la lesión.

8.6 Evaluación de la variable sombra

Se utilizó un densiómetro esférico Forest Densimeters® sobre plantas de *Agave montana* con la sintomatología de E2, 10 enfermas y 10 visiblemente sanas, en el sitio de estudio para tomar datos de cobertura o dosel. Dichos datos se almacenaron en una base de datos y se hizo un análisis estadístico para determinar si la incidencia de sombra sobre los agaves es significativa en relación a las sanas. Además, se tomó en consideración los resultados obtenidos de las cámaras húmedas realizadas en Pruebas de laboratorio.

8.7 Análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar para ambas colectas, E1 y E2, con una unidad experimental de 10 ejemplares. Se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA). Para la detección de diferencias entre los tratamientos se empleó la

prueba de Tukey con un nivel de significancia de $p \leq 0.05$, utilizando el paquete estadístico Past 4.03.

9. Resultados y discusión

9.1 Reconocimiento de microorganismos y determinación taxonómica

Los resultados arrojaron que los materiales colectados E1 son bacterias Gram (-) que se obtuvieron de los fluidos en las muestras colocadas en cámara húmeda, además de que las lesiones expedían un fuerte olor a fermento. Por otra parte, E2 presentó protuberancias que al tacto eran duras y al analizarse bajo microscopio de disección, dichas estructuras sobresalían de la epidermis de la hoja mostrando cada uno, un orificio que por lo general son el medio de expulsión de “esporas” de algunos hongos.

9.1.1 Reconocimiento de microorganismos: Pruebas de laboratorio

Colecta E1

Se determinó que los insectos hallados en los ejemplares de *A. montana* enfermos, pertenecieron a la especie *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal (Figura 6), comúnmente llamado picudo del agave, perteneciente a la familia Dryophthoridae, orden Coleoptera. Lo anterior en base a las guías de identificación de insectos (Triplehorn & Johnson, 2005) y la ficha técnica de SENASICA-DGSV (2016).

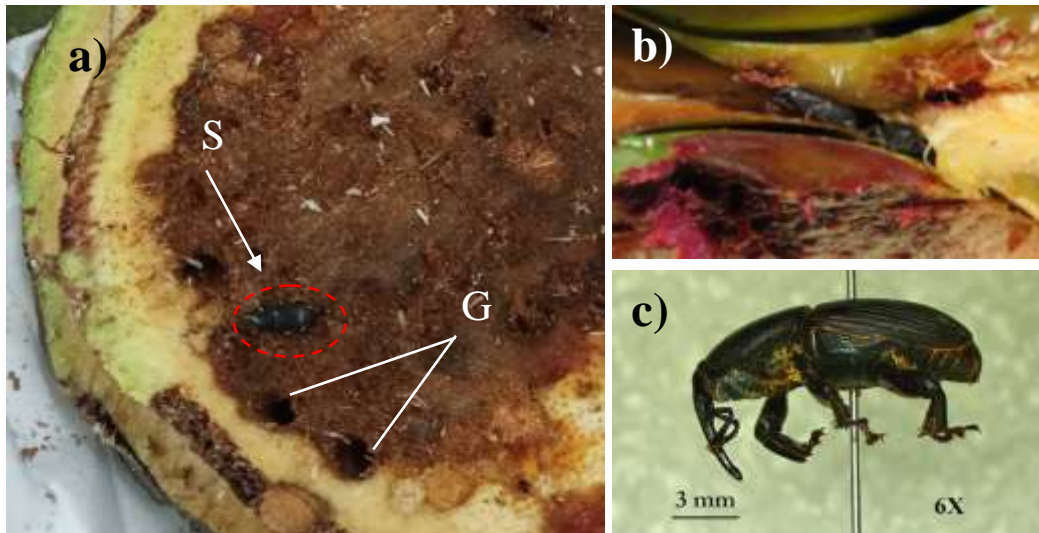


Figura 6. *Scyphophorus acupunctatus* en agave, a) Galerías en cogollo de *A. montana* (G), adulto de *Scyphophorus acupunctatus* sobre material vegetal (S); b) ejemplares del picudo *in situ*, entre pencas con pudrición; c) Montaje de *S. acupunctatus*.

Hoy en día, *Scyphophorus acupunctatus* se considera una plaga de importancia en México para plantas cultivadas y silvestres del género *Agave*, por las que presenta una especial preferencia (Cuervo-Parra et al, 2019). Los ejemplares del picudo del agave que se encontraron en *A. montana* provenían de plantas en la madurez con escapo floral y según Terán-Vargas & Azuara-Domínguez (2017), la incidencia de estos insectos aumenta cuando el maguey entra en la madurez a los 4 años o más dependiendo de la especie, puesto que es cuando más cantidad de azúcar se incrementa al acercarse la fase de reproducción.

Solís-Aguilar et al. (2001) mencionan que las larvas del picudo barrenan la base de las hojas y de la piña, en donde generan galerías rodeadas por una pudrición o necrosamiento de color rojo intenso, de la cual se han aislado bacterias, mismas que han sido encontradas en el aparato bucal, en el tracto digestivo o como en este caso, sobre el cuerpo del insecto. Se ha mencionado que la relación que existe entre *S. acupunctatus* y bacterias fitopatógenas, es muy estrecha pues

estos insectos requieren bacterias que puedan degradar los tejidos del agave y sean asimilables para ellos.

Cámaras húmedas

Después de los cinco días de incubación, sobre el material vegetal se observaron flujos de consistencia mucoide lechosa, lo cual se atribuye a fluidos bacterianos (Figura 7), lo que confirmó lo analizado previamente.



Figura 7. Fluido bacteriano presente sobre material vegetal en cámara húmeda, observado bajo microscopio de disección.

Aislamiento en Agar nutritivo

Después de las 24 y 48 horas de incubación de las placas, se reconocieron 4 bacterias de las cuales dos de ellas se aislaron nuevamente en agar nutritivo. **E1ID B1**.- de coloración naranja brillante, circular con bordes lisos; **E1ID B2**.- de coloración blanquecina brillante, circular con bordes lisos de diámetro de 0.6 mm (Figura 8).

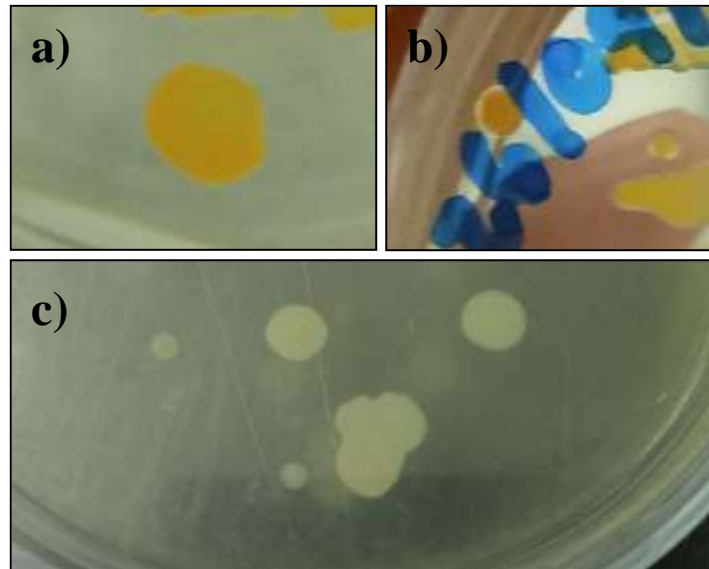


Figura 8. Colonias de las bacterias aisladas en agar nutritivo después de 24 horas, a,b) **E1ID B1**; c) **E1ID B2**.

El aislamiento **E1ID B1** y **E1ID B2** se reconocieron del material vegetal E1 y se empata con los aislados del cuerpo de individuos de *Scyphophorus acupunctatus* (ID) que se colectaron. Las otras dos bacterias aisladas fueron colonias morfológicamente muy diferentes y de menor frecuencia a las finalmente seleccionadas. Posiblemente se traten de fases de colonización de estas bacterias pues **E1ID B1** y **E1ID B2** fueron obtenidas de lesiones más necróticas mientras que las colonias descartadas se obtuvieron de lesiones menos necróticas y de tejido poco blando.

Tinción de GRAM

La primera prueba de caracterización que se realizó fue la tinción de Gram. La prueba arrojó presencia de bacilos rosados en todas las bacterias aisladas, que se tratan de bacterias Gram negativa (-) (Figura 9).



Figura 9. Tinción Gram en la bacteria **E1ID B1**. Bacilos rosados, Gram (-), observado bajo microscopio a 100X.

Prueba KOH

Al momento de hacer el levantamiento de asa, la bacteria denominada **E1ID B2** formó una especie de filamento transparente (Figura 10) que se mantenía por algunos segundos, al contrario de la bacteria denominada **E1ID B1** en la cual el hilo no era consistente. Lo anterior nos indicó que aquellas bacterias que reaccionaron al KOH 2% se trata de bacterias Gram (-) (Suslow et al., 1982).

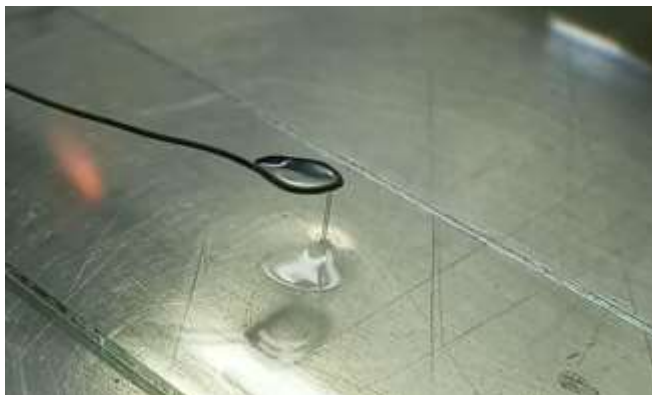


Figura 10. Reacción de **E1ID B2**, positivo a KOH 2%.

Prueba de fluorescencia en Agar B. King

Después de las 48 horas de inoculación recomendadas, ninguna de las bacterias presento pigmentación fluorescente luego de observarlas bajo luz normal y en oscuridad, bajo luz UV de longitud de onda (366 nm), por lo cual se descartó que alguna correspondiera al género *Pseudomonas*.

Prueba de crecimiento anaeróbico (Hugh and Leifson) Medio basal OF.

Los tubos con las bacterias **E1ID B1** y **E1ID B2** presentaron viraje amarillo en ambos tubos, cerrado y abierto, pasadas las 24 horas de reposo, dado el caso, se consideraron positivas a la fermentación de glucosa (Figura 11).

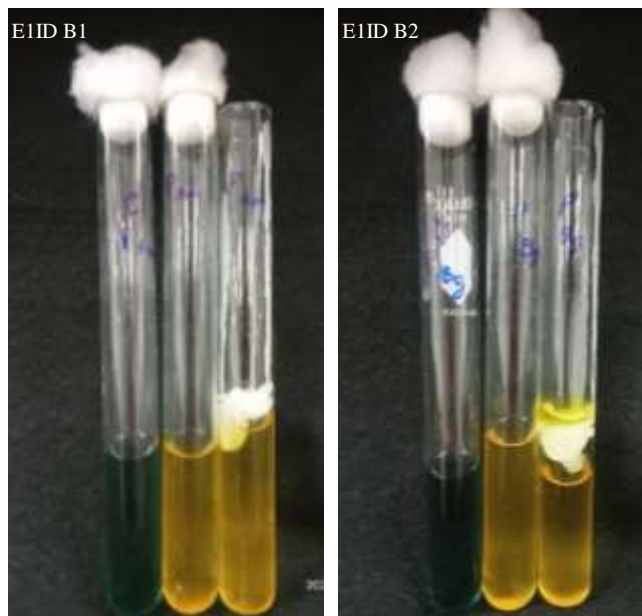


Figura 11. Resultados de la prueba en medio OF. De izquierda a derecha: control, con tapón de algodón, sellado con parafina.

Medio de crecimiento específico levadura-dextrosa-carbonato de calcio (YDC).

Las bacterias probadas dieron negativo al no presentar ninguna colonia de color amarillo en la prueba en medio YDC, en cambio, todas ellas mostraron colonias blancas (Figura 12). Según la guía de Schaad et al (2001), el resultado arroja al grupo de Enterobacterias en el cual se incluye al género *Erwinia*, documentado para pudrición blanda en *A. tequilana* (Jiménez-Hidalgo et al., 2004).

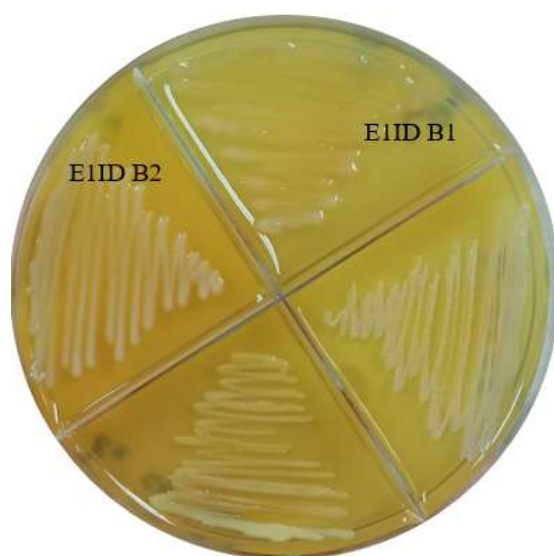


Figura 12. Bacterias aisladas en medio YDC.

Lo anteriormente expuesto en cuanto a pruebas bioquímicas y de medios selectivo se resume en la Cuadro 2, como parte de los resultados que se obtuvieron en el laboratorio.

Cuadro 2. Resultados de las pruebas realizadas a las bacterias aisladas.

Bacteria	Agar Nutritivo	Tinción GRAM	Prueba KOH	Agar B. King	Medio OF	Medio YDC
*E1ID B1	Colonias naranjas, redondas con bordes lisos	-	-	-	+	-

*E1ID B2	Colonias blancas, redondas y brillantes, bordes lisos, diámetro 0.6 mm	-	+	-	+	-
----------	--	---	---	---	---	---

*E1=ejemplar de donde se obtuvo el aislamiento; ID=cuerpo de insecto; B=bacteria; 1 y 2= número dado a cada aislamiento.

Colecta E2

Las estructuras observadas en un primer momento fueron picnidios aglomerados, con un notorio ostiolo en cada uno de ellos (Figura 13 a). En cortes transversales sobre laminilla, los conidios contenidos en el picnidio mostraban estar densamente agrupados (Figura 13 b). El aislamiento del microorganismo en PDA resultó difícil al contaminarse todos los aislamientos realizados. Por otro lado, el material vegetal resguardado en refrigeración, presentó una masa rosada sobre las lesiones estudiadas (Figura 13 c) luego de varios días.

Al momento de maduración, de acuerdo con la literatura y el manual de identificación, los picnidios expulsan una masa de conidios embebidos en una especie de mucilago que en este caso es de coloración rosa salmón y al contacto con el agua se vuelve hialina. Eventualmente los soros desarrollaron setas oscuras entre la masa de conidios (Figura 13 d). En base a las claves de identificación para hongos imperfectos y la descripción morfológica de EPPO (2015), el género encontrado es *Dothistroma*, el cual ha sido documentado hasta el momento para especies de la familia Pinaceae, principalmente *Pinus*.

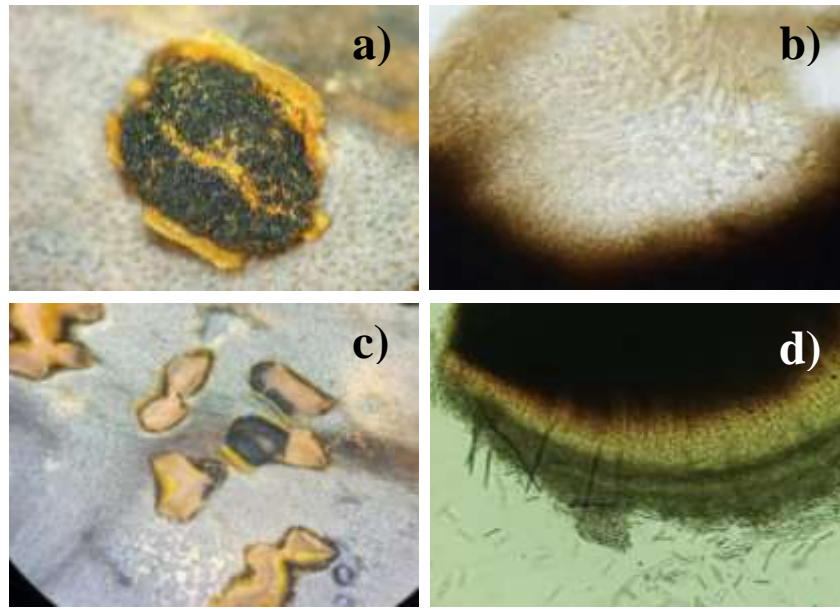


Figura 13. a) Picnidios agrupados en estroma, b) masa de conidios hialinos aglomerados dentro del picnidio, c) masa de conidios rosados sobre estromas maduros, d) setas oscuras en corte transversal de picnidio.

Puede haber diversos factores por los cuales los hongos fitopatógenos tengan más de un hospedero y que sean botánicamente diferentes entre sí como en este caso. Para que un hongo fitopatógeno llegue a ser \pm huésped de una especie de planta en específico, se necesita que haya una compatibilidad básica en donde se ven involucrados requerimientos fisiológicos y bioquímicos para colonizar y parasitar una planta en particular por un hongo determinado (Prell & Day, 2001).

Es indispensable que el hongo sobrepase la resistencia básica de esta planta e inclusive una segunda. Estos tipos de resistencia se refieren más que nada a un sistema complejo de sustancias químicas producidas por la planta que reconocen o no al agente exterior. Por tanto, el rango de huéspedes que puede llegar a tener un hongo está determinado por la posesión de los genes de patogenicidad apropiados y de su capacidad para superar cierta resistencia específica en la planta huésped mediante la mutación del patógeno (Prell & Day, 2001).

Se confirmaron las estructuras previamente analizadas en el microscopio en las cámaras húmedas, además, la expulsión de la masa conidios y micelio fueron más rápidas bajo condiciones de oscuridad, temperatura ambiente y humedad constante al contrario de oscuridad, humedad constante y frío donde si bien si hubo maduración y expulsión de conidios, no hubo una generación de micelio al día siete. Esto podría suponer la necesidad que tiene el hongo por temperaturas más cálidas que le permita un correcto desarrollo para su propagación.

Una hoja de un ejemplar de *A. montana* herborizado con la sintomatología característica de esta enfermedad se resguaró en el laboratorio de Patología Vegetal para futuras consultas (Anexo 2).

9.1.2 Determinación taxonómica: Caracterización molecular

Las secuencias depuradas (Anexo 3) de los patógenos de interés, se compararon con las depositadas en el GenBank del National Center For Biotechnology Information (NCBI), por medio del programa BLASTn (Zhang et al., 2000). Los resultados arrojaron que la bacteria **E1ID B1** se identificó como *Chryseobacterium* sp. mientras que la bacteria **E1ID B2** corresponde a la especie *Raoultella terrigena*. Por otra parte, la secuencia del hongo, de la muestra E2 tomada desde la lesión de la hoja, correspondió a *Dothistroma septosporum* (Cuadro 3).

Cuadro 3. Resultados de la búsqueda en BLASTn para secuencia parcial del gen 16S rRNA para bacterias y la región del gen LSU rRNA para el hongo, aislados obtenidos de *A. montana*.

Simbología del microorganismo aislado	Organismo más cercano comparado en GenBank (n° de accesoión)	% de similitud
E1ID B1	<i>Chryseobacterium</i> sp. (KX079857)	99.85%
	<i>Chryseobacterium tagetis</i> (MW386407)	99.20%
E1ID B2	<i>Raoultella terrigena</i> (KF040996)	100%

	<i>Raoultella terrigena</i> (NR_037085)	100%
E2	<i>Dothistroma septosporum</i> (MH876535.1)	99.26%
	<i>Dothistroma septosporum</i> (GU214427)	99.15%

9.1.3 Determinación taxonómica: Caracterización morfológica

Chryseobacterium sp.:

Pertenece a la familia Flavobacteriaceae, son bacterias en forma de bacilos, Gram-negativas que generan colonias con forma circular, con margen entero, bordes lisos y de color anaranjadas-brillantes, característica dada por la producción de flexirubina de esta bacteria; muestra buen crecimiento a temperatura ambiente (27°C) después de 48 horas en agar nutritivo; además fermenta glucosa y no presenta fluorescencia. Esta bacteria es anaeróbica facultativa, tiene ambos metabolismos oxidativo y fermentativo (Bernardet et al., 2006), por tanto, empata con el resultado obtenido en el medio basal OF.

Especies del género *Chryseobacterium* han aislados de diferentes ambientes como suelos (Weon et al., 2006; Shen et al., 2005), en agua, productos lácteos, e incluso como patógenos oportunistas de humanos y animales (Bernardet et al., 2006; Izaguirre-Anariba & Sivapalan, 2020); en plantas se han documentado como supresores de patógenos vegetales (Kim et al., 2012; Sang et al., 2013), al igual que como promotoras de crecimiento (Dardanelli et al., 2010; Montero-Calasanz et al., 2013).

Raoultella terrigena:

Bacterias en forma de bastón, Gram-negativas que generan colonias con margen entero, en forma circular, blancas-brillantes de bordes lisos, con diámetros de 0.6

mm y textura cremosa en agar nutritivo. En base a los resultados que se obtuvieron en la prueba en medio OF, la bacteria aislada presenta un metabolismo del tipo fermentativo. Sin embargo, en base a la literatura consultada, *Raoultella terrigena* suele ser una bacteria que presenta ambos metabolismos del tipo oxidativo y fermentativo, siendo así facultativamente anaerobia. La mayoría de las bacterias pueden utilizar glucosa como única fuente de carbono la cual se fermenta con la producción de ácido y gas, lo que concuerda con lo obtenido en esta prueba. De manera general esta bacteria se puede aislar de medios como suelo, agua y plantas, en el menor de los casos, en humanos (Drancourt et al., 2001; Izard et al., 1981).

Dothistroma septosporum (Dorogin) M. Morlet.:

Picnidios agrupados en un estroma negro a rojo cobre, volviéndose errupente e hinchado, compuesto internamente por células pseudoparequimatosas de color marrón; conidióforos marrón pálido a hialinos, densamente agregados, subcilíndricos, septados (0-4); conidios hialinos, alargados-cortos y cilíndricos, septados (1); en la madurez, en *A. montana*, los conidios son expulsados a través de los ostiolos formando una masa gelatinosa de color salmón a rosa fucsia pero que al contacto con agua se vuelve hialina dejando ver setas oscuras no descritas antes en aislados de *D. septosporum*.

Barnes et al. (2004) menciona que los estromas pueden ser de tipo acervular en la madurez de hasta 1 mm de longitud, internamente revestida de células pseudoparequimatosas que dan lugar a los conidióforos. La variación morfológica de los conidios y de las células conidiógenas es muy diversa en *D. septosporum*. Mientras que en EPPO (2015), los estromas son descritos como pseudopicnidial a acervular con conidios en forma recta a curvo con ápice redondeado a puntiagudo y base truncada; 1-5 septada. Sobre agar extracto de malta (AEM) su crecimiento va de 1.5 a 2 mm por semana a una temperatura de 20°C.

D. septosporum (teleomorfo *Mycosphaerella pini*) es un ascomiceto de distribución mundial y ha sido documentado como fitopatógeno para más de 90 especies del género *Pinus* pero también ha sido hallado, en un menor grado, en cinco géneros más de la familia Pinaceae. El teleomorfo de *D. septosporum* también se ha encontrado presente en pinos aunque con una menor frecuencia. Su presencia representa un mayor riesgo debido a la división celular por meiosis que permite una variación genética mucho mayor de la enfermedad y aumenta su capacidad de adaptación a los climas locales y su resistencia (Nowakowska et al., 2014) En México únicamente se ha documentado *D. septosporum* y .García-Díaz et al. (2023) menciona su presencia en pinos, en estados como Guanajuato, Ciudad de México, Hidalgo, Jalisco, Morelos, Puebla, Oaxaca, Tlaxcala, Estado de México y Veracruz, ahora también en el estado de Querétaro en una especie de *Agave*.

9.2 Descripción de sintomatología

Pudrición blanda en *Agave montana*

Una pudrición blanda que comienza en la parte basal de las pencas, con tonalidades rojizas, que se va extendiendo hacia la parte apical de la hoja produciendo áreas necróticas en la parte central de la hoja, el color se vuelve de naranja a cobrizo. En el interior de la lesión, tejido necrosado de coloración rojiza a marrón, a veces acuoso, y con un fuerte olor a fermento, además puede estar presente el picudo del agave, *Scyphophorus acupunctatus*. Esta pudrición es capaz de impedir el desarrollo óptimo de los ejemplares (Figura 14).

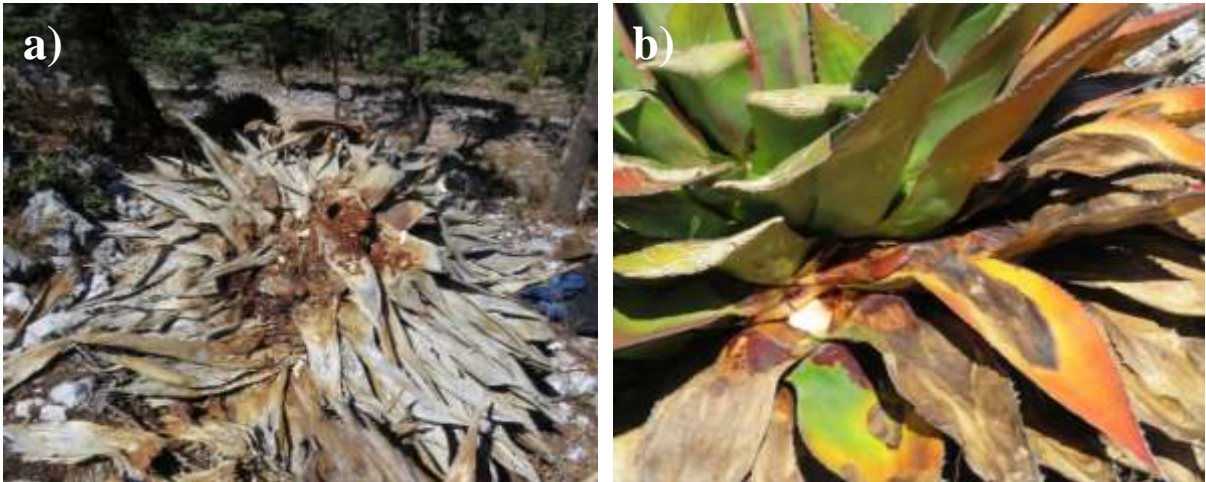


Figura 14. Ejemplares adultos de más de 6 años de edad de *A. montana* con síntomas de pudrición bacteriana, a) encontrado en campo, totalmente muerto con presencia del picudo del agave, b) con pudrición basal en hojas.

La sintomatología aquí descrita de pudrición blanda para *A. montana*, concuerda con lo señalado en (DGSV-CNRF, 2017), en donde se menciona que esta enfermedad causa una pudrición progresiva de consistencia blanda que llega a desintegrar el tejido afectado e incluso llegando a matar en su totalidad a la planta. Por otra parte, Rubio-Cortes (2007) señala la pudrición de hojas y planta completa como una pudrición blanda que puede comenzar en la punta o en la base de las hojas, muy parecido a los síntomas encontrados en nuestra especie de estudio. Además, enfatiza que esta pudrición destruye todo el tejido de la hoja a excepción de la epidermis. Después puede inflarse la hoja, producto de los gases por la fermentación del tejido afectado que, al secarse, queda un aspecto papeloso. En *A. montana* los síntomas descritos por Rubio-Cortes (2007) se observaron después de los 9 meses de inoculación en donde finalmente la planta murió.

Sintomatologías como pudrición blanda o marchitez en el género *Agave*, se han documentado diversas especies de bacterias u hongos asociados como *Fusarium* spp, *Bacillus pumilis*, *Erwinia cacticida* o *Pantoea aglomerans* (López-Bautista et al., 2020; Aquino-Bolaños et al, 2020; Palemón-Alberto et al., 2021). En la mayoría de los casos más de dos especies han sido aisladas de materiales infectados e

incluso todas estas especies muestran cierto grado de patogenicidad, como lo vimos en las bacterias aisladas en este trabajo.

Las enfermedades como la pudrición blanda donde se ven involucradas diversas especies bacterianas, podrían estarse tratando de un síndrome en lugar de una sola infección bacteriana, así como lo postula López-Bautista et al. (2020) para la pudrición seca del cogollo. Salazar-Rivera et al. (2024) concuerda con lo antes mencionado y además agrega que podría tratarse de un síndrome causado por el patobioma en cuestión, que va cambiando en estructura según la especie de agave huésped y las comunidades bacterianas circundantes. Por lo anterior, es de comprenderse el por qué en *A. montana* las bacterias halladas difieren a otras ya documentadas para *Agave*.

Tizón de la penca de agave en *Agave montana*

Lesiones que van de los 2 a los 4 cm de diámetro en hojas grandes, llegando a fusionarse; halos cloróticos, amarillentos y a veces rojos-cobre en el centro del halo, en los que se encuentran estromas con tonalidades oscuros a rojizos; en la madurez de color negro donde los conidios son exudados formando una masa mucilaginosa color salmón; situados en haz y envés de la penca con arreglo circular, en grupos. Dichos signos y síntomas pueden cubrir el total de la hoja y producir la muerte de la misma (Figura 15).

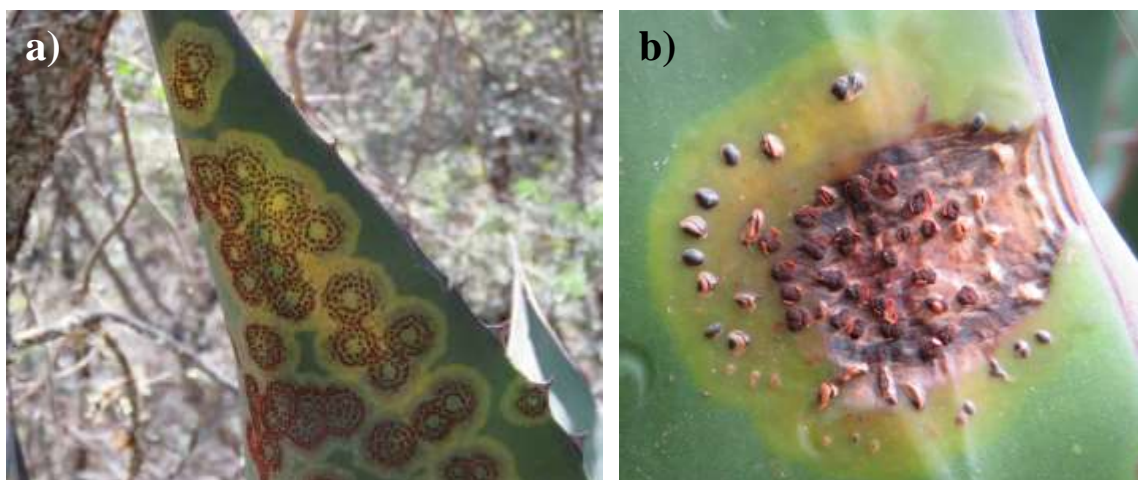


Figura 15. a) Sintomatología del Tizón de la penca por *Dothistroma septosporum* en *A. montana*, b) Estromas rojizos en halo clorótico, de 4 cm de diámetro.

La enfermedad del tizón rojo bandeado de las acículas (red band needle blight) en pinos es causada por dos especies fúngicas pertenecientes al género *Dothistroma*, *D. pini* y *D. septosporum*, especies morfológicamente iguales y por tanto los síntomas en planta son difíciles de diferenciar por lo que el uso de pruebas moleculares es necesario. Esta patología en pinos se distingue inicialmente por halos amarillos en las acículas que luego se ensanchan convirtiéndose en bandas necróticas marrones que por lo regular se ven rodeadas por una zona rojiza en donde se desarrollan los estromas debajo de la epidermis y que al desarrollarse más rompen estos tejidos epidérmicos. Cuando se concentra un número significativo de estas estructuras fúngicas, las acículas atacadas se vuelven marrones y terminan por caer. Los pinos atacados por esta enfermedad pueden resultar en la muerte de las ramas o de ejemplares (EPPO, 2015; Barnes et al., 2004).

Los signos y síntomas descritos anteriormente en pinos son muy similares a las encontradas en *A. montana*, aunque en lugar de las bandas rojizas que se forman en las acículas, en este caso son halos que pueden o no estar de este color. A pesar de que en los materiales colectados ninguno mostró estos halos rojizos lo cual puede deberse a la temporalidad y fases de desarrollo, en campo si se

observaron ejemplares con esta característica, además, los estromas con esta coloración fue una constante incluso cuando en descripciones de *D. septosporum* no se menciona.

La detección de esta coloración es importante a la hora de observar los signos en la planta pues es característica de *D. septosporum*, la cual no siempre está presente y depende de otros factores como la luz. Otra diferencia detectable fue que en *A. montana* los estromas son mucho más grandes y se agrupan formando círculos que se van expandiendo mientras que en *Pinus* no. Esto puede deberse al área fotosintética que poseen los agaves, lo que hace que el arreglo y el tamaño de estromas sea distinto.

9.3 Pruebas de hipersensibilidad y patogenicidad bacteriana

La prueba de actividad pectolítica en las rodajas de tubérculo de papa resultó positivo para todas las bacterias, produciendo pudrición y crecimiento bacteriano en las rodajas, siendo más notoria en **E1ID B1**. Por otra parte, las inoculaciones en hojas de chile no presentaron ningún cambio evidente mientras que en la hoja de *Aloe vera* la bacteria **E1ID B1** presentó secreción en el exterior al contrario de **E1ID B2**. En corte longitudinal se pudo observar con mayor precisión un cambio significativo en las punciones con la bacteria **E1ID B1** presentando un cambio de coloración evidente (Figura 16). Mientras que la bacteria **E1ID B2** mostró actividad, aunque en un menor grado.

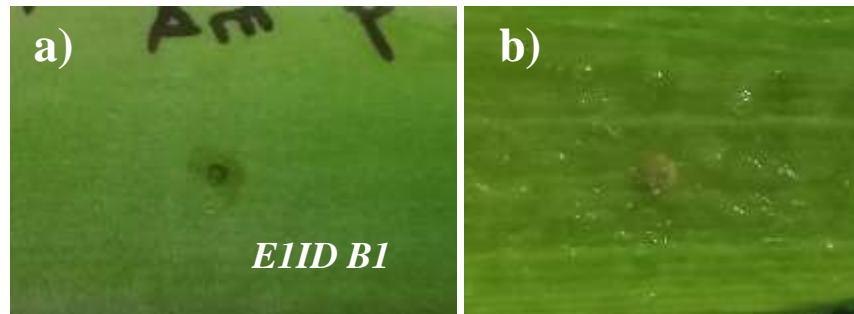


Figura 16. Prueba de hipersensibilidad en *A. vera*. a, b) Punciones con exudado en el exterior de la hoja por la bacteria y actividad bacteriana dentro de la lesión por la bacteria ***EIID B1***.

Las inoculaciones que se realizaron en las hojas de *Agave tequilana* sin bolsa tardaron más en presentar síntomas que cuando se cubrió con la bolsa plástica, 6 y 4 días respectivamente. Sin la bolsa, las hojas inoculadas presentaron en el envés ligeros halos amarillentos en donde se realizó la punción mientras que, con la bolsa, la hoja con la bacteria ***EIID B1*** presentó escurrimiento bacteriano, hundimiento y crecimiento de la lesión; la bacteria ***EIID B2*** presentó un ligero hundimiento y escurrimiento bacteriano, pero en menor cantidad (Figura 17).

Al séptimo día la hoja con ***EIID B1*** tenía el área de punción necrótica tanto en el haz como en el envés; ***EIID B2*** un cambio de coloración (Figura 18). Se tomaron en cuenta únicamente los resultados con la bolsa plástica pues fueron los síntomas más desarrollados a los 7 días.

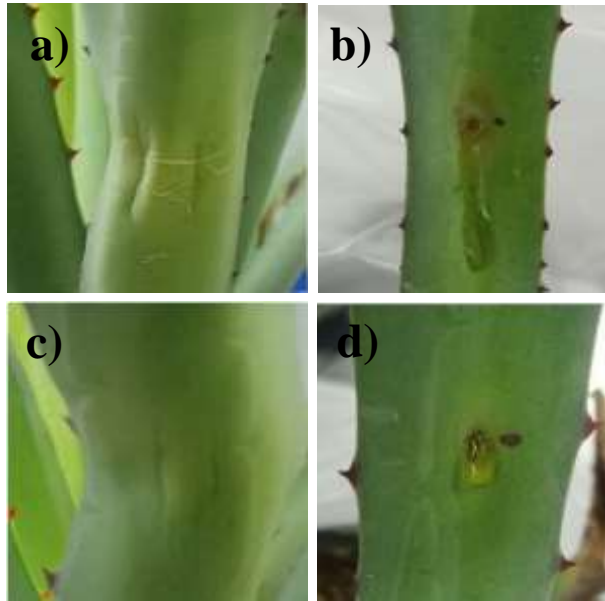


Figura 17. Respuesta hipersensibilidad en *A. tequilana*. Bacteria **E1ID B1**, a) arrugamiento en el envés de la hoja, b) hundimiento y escurrimiento en haz de la hoja; bacteria **E1ID B2** c) arrugamiento en envés de la hoja, d) escurrimiento en haz de la hoja.

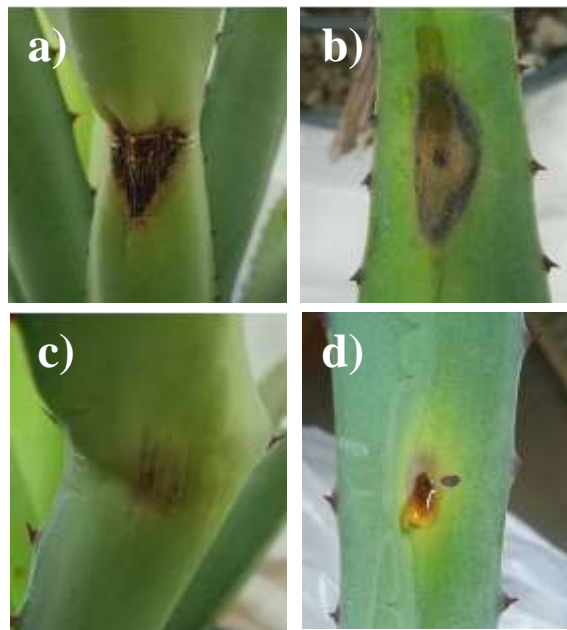


Figura. 18. Evolución de los síntomas a los 7 días después de la inoculación en *A. tequilana*. a, b) envés y haz de la hoja con necrosamiento con la bacteria **E1ID B1**; c, d) envés con deformación y haz de la hoja escurrimiento con bacteria **E1ID B2**.

Ambas bacterias, **E1ID B1** identificada como *Chryseobacterium* sp. y en adelante se le denominara **E1ID B1 Chr** y **E1ID B2** identificada como *Raoultella terrigena* y en adelante **E1ID B2 Rao**, se tomaron para su identificación molecular y pruebas de patogenicidad en *Agave montana* y dos especies más de fácil acceso, *A. tequilana* y *A. angustifolia*.

La primera semana después de la inoculación de **E1ID B1 Chr** en *A. montana*, los individuos presentaron un ligero cambio en la coloración de la lesión e incluso algunas de las plantas mostraron decoloración en el envés de la hoja inoculada. En la segunda semana algunas de las lesiones se tornaron negruzcas (Figura 19), sin embargo, no hubo crecimiento en la misma. Para las semanas 3 y 4, en las lesiones ya no se presentó evolución, permanecieron igual que la segunda semana.



Figura 19. Punción negruzca en hoja de *A. montana* causada por la bacteria **E1ID B1 Chr**.

Agave tequilana, en la primera semana, algunos de los individuos mostraron una ligera supuración y decoloración en el envés de la hoja, así como el crecimiento de las lesiones (Figura 20). Para la semana 2, 3 y 4 las lesiones permanecieron con el mismo tamaño de la primera semana.



Figura 20. Punción con bacteria **E1ID B1 Chr** en hoja de *A. tequilana*, a) envés con halo clorótico, b) haz con ligera supuración.

Se logró observar un cambio con algunas plantas presentaron supuración y amarillamiento en el envés para *A. angustifolia* en la primera semana. En la segunda semana las lesiones de la mayoría de los ejemplares se tornaron negruzcas al hacer una comparación con el control que prácticamente estaba cicatrizado (Figura 21). En la semana 3 y 4 no hubo cambio.

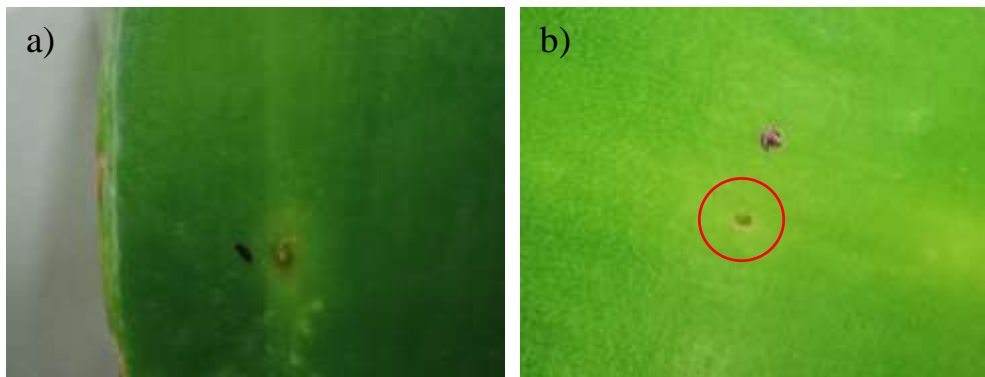


Figura 21. a) Punción con la bacteria **E1ID B1 Chr** en hoja de *A. angustifolia*, supuración y halo clorótico, b) hoja de testigo con punción, herida casi cicatrizada.

Al someter los datos a un análisis ANOVA, puede observarse que, si hay diferencias significativas en el crecimiento de la lesión entre las tres especies

probadas, teniendo en *A. montana* una patogenicidad más baja y más alta en *A. tequilana* (Figura 22). Además, al analizar la lesión de manera interna, en *A. montana* la punción realizada en la hoja control no presentó ningún cambio de coloración o crecimiento anormal a comparación de la hoja con la bacteria, la cual presentó un necrosamiento de forma vertical pero no logró expandirse a los lados como en el caso de *A. tequilana* en donde la lesión llegó al otro extremo de la hoja e incluso se tornó más rojiza, observando así el colapso de las células del parénquima. Por otra parte, en *A. angustifolia* el crecimiento se mantuvo cerca de la punción logrando expandirse solo unos milímetros a los lados (Figura 23).

Grado de patogenicidad de E1ID B1 Chr.

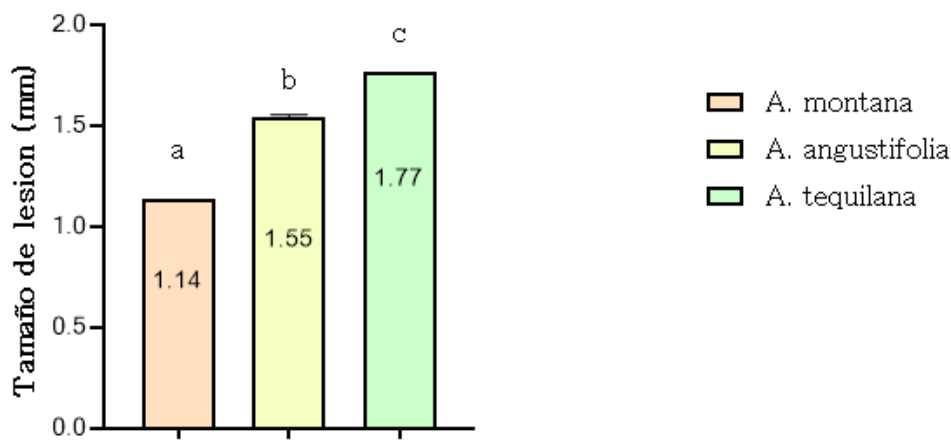


Figura 22. Grado de patogenicidad de *Chryseobacterium* sp. entre las tres especies de agave. Las letras indican las diferencias entre medias usando la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p \leq 0.05$).

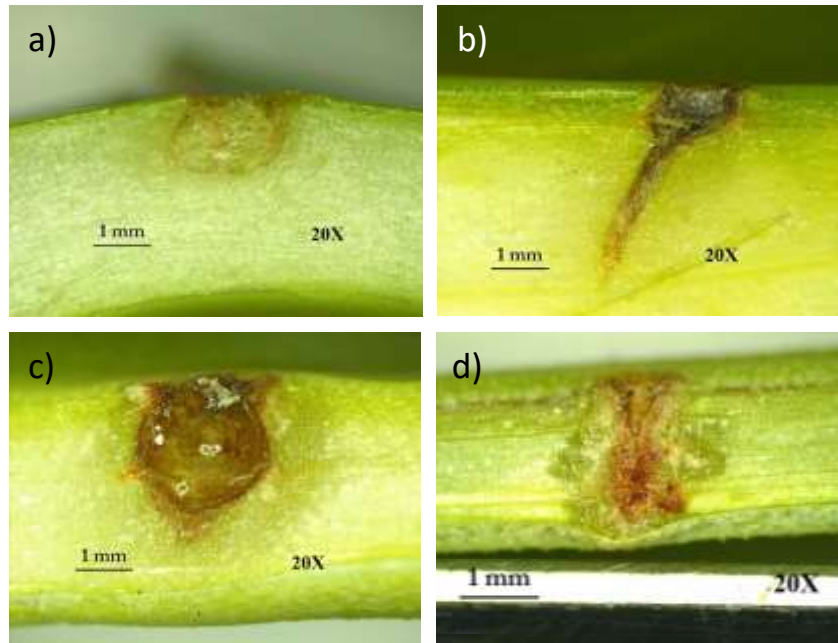


Figura 23. Vista interna de lesión en corte transversal. Hoja de *A. montana*, a) lesión en hoja control; b) crecimiento vertical de la lesión y necrosamiento con ***E1ID B1 Chr.***; c) crecimiento alrededor de la punción en hoja de *A. angustifolia* con ***E1ID B1 Chr.***; d) crecimiento vertical y horizontal además de notoria coloración rojiza en la lesión, en hoja de *A. tequilana* con ***E1ID B1 Chr.***

Las hojas que se inocularon con ***E1ID B2 Rao*** mostraron cierta patogenicidad, que, si bien no fue medida como en el caso anterior, si se observaron cambios significativos y en un menor grado que en ***E1ID B2 Chr.*** Las lesiones, en los tres casos, presentaron muerte celular alrededor de la punción.

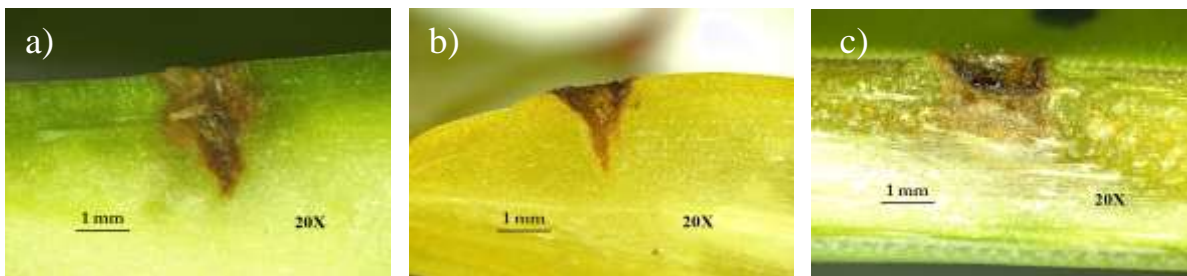


Figura 24. Vista interna de lesión en corte transversal en hoja con ***E1ID B2 Rao***. a) *A. montana*; b) *A. angustifolia*; c) *A. tequilana*.

Las condiciones climáticas pueden jugar un papel de suma importancia en el desarrollo de enfermedades bacterianas como lo es una pudrición blanda (Gudiño-Oceguera, 2005; DGSV-CNRF, 2017). Debido a que los ensayos se hicieron a temperatura ambiente, aunque e condiciones de laboratorio, puede ser necesario que se simule un ambiente en que las plantas de *A. montana* se encuentren de manera natural (temperaturas frescas a frías y humedad relativa elevada) para descartar este tipo de variables.

El análisis estadístico mostró a *A. montana* como la más tolerante a las bacterias inoculadas. Puede deberse a que los ejemplares utilizados provenían de condiciones silvestres, por tanto, poseen una mayor variabilidad genética que les confiere propiedades de resistencia ante los patógenos inoculados, en comparación a especies como *A. angustifolia* o *A. tequilana*. Esta última es una especie que mayormente se propaga de forma clonal (hijuelos) en un sistema de monocultivo que limita la capacidad de respuesta adaptativa ante un ambiente cambiante en el corto y largo plazo, por lo cual, es muy frecuente que presente problemas fitosanitarios (Gil-Vega et al., 2001; Mandujano et al., 2018).

Aunque el desarrollo de la enfermedad no avanzó de manera drástica en las primeras cuatro semanas de la inoculación, todos los ejemplares murieron luego de nueve meses, a excepción de los testigos, lo cual puede indicar que las bacterias se mueven lentamente entre las células de la planta, pero terminan ejerciendo su acción patogénica.

Se aisló en este trabajo *Chryseobacterium* sp. y *Raoultella terrigena* de lesiones con presencia de pudrición blanda y en ambos casos presentaron actividad pectolítica y patogenicidad en diferentes grados en tres especies del género *Agave*, hecho que se asemeja a lo encontrado por Mikicinski et al. (2010) en donde dichos autores documentan por primera vez a *Chryseobacterium* sp. como fitopatógena y posible causante de la pudrición blanda en tubérculos de alcatraz (*Zantedeschia* spp.). Si bien, no fue la única aislada, si presentó actividad pectolítica y cierto grado de patogenicidad. En otro estudio, realizado en México

por San Martín-Romero, et al. (2014), se aislaron también bacterias de *Chryseobacterium* en hojas de Chayote (*Schinus edule*) que presentaban manchas acuosas que evolucionaron a necrosis. Sin embargo, los resultados obtenidos difieren con lo encontrado por Mikicinski et al. (2010) puesto que las bacterias aisladas no presentaron actividad pectolítica ni hipersensibilidad en tabaco, pero sí patogenicidad en diferentes grados. San Martín-Romero et al. (2014) y Mikicinski et al. (2010) resaltan la posibilidad de que la infección de *Chryseobacterium* sp. sea fortuita debido a su gran plasticidad genética.

Un grupo de investigadores en Costa Rica aislaron bacterias en hortalizas que presentaban también síntomas de pudrición blanda, siendo por medio de ensayos de patogenicidad y reacción de hipersensibilidad, que en hojas y frutos de chile dulce se logró reproducir los síntomas; halos cloróticos en el sitio de punción y presencia de exudados. Dichos aislados pertenecen a la especie bacteriana *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* y *Raoultella terrigena* (Cubero-Agüero et al., 2021). Estos datos concuerdan con lo hallado en esta investigación en donde la bacteria **E1ID B2 Rao** (identificada como *R. terrigena*) mostró reacción positiva en las tres especies de *Agave* probadas, aunque en un menor grado que *Chryseobacterium* sp. *R. terrigena* ha mostrado plasticidad genética.

El resultado que se obtuvo de la inoculación de **E1ID B1 Chr** y **E1ID B2 Rao** en hoja de chile se asemeja a lo obtenido por Cubero-Agüero et al. (2021) ya que *Raoultella terrigena* no mostró hipersensibilidad en hoja de chile. Sin embargo, las inoculaciones realizadas en el fruto sí mostraron actividad pectolítica, posiblemente porque los frutos poseen una cantidad considerable de azúcares y pectinas que las bacterias son capaces de degradar y por consecuencia, generar pudrición (Charkowski, 2018).

Incluso si estos trabajos son los únicos, hasta el momento, que documentan estas especies como agentes patógenos de plantas, no se debe descartar que *Chryseobacterium* sp. y *R. terrigena* puedan tener la capacidad de producir síntomas de pudrición blanda en plantas cultivadas y silvestres como en el caso de *A. montana*.

9.4 Evaluación de la variable sombra en la incidencia de *Dothistroma septosporum*

La variable sombra por sí sola no fue significativa en la incidencia de la enfermedad en la zona de estudio. Distinto a lo que se observó en las cámaras húmedas puesto que hubo una rápida maduración de estructuras, expulsión de conidios y formación de micelio en cajas con obscuridad en comparación con las cajas que no contaron con esta. Sin embargo, el factor de la temperatura fue clave para la maduración de las estructuras y la generación de micelio. Además, fue evidente la pérdida de la coloración rojiza presente entre cada picnidio al contar con obscuridad. Esta coloración rojiza es dada por una acumulación de dothistromina, toxina producida por el mismo hongo, de la cual, su incremento aumenta la patogenicidad (Bradshaw et al., 2000).

Una fuerte exposición a la luz realza la coloración rojiza mientras que la obscuridad la suprime. Los niveles de producción de dothistromina pueden verse alterados por cambios ambientales o incluso por la introducción de cepas de otros lugares. El alto nivel de producción de la toxina dothistromina por parte de algunas cepas es motivo de preocupación para la salud de los bosques, así como para las personas que manejan estas plantas, ya que se ha visto cierta toxicidad para las células humanas (Stoessl et al., 1990).

La sombra producida por los árboles que cohabitan con *A. montana* puede ayudar a que se cree un microclima favorable para la reproducción de *D. septosporum*. Las variables como las precipitaciones, la humedad, temperatura y las ráfagas de viento asumen un rol importante en la incidencia de este hongo, lo que se relaciona estrechamente con la amplia gama de climas en las que se ha hallado, además de la rapidez con la que se ha diseminado en las últimas décadas en diversas regiones del mundo. Aunque los factores naturales juegan un papel importante en el éxito de dispersión de este hongo, la movilización de material infectado de sitio a sitio, exacerba la propagación (Mullett et al, 2016; Drenkhan et al., 2015).

Se ha visto que la incidencia y la gravedad de la enfermedad del tizón de la acícula por *Dothistroma* (DNB) en pinos están fuertemente influenciadas tanto por las condiciones ambientales/climáticas como por la susceptibilidad del huésped. La humedad es un factor ambiental clave, puesto que los brotes del tizón ocurren en áreas o años con altos niveles de lluvias en verano o frecuentes eventos de lluvias cálidas (Drenkhan et al., 2015).

El hecho que *A. montana* se encuentre en un ecosistema como lo es el de pino-encino, la introducción de especies enfermas al medio y el cambio brusco de precipitaciones y temperaturas derivado del cambio climático, puede aumentar las probabilidades de incidencia de la enfermedad, y aunque es notable su capacidad de resistencia en comparación con ejemplares de *A. salmiana* con la misma sintomatología en campo, es necesario realizar estudios que lo confirmen.

La hipótesis planteada menciona que al ser *Agave montana* una especie silvestre, los agentes patógenos asociados serían distintos a los documentados previamente para otras especies de agaves mezcaleros. En base a lo anterior, la hipótesis fue correcta ya que los agaves en México habitan en diferentes ecosistemas a lo largo de todo el país y por tanto los componentes son específicos para cada caso. No es de extrañar que los patógenos aislados en este y otros trabajos sean tan diversos y distintos. Los microorganismos circundantes, los componentes particulares de su ecosistema como el clima, así como las interacciones que ocurren dentro del mismo son factores que desempeñan un papel en estas diferencias.

A. montana es una especie silvestre que habita en bosque conservado de pino-encino en la Sierra El Doctor, sin embargo, los cambios bruscos de temperatura que enfrenta el ecosistema actualmente y las perturbaciones que pudiese sufrir *in situ*, hace susceptible a la especie de ser atacada por patógenos antes no reconocidos como se observó en la presente investigación.

10. Conclusiones

Se reconocen dos bacterias asociadas a la colecta E1 y un hongo a la colecta E2.

Se aísla e identifica a *Chryseobacterium* sp, *Raoultella terrígena* y *Dothistroma septosporum* asociados por primera vez a *Agave montana* Villarreal en la Sierra El Doctor.

Las bacterias aisladas en el presente trabajo, **E1ID B1 Chr** y **E1ID B2 Rao** causaron síntomas de pudrición blanda en *A. montana*, siendo *Chryseobacterium* sp. la más virulenta.

Chryseobacterium sp. y *Raoultella terrigena* son microorganismos que pocas veces se ha relacionado con alguna fitopatología y ninguna en *Agave*, sin embargo, en este trabajo se observó que si tienen la capacidad de producir enfermedad.

Se documenta por primera vez a *A. montana* como nuevo hospedero de *Scyphophorus acupunctatus*, el cual, es posible vector y acelerador de la pudrición blanda. Su control, puede ser clave para evitar la incidencia y propagación de dicha afección en *A. montana*.

D. septosporum, que es un hongo fitopatógeno causante del tizón de la acícula por *Dothistroma* (DNB) en pinos y es reconocido a nivel mundial desde hace muchos años, hasta el momento no se había documentado para *Agave*.

Se propone el nombre de “Tizón de la penca de agave” para la sintomatología causada por *Dothistroma septosporum* en *A. montana*, nombre que hace alusión al patógeno y la parte vegetal donde este incide.

La sombra por sí sola no genera un impacto significativo en la incidencia de *D. septosporum* sobre *A. montana*, sin embargo, las especies arbóreas presentes, al combinarse con la temperatura y humedad, pueden crear un microclima que fomenta la enfermedad.

Se acepta la hipótesis de la investigación debido a que se encontraron agentes patógenos no documentados previamente, tanto para el género *Agave* como para *A. montana* en la Sierra El Doctor, Querétaro; patógenos que pueden ser determinados por las condiciones ecológicas específicas de la especie además del estado silvestre en el que se encuentra.

Perspectivas de estudio

Se recomienda monitorear el estado fitosanitario de las especies arbóreas, como pinos, presentes en el sitio de estudio para descartar fuentes de inóculo de *Dothistroma septosporum*, así como descartar la presencia de la fase asexual, *Mycosphaerella pini*. Así también, adoptar medidas que ayuden a los productores a una mejor planeación del cultivo de *A. montana*, para evitar en una mayor medida la diseminación del patógeno.

11. Literatura consultada

APG. The Angiosperm Phylogeny Group (2016). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 181(1), 1–20. <https://doi.org/10.1111/boj.12385>

Araújo, E. R. M. C., Oliveira, K. F. B., Sousa, E. S., Barguil, B. M., Matos, K. S., & Beserra, J. E. A., Jr. (2021). First report of *Colletotrichum agaves* causing anthracnose in *Agave angustifolia* in Brazil. *New Disease Reports*, 44(2). <https://doi.org/10.1002/ndr2.12047>

Arellano-Plaza, M., Paez-Lerma, J.B., Soto-Cruz, N.O., Kirchmayr, M.R. & Gschaedler Mathis, A. (2022) Mezcal Production in Mexico: Between Tradition and

Commercial Exploitation. *Front. Sustain. Food Syst.* 6:832532. doi: 10.3389/fsufs.2022.832532

Ayala-Escobar, V., Yanez-Morales, M. D. J., Braun, U., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2005). *Cercospora agavicola* - a new foliar pathogen of *Agave tequilana* var. azul from Mexico. *Mycotaxon*, 93(1), 115-121.

Barnes, I., Crous, P. W., Wingfield, B. D., Wingfield, M. J. (2004). Multigene phylogenies reveal that red band needle blight of *Pinus* is caused by two distinct species of *Dothistroma*, *D. septosporum* and *D. pini*. *Stud. Mycol.* 50, 551–566

Barnett, H. L., & Hunter, B. B. (1998). Illustrated genera of imperfect fungi. The American Phytopathological Society. *US Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Washington State University, Pullman. APS Press. USA. St. Paul, Minnesota USA. 218p.*

Bailón-Ortiz, A.Z. & Amábilis-Sánchez, M.J. (2024). Identificación de agentes causales de la pudrición seca de *Agave potatorum* Zucc en vivero. *Revista Mexicana de Agroecosistemas*, 11(1): 11-20. DOI: <https://doi.org/10.60158/rma.v11i1.417>

Bernardet, J.-F., Hugo, C., & Bruun, B. (2006). The Genera *Chryseobacterium* and *Elizabethkingia*. *The Prokaryotes*, 638–676. doi: 10.1007/0-387-30747-8_25

Butter, N. S. (2018). *Insect Vectors and Plant Pathogens*. CRC Press.

Cabrera-Huerta, E., Aranda-Ocampo, S., Hernández-Castro, E., Nava-Díaz, C., Mora-Aguilera, A., & Vásquez-López, A. (2019). First report of bacterial wilt caused by *Dickeya chrysanthemi* on agave-mezcal (*Agave cupreata*) in Mexico. *Plant Disease*, 103(6), 1-3.

Cen Caamal, J. C. (2012). Determinación del agente causal de la pudrición del cogollo del *Agave tequilana* Weber var azul en el estado de Jalisco. Tesis de Maestría.

Charkowski, A. O. (2018). The Changing Face of Bacterial Soft-Rot Diseases. *Annual Review of Phytopathology*, 56(1). doi:10.1146/annurev-phyto-080417-045906

CIPF. (2021). Convención Internacional de Protección Fitosanitaria. Revisión científica del impacto del cambio climático en las plagas de las plantas. Un desafío mundial en la prevención y la mitigación de los riesgos de plagas en la agricultura, la silvicultura y los ecosistemas. Roma. FAO en nombre de la Secretaría de la CIPF. <https://doi.org/10.4060/cb4769es>

Colunga-GarcíaMarín, P., Torres-García, I., Casas, A., Figueredo-Urbina, C.J., Rangel-Landa, S., Delgado-Lemus, A., Vargas, O., Cabrera-Toledo, D., Zizumbo-Villareal, D., Aguirre-Dugua, X., Aguirre-Dugua, X., Eguiarte, L.E. & Carrillo-Galván, G. (2017). Los Agaves y las prácticas mesoamericanas de aprovechamiento, manejo y momesticación. *Domest. Cont. Am.* 2, 273–309.

COMERCAM. (2024). Informe estadístico 2024. Disponible en <https://comercam-dom.org.mx/> (consultado 10 octubre, 2024).

Cox-Tamay, L. D., & Heredia-Campos, E. B. (2020). Epidemias en la agricultura ¡Las plantas también se enferman! *Centro de Investigación Científica de Yucatán, AC*, 187-193.

Cubero-Agüero, D., Brenes-Guillén, L., Vidaurre -Barahona, D., & Uribe-Lorío, L. (2021). *Raoultella terrigena* y *Pectobacterium carotovorum* en hortalizas en dos provincias de Costa Rica. *Agronomía mesoamericana: órgano divulgativo del PCCMCA, Programa Cooperativo Centroamericano de Mejoramiento de Cultivos y Animales*, 178–195. <https://doi.org/10.15517/am.v32i1.40845>

Cuervo-Parra, J.A., Pérez-España, V.H., López Pérez, P.A., Morales-Ovando, M.A., Arce-Cervantes, O., Aparicio-Burgos, E. & Romero-Cortes, T. (2019). *Scyphophorus acupunctatus* (Coleoptera: Dryophthoridae): A Weevil Threatening the Production of Agave in Mexico. *Florida Entomologist* 102(1), 1-9. <https://doi.org/10.1653/024.102.0101>

Díaz-Plaza, R. 1984. Identificación e importancia de las principales enfermedades del henequén. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 85 p.

DGSV-CNRF. (2017). Pudrición Blanda del cogollo del Agave. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. SAGARPA-SENASICA. Dirección General de Sanidad Vegetal-Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria. Tecámac, México. 16 p.

Drancourt, M., Bollet, C., Carta, A., & Rousselier, P. (2001). Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(Pt 3), 925–932. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-3-925>

Drenkhan, R., Tomešová-Haataja, V., Fraser, S., Bradshaw, R. E., Vahalík, P., Mullett, M. S., Kirisits, T. (2016). Global geographic distribution and host range of *Dothistroma* species: a comprehensive review. *Forest Pathology*, 46(5), 408–442. doi:10.1111/efp.12290

Elad, Y. & Pertot, I. (2014) Climate Change Impacts on Plant Pathogens and Plant Diseases, *Journal of Crop Improvement*, 28:1, 99-139, DOI: 10.1080/15427528.2014.865412

EPPO. European and Mediterranean Plant Protection Organization. (2015). PM 7/46 (3) *Lecanosticta acicola* (formerly *Mycosphaerella dearnessii*), *Dothistroma septosporum* (formerly *Mycosphaerella pini*) and *Dothistroma pini*. EPPO Bulletin, 45(2), 163–182. doi:10.1111/epp.12217

Galindo-Mendoza, G. (2011). La sanidad vegetal en México: situación actual y perspectivas. En: Galindo-Mendoza G., Contreras-Servín C. y Aldama-Aguilera C. Coords. *La Vigilancia Epidemiológica y Fitosanitaria en México: un acercamiento metodológico*, pp. 17-38. Editorial Universitaria Potosina, San Luis Potosí.

García-Díaz, S.E., Duran-López, L.G., & Pérez-Vera, O.A. (2023). Tizón de la banda roja de las acículas de pino por *Dotistroma* sp. En: Cibrián-Tovar, D. & García-Díaz, S. E. (Eds). Manual para la identificación y manejo de plagas y enfermedades que afectan los viveros forestales de México.

García-Mendoza, A., & Galván-Villanueva, R. (1995). Riqueza de las familias Agavaceae y Nolinaceae en México. *Botanical Sciences*, (56), 7-24. <https://doi.org/10.17129/botsci.1461>

García-Mendoza, A. J. (2007). Los agaves de México. *Ciencias* 87: 14-23.

García-Mendoza, A.J. (2011). Agavaceae. Flora del Valle de Tehuacán-Cuitlatán. Fascículo 88. Instituto de Biología, UNAM.

Gil, V. K., Chavira, M. G., Vega, O. M. de la, Simpson, J., & Vandemark, G. (2001). Analysis of genetic diversity in *Agave tequilana* var. Azul using RAPD markers. *Euphytica*, 119(3), 335–341.

Gudiño-Oceguera, J.M. (2005). Influencia climática sobre el desarrollo de la enfermedad pudrición del cogollo del Agave (*Agave tequilana* Weber variedad azul). Universidad de Guadalajara. Tesis.

Hamada, E. & Ghini, R. (2011). Impactos del cambio climático en plagas y enfermedades de las plantas en Brasil. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 2(7):195-205.

Hernández José, J., Hernández Domínguez, E. M., López Vázquez, E., & Álvarez Cervantes, J. (2023). Aislamiento e identificación del fitopatógeno causal de viruela o “negrilla” en *Agave salmiana* de municipios del estado de Hidalgo, México. *Scientia fungorum*, 53, e1425. <https://doi.org/10.33885/sf.2022.53.1425>

Hoz-Zavala, Ma. E. E. y Nava-Diguero, P. (2017). Situación del Agave y sus residuos en Tamaulipas. *Revista de Energías Renovables*. 1-1:19-31.

Hugh, R. & Leifson, E. 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram negative bacteria. *J. Bacteriol.* 66:24-26.

Ibarra-Medina, A.V. (2005). Agente causal de anillo rojo en agave (*Agave tequilana* weber variedad azul). Tesis.

Izaguirre-Anariba, D. E., & Sivapalan, V. (2020) *Chryseobacterium indologenes*, an Emerging Bacteria: A Case Report and Review of Literature. *Cureus*, 12(1): e6720. DOI 10.7759/cureus.6720

Izard, D., Ferragut, C., Gavini, F., Kersters, K., De Ley, J., & Leclerc, H. (1981). *Klebsiella terrigena*, a New Species from Soil and Water. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 31(2), 116–127. doi:10.1099/00207713-31-2-116

Jacques-Hernández, C., & Bravo, Á. S. (2009). Caracterización y usos de las especies de agave en Tamaulipas. *El Reino Veg. Farmacol. y Ter*, 89, 91-100.

Jacques-Hernández, C., Herrera-Pérez, O., & Ramírez-De León, J. A. (2007). El Maguey Mezcalero y la agroindustria del mezcal en Tamaulipas. *En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves*, eds. P. Colunga-GarcíaMarín, L. Eguiarte, A. Larqué, and D. Zizumbo-Villarreal, 287-317.

Jiménez-Díaz, R.M. (2008). Impactos potenciales del cambio climático sobre las enfermedades de los cultivos. *Phytoma España: la revista profesional de sanidad vegetal* 203: 64-69.

Jiménez-Díaz, R.M. (2017). Las enfermedades de las plantas: impactos, amenazas y control. *Boletín de la Real Academia de Córdoba* 166: 111-130.

Jiménez-Hidalgo, I., Virgen-Calleros, G., Martínez-de la Vega, O., Vandermark, G. & Olalde-Portugal, V. (2004). Identification and Characterization of Bacteria Causing Soft rot in *Agave tequilana*. *European Journal of Plant Pathology* **110**, 317–331. <https://doi.org/10.1023/B:EJPP.0000019791.81935.6d>.

King, E.O., Ward, M.K. & Raney, D.K. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* 44:301-307.

Kim, H.-S., Sang, M. K., Jung, H. W., Jeun, Y.-C., Myung, I.-S., & Kim, K. D. (2012). Identification and characterization of *Chryseobacterium wanjuense* strain

KJ9C8 as a biocontrol agent of *Phytophthora* blight of pepper. *Crop Protection*, 32, 129–137. doi: 10.1016/j.cropro.2011.10.018

Langarica Rivera, V. M., Gutierrez Siordia, Á.R., Mojica Sanchez, J. P., & Ruiz Ibarra, G. (2024). Insectos que afectan la producción del agave (*Agave tequilana* Weber) en el Mpio de Tuxpan, Jalisco. *Investigación y Ciencia Aplicada a la Ingeniería*, 7(45). <https://ojsincaing.com.mx/index.php/ediciones/article/view/354>

Llamada Ibarra, E. (2023). Análisis de la industria del Agave-Tequila en México: malas prácticas en un sector en auge. Universitat Politècnica de València. <http://hdl.handle.net/10251/202702>

López-Bautista, V., Mora-Aguilera, G., Gutiérrez-Espinosa, M.A., Mendoza-Ramos, C., Martínez-Bustamante, V.I., Coria-Contreras, J.J., Acevedo-Sánchez, G., & Santana-Peñaloza, B. (2020). Caracterización morfológica y molecular de *Fusarium* spp. asociados a la ocurrencia regional de marchitez y pudrición seca del cogollo en *Agave tequilana*. *Revista mexicana de fitopatología*, 38(1), 79-106. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1911-4>

López, M. G., Mancilla-Margalli, N. A., & Mendoza-Diaz, G. (2003). Molecular structures of fructans from *Agave tequilana* weber var. azul. *J. Agric. Food Chem.* 51, 7835–7840. doi: 10.1021/jf030383v

Mandujano Bueno, A., Pons Hernández, J. L., Paredes Melesio, R. & García Meza, Paul. (2018). Diversidad genética de maguey (*Agave* spp.) en las sierras y llanuras del norte de Guanajuato. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 9(3), 511-523. <https://doi.org/10.29312/remexca.v9i3.1212>

Martínez-Palacios, A., Morales-García, J. L., & Rodríguez, S. G. (Eds.). (2015). *Aspectos sobre el manejo y la conservación de agaves mezcaleros en Michoacán*. CECTI, Consejo Estatal de Ciencia, Tecnología e Innovación de Michoacán.

Mikiciński, A., Sobiczewski, P., Sulikowska, M., Puławska, J., & Treder, J. (2010). Pectolytic Bacteria Associated with Soft Rot of Calla Lily (*Zantedeschia*

spp.) Tubers. *Journal of Phytopathology*, 158(4), 201–209. doi:10.1111/j.1439-0434.2009.01597.x

Montero-Calasanz, M. D. C., Göker, M., Rohde, M., Spröer, C., Schumann, P., Busse, H. J. & Camacho, M. (2013). *Chryseobacterium hispalense* sp. nov., a plant-growth-promoting bacterium isolated from a rainwater pond in an olive plant nursery, and emended descriptions of *Chryseobacterium defluvii*, *Chryseobacterium indologenes*, *Chryseobacterium wanjuense* and *Chryseobacterium gregarium*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63 (Pt_12), 4386-4395.

Morales-García, J. L., Hernández Valencia, A. S. y Martínez-Palacios, A. (2015). Identificación y medidas de control de las principales enfermedades que afectan al *Agave cupreata* en Michoacán. 17-27 p. En: Martínez-Palacios, A., Morales-García, J. L., & Rodríguez, S. G. (Eds.). *Aspectos sobre el manejo y la conservación de agaves mezcaleros en Michoacán*. CECTI, Consejo Estatal de Ciencia, Tecnología e Innovación de Michoacán.

Mullett, M. S., Tubby, K. V., Webber, J. F., & Brown, A. V. (2016). A reconsideration of natural dispersal distances of the pine pathogen *Dothistroma septosporum*. *Plant Pathology*, 65(9), 1462–1472. doi:10.1111/ppa.12522

Muñoz R., Violeta, Cisterna O., Viviana & France I., Andrés (2020). Aislamiento de microorganismos fitopatógenos [en línea]. *Chillan: Boletín INIA - Instituto de Investigaciones Agropecuarias*. 428. p. 77-91. Disponible en: <https://biblioteca.inia.cl/handle/123456789/67165>.

Narayanasamy, P. (2011). *Microbial Plant Pathogens-Detection and Disease Diagnosis: Bacterial and Phytoplasmal Pathogens*. Springer, 2. DOI 10.1007/978-90-481-9769-9_5

Narayanasamy, P. (2011). *Microbial Plant Pathogens-Detection and Disease Diagnosis: Fungal Pathogens*. Springer, 1. DOI 10.1007/978-90-481-9735-4

Obregón, P & Obregón, R. (2016). Mezcales únicos Montana Edición Especial 2016. *Mezcales de Leyenda*. <https://mezcaldeleyendas.com/mezcales-unicos/>

Oliver, R. (Ed.). (2024). *Agrios' Plant Pathology*. Elsevier Academic Press. <https://doi.org/10.1016/C2019-0-04179-9>

Ormeño Villajos, S. (2023). *Introducción sintética a las Enfermedades de las Plantas*. Universidad Politécnica de Madrid. Madrid. ISBN 978-84-09-50046-8.

Palemón-Alberto, F., Ortega-Acosta, S.Á., Domínguez-Monge, S., Castañeda-Vildozola, Á., Reyes-García, G., Cruz-Lagunas, B., & Flores-Simon, O. U. (2021). First report of bud soft rot on *Agave angustifolia* caused by *Pantoea dispersa* in México. *Plant Disease*, 105(10), 3286.

Prell, H.H., & Day, P.R. (2001). *Plant-fungal pathogen interaction: a classical and molecular view*. Berlin: Springer, pp. 1-191.

Riley, M.B., Williamson, M.R., and Maloy, O. (2002). Plant disease diagnosis. Spanish translation by José Carlos Ureta R., 2016. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2002-1021-01

Rubio Cortes, R. (2007). Enfermedades del cultivo de agave. p. 169-195, En: Rulfo Vilchis, F.O., Pérez Domínguez, J.F., Del Real Laborde, J.A. & Byerly-Murphy, K.F. (eds.). Conocimiento y prácticas agronómicas para la producción de *Agave tequilana* Weber en la zona de denominación de origen del tequila. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Pacífico Centro.

Salazar-Rivera, G. I., Pereira-Santana, A., Hernández-Velázquez, I. M., Olivares-Miranda, M., Ibarra-Laclette, E., Gschaedler Mathis, A. C., Enríquez-Vara, J.N. & Zamora-Briseño, J. A. (2024). Disentangling the gut bacterial communities of the agave weevil, *Scyphophorus acupunctatus* (Coleoptera: Curculionidae). *Symbiosis*, 92(3), 381-392.

Salcedo-Martínez, S. M., González-Álvarez, M., & Moreno-Limón, S. (2010). Plantas productoras de fibras de importancia económica. En Alvarado Vázquez, M., Rocha Estrada, A. & Moreno Limón S. (eds.), *De la lechuguilla a las biopelículas vegetales* (pp. 199-226). UANL.

Sang, M. K., Kim, H.-S., Myung, I.-S., Ryu, C.-M., Kim, B. S., & Kim, K. D. (2013). *Chryseobacterium kwangjuense* sp. nov., isolated from pepper (*Capsicum annuum* L.) root. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, 63(Pt8), 2835–2840. doi:10.1099/ijms.0.048496-0

San Martín-Romero, E., Luna-Rodríguez, M., Díaz-Fleischer, F., Iglesias-Andreu, L.G., Noa-Carranza, J.C., Flores-Estévez, N., & Barceló-Antemate, D. (2014). A strain of *Chryseobacterium* sp. isolated from necrotic leaf tissue of chayote (*Sechium edule* Jacq). *International Research Journal of Biological Sciences*, 3(4), 52-60.

Schaad, N.W., Jones, J.B. & Chun, W. (2001). *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*, Third Edition. American Phytopathological Society Press (APS press). <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2001.00635.x>

Shen, F.T., Kämpfer, P., Young, C.C., Lai, W.A., & Arun, A.B. (2005). *Chryseobacterium taichungense* sp. nov., isolated from contaminated soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55(3), 1301-1304.

SENASICA-DGSV. (2016). Picudo del agave (*Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal 1838) (Coleoptera. Dryophthoridae). Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria Dirección General de Sanidad Vegetal-Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria-Grupo Especialista Fitosanitario. Ficha Técnica. Tecámac, México, 13 p.

SENASICA. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (2020). Ficha Técnica: Aislamiento de bacterias fitopatógenas y pruebas de patogenicidad [Versión 1.0]. Autor.

SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, (2016). El impacto de las plagas y enfermedades en el sector agrícola. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. <https://www.gob.mx/siap/articulos/el-impacto-de-las-plagas-y-enfermedades-en-el-sector-agricola#:~:text=Las%20enfermedades%20de%20las%20plantas,la%20agricultura%2C%20es%20muy%20grande>.

Solís-Aguilar, J.F., González-Hernández, H., Leyva-Vázquez, J.L., Equihua-Martínez, A., Flores-Mendoza, F.J. & Martínez-Garza, A. (2001). *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal, plaga del agave tequilero en Jalisco, México. *Agrociencia* 35: 663–670

Stoessl, A., Abramowski, Z., Lester, H.H., Rock, G.L. & Towers, G.H.N. (1990). Further toxic properties of the fungal metabolite dothistromin. *Mycopathologia* 112, 179–186. <https://doi.org/10.1007/BF00436652>

Strange, R. (2003). Introduction to plant pathology. John Wiley & Sons (498). ISBN 0470849738, 9780470849736, 9780470869536

Suslow, T.V., Schroth, M.N. & Isaka, M. (1982). Application of a rapid method for Gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. *Phytopathology* 72:917-918.

Terán-Vargas, A.P. & Azuara-Domínguez, A. (2013). El picudo *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal y su manejo en el agave tequilero (*Agave tequilana* F.A.C. Weber) variedad azul. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Noreste Campo Experimental Las Huastecas. Folleto Técnico 1. Ciudad de México, México.

Treviño-Carreón, J., Mora-Olivo, A., Carreón-Pérez, A., & Valiente-Banuet, A. (2011). Descubriendo el valor de los magueyes tamaulipecos. *CienciaUAT*, 5(3), 34-40.

Triplehorn, C.A. & Johnson, N. (2004). Borror and DeLong's Introduction to the Study of Insects. 7th ed.

Valiente-Banuet, A. (2023). Mezcal Boom and Extinction Debts. In: Jones, R.W., Ornelas-García, C.P., Pineda-López, R., Álvarez, F. (eds) Mexican Fauna in the Anthropocene. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-031-17277-9_14

Vargas Cruz, M. (2022). Potencial biotecnológico del *Agave montana* Villarreal (Asparagaceae) en el cultivo in vitro. (Tesis).

Vázquez-García, J.A., Padilla-Lepe, J.1, Servín Díaz, A.S., Cortés García, C. (2022). *Agave martaelenae* y *A. servandoana* (sección Inermes, Asparagaceae), Dos especies nuevas endémicas de Jalisco, México, con aptitud ornamental. Bol. Nakari, 33(2): 43-55

Villarreal Q., J. A. (1996). Una nueva especie de “*Agave*” subgénero “*Agave*” (Agavaceae) de México. SIDA, Contributions to Botany, 17(1), 191–195. <http://www.jstor.org/stable/41960966>

Wang, H.F., Rui K., Zeng, X.P., Xiao, M., Fu, M.Y., & Chen M.C. (2018). Investigating report of diseases and identification of major pathogens on *Agave sisalana*. Journal of Southern Agriculture, 49(10), 1988-1994 ref. 23.

Weon, H.-Y., Kim, B.-Y., Yoo, S.-H., Kwon, S.-W., Cho, Y.-H., Go, S.-J. & Stackebrandt, E. (2006). *Chryseobacterium wanjuense* sp. nov., isolated from greenhouse soil in Korea. INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY, 56(7), 1501–1504. doi:10.1099/ijs.0.64179-0

Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., & Miller, W. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences, J Comput Biol 2000; 7(1-2):203-14.

Zizumbo-Villareal, D., Vargas, O., Rosales, J. J., Colunga García-Marín, P. (2012). Sustainability of the traditional management of *Agave* genetic resources in the elaboration of mezcal and tequila spirits in western México. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 60, 33-47.

12. Anexos

Anexo 1. Metodología utilizada para la preparación de medios y pruebas rápidas realizadas.

Tinción de Gram (Schaad et al., 2001).

Reactivos

Agua destilada

Cristal violeta

Lugol

Alcohol 95%

Safranina

Sobre un portaobjetos colocar una gota de agua destilada y esparcir una película bacteriana con el asa bacteriológica, secar al aire para luego pasarlo dos veces sobre una flama y así fijar las bacterias al portaobjetos. Añadir una gota de cristal violeta y dejar reposar por 1 minuto. Lavar con agua destilada por unos segundos y escurrir el agua restante, agregar una gota de Lugol por 1 minuto. Volver a lavar con agua destilada evitando que el chorro de agua sea directo, posteriormente aplicar una gota de alcohol al 95% durante 15 segundos para eliminar el exceso de colorante y lavar. Por ultimo añadir una gota de safranina por 10 segundos y lavar. Dejar secar para luego observarse bajo microscopio. Las bacterias Gram positivas se tiñen de púrpura a negro azulado; Las bacterias Gram negativas se tiñen de rojo.

KOH test (Suslow et al., 1982; Schaad et al., 2001).

La prueba de KOH 2% nos permite detectar de manera fácil y rápida bacterias Gram negativas por lo que es un complemento a la tinción de Gram.

Mezclar un bucle de bacteria con 2 gota de KOH al 2%. Las bacterias Gram-negativas se volverán gomosas y formaran una especie de hilo viscosos al levantar el asa bacteriológica de la mezcla, mientras que las bacterias Gram-positivas no reaccionaran.

King et al's medium B agar (KB) (King et al., 1954; Schaad et al., 2001).

	Para 500ml
Peptona de proteasa #3 (Difco)	10.0 g
K ₂ HPO ₄	0.75 g
MgSO ₄ •7H ₂ O	0.75 g
Glicerol	7.5 ml
Agar	7.5 g

Estriar bacteria en la placa de agar e incubar a 25°C. Después de 48 h, observar si hay pigmento fluorescente con luz normal y en la oscuridad con luz ultravioleta de longitud de onda larga (366 nm) para el pigmento fluorescente.

Anaerobic growth (Hugh and Leifson) Medio basal OF. (Hugh & Leifson, 1953; Schaad et al., 2001).

	Para 250ml
Peptona de caseína	0.5 g
NaCl	1.25 g

KH ₂ PO ₄	0.075 g
Agar	0.75 g
Azul de bromotimol (solución acuosa 1%)	0.75 ml

Disolver los ingredientes y ajustar el pH al 7.1, esterilizar en autoclave. Añadir 5 ml de medio basal en tubos; preparar solución acuosa de glucosa 10% y esterilizar por filtración. Agregar 0.5 ml de glucosa estéril por vía aséptica para cada tubo con el medio basal. Inocular dos tubos por cada cepa de organismo a probar, por medio de punción sin tocar el fondo del tubo. Cubrir uno de los tubos con una capa de parafina esterilizada, el otro con torunda de algodón. Un cambio de color de azul a amarillo en ambos tubos es positivo para crecimiento anaerobio (fermentación).

Yeast extract-dextrose-CaCO₃ (YDC) (Schaad et al., 2001).

	Para 500ml
Extracto de levadura	5.0 g
Dextrosa (glucosa)	10.0 g
Carbonato de calcio, USP polvo fino	10.0 g
Agar	7.5 g

Esterilizar en Autoclave a 10 PSI por 1h. El medio estéril debe ser enfriado en baño de agua y el CaCO₃ suspendido mediante remolinos antes ser verterse en las placas.

Anexo 2. Ejemplar herborizado de *Agave montana* con síntomas y/o signos de Tizón de la penca de agave por *Dothistroma septosporum*, para futuras consultas.



Anexo 3. Secuencias depuradas de los patógenos más relevantes encontrados en *Agave montana*.

	Secuencia (3'-5'):
<i>Chryseobacterium</i> sp.	GCCGAGCGGTATTTGTTCTTCGGAACAGAGAGCGGCGTACGGGTGCGGAACACGTGTGCAACCTG CCTTTATCAGGGGATAGCCTTTGAAAGGAAGATTAATACCCATAATATTAAGTGGCATCACTTGA TATTGAAACTCCGGTGGATAGAGATGGGCACGCGCAAGATTAGATAGTTGGTAGGTAACGGCCTACCA AGTCAGTGATCTTTAGGGGGCTGAGAGGGTATCCCCACACTGGTACTGAGACACGGACAGACTCCT ACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGACAATGGGTGAGAGCCTGATCCAGCCATCCCCTGTAAGGAC GACGGCCATGCGGTTGTAACCTCTTTTGTATAGGGATAAACCTTTCCAGCTGTGGAAGCTGAAGGTAC TATACGAATAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTATCCG GATTTATTGGGTTAAAGGGTCCGTAGGCGGATCTGTAAGTCAGTGGTAAATCTCACAGCTTAACTGTGA AACTGCCATTGATACTGCAGGCTTTGAGTAAAGTGAAGTGGCTGGAATAAGTAGTGTAGCGGTGAAATG CATAGATATTACTTAGAACCAATTGCGAAGGCAGGTCACTATGTTTTAACTGACGCTGATGGACGAAAG CGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAGCCGTAACGATGCTAACTCGTTTTTGGGGC TTCGGCTTCAGAGACTAAGCGAAAGTATAAGTTAGCCACTGGGGAGTACGTTCCGAAGAATGAAACTC AAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAGCGGTGATTATGTGGTTTAATTCGATGATACGCGAGGAACCTT ACCAAGGCTTAAATGGGAATTGATCGGTTTAAAGTACACTTCCCTCGGGCAATTTCAAGGTGCTGCAT GGTTGTCGTAGCTCGTCCGTGAGGTGTTAGGTTAAGTCTGCAACGAGCGCAACCCCTGCTACTAGTT GCCATCATTAAAGTTGGGACTCTAGTGAGACTGCCTACGCAAGTAGAGAGGAGGTTGGGATGACGTC AATCATCACGGCCCTTACGCCCTTGGGCCACACACGTAATAACAATGCGCGGTACAGAGGGCAGCTACACA GCGATGTGATGCAAACTCGAAAGCCGGTCTCAGTTCGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCTATGAAGCT GGAATCGCTAGTAATCGCGCATCAGCCATGGCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCGCCC GTC AAGCCATGGAAGTCTGGGGTACCTGAAAGTCCGGTGACCGTAAAGGAGCTGCC
<i>Raoultella terrigena</i>	CGCCCTCCCGAAGGTTAAGTACCTACTCTTTTGC AACCCTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACA AGGCCCGGGAACGTATTCACCGTGGCATTCTGATCCACGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGGAGTTCGA GTTGCAGACTCCGATCCGGACTACGACATACTTTATGAGGTCCGCTTGTCTCTCGGAGGTCGCTTCTCTTT GTATATGCCATTGTAGCAGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCAATCCCCACCTT CCTCCAGTTTACTACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGGCCGAACCGCTGGCAACAAGGATAAAGGTTGC GCTCGTTGCGGGACTTAACCAACATTTCAACAACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAGAG TTCCGAAGGCACAAAGCATCTCTGCTAAGTTCTCTGGATGTAAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGC ATCGAATTAACCCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTC AATTCATTTGAGTTTTAACCTTGGGGCC GACTCCCCAGGCGGTGACTTAACCGGTTAGCTCCGGAAGCCACTCCTCAAGGGAACAACCTCCAAGTC GACATCGTTTACAGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGC
<i>Dothistroma septosporum</i>	GGGTATTGCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGCAAGCCGAGTTG TAATTTGTAGAGGATGCTTTCGCCAGCGCCGTTCTAAGTTCCCTTGGACAGGACGTATAGAGGGTGAG AATCCCCTATGTGACCGGCGCGCAGCCTTTACGTAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGC TCTAAATGGGAGGTAATTTCTTCTAAAGCTAAATACCGCCAGAGACCGATAGCGCACAAAGTAGAGTGATC GAAAGATGAAAAGCACTTTGGAAGAGAGTTAAAAAGCAGTGAAATTTGTAAGGGAAGCGCTTGC AACC AGACTTCGTAGCGATGTTCCGCCGGTCTTCTGACCGGTCTACTCATTGTGCGGAGGCCAACATCGTCTAGG GCCGCTGGATAAGACCTAAGGAATGTAGCTTCCCTCGGGAAGTGTATAGCCTGTGGTGATGCGGGGAGTC CCGGGCGAGGTCTGCGCTTCGGCAAGGATGTTGGCGTAATGTTGTGACGCGCCCGTCTTGAACACGGA CCAAGGAGTCTAACATCTATGCGAGTGTTCGGGTGTCAAACCCCTACGCGTAATGAAAGTGAACGGAGGTG GGAAGCGCAAGTGCACCATCGACCGATCCTGATGTCTCGGATGGATTGAGTAAGAGCATAGCTGTTGG GACCCGAAAGATGGTGAACATGCTGAATAGGGTGAAGCCAGAGGAAACTCTGGTGGAGGCTCGCAGCG GTTCTGACGTGCAAACTCGATCGTCAAATTTGGGTATAGG