UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO

Facultad de Ciencias Agropecuarias y Ambientales
Maestría en Ciencias Agropecuarias y Gestión Local

Participación de *Scyphophorus acupunctatus* como vector de *Dickeya chrysanthemi*, agente causal de la pudrición del cogollo de agave-mezcal (*Agave cupreata*) y susceptibilidad in vitro del patógeno a antibióticos

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias Agropecuarias y Gestión Local

Presenta
Carmen Aurelio Felicito

Dirigida por:

Director: Dr. Elías Hernández Castro
Co-director: Dr. J. Antonio Mora Aguilera

Asesores:

Dra. Mirna Vázquez Villamar
Dr. Héctor Ramón Segura Pacheco
Dra. Teolincacihuátl Romero Rosales

Iguala de la Independencia Gro, 13 de diciembre de 2020.

La presente tesis titulada "**Participación de *Scyphophorus acupunctatus* como vector de *Dickeya chrysanthemi*, agente causal de la pudrición del cogollo de agave-mezcal (*Agave cupreata*) y susceptibilidad in vitro del patógeno a antibióticos"**, realizada por la alumna **Carmen Aurelio Felicito**, forma parte del proyecto sectorial 263188 SEMARNAT-CONACYT: "**CARACTERIZACIÓN FÍSICA, QUÍMICA Y BIOLÓGICA DEL MAGUEY SACATORO (*Agave angustifolia* HAW) PARA SU APROVECHAMIENTO SUSTENTABLE EN LA REGIÓN COMPRENDIDA ENTRE LOS MUNICIPIOS DE CHILAPA Y HUITZUCO, GRO. BALSAS**", bajo la dirección del Comité Tutoral indicado y ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRIA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y GESTIÓN LOCAL

COMITÉ TUTOTRIAL

Director+	Dr. Elías Hernández Castro
Codirector	Dr. J. Antonio Mora Aguilera
Tutor	Dra. Mirna Vázquez Villamar
Tutor	Dr. Héctor Ramón Segura Pacheco
Tutor	Dra. Teolincacihuátl Romero Rosales

Cada uno de nosotros, como el maguey, nace en la tierra tibia de México.
Aferrado con amor a ella, crece.
En la escasez y en la sequía, al cielo levanta sus hojas con púas.
En gratitud, florece una vez, y se seca.
(Karl Von Gagern, 1862)

Dedicatorias

A mis padres Nicolás y Rosario por haberme dado la vida y alentarme a seguir cosechando mis logros, solo puedo decirles gracias por todo.

A mis hermanos Sandy, Jaime, Samuel, Rodolfo y Dionisio que siempre me han apoyado de alguna u otra forma, a pesar de la distancia y los obstáculos que se hayan presentado, gracias a todos.

A mi hijo Nicolás por apoyarme en todo y alentarme con sus ocurrencias y amor incondicional.

A Castro Joaquín por siempre animarme y creer en mí, por la confianza depositada y apoyo incondicional.

A Juanita gracias por recibirme, acompañarme y nunca dejarme sola, por su amistad muchas gracias.

A la Dra. Mirna por haberme apoyado en todo y nunca dejarme sola en este camino, por sus enseñanzas y amistad, le agradezco infinitamente.

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma de Guerrero (UAGro) y Facultad de Ciencias Agropecuarias y Ambientales por permitirme participar en la Maestría en Ciencias Agropecuarias y Gestión Local (MCAYGL) y postularme en la convocatoria para becas de financiamiento. Al personal que me brindo todo el apoyo, les agradezco de corazón.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada de acuerdo al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC).

A los maestros que fueron parte de mi formación y que compartieron sus experiencias, conocimientos y dedicaron su tiempo durante el proceso de esta investigación.

Al proyecto sectorial 263188 SEMARNAT-CONACYT: "CARACTERIZACIÓN FÍSICA, QUÍMICA Y BIOLÓGICA DEL MAGUEY SACATORO (*Agave angustifolia* HAW) PARA SU APROVECHAMIENTO SUSTENTABLE EN LA REGIÓN COMPRENDIDA ENTRE LOS MUNICIPIOS DE CHILAPA Y HUITZUCO, GRO. BALSAS", gracias por haberme incluido y poder llevar a cabo el trabajo de investigación.

Mi más sincero reconocimiento al Dr. Elías Hernández Castro por el apoyo académico durante estos dos años de estudio.

Al Dr. J. Antonio Mora Aguilera gracias por contribuir y enriquecer este trabajo.

Gracias al Dr. Héctor Ramón Segura Pacheco por compartir su conocimiento y experiencias durante esta investigación.

A la Dra. Teolincacihuátl Romero Rosales por contribuir con su conocimiento en la realización de esta investigación.

A los M. C. Eugenia Cabrera y José Luis Noyola muchas gracias, por haberme compartido su conocimiento, tenido tanta paciencia hacía mí y haber contribuido en esta investigación.

A las Dras. Del Laboratorio de Ecología Genómica del Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM en Cuernavaca, Morelos, Méx. Muchas gracias por haberme recibido y dado todas las facilidades para que mi estancia fuera muy agradable con Uds.

Pero esta investigación no hubiera sido posible sin el apoyo de los productores mezcaleros muy en especial a los Sres.

Faustino Castro, Felipe Flores Moreno. Al Señor Melquiades Tlacotempa Zapoteco† y Roberto Ataque Sereno† que Dios los tenga en su gloria, y principalmente a la organización SANZEKAN TINEMI por el apoyo incondicional para hacer posible esta investigación.

No puedo dejar de agradecer al Programa de Mujeres Indígenas encabezada por la Dra. Berenice Illades Aguiar. Por todo el apoyo otorgado y haberme permitido conocer otras culturas y grandes experiencias adquiridas, lo que contribuyó a que yo este avanzando un peldaño más en mí vida. muchas gracias.

ÍNDICE

I.- INTRODUCCIÓN GENERAL ***9***

II.- OBJETIVOS ***11***

2.1.- Objetivo General 11

2.2.- Objetivos Particulares 11

III.- HÍPOTESIS ***12***

3. 1.- Hipótesis Generales 12

3. 2.- Hipótesis específicas 12

IV. REVISIÓN DE LITERATURA GENERAL ***13***

4. 1.- El Maguey mezcalero 13

4. 2.- Importancia del maguey mezcalero 13

4.3.- Problemas fitosanitarios del maguey 14

4.3.1.- Plagas del maguey 14

4.3.2.- Enfermedades de importancia en el maguey 15

4.4.- Estatus como plaga. 15

4.5.- Hospedantes 15

4.6.- Picudo del agave *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae). 16

4.6.1.-Origen y distribución geográfica 16

4.6.2.-Clasificación taxonómica 16

4.6.3.-Descripción morfológica del picudo 16

4.6.4.-Biología del picudo 17

4.6.5.-Hábitos del picudo 17

4.6.6.-Daños por picudo. 18

4.7.-Métodos de control biológico, cultural y químico 19

4.8.- *Dickeya* chrysanthemi como principal causa de daño en cogollos de Maguey mezcalero 19

4.8.1.-Descripción Morfológica de *Dickeya* 21

4.8.2.-Reservorios de *Dickeya chrysanthemi* 21

4.8.3.-Distribución geográfica de *Dickeya* 21

V.- LITERATURA CITADA ***22***

VI. CAPÍTULO I. DEMOSTRACIÓN DEL PAPEL DE Scyphophorus acupunctatus COMO VECTOR DE Dickeya chrysanthemi, AGENTE CAUSAL DE LA MARCHITEZ DEL COGOLLO DE Agave cupreata. ***26***

6.1. RESUMEN 26

6.1.1. ABSTRAC 27
6.2. INTRODUCCIÓN 28
6.3. MATERIALES Y MÉTODOS 30
6.3.1 Localización. 30
6.3.2. Material Biológico. 30
6.3.3. Desinfestación de plántulas 30
6.3.4. Desinfestación de Picudos, periodo de ayuno he infestación 31
6.3.5. Preparación del inóculo de *Dickeya chrysanthemi* 31
6.3.6. Infestación de plantas de *A. cupreata* con *Scyphophorus acupunctatus* contaminado naturalmente con *Dickeya chrysanthemi* 31
6.3.7. Transformación genética de *Dickeya chrysanthemi* 32
6.3.8. Disección de *Scyphophorus acupunctatus* G. 33
6.3.9. Diseño experimental y análisis de resultados 36
6.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN 36
6. 5 CONCLUSIONES 48
.6.6.- LITERATURA CITADA 49
VII. CAPITULO II. EXPLORACION DE LA SENSIBILIDAD in vitro DE Dickeya chrysanthemi HA ANTIBIÓTICOS 54
7.1. RESUMEN 54
7.2. ABSTRAC 54
7. 3. INTRODUCCIÓN 55
7.4. MATERIALES Y MÉTODOS 56
7.4.1. Localización 56
7.4.2. Material Biológico. 56
7.4.3 a) Método del antibiograma disco-placa. 57
7.4. 4 b) Método de difusión en agar. 57
7.4.5. Proceso de maceramiento de las piezas de los picudos para verificar la eficiencia de los métodos de desinfestación 58
7.4.6 El análisis estadístico. 58
7.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN 59
7.4.- CONCLUSIÓN 64
7. 5 LITERATURA CITADA 65
VIII. CONCLUSIÓN GENERAL 68

I.- INTRODUCCIÓN GENERAL

El maguey mezcalero (*Agave cupreata*) es una planta representativa de México. De ella se obtiene la bebida alcohólica llamada mezcal (Barraza *et al*., 2014). El cultivo de esta especie es de gran importancia, debido a su alto requerimiento como materia prima en la industria mezcalera. En México se producen anualmente alrededor de dos millones de litros, generados a partir de magueyes presentes en 330,000 ha cultivadas con esta especie (Pérez *et al*., 2016). El mezcal se elabora en nueve entidades federativas de México que poseen la Denominación de Origen del Mezcal, la cual protege la propiedad y comercialización. La producción en el estado de Guerrero ocurre en 80 localidades de 18 de sus 81 municipios (Diario Oficial de la federación 2012) de las regiones: Centro, Costa Grande. Tierra Caliente, Norte y Montaña. Guerrero es el segundo estado en importancia nacional, después de Oaxaca.

Al generar un número importante de empleos: desde jornaleros hasta profesionistas haciendo investigación sobre el manejo de la especie: al contribuir para su manejo agronómico, preservación, cosecha, producción y comercialización (COMERCAM. 2019). Además, contribuye a la conservación de los bosques, selvas bajas y matorrales, que son hábitat de animales de importancia ecológica (CONABIO, 2018).

Las plantas de maguey alcanzan su madurez sexual entre siete y 15 años, período durante el que están expuestas al efecto de diversos factores bióticos y abióticos. Entre los primeros, está el coleóptero S*cyphophorus acupunctatus* Gyllenhal, conocido comúnmente como el picudo del maguey, es considerado el principal insecto plaga del agave al alimentarse de los tejidos de la planta, además de favorecer condiciones para el desarrollo de otros macro y microorganismos en los magueyes cultivadas o silvestres. Entre estos, es importante comprender la compleja interacción que involucra a *S. acupunctatus* y bacterias (Beltrán, 2005).
Dickeya chrysanthemi se aisló recientemente a partir de ejemplares de *A. cupreata* colectados en viveros de Chilapa, Guerrero (Cabrera *et al*., 2019). Es muy común

encontrar asociados a *S. acupunctatus* y *D. chrysanthemi*. Entender su interacción biológica es importante para mejorar la tecnología de control. En combinación, ambos organismos causan diferentes daños a plantas de *A. cupreata*, como son: pudrición, degradación y barrenado de tejidos, generando pérdida de plantas y baja productividad en vivero y poblaciones silvestres. El conocimiento de dicha interacción permitirá establecer las bases para el manejo de la enfermedad y del picudo. Además, podrá servir para consulta de futuras investigaciones (García-Mendoza, 2011).

Los objetivos fueron determinar la interacción biológica de *Dickeya chrysanthemi* con *Scyphophorus acupunctatus* en plantas de *A. cupreata,* considerando el modelo patógeno-vector. Y evaluar diversos antibióticos para determinar el que presentara la mayor efectividad para el control de *D. chrysanthemi*.

II.- OBJETIVOS

2.1.- Objetivo General

Explorar la participación de *Scyphophorus acupunctatus* como vector de *Dickeya chrysanthemi*, agente causal de la pudrición del cogollo de agave-mezcal (*Agave cupreata*) y susceptibilidad in vitro del patógeno a antibióticos de uso comercial y experimental.

2.2.- Objetivos Particulares

a) Determinar la capacidad de *Scyphophorus acupunctatus* para trasmitir células de *D. chrysanthemi*, transformadas con el plásmido pFAJ1819A, y causar marchitez suave de plantas de *A. cupreata* en condiciones de laboratorio y vivero, con base en el modelo de los postulados de Koch.

b) Documentar la naturaleza de la interacción física bacteria-insecto en el proceso de transmisión con base en cortes anatómicos de órganos internos de *S. acupunctatus* infestados con la cepa transformada de *D. chrysanthemi*

c) Explorar la sensibilidad *in vitro* de *D. chrysanthemi* a 14 antibióticos mediante la técnica de antibiogramas.

III.- HIPÓTESIS

3. 1.- Hipótesis Generales

En la interacción parasítica marchitez-*Agave cupreata*, el insecto *Scyphophorus acupunctatus* es el vector preferente de *D. chrysanthemi* al portarlo internamente, y es sensible a antibióticos de uso comercial y experimental

3. 2.- Hipótesis específicas

a) *Scyphophorus acupunctatus* es capaz de portar internamente células *de D. chrysanthemi*, en una relación no específica, y asociado a la bacteria, también de replicar la marchitez suave observada en plantas de agave-mezcal (*A. cupreata*) en Guerrero, México.

b) La transformación genética de *D. chrysanthemi* con el plásmido pFAJ1819A permite detectar por fluorescencia la ubicación precisa de la bacteria en órganos internos del insecto, y a la vez, documentar su presencia inequívoca en las diferentes etapas de verificación etiológica de la marchitez del cogollo, en el contexto de los postulados de Koch.

c) *D. chrysanthemi* presenta susceptibilidad diferenciada a distintos antibióticos de uso comercial y experimental.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA GENERAL

4. 1.- El Maguey mezcalero

La familia Agaváceae está ampliamente distribuida en el mundo. Por su diversidad, es un digno representante de México, con cerca de 330 especies, de las cuales 251 se ubican en este país. De ellas, 177 son endémicas y pueden ser encontradas en 24 estados. El género *Agave* se distribuye desde el sur de los Estados Unidos de América hasta Ecuador, (García-Mendoza, 2002 y 2011).

Cabe mencionar que, del total de *Agave*s identificados a nivel internacional, México posee en su territorio el 75 % de las especies conocidas (Flores *et al.,* 2010).

En todo el mundo, México se considera como el centro de origen del maguey mezcalero. Guerrero es uno de los nueve estados que cuentan con la Denominación de Origen de Mezcal (CRM, 2018).

Agave cupreata es una especie endémica, de la depresión del Río Balsas, una región semiárida de Guerrero y Michoacán, se distribuye en laderas de 1220 1850 msnm, este agave se destina a la producción del mezcal. (Gentry, 1982).

El maguey puede vivir entre cinco y setenta años, según la especie. Al llegar a su madurez produce cientos de flores que ofrecen néctar a insectos, aves y murciélagos que favorecen la polinización. Las flores fertilizadas producen semillas que son dispersadas por el viento y lluvia (Martínez-Palacios *et al*., 2011).

4. 2.- Importancia del maguey mezcalero

En Mesoamérica, los Agaves se conocen desde antes de la llegada de los conquistadores europeos. Los pueblos originarios de México los empleaban como fuente de alimento, bebida, fibra, medicina y material de construcción. Los colonizadores españoles lo llamaron “maguey”, palabra adoptada en su paso por las Antillas en el siglo XVI. Viene del náhuatl mexcalli (de metl, maguey, e ixcalli, cocido) (Guerrero, 2017). La palabra *Agave,* derivada del griego “admirable” o

“noble” y su nombre científico fue acuñado por el naturalista sueco Carl von Linné en su obra *Species Plantarum* en 1753. (CONABIO, 2018)

Tal es la diversidad del maguey o *Agave,* que de esta se obtienen productos famosos en todo el mundo, como el Mezcal y el Tequila, así como otros de menor conocimiento y difusión, tales como el pulque, la bacanora y el sotol, bebidas artesanales consumidas en diversas regiones de México. Además, existen otros productos derivados, como fibras textiles, forrajes, gusanos de maguey. Jarabes de agave, bebidas fermentadas (savia de la inflorescencia, jugo de hojas crudas o de piñas cocidas (Rodríguez *et al*., 2017).

En el grupo de los *agaves* usados para elaborar las bebidas etílicas, fermentadas y destiladas, está el maguey mezcalero (*A. cupreata*) de mayor importancia económica. El estado de Guerrero actualmente produce 5 millones de litros anuales, en 18 municipios de las regiones de Tierra Caliente, Centro, Norte, Montaña y Sierra (SIAP, 2019).

4.3.- Problemas fitosanitarios del maguey

El género *agave,* al ser una especie rica en azucares, es atacada por plagas, enfermedades y malezas, lo que llega a generar grandes pérdidas e incrementa costos de producción (CRM, 2019).

4.3.1.- Plagas del maguey

El Maguey es afectado por distintas plagas, por el daño que causan, los han clasificado en: barrenadores, chupadores y rizófagos (Solís *et al*., 2002).

Estos son algunos insectos considerados plagas relevantes en *A. cupreata* y son: escarabajo Rinoceronte, *Strategus aloeus* (L.). El insecto *S. acupunctatus* Gyllenhal y *S. interstitialis* (Pérez y Rubio, 2007).

4.3.2.- Enfermedades de importancia en el maguey

En cultivos tecnificados de *A. cupreata* se han aislado diferentes hongos como: *Nectria miltina*, *Alternaria tenuisisima, Fusarium oxysporum*, *F. proliferatum.*

Así mismo, se ha aislado una bacteria que causa síntomas de pudrición, identificada como *Erwinia* sp*.*, posteriormente corroborada con *Erwinia carotovora*, (Morales *et al*., 2012).

Beltrán (2005) documentó varios microorganismos en el lumen intestinal de larvas de *S. acupunctatus*. En este trabajo se identificó a *Rhodutula mucilaginosa, Leuconostos mesenteroides, Erwinia sp, Pseudomonas paucimobilis* y algunas especies de *Candida*, asociados al daño observado en *Agave tequilana* Weber var. Azul.

4.4.- Posición como plaga.

El picudo *S. acupunctatus* está catalogado como la plaga de gran importancia por su rango de distribución, registrado en todas las etapas fenológicas del maguey mezcalero *A. cupreata*, *A. tequilana* Weber var. Azul, *A. angustifolia* (Haw) y en sisal (*A. sisalana* Perrine), (Halffter, 1957).

Dicha especie causa daños desde 25 hasta el 95 % en la materia prima para producción del mezcal, tequila y otros subproductos que se obtienen del maguey, favoreciendo la entrada de otros microorganismos al momento de perforar las galerías en las hojas y piñas del *Agave*. Algunos autores consideran al picudo como transmisor de fitopatógenos (bacterias y hongos) en Agaves, encontrándose el resto del año (Solís *et al.,* 2001).

4.5.- Hospedantes

El picudo del agave *S. acupunctatus,* suele preferir especies como *A. cupreata, A. tequilana,* A. *fourcroydes, A. atrovirens* Karw, *A. angustifolia*, A. *sisalana*, A. *americana* L. y *A. lechuguilla* Torr., de la misma manera se ha evidenciado en

plantas del género *Dasyliron* y especies como el nardo (*Polianthes tuberosa* L.), (*Yucca valida* Brandegee), (*Aloe vera*), (*Draco* sp.) hasta en especies de cactus, como el *Pachycereus pringlei* (Solís *et al*., 2001; Servín *et al.*, 2006; González *et al*., 2007 a; Maya *et a*l., 2011).

4.6.- *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal.

4.6.1.-Distribución geográfica

El picudo *S. acupunctatus* fue identifcado por primera vez en América, en la actualidad está disperso por todo el mundo, encontrándose en Africa, Estados Unidos, Tanzania y sudamérica (González *et al.,* 2007).

4.6.2.-Clasificación taxonómica

Reino: Animalia
Phylum: Arthropoda
Clase: Insecta
Orden: Coleoptera
Familia: Dryophthoridae
Género: *Scyphophorus*
Especie: *S. acupunctatus*
Nombre científico *Scyphophorus acupunctatus*
Sinonimias: *Rhynchophorus asperulus* Le Conte, 1857, *Scyphophorus anthracinus* Gyllenhal, 1838, *Scyphophorus interstitialis* Gyllenhal, 1838 (Max del henequén), *Scyphophorus robustior* Horn, 1873 (CAB International, 2016).

4.6.3.-Descripción morfológica del picudo

Los adultos de *S. acupunctatus,* su medida va de 12 a 15 mm de longitud, pueden llegar a crecer hasta 19 mm; su cuerpo es negro brillante. El abdomen consta de 10 secciones, sin embargo, en la parte ventral solo cinco son visibles y en el dorso se aprecian ocho (Siller, 1985; Booth *et al.,* 1990).

Para determinar el sexo de los adultos, se usa la última sección del abdomen en la parte ventral; para las hembras es acuminado y angosto, mientras que en los machos es romo y suele ser más ancho (con forma de media luna) (Ramírez, 1993a; Sille 1985).

Los huevecillos son ovoides de aproximadamente 1.5 mm de longitud y de 0.5 a 0.6 mm de diámetro de color crema. Cuando están bien desarrolladas llegan a medir alrededor de 18 mm a lo largo por 4 mm de ancho. Las pupas, del tipo exarata, tienen una longitud media de 16 mm (Lock, 1969; Ramírez, 1993).

4.6.4.-Biología del picudo

El ciclo biológico de este insecto depende del huésped, esto con base en los estudios realizados en diferentes especies de agave, el ciclo biológico varía en función del contenido de nutrimentos que son esenciales para el óptimo desarrollo de *S. acupunctatus*. El tiempo de incubación del huevo es de 3 a 8 días, aunque con frecuencia duran 5 días. En estado de larva su estadio vario; un ejemplo, es en el maguey pulquero *Agave atrovirens* el insecto presenta tres estadios requiriendo 58 días para completar su desarrollo, mientras tanto en *A. sisalana* dura cinco estadios que necesita 21 a 58 días para alcanzar su desarrollo. En *A. fourcroydes* presenta 11 estadios, con ello necesita 108 días para alcanzar su desarrollo. Las etapas de prepupa (larva en el cocón) y pupa de 2 a 16 días. El adulto puede llegar a vivir hasta ocho meses (Bravo *et al.*, 2004)

Ramírez (1993) mencionó que el ciclo biológico de *S. acupunctatus* necesita un promedio de 135 días, a 27 °C.

4.6.5.-Hábitos de *S. acupunctatus*

El insecto se ha localizado los 365 días del año, además no les gusta la claridad. Por lo general arriban primero en las hojas del maguey y de ahí se introducen al cogollo hasta llegar a la raíz de la planta. En daños muy severos la planta queda completamente infestada, se ha documentado que prefiere plantas adultas, pero también en plantas jóvenes. De acuerdo con distintos autores, el picudo es atraído

por el agave con pudrición del cogollo o en estado de mayor severidad (González et al., 2007).

Estos carbohidratos representan una importante fuente de energía para los insectos herbívoros, especialmente durante el estado larvario. Algunos carbohidratos son más importantes que otros. La fructosa es la más utilizada en un 100 %. La sacarosa se relaciona con el peso del cocón. Por lo general, los carbohidratos utilizados por el insecto son mono y disacáridos. (Beltrán, 2005).

Otro estudio demostró que el contenido de nitrógeno en la dieta diaria es proporcional al desarrollo del insecto, y que los niveles de proteína solubles y aminoácidos son importantes para proporcionar la cantidad de nitrógeno total. El agua en los alimentos es de gran importancia para algunas especies de insectos, incluido *S. acupunctatus,* porque un bajo contenido de esta puede reducir la eficiencia en la absorción de nitrógeno (Frieind, 1958).

El picudo cuando recién emerge se queda dentro del cocón por varios días. Después sale de este, pero permanece en la piña (copula ahí) por un tiempo o irse, esto depende de la cantidad de alimento para ovipositar y alimentarse. Los picudos por lo general se quedan cerca de donde nacieron, lo que quiere decir que no se dispersan muy lejos (Solís, 2001).

4.6.6.-Daños por picudo.

Las piñas presentan daños causados principalmente por larvas, se alimentan haciendo galerías, en plantas de siete años o hasta de un año (González *et al.,* 2007a).

El insecto llega a dañar un 24.5 % en piñas de *A. tequilana,* el grado de ataque propicia la muerte total de la planta, a diferencia de otros insectos y plagas de los magueyes en que su ataque es secundario al picudo, debido a la asociación que realiza este insecto, inicia el ataque y la planta se debilita, tanto en especies

silvestres como en vivero. reportada en especies silvestres, pero también en vivero (Solís *et al.,* 2001).

El principal daño lo genera el picudo al perforar el tejido del agave, permitiendo la invasión de fitopatógenos, como *petobacterium carotuvrum* J. causante de la pudrición de cogollo en *A. tequilana.* Tal enfermedad podría ser mortal y se ha propuesto considerar al picudo como vector de dicho (González *et al.,* 2007).

4.7.-Métodos de control biológico, cultural y químico

Para el control biológico, han utilizado insectos que se alimentan del picudo o viven asociados a él, como los histéridos que depredan larvas: *Placodes ebeninus* Liwis., *Hololepta* spp., *L. cacti* Marseul *lioderma yucateca* Marseul y *L*; el que vive como parásito *Alienoclypeus insolitus* Shenefelt algunos hongos como *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill., *Verticillium* spp. *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff).

4.8.- *Dickeya* chrysanthemi como principal causa de daño en cogollos de Maguey mezcalero

Dickeya sp. se caracteriza por la capacidad de degradar los órganos suculentos de sus hospederos y por sobrevivir largos periodos en suelo y en desechos vegetales, lo cual genera infecciones latentes (Snehalatharani y Khan 2010; CABI 2011).

En un estudio realizado por Beltrán (2005) mencionó que el picudo sirve de transporte y huésped de la levadura *Rhodutula mucilaginosa y Leuconostoc mesenteroides*. comenta que cada microorganismo ejecuta una función indispensable en esta asociación, donde la levadura es un productor natural de la enzima inulinasa, provocando la hidrólisis de la inulina y aportando los carbohidratos para el desarrollo del insecto. La bacteria *L. mesenteroides* prepara el ambiente favorable disminuyendo el pH sin dañar a la planta. Esto, para evitar presencia de microbios secundarios u oportunistas como *Pseudomonas y Erwinia*.

Dickeya spp. y Pectobacterium son patógenos de amplio rango de hospederos. Fucikovsky y Velázquez (2002) mencionaron que las larvas introducen bacterias pectinolíticas Gram positivas, que son las causantes de la infección, provocando una pudrición suave y coloración en el tejido, que conlleva al daño total del agave.
Las condiciones ambientales de humedad, temperatura y disponibilidad de oxígeno ejercen una gran influencia, tanto en la aparición de la enfermedad como en la extensión del daño causado. Las especies que afectan el pseudo-tallo de banano y plátano se han agrupado o nombrado como *Dickeya chrysanthemi* (*Erwinia chrysanthemi*) y *Dickeya sp*. (Pectobacterium *chrysanthemi*) (Samson *et al*., 2005, Li *et al.,* 2011**).**

Algunos autores plantean que dicho patógeno puede causar pérdidas hasta de 90 %. *Pectobacteriu*m (antes *Erwinia),* incluye especies que ocasionan pudriciones blandas por la degradación enzimática de la pectina estructural de la pared celular vegetal. Dicha especie constituye un taxón complejo que incluye géneros con un amplio rango de características génicas, fenotípicas, bioquímicas y de hospederos; en consecuencia, de una amplia distribución (Edward *et al*., 1973).

Clasificación Taxonómica de *Dickeya chrysanthemi:*
Reino: Bacteria
Phylum: Proteobacteria
Clase: Gammaproteobacteria
Orden: Enterobacteriales
Familia: Enterobacteriaceae
Género: *Dickeya*
Especie: *chrysanthemi*
Sinónimos: *Erwinia carotovora* var. *Chrysanthemi, Erwinia chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum var. crisantemo, Pectobacterium cartovorum f. sp. Chrysanthemi, Pectobacterium chrysanthemi, Pectobacterium parthenii, Pectobacterium parthenii var. Chrysanthemi.* Los nombres hacen referencia al huésped que pudieran afectar, de esta manera, *E. chrysanthemi* se ha clasificado

en distintos patovares, (pv. *chrysanthemi,* pv. *Dianthicola*, pv *dieffenbachiae*, pv. *Paradisia, pv. Parthenei y pv. zeae*). Recientemente, dichas especies han sido transferidas al género Dickeya, quedando distribuida en las siguientes especies, *D. chrysanthemi, D*. *dianthicola, D. dadantii*, *D. diaffenbachiae*, *D. zeae D. solani* (Samson *et al*., 2005, Corzo *et al.,* 2017).

4.8.1.-Descripción Morfológica de *Dickeya*

Dickeya spp., es una bacteria con forma bacilar, Gram-negativa, anaeróbica facultativa y motil con varios flagelos perítricos, el rango del tamaño de las células va de 0.8 a 3.2 µm por 0.5 a 0.8 µm. Las bacterias *Pectobacterium carotovorum subsp, carotovorum* y de *P. atroseptricum* se pueden diferenciar a través, de caracteres bioquímicos y serológicas moleculares. Dichas bacterias dependen de la fuente de carbono y energía disponible en la planta con pudrición.

4.8.2.-Reservorios de *Dickeya chrysanthemi*

Allium cepa, Dianthus caryophyllus, Agave spp., *Zea mays, Solanum tuberosum* y otras especies hortícolas y ornamentales. Sintomatología en patata, podredumbre blanda, necrosis y marchitez sistémica, en condiciones climáticas húmedas y cálidas, en maíz y otras especies podredumbre húmeda y marchitez de cogollo y doblado de las plantas a nivel del cogollo (Samson *et al*., 2005).

4.8.3.-Distribución geográfica de *Dickeya*

Se encuentra en zonas templadas y subtropicales: Estados Unidos, Canadá, Nueva Zelanda, Japón y México (Palacio *et al.,* 2006).

V.- LITERATURA CITADA

Aquino B. T., J. Ruíz V. y D. Martínez S. (2010). Ecología y biología de Scyphophorus acupunctatus G. (Coleoptera: Curculionidae), plaga del agave mezcalero en los Valles Centrales de Oaxaca. Naturaleza y desarrollo pp:8

Angelina B. R., H. González H., J. F. Solís A., M. Vázquez G. y J. M. Becerra L. (2007). Plagas Rizófagas. Manejo de Plagas del agave tequilero. Colegio de Postgraduados y Tequila Sauza S.A. de C.V., Zapopan, Jalisco, México.: 79-93. pp

Booth, R. G., L. M. Cox, and R. B. Magde. (1990). Coleoptero. Instituto Internacional de Entomología (An Institute of CAB International). Cambridge University Press. UK.

Beltrán, G. M. C. (2005). el picudo *Scyphophorus acupunctatus* Ghyllenhal (Coleoptera: Curculionadae) y su microbiota asociada al tejido dañado de *A. tequilana* Weber var. Azul TESIS, Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias:71. pp

CRM (2019). Consejo Regulador del Mezcal. Informe Estadístico. Consultado el 20 de junio de 2020. Disponible en: www.crm.org.mx

Conabio. (2008). Mezcales y diversidad. 19 de marzo 2020, de Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad Sitio web: www.conanbio.gob.mx

Corzo, L. M., Madelaine L. Quiñones-Pantoja. (2017). Identificación bioquímica, fisiológica y patogénica de aislados bacterianos asociados a la pudrición blanda y pierna negra en papa, Grupo de Fitopatología, Dirección de Sanidad Vegetal, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA) Vol. 32, No 3, Apartado 10, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba

De la C. G. H. (2006). Insectos asociados al cultivo de *Agave tequilana* Weber Var. Azul. en Yautepec, Morelos. Tesis de maestría en Protección Vegetal. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México 50 pp

Edward J.C., Tripathi S.C., Singh K.P. 1973. Observations on a “Tip-over” disease of banana in Allahabad. Current Science 42:696-697.

Fucikovsky L, Velasquez J. (2002). Complex bacterial, fungal and insect invasion of *Agave tequilana* Weber var. Azul. In: III International Bacterial Wilt Symposium. México (ABSTRACT). http://ibws.nexenservices.com/RSA%20Programm/Monday_poster.htm

Friend, W.G. (1958). Nutritional requirements of phytophagus insects. Annu. Rev. Entomol. 3:57-72.

García, M. A. (2011). *Agavaceae.* En R. Medina Lemos (Ed.), Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán (Fascículo 88). México: Universidad Nacional Autónoma de México -Instituto de Biología p. 95.

Garcia, M. A. (2002). Distribution of the genus *Agave (*Agavaceae) in Mexico. Cactus and Succulent Journal (74), pp:177-187.

González H. H., J. F. Solís A. & F. J. Flores M. (2007). Insectos chupadores y del follaje. Colegio de Postgraduados y Tequila Sauza S.A. de C.V., Zapopan, Jalisco, México. pp: 68-78

Guerrero (2017). Mediateca Guerrero consultado el 27 de mayo 2020. Disponible en: www.mediatecaguerrero.gob.mx/

Hernández-Valencia, R.E.M., López-Franco, R., Ruíz-Ordoñez, J., Ramirez-Rodriguez, H. and Benavides-Mendoza, A. (2003). The stomatal complex and epicuticular characteristics of crown rot disease of *Agave tequilana*

Weber (Agavaceae). Acta Hort. (ISHS) 618: 427 – 433. http://www.actahort.org/books/618/618_51.htm

Halffter G. (1957). Plagas que Afectan a las Distintas Especies de Agaves Cultivadas en México. Secretaria de Agricultura y Ganadería. México

Li p., Lin B., Shen H & PU X. (2011). Species-specific detection of *Dickeya sp*. (*Pectobacterium chrysanthemi*) in infected banana tissues, soil and water. African Journal of Biotechnology 10(74):16774-16780

Martínez, P. A., J.M. Gómez, C. Saenz, S. N. Perez-Nasser y N. Sanchez-Vargas (2011). Diversidad genética de *Agave cupreata* Trel. & Berger., consideraciones para su conservación. *Revista Fitotecnia Mexicana* 34: 159-165.

Mendoza, A. G. (2011). Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. *Agavaceae, faciculo*(88), 95.

Maya, Y., Palacios-Cardiel, C. y Jiménez, M. L., (2011). El cardón *Pachycereus pringley,* nuevo hospedero para *Scyphophorus acupunctatus* (Coleoptera: Curculionidae) en Baja California Sur, México. Revista Mexicana de Biodiversidad 82: 1041-1045

Ramírez C. J. L. (1993). Max del henequén *S. interstitialis* G., bioecología y control. Centro de Investigación Regional del Sureste. INIFAP-SARH. Mérida, Yucatán, México. Regional del Pacifico Centro p. 227

Pérez D. J. F. y R. Rubio C. (2007). Practicas agronómicas en la producción de *A. tequilana* Weber en zona de Denominación de Origen de Tequila pp: 135-168.

Rodríguez, R., Jiménez J, F., Del Real, J. I., Salcedo E., Zamora, J. F y Gilberto Íñiguez. (2013). Utilización de subproductos de la industria tequilera. Parte II. Compostaje de bagazo de agave crudo y biosóido provenientes de una

planta de tratamiento de vinazas tequileras. Rev. Int. Contam. Ambient vol. 29 no. 4, México nov.pag. 303-313.

Rubio, M. (2011). Las plagas exóticas amenazan el paisaje. Región de Murcia. [Publicado en línea el 3-1-2011].

Samson R., Legendre J.B., Systematic and Evolutionary Microbiology 55:14151427. Christen R., Fischerle Saux M., Achouak W., Gardan L. (2005). Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder et ál. 1953). International Journal of

SIAP (2019) Servicio de Información Agroalimentaria y pesquera. Anuario Estadístico de la producción Agrícola. (consultada en línea) http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/AvanceNacionalCultivo.do

Solís, J. F., H. González, J. l. Leyva, A. F. J. FLores A. Martínez. (2001). *S. acupunctatus* Gyllenhal, plaga del Agave en Jalisco, México. Agrociencia, # 35. pp: 663- 670

Servín, R., Tejas, A., Montoya, M. A., Robert, M. L., (2006). *Scyphophorus acupunctatus* G. Como potencial insecto–plaga de Yucca valida Brandegee en Baja California Sur, México. Folia Entomológica Mexicana 45: pp:1-7.

Tlalpal, B. B., González, H. H., Zavaleta Mejía, E., Sánchez Gaecía, P., Mora Aguilera. G., Nava Díaz, C., Del Real Laborde, J. y Rubio cortes, R. (2014). Colonización de Tricoderma y Bacillus en Plántulas de *Agave tequilana* Weber, Var. Azul y el Efecto Sobre la Fisiología de la planta y Densidad de Fusarium. Revista Mexicana de Fitopatología, (En línea) 32(1), pp 62-74. Disponible en: https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61232999006

VI. CAPÍTULO I. DEMOSTRACIÓN DEL PAPEL DE S*cyphophorus acupunctatus* COMO VECTOR DE *Dickeya chrysanthemi*, AGENTE CAUSAL DE LA MARCHITEZ DEL COGOLLO DE *Agave cupreata*.

DEMONSTRATION OF THE ROLE OF *Scyphophorus acupunctatus* AS A VECTOR OF *Dickeya chrysanthemi,* CAUSAL AGENT OF THE MARCHITY OF THE BROWN, OF *Agave cupreata.*

6.1. RESUMEN

Agave cupreata es una especie endémica del estado de Guerrero y Michoacán, México. La pudrición del cogollo, causada por *Dickeya chrysanthemi* (Dc), es uno de los principales problemas parasitarios en campo y viveros. *Scyphophorus acupunctatus* (Sa) se ha reportado asociado a la trasmisión de Dc, agente causal de la marchitez del cogollo de agaváceas. El objetivo de este trabajo fue demostrar, mediante técnicas de transformación genética, análisis histológico del insecto y pruebas de inoculación, el papel de *S. acupunctatus* como vector de *D. chrysanthemi.* Las pruebas se realizaron en plántulas de un año de *A. cupreata*, considerando tres periodos de inoculación-alimentación (24, 48 y 72 h) con base en el modelo de los Postulados de Koch. Durante las pruebas de transmisión (inoculación) se observó que el picudo portó internamente células de Dc, además de otras especies bacterianas como *Pseudomonas* sp., que junto con Dc, no pudieron eliminarse mediante distintos métodos experimentales, incluido el uso de antibióticos. Para fortalecer las pruebas de transmisión y confirmar la presencia inequívoca de Dc en las distintas etapas del proceso experimental se recurrió a su transformación con un fluoróforo pFAJ1819 (GFP: Km). se demostró que Sa es vector de *D. chrysanthemi*. Los síntomas inducidos por la alimentación de insectos infectados internamente con Dc fueron típicos a los observados por la infección individual por esta especie bacteriana. Los síntomas de pudrición blanda promovidos por picudos infestados con la bacteria fueron hasta en un 90 % en el periodo de alimentación mayor (72 h). Se observaron células de Dc a lo largo del

túbulo de Malpighi que va desde el ventrículo anterior hasta el posterior del lumen de *Scyphophorus cupunctatus* G.

Palabras clave: *Agave Cupreata, Dickeya chrysanthemi, Scyphophorus acupunctatus*, vector, pudrición blanda.

6.1.1. ABSTRAC

Agave cupreata is endemic to the state of Guerrero and Michoacán, México. The rot or wilting of the bud, caused by *Dickeya chrysanthemi* (Dc), is one of the main parasitic problems in the field and nurseries. *Scyphophorus acupunctatus* (Sa) has been reported to be associated with the transmission of Dc, a causal agent of the withering of the agavaceas bud. The objective of this research was to demonstrate, through genetic transformation techniques, histological analysis of the insect and inoculation tests, the role of *S. acupunctatus* as a vector of *D. chrysanthemi*. The tests were carried out on one-year seedlings of *A. cupreata*, considering three periods of inoculation-feeding (24, 48 and 72 h) based on Koch's postulate model. During transmission tests (inoculation) it was observed that the weevil carried Dc cells internally, in addition to other bacterial species such as *Pseudomonas* sp., which together with Dc, could not be eliminated by different experimental methods, including the use of antibiotics. To strengthen the transmission tests and confirm Dc's unequivocal presence at different stages of the experimental process, its transformation with a pFAJ1819 fluorophore (GFP: Km) was used. Sa was shown to be a vector for *D. chrysanthemi*. The symptoms induced by feeding insects internally infected with Dc were typical of those observed by individual infection by this bacterial species. Symptoms of soft rots promoted by weevils infested with bacteria were up to 90 % in the longest feeding period (72h). Dc cells were observed along the Malpighi tubulus ranging from the anterior ventricle to the posterior lumen of *Scyphophorus acupunctatus* G.

Key words: *Agave cupreata*, *Dickeya chrysanthemi*, *Scyphophorus acupunctatus*, vector, soft rot.

6.2. INTRODUCCIÓN

El mezcal es una bebida que se elabora de diferentes agaves mezcaleros, y su aprovechamiento genera empleos, uno de estos agaves es el maguey papalote *Agave cupreata* es una planta endémica que se distribuye en la Depresión del Balsas, una región semiárida de los estados de Guerrero y Michoacán, al sur - occidental de México (Martínez-Palacios *et al*., 2011).

El crecimiento de la industria mezcalera ha incrementado la demanda de plantas, por lo que la producción en viveros ha crecido en las comunidades de Chilapa (Aquino *et al*., 2007 y CRM, 2019). La producción de agave se ve afectada por diversos problemas fitosanitarios como enfermedades e insectos plaga (Valenzuela, 2003), en el caso de las plagas la especie más importante en el maguey es el insecto *S. acupunctatus* conocido como el picudo (González *et al*., 2007).

Las enfermedades más peligrosas que afectan al cultivo de maguey son aquellas contempladas en el síndrome de secazón, marchitez o pudrición del cogollo, *Erwinia* sp, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* reportadas en *Agave tequilana* y *A. angustifolia* respectivamente (Beltrán 2005, Nuño, 2005 y Aquino *et al*., 2009). Sin embargo, en *Agave cupreata*, se encontró a *Dickeya chrysanthemi*, causando la pudrición del cogollo (Cabrera *et al*., 2019).

Waring y Smith (1986), Sánchez y Rodríguez (1999) reportaron que existen evidencias de que *Scyphophorus acupunctatus* es un posible vector de las bacterias que provocan dicha pudrición del cogollo, sin embargo, las evidencias no son claras ya que no realizaron un estudio sobre la portación de la bacteria en el picudo, solo se asocia a la presencia y daño.

Además, Beltrán (2005) mencionó que el picudo porta en su intestino las bacterias, *Leuconostoc mesenteroides, Erwinia sp y Psudomonas paucimobilis*.

La enfermedad con mayor recurrencia en los cultivos, es la pudrición blanda causada por bacterias, como *Dickeya chrysanthemi,* asociada a plagas como el picudo *S. acupunctatus*. Afectando ambos organismos plantas cultivadas y silvestres. *Dickeya* sp., se ha caracterizado por la capacidad de degradar principalmente los órganos suculentos, además de sobrevivir largos periodos de tiempo en desechos vegetales y suelo (Snehalatharani y Khan 2010, CABI 2011).

S. acupunctatus porta de forma endémica e interna distintos microorganismos bacterianos, entre los que se incluye *D. chrysanthemi*, difíciles de limpiar mediante procedimientos de laboratorio. Por esta razón, se recurrió a la transformación de *D. chrysanthemi* con el plásmido pFAJ1819 la Proteína Verde Fluorescente (GFP; Km), con la finalidad de distinguir la presencia de este patógeno durante las pruebas de trasmisión realizadas. La presencia de *D. chrysanthemi* se confirmó también mediante histología de distintos órganos internos en especímenes de *S. acupunctatus* alimentados con plantas de *A. cupreata*, inoculadas con *D. chrysanthemi* en condiciones controladas. El presente estudio tuvo como objetivo determinar el posible papel de *Scyphophorus acupunctatus* como vector de *Dickeya chrysanthemi*, agente causal de la pudrición del cogollo de plantas de *A. cupreata.*

6.3. MATERIALES Y MÉTODOS

6.3.1 Localización.

Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología Agrícola de la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Ambientales, Universidad Autónoma de Guerrero, ubicada en el Km. 2.5 de la Carretera Iguala-Tuxpan, en Iguala de la Independencia, Gro, Méx., y en el Laboratorio de Ecología Genómica del Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM en Cuernavaca, Morelos, Méx.

6.3.2. Material Biológico.

Se utilizaron adultos de *Scyphophorus acupunctatus*, recolectados en cultivos de *Agave cupreata*, de Chilapa de Álvarez, Guerrero (17°36′00″N y 99°10′00″W), los muestreos fueron dirigidos a plantas asintomáticas a marchitez. Las plantas se decapitaron y recolectaron los picudos presentes. Aproximadamente 100 picudos que se mantuvieron en Tarro pet transparente de 500 y 1000 mL LeoPastic® para los diversos experimentos. Dicha especie se alimentó a base de hojas de *A. cupreata* asintomáticas y desinfestadas con hipoclorito al 5 % por 10 min.

Las plántulas de *Agave cupreata* fueron proporcionadas por el vivero de la organización Sanzekan tinemi, por lo que solo se utilizaron plantas asintomáticas de aproximadamente un año de edad, trasplantadas en suelo estéril, bajo condiciones de invernadero.

La cepa de la bacteria utilizada *Dickeya chrysanthemi*, fue proporcionada por el laboratorio de fitopatología del COLPOS quienes fueron los que la aislaron e identificaron en viveros de *A. cupreata* en Chilapa, Guerrero, causando la pudrición blanda del cogollo (Cabrera *et al*., 2019)

6.3.3. Desinfestación de plántulas

Las hojas de *Agave cupreata* se desinfestaron con hipoclorito al 5 % por 3 min, siete veces enjuague con agua destilada estéril (ADE). El sustrato de suelo utilizado para el trasplante se esterilizó en autoclave a 121 ^{o}C por 15 min.

6.3.4. Desinfestación de Picudos, periodo de ayuno he infestación

Los picudos confinados se desinfestaron con hipoclorito de sodio al 5 % por inundación en matraz Erlenmeyer de 1 L. durante 2 minutos intercalado con agua destilada estéril por siete veces. Con sanitos estériles se eliminó el exceso de agua y seleccionaron los picudos más vigorosos y activos. Se colocaron en ayuno durante 3 días en botes de plástico transparentes en condiciones asépticas a 30 °C y 80% HR. Posteriormente se introdujeron en cajas Petri, donde se colocaron hojas de *Agave cupreata* infectadas de *D. chrysanthemy,* un picudo por caja Petri, para verificar la alimentación.

6.3.5. Preparación del inóculo de *Dickeya chrysanthemi*

La bacteria previamente conservada en tubos de vidrio con agar se reactivó en agar nutritivo (Pluripeptona, extracto de carne, cloruro de sodio, Agar) BD Bioxon Fabricado en México por: Becton Dickinson de México, S. A. de C. V. Autopista México-Querétaro, Km 37.5, complejo industrial Cuamatla, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, C. P. 54730.

Para las soluciones bacterianas se seleccionaron de 3 a 5 colonias con crecimiento de 24 h. Las cuales se introdujeron en un tubo de ensayo con tapa rosca de 12x 75 mm, con 5 mL de agua destilada estéril. Esta solución se preparó de acuerdo al estándar de McFarland.

La investigación se divide en varias etapas:

6.3.6. Infestación de plantas de *A. cupreata* con *Scyphophorus acupunctatus* contaminado naturalmente con *Dickeya chrysanthemi*

La primera fue evaluar el papel que juegan los picudos desinfestados y los obtenidos directamente de campo (sin desinfestar) se colocaron uno por planta, y mantuvieron en observación hasta que penetraron completamente al cogollo de plantas asintomáticas y producidas de forma aséptica con hipoclorito de sodio al 5 % por 3 min.

a) Se liberó un picudo por planta alimentado con maguey infectado de *D. chrysanthemi* y como testigo, picudos desinfestados con hipoclorito de sodio al 5 % por 2 min.

b) Se colocó dentro de una microjaula un picudo alimentado con maguey infestado de *D. chrysanthemi* y uno directo de campo sin desinfestar. Las microjaulas consistieron de (un frasco con tapa de 5 mm y una pinza para sostener el cabello con forma de cocodrilo, (Figura 6b).

c) Las plántulas se inocularon con una solución de 1 µl x 10^8 UFC/mL. de *Dickeya chrysanthemi* con jeringa hipodérmica. Las plantas testigo se infiltraron sólo con agua destilada Estéril (ADE), se mantuvieron en condiciones de invernadero (30 ^{o}C y 85 % HR). Las plantas experimentales se introdujeron en bolsas plásticas para mantener las mismas condiciones de humedad relativa.

A las 24 h se extrajeron los picudos de las plántulas, enseguida con una regla se midió la lesión o pudrición, esto de acuerdo al diagrama arbitraria para evaluar el porcentaje de daño en cm (Cuadro 1 y Figura 2). A las 48 y 72 h se realizó el mismo procedimiento.

Para el sacrificio, los picudos se introdujeron en un frasco de vidrio impregnado con veneno volátil (Acetato de etilo) esto para evitar mayor sufrimiento.

6.3.7. Transformación genética de *Dickeya chrysanthemi*

En la segunda etapa se recurrió a la transformación de *Dickeya chrysanthemi* con el plásmido pFAJ1819 la Proteína Verde Fluorescente (GFP;Km), para asegurar y dar seguimiento a la bacteria en el picudo (Xi *et al*., 1999). Para los ensayos de conjugación, *D. chrysanthemi* (cepa receptora) y E. coli S17-1 λpir (huésped de plásmidos), que posee el pFAJ1819 (cepa donadora) fueron cultivados individualmente en caldo LB agar, Miller (Luria-Bertani) Becton, Dickinson and Company. Por una noche. Posteriormente, los cultivos fueron mezclados en

proporción 2:1 en placas de agar LB y se incubaron por 24 h a 30 ºC. La mezcla bacteriana fue resuspendida en 1 mL de 10 mM Mg SO_4, 0.01 % tween40 (v/v) y diluciones de esta mezcla fueron plateadas en agar Koser citrate (Difco laboratories) con Kanamicina (45 mg/mL).

Las colonias transconjugantes (célula receptora que ha incorporado un segmento de ADN de la célula donadora) resistentes a Kanamicina y emisoras de fluorescencia bajo luz ultravioleta fueron inoculadas en láminas de papa (2 cm x 2 cm), previamente lavadas con agua destilada estéril y etanol al 70 %, e incubadas por 72 h a 30 ºC. las cepas fluorescentes causantes de pudrición de la papa fueron consideradas como *D. chrysanthemi* marcadas con la proteína verde fluorescente. En el contexto de los postulados de Koch. Los picudos portaron, con carácter endémico, levaduras sp, que no se logró eliminar internamente mediante distintos métodos experimentales, incluido el uso de antibióticos (ver Figura 9).

6.3.8. Disección de *Scyphophorus acupunctatus* G.

En la tercera etapa se utilizaron 30 picudos desinfestados con hipoclorito de sodio al 5 % por dos minutos, en ayuno por tres días y alimentados con *Agave cupreata* infestada artificialmente con la cepa de *D.* c*hrysanthemi* transformada con el plásmido pFAJ1819A (GFP; Km).

La disección de los especímenes se realizó bajo Microscopio Estereoscópico Zeiss Stemi SV 6, con pinzas de disección y Bisturí del No. 10 iniciando con la separación de los músculos que unen el protórax y mesotórax y también los apéndices alares y las patas según Lanuza-Garay (2015). para los cortes del lumen se tomó como referencia la (Figura 1).

Las vísceras internas se eliminaron del cuerpo utilizando una tijera titular de aguja tipo Forceps de 14 cm y escalpelos estériles. Posteriormente, fueron trituradas usando un mortero (Evans *et al*., 2015).

Con algunas modificaciones al protocolo propuesto por Koga *et a*l. (2009), se procesaron los cortes del lumen intestinal de *S. acupunctatus* para cuantificación de Unidades Formadoras de Colonias (10^8 UFC/mL) de *D. chrysanthemi* en medio Agar nutritivo, adicionado con *Kanamicina*.

Las modificaciones realizadas al protocolo propuesto por Koga *et al* (2009) se indican a continuación: la disección se realizó en PBS (Phosphate-buffered saline) compuesto de NaCl, Na_2HPO_4, KCl y KH_2PO_4. Pero las piezas no se deshidrataron con etanol, así mismo no se fijaron en carnoy's toda la noche.

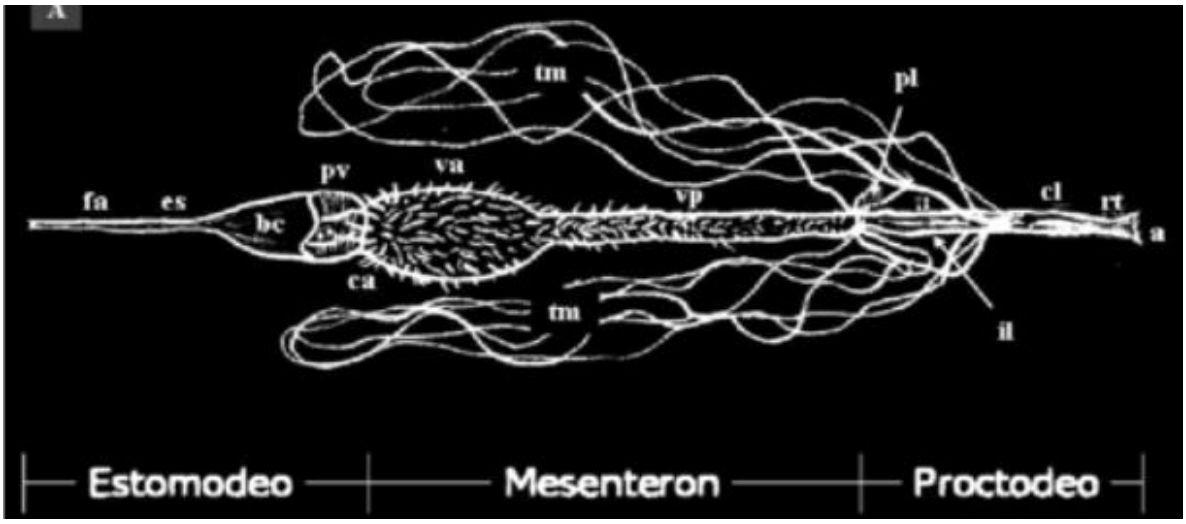


Figura 1. Faringe (fa), esófago (es), buche (bc), proventrículo (pv), cardias (ca), ventrículo anterior (va), ventrículo posterior (vp), píloro (pl), íleo (il), túbulos de Malpighi (tm), colon (cl), recto (rt) y ano (a)**,** imagen tomada como referencia para los cortes del lumen intestinal (Rubio y Acuña, 2006).

Cuadro 1. Diagrama de Severidad Arbitraria para Evaluar el (%) de Daño causado por *D. chrysanthemi* asociado a *S. acupunctatus* en plántulas de maguey *A. cupreata*.

Categoría	Daño de tejido total (%)	Tiempo (h)
0	0	0
1	1-3 cm =25	12
2	4-7 cm = 50	24
3	8 – 12 cm =75	48
4	13 -15 cm = 100	72

Para elaborar este cuadro se tomó como referencia la escala propuesta por Solís *et al.* (2001).

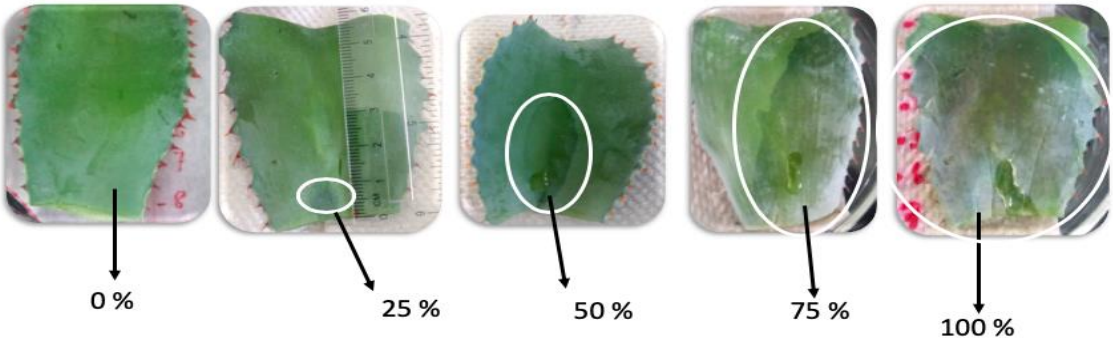


Figura 2. Escala de daño en hojas de *A. cupreata*, inoculadas de manera artificial con la cepa de *D. chrysanthemi* calculada en cm.

La escala arbitraría se utilizó para medir con una regla en cm el daño causado por la bacteria *D. chrysanthemi* infiltrada con jeringa y asociada a *S. acupunctatus* en plántulas de *A. cupreata*. La hoja asintomática representa el (0) %, de 1-3 cm (25) %, de 4-7 cm (50) % y de 13 a 15 cm representa el 100 % de daño. La escala se adaptó de esta manera porque el tamaño de las hojas de *A. cupreata* utilizadas en los experimentos de 8 a 17 cm de largo y 4 a 8 cm de ancho.

6.3.9. Diseño experimental y análisis de resultados

Se utilizó un diseño completamente al azar con seis tratamientos, incluyendo a tres testigos con cinco repeticiones por tratamiento, los resultados se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) los tratamientos se compararon mediante la prueba de Tukey (P≤0.05), con el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System, versión 9.4®)

6.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Daño causado por *S. acupunctatus* infestado artificialmente por *D. chrysanthemi*

El porcentaje de daño por hoja en plántulas de *A. cupreata,* se calculó con base a la escala arbitraria (Figura1). El porcentaje de hojas con síntomas de pudrición blanda en las plántulas de *A. cupreata* es provocado por *S. acupunctatus* infestados artificialmente con *D. chrysanthemi* (S-D). Y picudos desinfestados (S), mostraron diferencias significativas en los tres tiempos. De esta manera la Figura 3 el daño que causa el picudo y la bacteria juntos es progresivo en los tres tiempos (24, 48 y 72 h), pero también se observa el daño causado por el picudo sin *D. chrysanthemi* el daño no presenta tal aumento en los tres tiempos (24, 48 72 h) esto es debido que solo es daño mecánico.

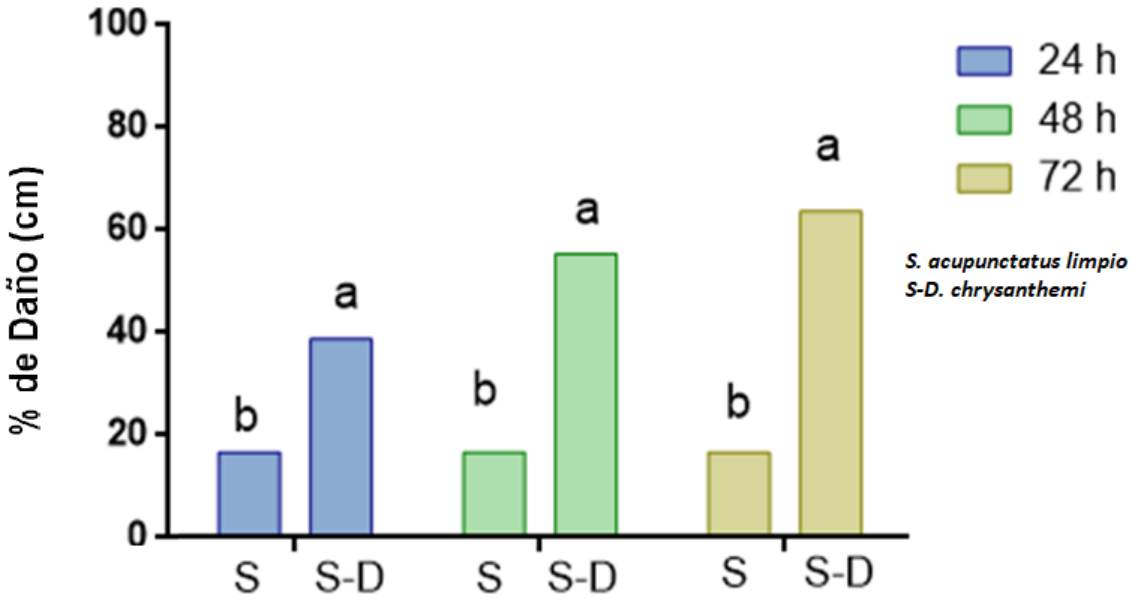


Figura 3. Daño promedio (%) en hojas de *Agave cupreata* infestada por S. acupunctatus contaminado artificialmente con *D. chrysanthemi* en condiciones de vivero en Iguala, Gro., México.

En la Figura 3, se pueden observar que los daños por pudrición fueron superiores a mayor periodo de alimentación (72 h), alcanzando un valor máximo de 90 % También, los daños fueron mayores cuando el tiempo de alimentación se combinó con picudos infestados de manera artificial con plántulas inoculadas con *D. chrysanthemi.* El daño observado en 72 h fue de 95.8 %. La severidad de la enfermedad se mantuvo sin cambios en un 25 % en (24, 48 y 72 h), cuando se utilizaron picudos sin *D. chrysanthemi*, esterilizados por inmersión.

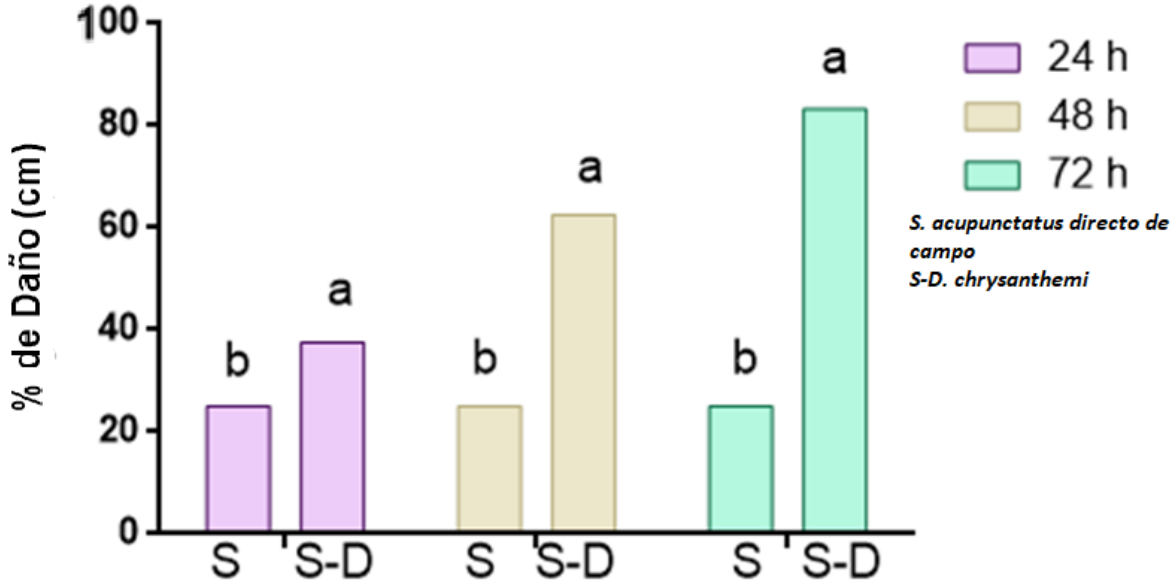


Figura 4. Porcentaje de daño en plantas de *A. cupreata* causada por el picudo directo de campo (sin limpiar) colocado dentro de una microjaula y asociado con *D. chrysanthemi* en condiciones de vivero en Iguala, Gro., México.

La mayor severidad de pudrición se observó a las 72 h de iniciada la prueba alimentación, con valor máximo de 83.3 % (Tukey P≤0.05).

En la Figura 4 se muestra el daño (%) en hojas causado por especímenes de *S. acupunctatus* infestados naturalmente con *D. chrysanthemi* (obtenidos de campo) y colocados dentro de una microjaula. A 24 h se observó pudrición blanda del 31. 25 % y a 72 h la bacteria había degrado el resto de las hojas y el cogollo de la plántula con 54.17 % de severidad (Tukey P≤0.05).

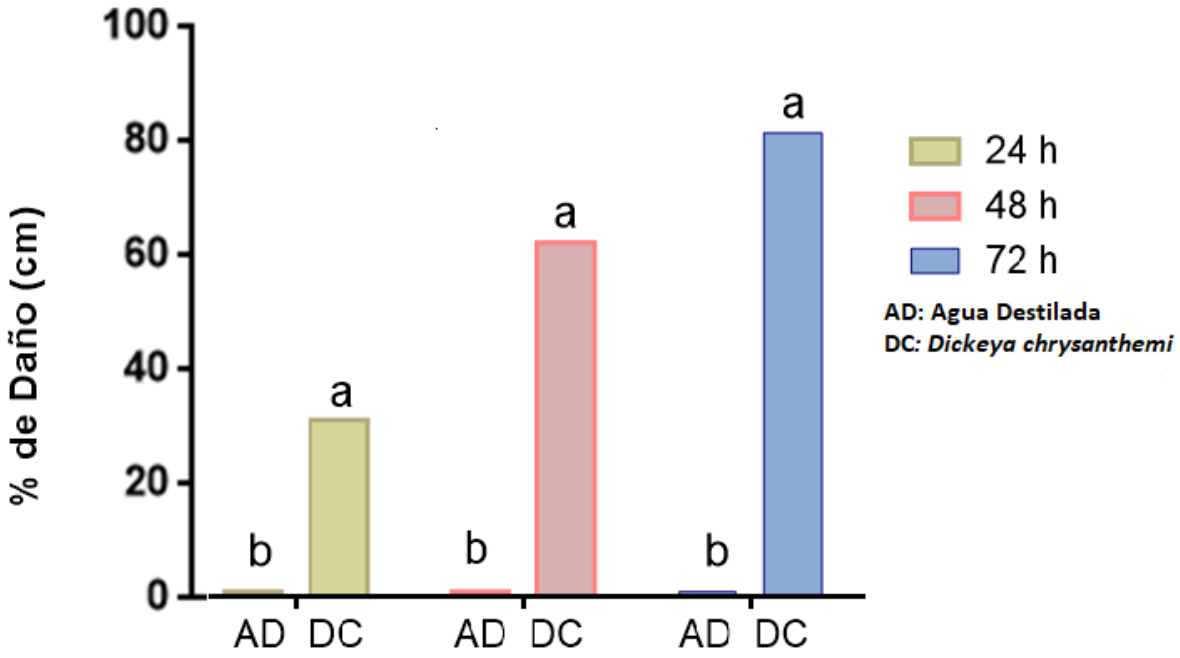


Figura 5. Daño promedio (%) en hojas de *Agave cupreata* inoculadas por infiltración de *D. chrysanthemi* en condiciones de vivero en Iguala, Gro., México.

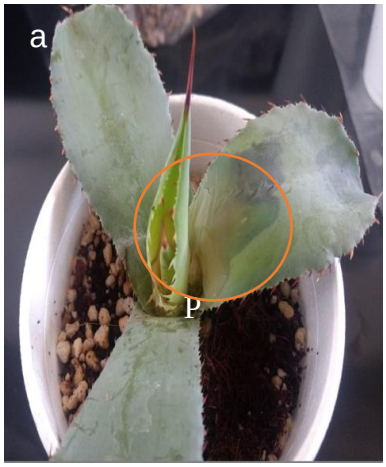
El daño que causó *D. chrysanthemi* en las hojas inoculadas con aguja hipodérmica fue de 24.17 %. En plantas infiltradas con agua destilada no se observó pudrición, sólo daño mecánico causado por la aguja (Figura 5).

Comparando el porcentaje de daño provocado por *D. chrysanthemi* asociado a *S. acupunctatus* en plántulas de *Agave cupreata* en las (Figuras 3 y 4), Solis *et al.* (2001) reportaron un 24 % de daño en piñas de *A. tequilana*, causado por *S. acupunctatus*, datos similares se pueden observar en la Figuras 5.

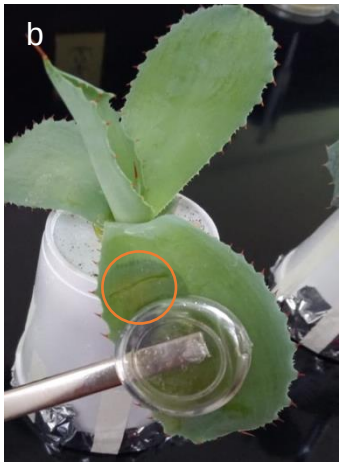
Terán-Vargas y Azuara Domínguez (2013) refirieron que el daño causado por la larva o el adulto del picudo a nivel fisiológico y mecánico influye en el desarrollo del

Agave. Un daño similar se observó en las plántulas con pudrición blanda causado por picudos libres y los que fueron colocados en microjaula infestados con *D. chrysanthemi.* Esto a pesar de diferir en dimensión del estudio y el tamaño de la muestra y a distinta escala el porcentaje del daño está documentada de manera clara.

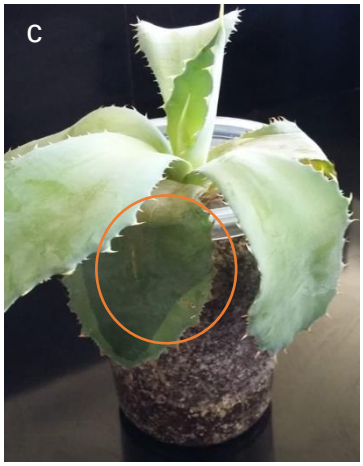
La patogenicidad de *D. chrysanthemi* transformada se corroboró en hojas de *A. cupreata*. Esto, de acuerdo a los postulados de Koch (Figura 7 A, B, C, D y E) habiendo un daño se aisló la muestra en agar nutritivo con Kanamicina. Esto permitió alimentar a *S. acupunctatus* con maguey inoculado con *D. chrysanthemi* transformada con el plásmido pFAJ1819 (GFP; Km), lo que permitió observar su presencia de *D. chrysanthemi* en el lumen intestinal de *Scyphophorus acupunctatus,* a lo largo de los túbulos de Malpigui (Figura 8 D, E, F y G), ubicados en el proctodeo de donde se originan y van desde la válvula pilórica hasta el ano, diferenciándose dos partes: el intestino anterior y el recto, el primero puede ser un simple tubo o subdividido en íleo y colon. Los túbulos de Malpigui tienen la función excretora desembocando en la parte anterior del proctodeo, de igual manera, como mencionan Rubio y Acuña, (2006).



Picudo libre, está dentro del cogollo del maguey con el objeto de ver el aumento del daño en 24 h



Daño por picudo directo de campo y colocado dentro de la microjaula



Marchitez inducida por la inoculación de *D. chrysanthemi* con jeringa hipodérmica

Figura 6. Plántulas de *A. cupreata* con síntomas de pudrición blanda inducidos por inoculación de *D. chrysanthemi* inocula por tres métodos distintos.

En la Figura 6 se observan los diferentes tratamientos utilizados para reproducir los síntomas de marchitez en plantas de *A. cupreata* por infestación de picudos: (a) picudo alimentado con plantas infestadas artificialmente con *D. chrysanthemi* y picudo desinfestados externamente. Ambos colocados de forma libre sobre las plántulas. (b) picudos recolectados en campo sin desinfestar y especímenes alimentados con plantas inoculadas con *D. chrysanthemi*. (c) plántulas infestadas únicamente con *D. chrysanthemi* por infiltración usando jeringa hipodérmica.

En la (Figura 7B) se observa el crecimiento de la colonia transformada de *D. chrysanthemi* a 24 h de incubación. Con luz UV se aprecia en color verde fluorescente. Esta cepa se utilizó para infestar internamente especímenes de *S. acupunctatus*. La Figura 7C se muestra el avance de la pudrición 24 h después de ser expuesta a la alimentación de especímenes de *S. acupunctatus* infestados internamente con la cepa transformada de *D. chrysanthemi* (7D) hoja con pudrición de 48 h y picudo alimentándose, 7E) con luz UV la hoja de maguey presenta color rojo en toda la zona afectada, daño similar al observado en Figura 7(A), por último, mediante la prueba de tinción de Gram se confirmó también que la bacteria reaislada fue la misma que se utilizó en la infestación de *S. acupunctatus* mediante un proceso de alimentación.

|

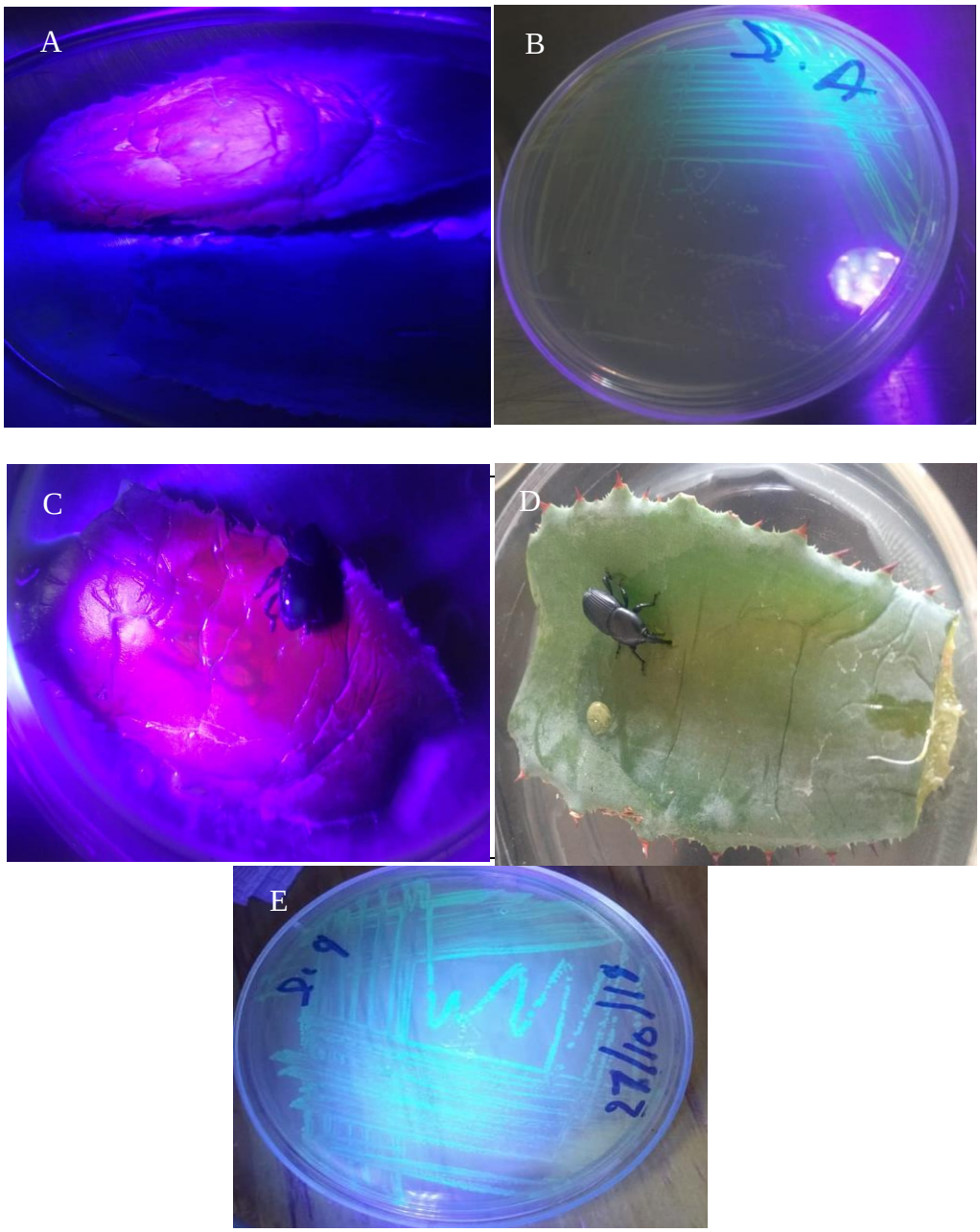


Figura 7. Síntomas de marchitez replicados en una hoja de *Agave cupreata* por alimentación de especímenes de *S. acupunctatus* infestados internamente con una cepa transformada de *D. chrysanthemi* con el plásmido pFAJ1819, con base en el modelo de los Postulados de Koch. A) hoja infectada por una cepa de *D. chrysanthemi* transformada con el plásmido pFAJ1819 que confiere fluorescencia, B) Placa Petri con la cepa de *D. chrysanthemi* aislada de una hoja con síntomas de pudrición blanda transformada genéticamente, C) y D) hojas con daños foliares

causados por la alimentación de *S. acupunctatus* infestados con la bacteria transformada, observados con luz UV (izquierda) y blanca (derecha), E) placa con *D. chrysanthemi* re aislada de la hoja (C) con síntomas de pudrición.

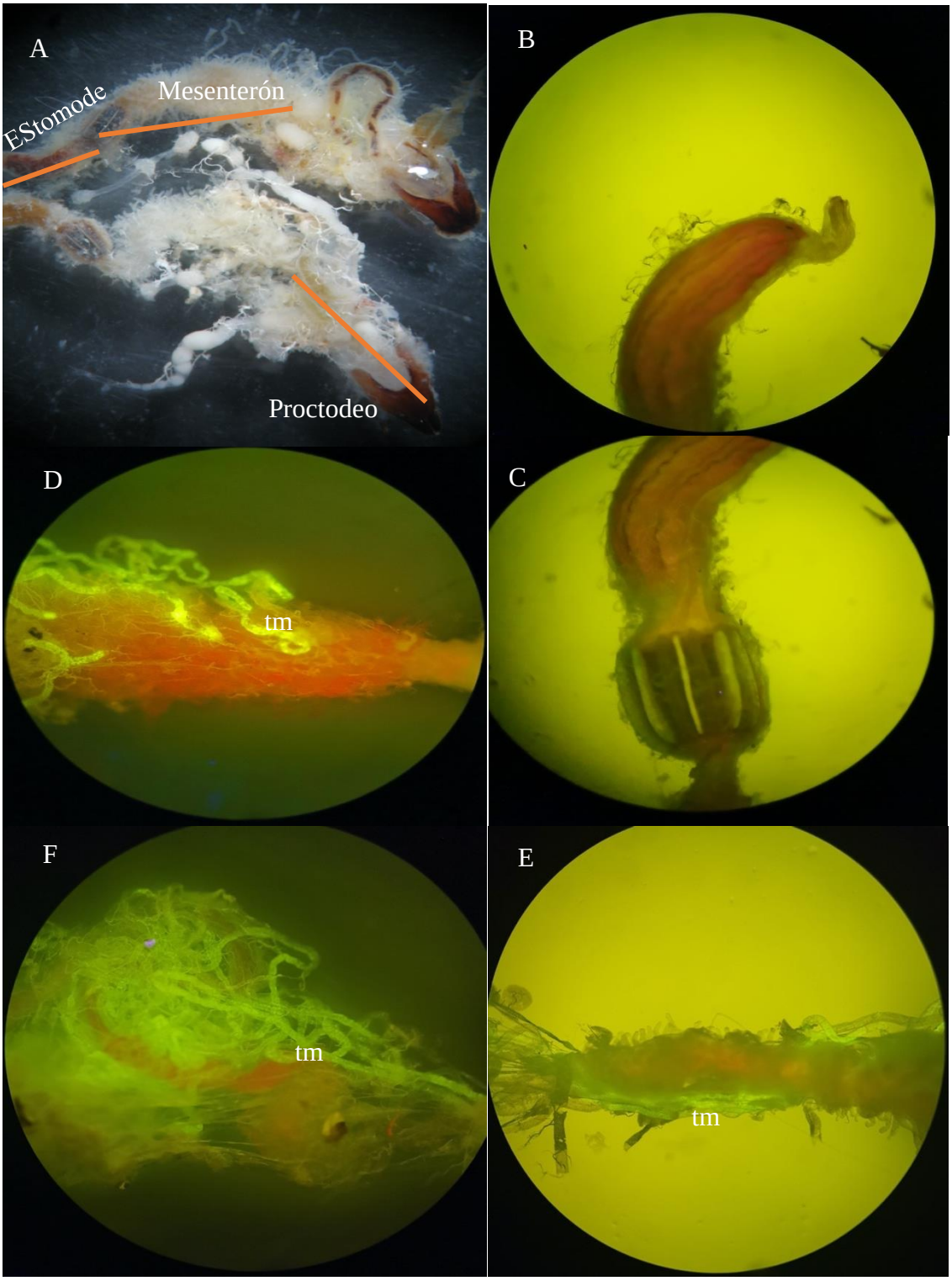


Figura 8. Cortes histológicos del lumen intestinal de *S. acupunctatus* que muestran la presencia de células de una cepa de *Dickeya chrysanthemi* transformada con el plásmido pFAJ1819A que le confiere fluorescencia: túbulos de Malpigui (tm),

Intestino completo (A), buche (B), proventrículo (C), ventrículo anterior (D), ventrículo posterior (E) y proctodeo (F).

El lumen intestinal es un tubo que va desde el pico hasta el ano y está dividido en tres partes: estomodeo, mesenterón y proctodeo. El estomodeo abarca la (faringe, esófago, buche y proventrículo. A su vez, el mesenterón está dividido en dos ventrículos, el anterior de forma ovoide y el posterior de forma alargada, presentando abundantes ciegos gástricos El proctodeo inicia en la válvula pilórica, continuando con el íleo y colon y desembocando el ducto en el ano; ésta región presenta varios plegamientos, en los cuales se acoplan los órganos reproductivos Figura 8 (A).

En el buche (B) y proventrículo (C) no se observaron células bacterianas fluorescentes. Sin embargo, en el ventrículo anterior (D) y ventrículo posterior(E) se observaron los túbulos de Malpigui de color verde fluorescente, evidenciando la presencia de *D. chrysanthemi* transformada, en relación al proctodeo (F) se puede decir que es donde se agrupan los túbulos de Malpigui observándose mayor fluorescencia a lo largo de estos hasta desembocar en la parte anterior del proctodeo cerca del ano.

Hakim *et al*. (2010) describieron que el proventrículo es el segundo órgano más largo y sitio de digestión y adsorción de nutrientes y entrada de muchas bacterias, eso explica la presencia de *D. chrysanthemi* en estos órganos.

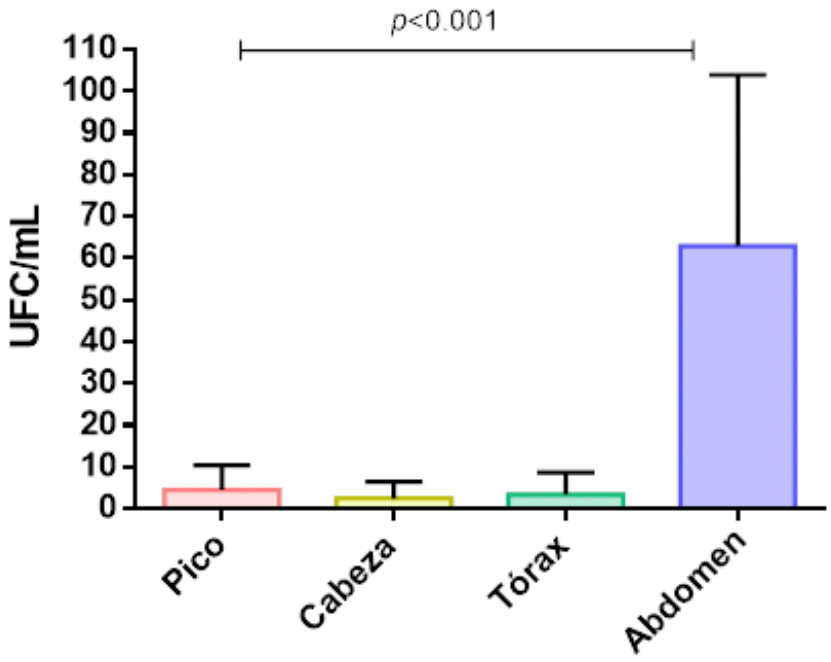


Figura 9. Cantidad de colonias fluorescentes de *D. chrysanthemi* presentes en órganos de *S. acupunctatus* colectado en Chilapa, Gro., México.

En la Figura 9, se muestra que *S. acupunctatus* aloja mayor cantidad de células bacterianas de *D. chrysanthemi* transformada con el plásmido pFAJ1819 en el proctodeo (abdomen) y menor cantidad en el estomodeo (cabeza).

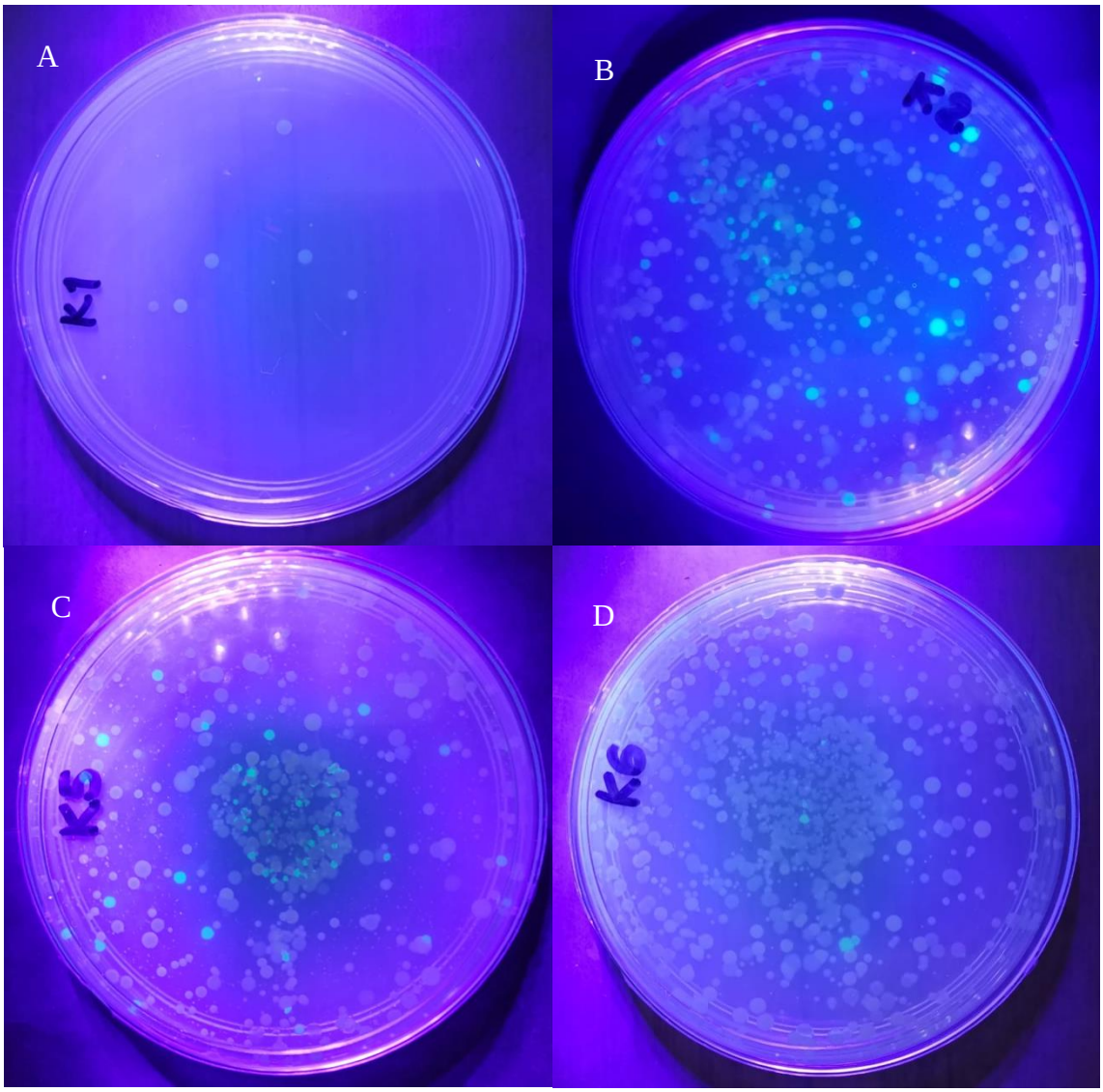


Figura 10. Plaqueo del lumén intestinal de *S. acupunctatus* G. “k” representa el antibiótico, los números 1, 2, 3, 4, 5, y 6 son las repeticiones. Faringe y esofago (A), buche(B), Ventrículo posterior(C) y proctodeo (D).

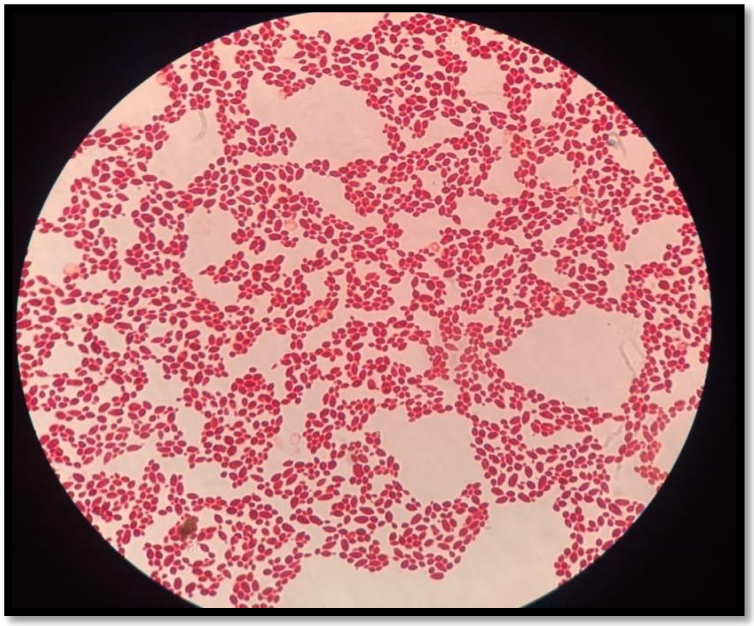


Figura 11. Levaduras Gram negativas obtenidas del lumen intestinal de especímenes de *Scyphophorus acupunctatus*, colectados de plantas de *Agave cupreata* en Chilapa, Gro., México.

Para confirmar la presencia de *D. chrysanthemi* a lo largo del lumen intestinal de *S. acupunctatus*. se colocaron en placas, los cortes del insecto (Figura 8) en agar nutritivo con Kanamicina. Como resultado, hubo mayor número de colonias fluorescentes en el buche (B) y ventrículo posterior(C), menor crecimiento de colonias fluorescentes en el proctodeo (D). Estos resultados se obtuvieron con seis repeticiones por órgano de *S. acupunctatus*. la Figura 10 únicamente muestra las placas donde hubo crecimiento de la bacteria fluorescente.

A pesar de haber utilizado el medio con el antibiótico Kanamicina, se observaron células bacterianas distintas a *D. chrysanthemi*, en todas las placas de Petri. Estas tuvieron forma redonda y de color crema, también fueron resistente a Kanamicina. De acuerdo a los postulados de Koch, no presentaron tal patogenicidad en las plántulas de *A. cupreata* inoculadas con la levadura. Así mismo con la tinción de Gram se confirmó que son Gram negativas al presentar una coloración roja y con forma ovalada, Figura 10.

6. 5 CONCLUSIONES

S. acupunctatus es un vector natural y persistente de *Dickeya chrysanthemi*. Los síntomas replicados en plantas de *A. cupreata* por especímenes contaminados internamente con el patógeno transformado con el plásmido pFAJ1819A fueron idénticos a los producidos por la infiltración de la cepa de *Dickeya chrysanthemi* transformada y silvestre. La incubación de extractos de jugo intestinal de *S. acupunctatus* permitió observar la cepa de *D. chrysanthemi* fluorescente en los túbulos de Malpigui, así como la recuperación de la cepa inoculada.

D. chrysanthemi coexiste con otras especies bacterianas endémicas que constituyen la flora natural de *S. acupunctatus*, la cual no pudo ser eliminada con sustancias desinfectantes de uso externo o interno, incluidos diversos antibióticos como Kanamicina, Oxitetraciclina y Sulfato de Estreptomicina.

D. chrysanthemi, sola o en asociación con *Scyphophorus acupunctatus*, causó pudrición significativa en las plantas inoculadas o infestadas a 24, 48 y 72 h. la mayor severidad de daños se observó a 72 h en el tratamiento picudos libres sobre las plántulas de *A. cupreata* e infestados de manera artificial con *D. chrysanthemi*.

6.6.- LITERATURA CITADA

Aquino, B. T., Iparraguire C. M. A., Ruiz V. J. (2007). *S. acupunctatus* G. (Coleoptera: Curculionidae). Plaga del agave-mezcal: pérdidas y daños en Oaxaca, México. Revista *UDO Agrícola*, # 7, pp:175-180. www.bioline.org.br/pdf?cg07018

Aquino, B. T., Ruiz V. J., Giron, P., Pérez, P. S. R., Martínez, T. S. H., Silva, R. M. E. (2011) Interrelationships of the agave weevil *Scyphophorus acupunctatus* (Gyllenhal), *Erwinia carotovora* (Dye), entomopathogenic agents and agrochemicals. African Journal of Biotechnology, 68, 15402–15406. DOI: 10.3958/059.038.0310

Beltrán, G. M. Celia; (2005). el picudo *Scyphophorus acupunctatus* Ghyll (Coleoptera: Curculionadae) y su microbiota asociada al tejido dañado de *Agave tequilana* Weber var. Azul (Maestría), Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias: Las Lagunas Zapopan Jalisco: 71 Pp,.

CABI. (2011). Compendio de Protección de Cultivos. 7a Edición, Módulo Global CAB International, Reino Unido http// www.cabi.org/cpc/-

Cabrera H. E, Aranda O. S, Hernández C. E, Nava D. C, Mora A. J. A., y Vasquez L. A. (2019). First Report of Bacterial Wilt Caused by *Dickeya chrysanthemi* on Agave-Mezcal (*Agave cupreata*) in México. https://doi.org/10.1094/PDIS-05-18-0877-PDN

Castro, D, A. S y Guerrero-Beltrán J. A. (2013). El agave y sus productos. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos, 7-2: 53-61

CRM (2019). Consejo Regulador del Mezcal, informe estadístico. www.crm.org.mx

Conabio. (2008). Mezcales y diversidad. 19 de marzo 2020, de Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad Sitio web: www.coanbio.gob.mx

Cuervo P, J, A., Pérez E, V, H., López Pérez P, A., Morales-Ovando M, A., Arce C, O., Aparicio-Burgos J, E., and Romero-Cortes T. *Scyphophorus acupunctatus* (Coleoptera: Dryophthoridae): a weevil threatening the production of agave in Mexico. 2019. https://bioone.org/journals/Florida-Entomologist on 10 Dec 2019 Terms of Use: https://bioone.org/terms-of-use

Datos de mapas ©2017Google INEGI Imágenes©2017.Digita Globe.

Diario Oficial de la Federación. (2012). Alejandro López González, Director General adjunto, Secretaría de Gobernación, http://www.dof.gob.mx

Evans W. Gloria V. Nakato, Walter Ocimati, Id Ramathani, Samuel Olal y Fenton Beed (2015). El gorgojo del banano, Cosmopolites sordidus (Germar), es un vector potencial de *Xanthomonas campestris* pv. musacearum in bananas, Canadian Journal of Plant Pathology, 37: 4,427-434, DOI: 10.1080 / 07060661.2015.111344

Figueroa, C. P, González, H. H, Carrillo-Sánchez JL, del Real-Laborde JI, Solís-Aguilar JF, Rojas JC. (2015). Ambos sexos de *Scyphophorus acupuncta* (Coleoptera: Dryophthoridae) pueden iniciar la colonización de la planta de agave (Asparagaceae). Acta Zoológica Mexicana (n. s.) 31: 495–497

González H. H. (2004). Principales plagas del agave. Avances de la Investigación en el Agave Tequilero. Editorial Ágata. Guadalajara, Jalisco, México, pp: 181-233.

García, M. A, J. (2007). Los Agaves de México. Ciencias 87, Julio-Septiembre, 14-23. [En línea]

Gentry, H.S. (1982). Agave de América del Norte. The University of Arizona Press.

García, M. A. (2011). *Agavaceae.* En R. Medina Lemos (Ed.), Flora del Valle de Tehuacán - Cuicatlán (Fascículo 88). México: Universidad Nacional Autónoma de México - Instituto de Biología, 95 pp.

Herrera-Pérez, L; Juárez-Sánchez, J.P.; Ramírez-Valverde, B. 2013. El cultivo de *Agave tequilana* Weber por pequeños productores de Tequila, Jalisco. AGROProductividad, vol. 6, no. 5, 2013, p. 21

Hernandéz-Valencia, R.E.M., López-Franco, R., Ruíz-Ordoñez, J., Ramírez-Rodríguez, H. and Benavides-Mendoza, A. (2003). The stomatal complex and epicuticular characteristics of crown rot disease of *Agave tequilana* Weber (Agavaceae). Acta Hort. (ISHS) 618: 427 – 433. http://www.actahort.org/books/618/618_51.htm

Li p., Lin B., Shen H., PU X. (2011). Species-specific detection of *Dickeya sp*. (*Pectobacterium chrysanthemi*) in infected banana tissues, soil and water. African Journal of Biotechnology 10(74):16774-16780

Lanuza-G, Alfredo. (2015). Descripción Anatómica del Tracto digestivo de Imagos de *Lagocheirus plantaris indistinctus* (DILLON, 1957) (COLEOPTERA: CERAMBYCIDAE). Boletín del Museo de Entomología de la Universidad del Valle

Maya, Y., Palacios-Cardiel, C. y Jiménez, M. L., (2011). El cardón *Pachycereus pringley*, nuevo hospedero para *Scyphophorus acupunctatus* (Coleoptera: Curculionidae) en Baja California Sur, México. Revista Mexicana de Biodiversidad 82: 1041-1045.

Martínez-Palacios, A., J.M. Gómez-Sierra, C. Sáenz-Romero, N. Pérez-Nassery N. Sánchez-Vargas (2011). Diversidad genética de *Agave cupreata* Trel & Berger., consideraciones para su conservación. Revista Fitotecnia Mexicana 34:159-165.

Tlalpal B, B. y González H, H. y Zavaleta Mejía, E. y Sánchez García, P. y Mora Aguilera. G. y Nava Díaz, C. y Del Real Laborde, J. y Rubio cortes, R. (2014). Colonización de Tricoderma y Bacillus en Plántulas de *Agave tequilana* W. y el Efecto Sobre la Fisiología de la planta y Densidad de Fusarium. Revista Mexicana de Fitopatología, (En línea) 32(1), pp 62-74. Disponible en: https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61232999006

Terán-V. AP, Azuara-D, A. (2013). El insecto *Scyphophorus acupunctatus* G. y su manejo en el (*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 (antes Distrito Federal), México

Rubio C., R. (2007). Enfermedades del cultivo de agave. INIFAP. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Centro de investigación pp:169-195

Rubio G., J. D., & Acuña Z., J. R. (2006). Anatomía comparada del tracto digestivo en imagos del complejo picudo (Coleoptera: Curculionidae) asociados al cultivo del plátano. (Sección Morfología, Comportamiento, Ecología, Evolución y Sistemática. *Revista Colombiana de Entomologia*, *32*(1), 67+.

Solís, J. F., H. González, J. l. Leyva, A. F. J. FLores A. Martínez,. 2001. *Scyphophorus acupunctatus* G., plaga del Agave en Jalisco, México. Agrociencia, #35: pp. 663- 670.

Schaad, N.W., J. B. Jones and W. Chun. 2001. Third Edition. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. APS PRESS. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota.

Schaad N.W. (2001). Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. Minnesota, U.S: The American Phytopathological Society:175-199

Sánchez, M.J. and Rodríguez, G.B. 1999. Uso de *Scyphophorus acupunctatus* en pruebas de patogenicidad de *Erwinia caratovora* en *Agave tequilana* Weber var. azul. Resúmenes del XXVI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología y X Congreso Latinoamericano de Fitopatología. Guadalajara, Jalisco. México. P.311.

Snehalatharani A., Khan N.A. (2010). Biochemical and physiological characterisation of *Erwinia* species causing tip-over disease of banana. Archives of Phytopathology and Plant Protection 43(11):10721080.

Samson R., Legendre J.B., Christen R., Fischerle Saux M., Achouak W., Gardan L. (2005). Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder et ál. 1953) Brenner et ál. 1973 and *Brenneria paradisiacato* the genus *Dickeya* gen. nov as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov and *Dickeya paradisiaca* comb. nov and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp nov.,

Waring, G. L. and R. L. Smith. 1986. Natural history and ecology of *Scyphophorus acupuntatus* (Coleoptera: Curculionidae) and its associated microbes in cultivated and native agaves. Ann. Entomol. Soc. Amer. 79: 334-340.

Xi, C., Lambrecht, M., Vanderleyden, J., & Michiels, J. (1999). Bi-functional gfp-and gusA-containing mini-Tn5 transposon derivatives for combined gene expression and bacterial localization studies. Journal of Microbiological Methods, 35(1), 85-92.

VII. CAPITULO II. EXPLORACION DE LA SENSIBILIDAD *in vitro* DE *Dickeya chrysanthemi* HA ANTIBIÓTICOS

EXPLORATION OF THE *in vitro* SENSITIVITY OF *Dickeya chrysanthemi* TO ANTIBIOTICS.

7.1. RESUMEN

El cultivo del maguey mezcalero *A. cupreata,* como principal recurso en la elaboración del mezcal. A propiciado su propagación en los viveros de las comunidades de Chilapa, Gro, México. La pudrición blanda del cogollo causada por *D. chrysanthemi*, es uno de los principales problemas fitosanitarios en los cultivos de agave. *D. chrysanthemi* se ha reportado asociado a insectos plaga, así mismo como agente causal de la marchitez de diversos cultivos de importancia económica. El objetivo de este trabajo fue explorar la sensibilidad de *D. chrysantemi* a 14 antibióticos. Las pruebas se realizaron de manera *in vitro,* con base a lo propuesto por Kirbe-Bauer. Durante las pruebas se observó que los antibióticos: Oxitetraciclina y Sulfato de estreptomicina inhibieron el 80 % de crecimiento de células bacterianas.
Palabras clave: *Agave cupreata, Dickeya chrysanthemi*, antibióticos, sensibilidad.

7.2. ABSTRAC

The cultivation of the mezcal maguey *A. cupreata*, as the main resource in the production of mezcal. It has promoted its propagation in the nurseries of the communities of Chilapa, Gro, Mexico. The soft rot of the bud caused by *D. chrysanthemi*, is one of the main phytosanitary problems in agave crops. *D. chrysanthemi* has been reported associated with pest insects, as well as a causal agent of wilting of various economically important crops. The objective of this work was to assess the sensitivity of *D. chrysanthemi* to different antibiotics. The tests were carried out in vitro, based on what Kirbe-Bauer proposed. During testing, antibiotics: Oxytetracycline and Streptomycin Sulfate were observed to inhibit 80% bacterial cell growth.
Keywords: *Agave cupreata, Dickeya chrysanthemi*, antibiotics, sensitivity.

7. 3. INTRODUCCIÓN

El agave es el género mejor representado de la familia Agavaceae con 210 especies (García-Mendoza, 2011). El área de mayor diversidad se encuentra en México (García-Mendoza, 2004), distribuidos principalmente en zonas áridas y semiáridas (Pérez Molphe *et al*., 2012). El agave mezcalero *Agave cupreata* es una especie endémica de la depresión del Balsas y se distribuye de manera natural entre los 1220 y 1890 metros de altitud en los estados de Guerrero y Michoacán (Gentry, 1982; Martínez-Palacios *et al*., 2011).

En Guerrero se cultiva principalmente en la región centro del Estado, en localidades del municipio de Chilapa de Álvarez, constituye el sustento económico de muchas familias. Las exportaciones de mezcal crecieron en un 35 % y se ubicaron en 26.8 millones de dólares, con lo que México anualmente produce dos millones de litros (CRM, 2017).

Una de las principales limitantes para la producción de esta bebida artesanal son los problemas fitosanitarios de las plantas de agave, entre las que destaca la pudrición blanda del cogollo causada por *D. chrysanthemi.* Considerada como una de las enfermedades más agresivas del cultivo de agave, esto por la maceración de tejidos y muerte de plántulas. Con una severidad de 25 a 80 % en viveros comerciales de *A. cupreata* en Chilapa, Guerrero (Cabrera *et al*., 2019). Este problema fitosanitario pone en riesgo la producción de *A. cupreata*, debido al escaso manejo profiláctico en vivero, lo que no garantiza la sobrevivencia de las plántulas en campo.

Dickeya chrysanthemi se encuentra distribuida en zonas templadas y subtropicales (Palacio *et al.,* 2006), se caracteriza por la capacidad de macerar tejidos suculentos de sus hospederos, por la capacidad pectinolítica, además de sobrevivir periodos largos en suelo y desechos vegetales (Snehalatharani y Khan 2010, CABI 2011). El control de esta enfermedad se basa principalmente en el uso de bactericidas de origen sintético; sin embargo, el uso excesivo y frecuente de estos productos genera

resistencia en los microorganismos, lo que conlleva problemas de salud y contaminación del medio ambiente, generando así mayor exigencia en producir alimentos libres de agroquímicos por parte de los consumidores (Sánchez-Bayo y Tenneekes, 2015).

El antibiograma es una herramienta utilizada en la bacteriología, su importancia conlleva a un tratamiento específico hacia enfermedades bacterianas que afectan a distintos cultivos de importancia económica. En la actualidad, se ha observado resistencia de los microorganismos a una gama de antibióticos (Islam *et al.*, 2014). Ante la problemática expuesta, el presente estudio se planteó el siguiente objetivo, determinar la sensibilidad *in vitro* de *Dickeya chrysanthemi* a antibióticos comerciales y exclusivos para uso de laboratorio.

7.4. MATERIALES Y MÉTODOS

7.4.1. Localización

Estas pruebas se realizaron en el Laboratorio de Microbiología Agrícola de la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Ambientales, Universidad Autónoma de Guerrero, ubicada en el Km. 2.5 de la Carretera Iguala-Tuxpan, en Iguala de la Independencia, Gro, Méx.

7.4.2. Material Biológico.

La cepa de la bacteria utilizada *Dickeya chrysanthemi*, fue proporcionada por el laboratorio de fitopatología del COLPOS quienes fueron los que la aislaron e identificaron en viveros de *A. cupreata* en Chilapa, Guerrero, causando la pudrición blanda del cogollo (Cabrera *et al*., 2019)

Sensidiscos: se cortaron discos de papel filtro de 10 mm, posteriormente se esterilizaron a 21 ºC por 15 min.

El antibiograma, está compuesto de doce antibióticos (multidiscos combinados MULTIBAC I.D).

7.4.3 a) Método del antibiograma disco-placa.

Para los multidisco se utilizó la técnica propuesta por Kirby-Bauer, un método desarrollado por National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS-2017). Se colocaron 203 µL de solución bacteriana sobre una caja Petri con medio Agar Nutritivo (Bioxon ™) y con un isopo estéril se homogenizó completamente sobre la superficie del agar. Enseguida se colocaron los multidiscos (MULTIBAC I.D: Reg. No. 1159R2002SSA) compuestos de papel secante impregnado con 12 antibióticos de amplio espectro: Amikacina (AK-30 mcg), Ampicilina (AM-10 mcg), Cefalotina (CF-30 mcg), Ceftriaxona (CTX-30 mcg), Cloranfenicol (CL-30 mcg), Dicloxacilina (DC-1 mcg), Nitrofurantoína (NF-300 mcg), Cefalotaxima (CFX-30 mcg), Gentamicina (GE-10 mcg), Netilmicina (NET-30 mcg), Penicilina (PE-10 U) y Trimetoprim-Sulafametoxasol (STX-25 mcg). Las cajas con multidiscos se mantuvieron en una incubadora a 28 ^{o}C en oscuridad continua. Transcurridos 24 – 48 h de incubación, se evaluaron los halos de inhibición (mm) de cada tratamiento, posteriormente se midió el diámetro de la zona de inhibición del disco con una regla.

7.4. 4 b) Método de difusión en agar.

Se prepararon soluciones acuosas de dos bactericidas en formulación polvo humectable: Sulfato de Estreptomicina (S. SP-0.2 mg) y Oxitetraciclina (OXI-500 mg) a una dosis de 0.2 g/20 mL de agua destilada. Se tomaron 203 µL de una suspensión bacteriana 3 x10^8 UFC/mL de *D. chrysanthemi* de 24-48 h de incubación a 28°C. Con Agar Nutritivo, se colocaron en cajas Petri y con un hisopo estéril se homogenizó sobre la superficie del agar, posteriormente se impregnaron 3 discos de papel filtro estéril de 10 mm de diámetro con Sulfato de Estreptomicina y Oxitetraciclina, con una pinza estéril se colocaron sobre la superficie de la caja Petri con Agar nutritivo a manera equidistante, evitando el contacto de las pinzas con el medio de cultivo.

Los testigos únicamente se impregnaron con agua destilada estéril. Las cajas se incubaron a 28 °C en oscuridad continua durante 24 - 48 h, con una regla se midió

el diámetro del halo de inhibición iniciando desde el centro del sensidisco hasta donde se inhibió el crecimiento.

7.4.5. Proceso de maceramiento de las piezas de los picudos para verificar la eficiencia de los métodos de desinfestación

Los picudos alimentados de manera artificial con maguey inoculado con *D. chrysanthemi* fueron extraídos de las hojas, 24 h después de haberse alimentado. Posteriormente se desinfestaron con hipoclorito de sodio al 1 y 2 % por 1 y 3 min, así mismo se preparó una solución de Benzalconio al 1.5 % aplicado por 2 min.

En seguida se disectaron bajo microscopio y se trituraron en mortero cada órgano con agua destilada estéril, posteriormente se cultivaron en agar nutritivo para el conteo de colonias por órgano.

7.4.6 El análisis estadístico.

Cada antibiótico consistió un tratamiento**,** los datos se procesaron utilizando el Software GraphPad Prims versión 6.0 (GraphPad Software Inc.; San Diego, CA, USA), con el que se presentaron los datos como frecuencia simple. Así mismo se utilizó un diseño experimental completamente al azar. La unidad experimental estuvo constituida por una caja Petri y se utilizaron seis repeticiones por tratamiento. Los datos se analizaron usando el paquete estadístico SAS (Versión 9.4). Las medias de los tratamientos se separaron con la prueba de diferencia mínima significativa (DMS) ($P \leq 0.05$) usando el paquete estadístico SAS.

7.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los órganos incubados de *S. acupunctatus* desinfestados con distintas concentraciones de hipoclorito y benzal. Presentaron crecimiento bacteriano del 50 a 100 % de colonias, lo que dificultó precisar el principal agente causal del daño en las plantas de *A. cupreata*.

Después de haber sometido a desinfestación de manera interna a *S. acupunctatus* con los antibióticos Kanamicina, Oxitetraciclina y Sulfato de Estreptomicina se corroboró el crecimiento de células bacterianas en algunas partes del lumen intestinal de *S. acupunctatus*.

El porcentaje del diámetro inhibitorio que se obtuvo en las dos réplicas son similares. se caracterizaron de acuerdo al diámetro del halo inhibitorio establecidas por el NCCLS basados en los diámetros de inhibición: 30 a 35 mm (cepa altamente sensible) e inferiores a 15 mm (cepas resistentes), las cuales son acreditadas por American National Standards Institute (ANSI), una institución encargada de proporcionar las normas, lineamientos y estándares para el uso de antibióticos, (NCCLSI, 2017).

Figura 1 A**,** de los catorce antibióticos evaluados para determinar la sensibilidad de *D. chrysanthemi*. Se obtuvieron dos antibióticos sensibles: el Oxitetraciclina (OXI-25 mg) con 30 mm de diámetro de inhibición, enseguida Sulfato de Estreptomicina (S.SP -25 mg) 20 mm de diámetro de halo inhibitorio (I), de acuerdo a la norma CLSI el resto de los antibióticos con un diámetro de inhibición menor a 15 mm son resistentes (R): PE (10 U) con 14.8 mm, CF (30 mcg) 10 mm, CL (30 mcg) el 9 mm, el Am (10 mcg) con 5 mm, AK (30 mcg) 4.8 mm, CTX (30 mcg) 4.8 mm, DC (1 mcg) 4.5 mm, GE (30 mcg) 5.5 mm, NET (30 mcg) 5 mm y STX (25mcg) de 5 mm de diámetro de inhibición, NF (300 mcg) y CFX (30 mcg) con 2 mm de inhibición bacteriana. Datos similares se obtuvieron en la réplica (Figura 1, B) donde solo difiere Cefalotaxima CF (30 mcg) con un mm, y CL (30 mcg) 3 mm de diámetro de inhibición, sin embargo, todos están en el mismo rango de resistencia en ambas

réplicas. En general las bactericidas Oxitetraciclina y Sulfato de Estreptomicina son los de mayor eficacia respecto a los doce multidiscos (Figura 1A y 1B).

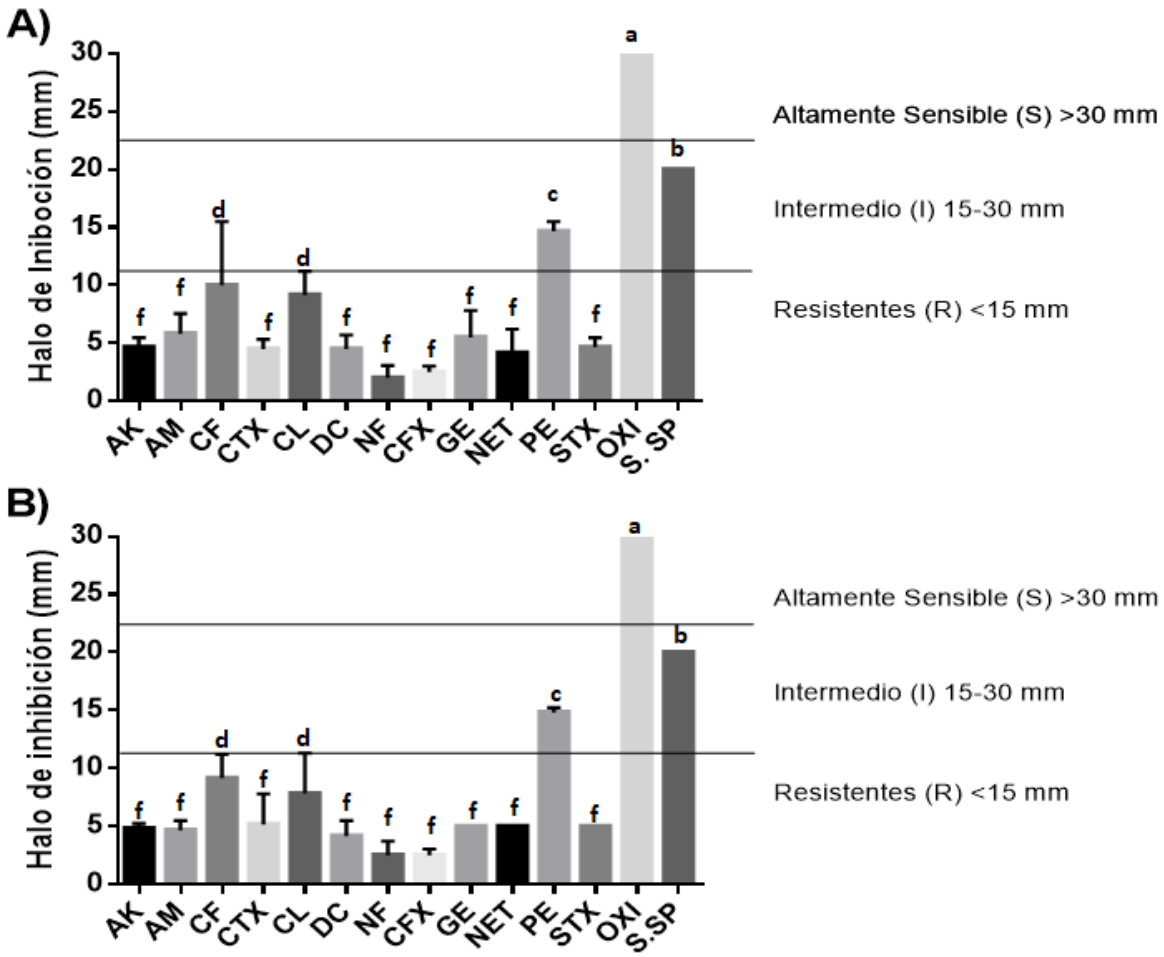


Figura 1. A y B. Sensibilidad de *Dickeya chrysanthemi* a catorce antibióticos: Amikacina (AK-30 mcg), Ampicilina (AM-10 mcg), Cefalotina (CF-30 mcg), Ceftriaxona (CTX-30 mcg), Cloranfenicol (CL-30 mcg), Dicloxacilina (DC-1 mcg), Nitrofurantoína (NF-300 mcg), Cefalotaxima (CFX-30 mcg), Gentamicina (GE-10 mcg), Netilmicina (NET-30 mcg), Penicilina (PE-10 U) y Trimetoprim-Sulafametoxasol (STX-25 mcg), Oxitetraciclina (OXI-500 mg) y Sulfato de Estreptomicina (S. SP-0.2 mg) prueba realizada en 48 h, con seis repeticiones por duplicado.

Durán (2011) realizó pruebas de detección de *Erwinia chrysanthemi* pv zeae (Sabet 1954), y caracterización bioquímica y fisiológica de 11 cepas aisladas, entre ellas *E. chrysanthemi*, presentando sensibilidad a Eritromicina.

Islam *et al*. (2014) evaluaron la sensibilidad *in vitro* de *Erwinia amylovora* a diferentes antibióticos, determinaron sensibilidad a Estreptomicina (10 µg), Cloranfenicol (30 µg), Gentamicina (10 µg), con 54.6, 81.89 y 36.4 % de diámetro de inhibición; clasificando a Cefalotaxima (30 µg) y Bacitracina (10 µg) como resistentes (R) con 100 y 81.89 % de crecimiento bacteriano.
Comparado con lo descrito en la (Fig. 1A y B).

En otro estudio *in vitro* realizado por Quesada *et al.* (2017) determinaron que *Erwinia chrysanthemi* presento 80 % de sensibilidad a Tetraciclina (30 µg), familia de la Oxitetraciclina y Gentamicina (10 µg), esto comparado con la Fig. A y B existe coincidencia, los antibióticos Gentamicina (30 mcg) presento poco sensible en comparación con Oxitetraciclina (25 mg) ambas a *D. chrysanthemi.*

En un estudio de sensibilidad *in vitro* de bacterias entre ellas (*Erwinia sp.*) procedentes de pasiflora y evaluación de antibióticos y productos cúpricos, Farfán, Benítez, Hoyos-Carbajal (2014) reportaron que el Cloranfenicol (50 mg L^{-1}) presentó el mayor porcentaje de inhibición (80 %) en géneros como *Burhodería sp., Erwinia sp., Pantoea sp., Pseudomonas sp y Xanthomonas sp.* pero refieren al Sulfato de Kanamicina y sulfato de estreptomicina a una dosis de (25 mg L^{-1}), mayor sensibilidad bacteriana, con porcentaje de inhibición del 83 y 87 %.

Con Kasugamicina (200 mn L^{-1}), se evaluó un porcentaje de inhibición del 50. 4 % de los aislamientos bacterianos.

Los antibióticos menos sensibles son Ampicilina (50 mg L^{-1}), Oxitetracilina (25 mg L^{-1}) y Validamicina (200 mg L^{-1}) a pesar de, una mayor dosis, solo inhibieron el 9 % de las bacterias evaluadas entre ellas *Erwinia sp.*

El análisis de comparación de medias (ANOVA) mostró que los antibióticos OXI, S. de Estreptomicina y Penicilina presentaron mayor diámetro de inhibición en *D. chrysanthemi* con 30, 20 y 14.8 mm de diámetro. Eso confiere diferencias significativas con el resto de los tratamientos. El resto de los tratamientos no tuvieron diferencias significativas en ambas réplicas (Cuadro 1.)

Cuadro 1. Sensibilidad *in vitro* de *Dickeya chrysanthemi* a catorce antibióticos: Amikacina (AK 30 mcg), Ampicilina (AM-10 mcg), Cefalotina (CF-30 mcg), Ceftriaxona (CTX-30 mcg), Cloranfenicol (CL-30 mcg), Dicloxacilina (DC-1 mcg), Nitrofurantoína (NF-300 mcg), Cefalotaxima (CFX-30 mcg), Gentamicina (GE-10 mcg), Netilmicina (NET-30 mcg), Penicilina (PE-10 U), Trimetoprim-Sulfametoxasol (STX-25 mcg), Oxitetraciclina (OXI-500 mg) y Sulfato de Estreptomicina (S. SP-0.2 mg) en 24-48 h.

Antibióticos	Diámetro de Inhibición (mm[1])			
	Réplica 1		Réplica 2	
AK	4.66[2]	f[3]	4.83	f
AM	5.83	f	5.00	f
CF	10.00	d	9.16	d
CTX	4.50	f	4.83	f
CL	9.16	d	7.83	d
DC	4.50	f	4.166	f
NF	2.00	f	2.50	f
CFX	2.33	f	2.50	f
GE	5.50	f	5.00	f
NET	4.16	f	5.00	f
PE	14.66	c	14.83	c
STX	4.66	f	5.00	f
OXI	30.00	a	30.00	a
S. SP	20.00	b	20.00	b
F-valor	99.90		185.70	
CV (%)	22.21		16.40	
LSD[4]	3.88		2.83	

[1] mm= milímetros; [2] promedio de seis repeticiones; [3] medias con letras iguales en cada columna no son estadísticamente diferentes; [4] LSD = Diferencia Mínima Significativa por prueba de Fisher ($P \leq 0.05$

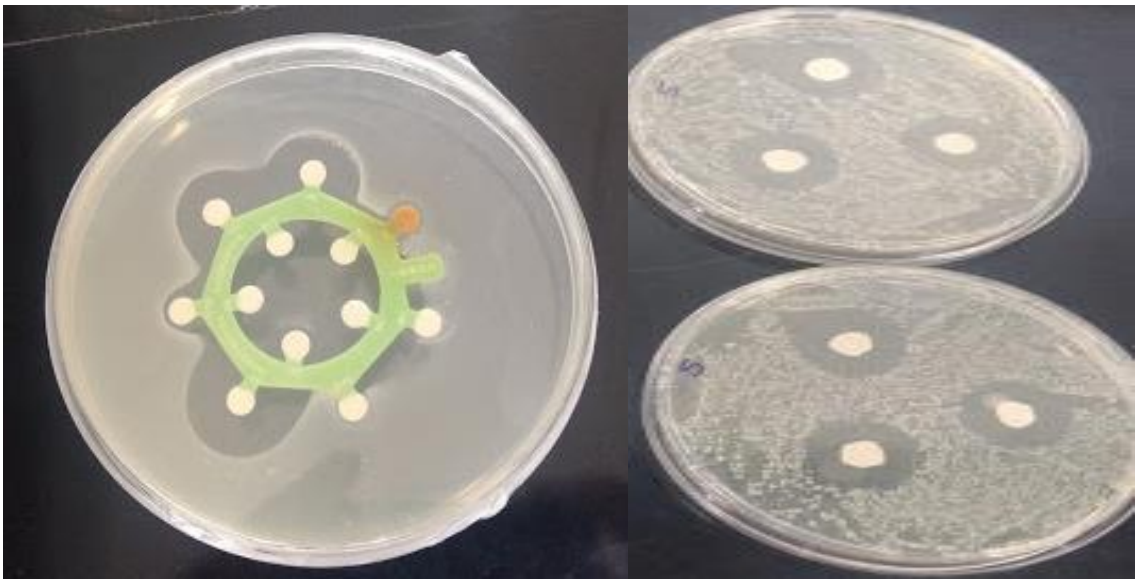


Figura 2. Placas con *D. chrysanthemi* sometida a distintos antibióticos

En la Figura 2, se observan halos de inhibición de los distintos antibióticos, a mayor halo inhibitorio significa que los antibióticos son sensibles a *D. chrysanthemi*.

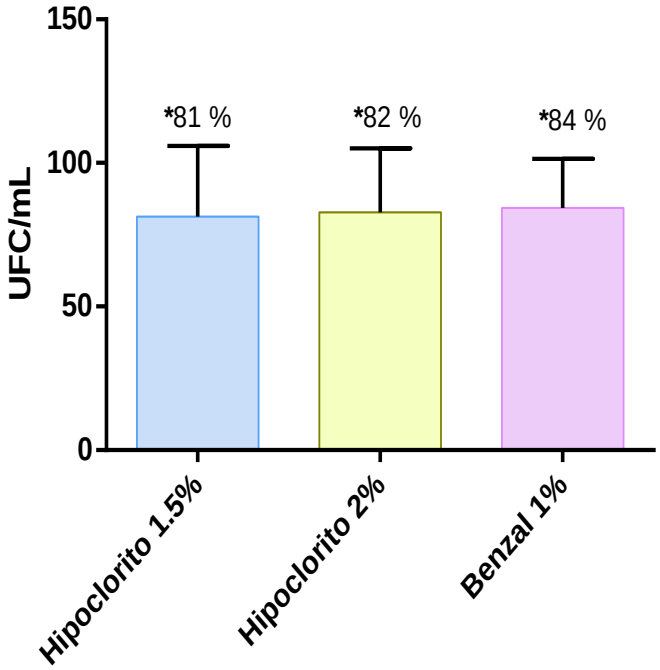


Figura 3. Desinfestación externa de *S. acupunctatus* colectado en Chilapa, Gro., México.

Las distintas concentraciones de hipoclorito de sodio y benzal no fueron efectivos para la eliminación de los microorganismos que porta el picudo de manera externa, al observarse un 80 % de crecimiento de células bacterianas en las placas de Petri. Sometida a las distintas concentraciones.

7.4.- CONCLUSIÓN

La bacteria *D. chrysanthemi* se observó a lo largo de los túbulos de Malpigui. La bacteria suele alojarse en el intestino debido a que es una enterobacteriaceae.

Los distintos métodos de limpieza externa aplicados a S*. acupunctatus* no fueron efectivos. Sin embargo, los antibióticos Kanamicina, Oxitetraciclina y S. de estreptomicina si inhibieron la mayoría de los microorganismos presentes de forma interna y externa en *S. acupunctatus*. Limitándose únicamente el crecimiento de una levadura sp. coincidiendo con Velázquez et al., (2006) en donde reportaron varias especies de levaduras del género cándida.

Dickeya chrysanthemi fue sensible Oxitetraciclina y S. estreptomicina, esto no impide el uso de los otros 12 antibióticos, motivando a más estudios que pudieran ser *in vivo*, esto por la ubicuidad de *D. chrysanthemi*. Al presentar más alternativas a los viveros comerciales de *Agave cupreata* y otras especies de agave. Esto podría disminuir la pudrición blanda, además los productores pueden prescindir con amplio espectro de productos químicos y evitar resistencia a antibióticos convencionales y de tercera generación. El resto de los antibióticos están clasificados como resistentes por haber presentado entre 80 a 100 % de crecimiento bacteriano en las dos réplicas.

7. 5 LITERATURA CITADA

Armon R., Dosoretz C., Yoirish A., Shelef G., Neeman I. (1995). Survival of the phytopathogen *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora* in sterile and non.sterile soil, sand and their admixture. Journal of Applied Bacteriiology, 78 (5). 513-518

Bauer A. W., Kirby W. M., Sherris J. C., Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. Am. J. Clin. Pathol. 1966,45: 493.

Cabrera H. E, Aranda O. S, Hernández C. E, Nava D. C, Mora A. J. A., y Vásquez L. A. (2019). First Report of Bacterial Wilt Caused by *Dickeya chrysanthemi* on Agave-Mezcal (*Agave cupreata*) in México. https://doi.org/10.1094/PDIS-05-18-0877-PDN.

CRM (2017). Consejo Regulador del Mezcal, informe de diversas actividades, http://www.crm.org.mx/PDF/INF_ACTIVIDADES/INFORME2017.pdf Citada el 20 de septiembre de 2019: http://sinavef.senasica.gob.mx/MDF/

Covarrubias, D. (2013). Aplicación De Técnicas De Minería De Datos en La Construcción De Un Inventario De Maguey Papalote, en El Estado De Guerrero.

CAB, (2011). International. Crop Protection Compendium, 2011 Edition. Wallingford, UK: CAB International. En línea: http://www.cabi.org/cpc. Fecha de consulta: 01-09-2019

Cockerill R., Franklin. (2010). CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement. Vol. 30 No. 1. Replaces M100-S20. M100-S19. Vol. 29 No. 3.

Dupuy M. A., (2016). Farmacocinética de Oxitetraciclina en dosificación oral múltiple en cerdos. Análisis PK-PD- Tesis doctoral, facultad de veterinaria. Universidad complutense de Madrid

Durán P. E., (2011). Detección de *Erwinia chrysanthemi* pv zeae (Sabet 1954) Victoria et al., 1957 en Maíz en Morelos, México. Tesis de Maestría. Posgrado de Fitosanidad.

Franco C., Stefanova N. M. (2008). Determinación de actividades cultivo de papa. Protección Vegetal 21(2):119-121.

Farfán M. L., Benítez V. S., y Hoyos-Carvajal M. L. (2014). Sensibilidad de bacterias procedentes de pasifloras a antibióticos y productos cúpricos. Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas – Vol. 8 -No. 1 – pp.20-33, enero-junio 2014.

García- Mendoza A.J. 2004. Agaváceas, en: A.J. García, M.J. Ordoñez y M. Briones –Salas, Biodiversidad de Oaxaca. Instituto de Biología. UNAM- Fondo oaxaqueño para la conservación de la naturaleza- World Wildlife Fund, México. Pp. 159-169.

García- Mendoza A.J. 2011. Agavaceae. Flora del valle de Tehuacán-Cuicatlan. Medina-Lemos R. (Ed). Universidad nacional autónoma de México. Fascículo 88 Agavaceae Instituto de Biología. México. PP: 1-95.

Islam M. A., Alam M. D., Urmee S. A., Rahaman M. H., Razu M. H. (2014). Isolation, Identification, In Vitro Antibiotic Resistance and Plant Extract Sensitivity of Fire Blight Causing *Erwinia amylovora*. J Plant Pathol Microb 5: 233. doi:10.4172/2157-7471.1000233

Martínez-Palacios, A., J.M. Gómez-Sierra, C. Sáenz-Romero, N. Pérez-Nassery N. Sánchez-Vargas (2011). Diversidad genética de *Agave cupreata* Trel & Berger., consideraciones para su conservación. Revista Fitotecnia Mexicana 34:159-165.

Martínez-Ramírez J. L. (2011). Evolución histórica y situación actual de la pudrición del cogollo en el cultivo del agave azul tequilero. Pp. 35-44.

Mederos P, Pérez-Mejía FA (eds). 1er, 4 Foro de discusión fitosanitaria en el cultivo del agave azul tequilero, integrando esfuerzos para impulsar bienestar en el sector. Guadalajara, Jalisco, México. 31 de mayo y 1 de junio de 2011.

Snehalatharani A., Khan N.A. (2010). Biochemical and physiological characterization of *Erwinia* species causing tip-over disease of banana. Archives of Phytopathology and Plant Protection 43(11):10721080.

Quesada, A., Chin, J. S., Aguilar, P., & Ruiz, K. (2018). Sensibilidad a los antibióticos en bacterias Gram negativas de bulbos de cebolla en Tierra Blanca de Cartago. *Repertorio Científico*, *20*(2), 121-130. https://doi.org/10.22458/rc.v20i2.2395

Palacio B., Combro A. M. A., López M. M. (2006). Characterization of potato isolates of *Dickeya chrysanthemi* in spays by a microtitre system for biovar, determination. Annals of Applied Biology 148: 157-164

Velázquez, J., Joly, L. J. y Tremont, J. (2006). Scyphophorus acupunctatus Gyllenhal, 1938 (Coleoptera: Curculionidae9) plaga del cocuy (Agave cocuy Trelease), en el estado Falcón, Venezuela. Entomotropica, 21(3): 181-183

VIII. CONCLUSIÓN GENERAL

S. acupunctatus es un vector natural y persistente de *Dickeya chrysanthemi*. Los síntomas replicados en plantas de *A. cupreata* por especímenes contaminados internamente con el patógeno transformado con el plásmido pFAJ1819 fueron idénticos a los producidos por la infiltración de la cepa de *Dickeya chrysanthemi* transformada y silvestre. La incubación de extractos de jugo intestinal de *S. acupunctatus* permitió observar la cepa de *D. chrysanthemi* fluorescente en los túbulos de Malpigui*,* así como la recuperación de la cepa inoculada.

D. chrysanthemi coexiste con otras especies bacterianas endémicas que constituyen la flora natural de *S. acupunctatus*, la cual no pudo ser eliminada con sustancias desinfestantes de uso externo o interno, incluidos diversos antibióticos como Kanamicina, Oxitetraciclina y Sulfato de Estreptomicina.

D. chrysanthemi, sola o en asociación con *Scyphophorus acupunctatus*, Causó pudrición significativa en las plantas inoculadas o infestadas a 24, 48 y 72 h. la mayor severidad de daños se observó a 72 h en el tratamiento picudos libres sobre las plántulas de *A. cupreata* e infestados de manera artificial con *D. chrysanthemi*.

De los 14 antibióticos evaluados para el control de *D. chrysanthemi*. Resultaron sensible Oxitetraciclina y Sulfato de estreptomicina con 30 mm de diámetro de inhibición, el resto de los antibióticos presentaron entre 80 a 100 % de crecimiento bacteriano. La importancia de buscar mejores alternativas evitará la disminución poblacional del maguey papalote, lo que representaría un mayor aprovechamiento para las comunidades que se dedican a la propagación de plantas y producción del mezcal, actividad heredada por generaciones. Además, proporcionará mayor variedad de antibióticos para el manejo adecuado de la pudrición del cogollo en el maguey.