



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
COORDINACIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola



TESIS

**DIAGNÓSTICO FITOSANITARIO, ESTABLECIMIENTO Y
MULTIPLICACIÓN IN VITRO DE AGAVE TOBALÁ (*Agave
potatorum* Zucc.)**

Que como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

Presenta

ARLETH OROZCO DUARTE

Bajo la supervisión de: DR. JOSÉ LUIS RODRÍGUEZ DE LA O



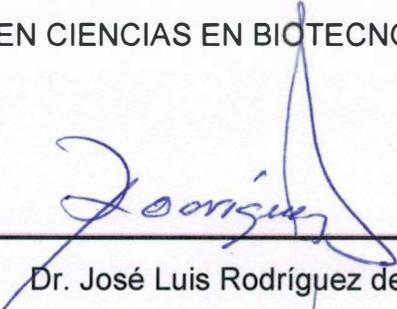
Chapingo, Estado de México, junio de 2023

**DIAGNÓSTICO FITOSANITARIO, ESTABLECIMIENTO Y
MULTIPLICACIÓN *IN VITRO* DE AGAVE TOBALÁ (*Agave
potatorum* Zucc.)**

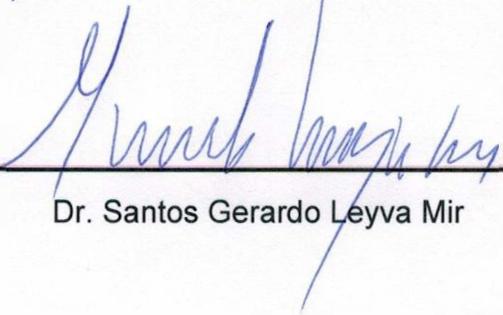
Tesis realizada por Arleth Orozco Duarte bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

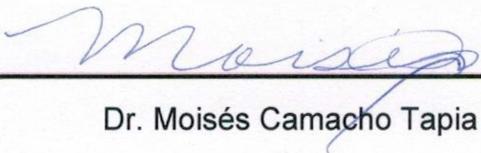
DIRECTOR:


Dr. José Luis Rodríguez de la O

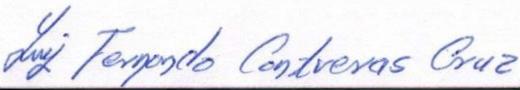
ASESOR:


Dr. Santos Gerardo Leyva Mir

ASESOR:


Dr. Moisés Camacho Tapia

ASESOR:


Dr. Luis Fernando Contreras Cruz

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS	V
LISTA DE FIGURAS	VI
DEDICATORIA.....	VIII
AGRADECIMIENTOS	IX
DATOS BIOGRÁFICOS	X
RESUMEN GENERAL	XI
OVERVIEW.....	XII
1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	13
2. REVISIÓN DE LITERATURA	15
2.1 El género agave.....	15
2.2 El mezcal	16
2.3 <i>Agave potatorum</i> , especie y distribución.....	16
2.4 Situación actual de <i>A. potatorum</i> y su uso comercial.....	17
2.5 Cultivo <i>in vitro</i> de tejidos vegetales	17
2.5.1 Los reguladores vegetales.....	18
2.5.2 La contaminación <i>in vitro</i> como limitante	19
2.5.3 Métodos <i>in vitro</i> de erradicación de patógenos	19
2.6 Diagnóstico de fitopatógenos.....	20
2.6.1 Postulados de Kotch	20
2.7 Enfermedades en Agaves.....	21
2.8 Literatura citada	23
3. DIAGNÓSTICO FITOSANITARIO EN AGAVE TOBALÁ (<i>Agave potatorum</i> Zucc.)	28
3.1 Resumen.....	28
3.2 Abstract.....	29
3.3 Introducción	30
3.4 Materiales y métodos	30
3.4.1 Colecta de material enfermo.....	30
3.4.2 Examinación	31
3.4.3 Aislamiento	31
3.4.4 Purificación	31
3.4.5 Pruebas de patogenicidad	31

3.4.6 Identificación molecular: Extracción de ADN, PCR y secuenciación.	33
3.4.6 Análisis	34
3.5 Resultados y discusión	34
3.5.1 Patogenicidad de cepas inoculadas.....	34
3.5.2 Identificación molecular	36
3.6 Conclusiones.....	38
3.7 Literatura citada	39
4. ESTABLECIMIENTO Y MULTIPLICACIÓN <i>IN VITRO</i> DE AGAVE TOBALÁ (<i>Agave potatorum</i> Zucc.).....	41
4.1 Resumen.....	41
4.2 Abstract.....	42
4.3 Introducción	43
4.3 Materiales y métodos	44
4.3.1 Obtención del material vegetal y preparación de plantas madre	44
4.3.2 Desinfestación	44
4.3.4 Desinfección	45
4.3.5 Obtención de explantes	46
4.3.6 Establecimiento <i>in vitro</i>	46
4.3.7 Multiplicación	46
4.3.8 Diseño experimental	47
4.3.9 Análisis estadístico	47
4.4 Resultados y discusión	47
4.4.1 Efecto de tratamientos sobre la contaminación por hongos, bacterias y oxidación.....	47
4.4.2 Regresión ordinal por tratamientos	51
4.4.3 Regresión ordinal por regiones.....	56
4.4.4 Efecto de los tratamientos en la supervivencia de explantes.....	57
4.4.5 La supervivencia de explantes en las regiones	60
4.4.6 Efecto de tratamientos y regiones en la supervivencia	62
4.4.7 Efecto de tratamientos reguladores en la multiplicación	64
4.4.8 Influencia de las regiones en el número de brotes.....	65
4.5 Conclusiones.....	67
4.6 Literatura citada	69

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Daño en pencas de <i>Agave potatorum</i> después de 30 días de la inoculación.	34
Cuadro 2. Organismos identificados mediante la amplificación de la región ITS y número de accesión en la base de datos Gen Bank.	36
Cuadro 3. Microorganismos identificados mediante la amplificación del factor de elongación 1 alfa (EF1) y número de accesión en el Genk Bank.	37
Cuadro 4. Tratamientos de desinfección con la dosis empleada.	45
Cuadro 5. Tratamientos con regulares BAP y AIB.	46
Cuadro 6. Probabilidades estimadas de que el explante corresponda a uno de los cuatro niveles de contaminación por hongos.	52
Cuadro 7. Probabilidades estimadas de que el explante corresponda a uno de los cuatro niveles de contaminación por bacterias.	53
Cuadro 8. Probabilidades estimadas de que el explante corresponda a uno de los cuatro niveles de daño por oxidación.	55
Cuadro 9. Probabilidades estimadas de que el explante corresponda a uno de los cuatro niveles de daño por la presencia de micelio.	56
Cuadro 10. Probabilidades estimadas de que el explante corresponda a uno de los cuatro niveles de daño por la presencia de bacterias.	56
Cuadro 11. Probabilidades estimadas de que el explante corresponda a uno de los cuatro niveles de daño por oxidación.	57
Cuadro 12. Análisis de varianza. Efecto de tratamientos sobre la supervivencia de explantes.	57
Cuadro 13. Comparación de medias Tukey HSD de supervivencia en los tratamientos.	58
Cuadro 14. Razón de probabilidades de supervivencia en cada tratamiento.	59
Cuadro 15. Análisis de varianza para el efecto de las regiones de explantes sobre la supervivencia de explantes.	60

Cuadro 16.Comparación de medias Tukey HSD supervivencia en cada región. ...	60
Cuadro 17.Razón de probabilidad supervivencia en las diferentes regiones	61
Cuadro 18. Razones de probabilidad de supervivencia por tratamiento.	62
Cuadro 19. Razón de probabilidades para la supervivencia de tipos de explante	62
Cuadro 20.Razón de probabilidades de las interacciones entre tratamientos y regiones para la supervivencia.....	63
Cuadro 21.Análisis de varianza del efecto de los tratamientos de reguladores sobre la generación de brotes.	64
Cuadro 22.Comparación de medias Tukey HSD de brotes en los tratamientos de reguladores.	64
Cuadro 23.Análisis de varianza de brotes generados a partir de las diferentes regiones.....	65
Cuadro 24.Efecto de las regiones sobre el vigor.....	65
Cuadro 25.Efecto de las regiones sobre el crecimiento en longitud.....	66
Cuadro 26. Comparación de medias Tukey HSD de brotes, longitud de hoja más larga (LMHL) y grosor de la hoja más larga (GHML).....	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A. Maceta con planta sana; B. Sacabocados utilizado para marcar círculos; C. Lesiones realizadas con la aguja estéril; D. Cepas en cajas Petri, atomizador con alcohol al 70%, tijeras, cinta, etc.; E. Penca con cinco círculos marcados; F. Penca con cinco discos de micelio; J. Maceta con cubierta de plástico; H. Macetas inoculadas.....	32
Figura 2.Ejemplo de cepas recuperadas y utilizadas para la prueba PCR.....	33
Figura 3.Daños en pencas de agave <i>Agave potatorum</i> tras un mes de la inoculación de cepas. A: P2B; B: P2F; C: P3F; D: P5D; E: P6A; F: P6F; G. P2A.	36
Figura 4. A. plantas extraídas de las macetas. B. tallos limpios sin hojas ni raíces. C. Tejido perforado por el sacabocados.....	44
Figura 5. Tipos de explantes. A. Región distal. B. Región proximal. C. Basal. D. Yemas axilares del tallo.	46

Figura 6. Gráfica de contaminación in vitro durante siete días por microorganismos fungosos.....	48
Figura 7.Efecto de tratamientos (0-18), sobre la variable oxidación, durante los primeros siete días de introducción in vitro.	50
Figura 8.Efecto de tratamientos (0-18) sobre la contaminación bacteriana durante los primeros siete días de introducción in vitro.....	50
Figura 9.Explantes tratados. A. Sin daño, explante de la región A; B. Sin daño proveniente de la región C; C. Daño leve ocasionado por hongos. D: daño grave por la cantidad de micelio; E: Daño moderado por hongos; F: daño grave provocado por hongos; G: daño leve por contaminación bacteriana; H. Daño moderado por presencia de bacteria; I.Daño grave por bacterias; J: oxidación leve; K. Oxidación moderada; L. oxidación grave.....	51
Figura 10. Supervivencia de explantes en los tratamientos (0-18), a los 15 días de introducción in vitro.	58
Figura 11. Supervivencia de explantes en cada región de tejido A = región apical, B=región proximal, C = región basal y D = yemas axilares.....	61
Figura 12. Brotes en diferentes regiones. A. Brote proveniente de la región A. B. Brote proveniente de la región B. C. Brote proveniente de la región C. Brote proveniente de la región D.	65
Figura 13. Explantes de <i>Agave potatorum</i> provenientes de la región proximal y basal, con seis semanas en medio MS al 100 % más 3mg·L ⁻¹ de BA y 1mg·L ⁻¹ de AIB.	67

DEDICATORIA

Con mucho cariño dedico esta tesis a mis padres, Mirtha y Leopoldo, por creer en mi capacidad para cumplir esta meta y motivarme a seguir superándome.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría.

Al Dr. José Luis, por aceptarme para realizar esta tesis de maestría bajo su dirección y disponibilidad para consultar dudas.

Al Dr. Leyva, por su apoyo y confianza en mi trabajo y haberme facilitado los medios para el diagnóstico.

Al Dr. Moisés, por la asesoría durante la identificación molecular

Al Dr. Luis Fernando, por su ayuda en el procesamiento de datos.

DATOS BIOGRÁFICOS

Arleth Orozco Duarte nació en la localidad de Placeres del Oro, en el estado de Guerrero, el 2 de diciembre de 1996, con CURP. Es ingeniero agrónomo especialista en Parasitología Agrícola por la Universidad Autónoma Chapingo (UACH), generación 2015-2019, con cédula profesional número 12913142. Los estudios de preparatoria los realizó en el departamento de Preparatoria Agrícola de la UACH. Realizó la estancia preprofesional en el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP-CEVAMEX) en el programa nacional de trigo.

RESUMEN GENERAL

DIAGNÓSTICO FITOSANITARIO, ESTABLECIMIENTO Y MULTILICACIÓN *IN VITRO* DE AGAVE TOBALÁ (*Agave potatorum* Zucc.)

El agave tobalá (*Agave potatorum* Zucc.) es una especie con potencial comercial debido a la gran demanda para la elaboración del mezcal. Una alternativa para la producción masiva de plantas de alta calidad es el cultivo *in vitro*. Un esquema completo de micropropagación requiere del conocimiento sobre el estado fitosanitario del cultivo. No se han reportado estudios de diagnóstico de fitopatógenos en *A. potatorum*, sin embargo, se han observado síntomas de posibles enfermedades. El objetivo de este estudio fue desarrollar un protocolo eficiente de establecimiento y multiplicación *in vitro* de *A. potatorum*. que permita la obtención de material vegetal libre de patógenos. Se realizó la colecta de plantas enfermas de dos y tres años en San Antonio, Huitepec, Oaxaca. El material vegetal se resguardó en la Universidad Autónoma Chapingo. Se eligieron plantas al azar para el aislamiento y purificación de cepas de hongos. A partir de la misma colecta, se tomaron plantas para obtener regiones explantes que fueron establecidos *in vitro* con la aplicación de tratamientos de desinfección. Se utilizaron tres dosis de BA y AIB en la etapa de multiplicación *in vitro*. Mediante los postulados de Kotch y la reacción en cadena de la polimerasa se identificaron *Fusarium solani*, *Fusarium incarnatum*, *Dothideales* sp., *Pyronemataceae* sp. 1 MJ12 y *Fusarium equiseti*. Se observó que la aplicación de productos: Hipoclorito de sodio, Tecto 60 y Bunsan 1129, tiene un efecto positivo en la supervivencia de explantes. La región con mayor supervivencia de explantes fue la región proximal, mientras que la región que generó más brotes fue la región basal con 13.15 brotes/explante, seguida de la región proximal con 12.35 brotes/explante. La técnica de PCR permitió la identificación de patógenos en *A. potatorum*. Las diferentes regiones influyeron en la respuesta *in vitro* durante la etapa de multiplicación. La aplicación 3 mg L⁻¹ de BAP y 1 mg L⁻¹ de AIB fue efectiva para la multiplicación de brotes.

Palabras clave: Diagnóstico, fitopatógenos, PCR, tratamientos, establecimiento, explante, brotes.

Tesis de Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Arleth Orozco Duarte

Director de Tesis: José Luis Rodríguez de la O

OVERVIEW

PHYTOSANITARY DIAGNOSIS, ESTABLISHMENT, AND IN VITRO MULTIPLICATION OF AGAVE TOBALA (*Agave potatorum* Zucc.)

Agave tobala (*Agave potatorum* Zucc.) is a species with commercial potential due to the great demand to produce mezcal. An alternative for the mass production of high-quality plants is in vitro cultivation. A complete micropropagation scheme requires knowledge about the phytosanitary status of the crop. No diagnostic studies of phytopathogens have been reported in *A. potatorum*, however, symptoms of possible diseases have been observed. The objective of this study was to develop an efficient protocol for the establishment and in vitro multiplication of *A. potatorum* that allows obtaining pathogen-free plant material. Diseased plants were collected in San Antonio, Huitepec, Oaxaca. The plant material was stored at Chapingo University. Plants were randomly selected for isolation and purification of fungal strains. From the same collection, plants were taken to obtain explant regions that were established in vitro with the application of disinfection treatments. Three doses of BA and AIB were used in the in vitro multiplication stage. Using Koch's postulates and polymerase chain reaction (PCR), *Fusarium solani*, *Fusarium incarnatum*, *Dothideales sp.*, *Pyronemataceae sp. 1 MJ12* and *Fusarium equiseti* were identified. It was observed that the application of products: Sodium hypochlorite, Tecto 60[®], and Bunsan 1129[®], had a positive effect on the survival of explants. The region with the highest explant survival was the proximal region, while the region that generated the most shoots was the basal region with 13.15 shoots/explant, followed by the proximal region with 12.35 shoots/explant. The PCR technique allowed the identification of pathogens in *A. potatorum*. The different regions influenced the in vitro response during the multiplication stage. The application of 3 mg L⁻¹ of BAP and 1 mg L⁻¹ of AIB was effective for the multiplication of shoots.

Keywords: Diagnosis, phytopathogens, PCR, treatments, establishment, explant, shoots.

Master of Science Thesis in Agricultural Biotechnology, Chapingo University.

Author: Arleth Orozco Duarte

Thesis director: José Luis Rodríguez de la O

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Agave potatorum fue descrita por Zuccarini en 1832, su nombre proviene del latín potator, –oris, bebedor (de vino) y es comúnmente conocido como “agave mariposa, papalometl, papalomé o tobalá”. Tradicionalmente se ha utilizado para la elaboración del mezcal, una bebida alcohólica de México, siendo una de las especies más apreciadas (Chávez et al., 2016). En los últimos años la popularidad del mezcal ha aumentado y como resultado la demanda comercial de plantas, sin embargo, el aprovechamiento de *A. potatorum* no está regulado, lo que ha ocasionado una reducción de las poblaciones locales, ya que la mayoría del mezcal elaborado a partir de esta especie proviene de ejemplares extraídos de su condición silvestre, los cuales se cosechan antes de que formen semillas, siendo ésta su única vía de propagación (Delgado et al., 2014; Torres et al., 2015).

El uso de plantas sin planes de manejo agronómico trae consigo el aumento de problemas fitosanitarios, limitando la producción. El cultivo in vitro permite la obtención de plantas libres de patógenos para programas de certificación fitosanitaria, además de la producción masiva de plantas. Aguilar y Rodríguez (2018) lograron la obtención de brotes *in vitro* de *A. potatorum* utilizando medio de cultivo MS al 100 %, más tarde Ramírez et al. (2022) realizaron la micropropagación mediante organogénesis directa, por otro lado, Bautista et al., (2020) lograron el enraizamiento de brotes *in vitro* en medio de cultivo con AIA y la aclimatación de plantas.

En *A. potatroum* no se ha reportado el diagnóstico de enfermedades, no obstante, en especies cercanas como *A. tequilana* se ha informado sobre la presencia de fitopatógenos altamente especializados que ocasionan daños y pérdidas en la producción (López et al., 2020; Mendoza et al., 2021; Jiménez et al., 2017).

Es por eso, que el objetivo de este trabajo fue determinar la etiología de plantas enfermas a partir de materiales colectados en campo, así como establecer un

protocolo *in vitro* de esta especie. Con este trabajo se pretende aportar información para futuros proyectos de certificación fitosanitaria en *A. potatorum*.

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un protocolo eficiente de establecimiento y multiplicación *in vitro* de explantes de *Agave potatorum* Zucc. que permita la obtención de material vegetal libre de patógenos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Diagnosticar mediante la técnica de PCR el estado fitosanitario de plantas de *A. potatorum* recolectadas en San Francisco, Huitepec, Oax.

Establecer tratamientos de control y/o erradicación de patógenos en cuatro tipos de explantes de *A. potatorum* durante la etapa de establecimiento *in vitro*.

Determinar la concentración de bencilaminopurina y ácido indol butírico que permita la multiplicación *in vitro* de *A. potarum*.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 El género agave

El género agave es endémico del continente americano y cuenta con aproximadamente 210 especies distribuidas desde el sur de Estados Unidos hasta Colombia y Venezuela (Bautista, et al., 2022). Se considera que el centro de diversidad se encuentra en México pues se ha reportado la presencia de hasta 160 especies de agaves (Jiménez et al., 2021), de las cuales 130 son endémicas, representando el 62% de la diversidad continental (García et al., 2019).

Los agaves pertenecen al grupo de plantas monocotiledóneas, ubicadas dentro de la familia Asparagaceae (Chase et al., 2016). Se caracterizan por presentar adaptaciones a climas áridos o semi áridos tales como un sistema radicular superficial que favorece la captación del agua de lluvia, hojas suculentas y fibrosas provistas con cutículas gruesas en la epidermis que brindan protección ante la evaporación y pérdida de la estructura en periodos de sequía, y metabolismo ácido crasuláceo (CAM) posibilitado por estomas complejos que permiten fijar el carbono en ácidos orgánicos con una mínima pérdida de agua (García, 2007).

La reproducción es de manera sexual y asexual, en la reproducción sexual, la planta desarrolla un qurote con inflorescencias y mediante la polinización por aves, insectos o murciélagos se forman las semillas, mientras que en la reproducción asexual consiste en producir clones en diferentes partes de la roseta o de la inflorescencia, dando origen a hijuelos y bulbillos (García, 2007).

Desde la época precolombina, los agaves se han utilizado principalmente para la preparación de bebidas alcohólicas, obtención de fibras, como alimento entre otros usos (Bautista et al., 2022). Actualmente en México, el principal uso de los agaves es destinado a la producción de bebidas destiladas como el tequila y el mezcal (Chávez et al., 2016).

2.2 El mezcal

De acuerdo con la NORMA Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-2016, el mezcal es una bebida 100 % de maguey o agave, obtenida de las cabezas maduras de magueyes o agaves cocidos. Los magueyes deben ser cosechados en los estados comprendidos en denominación de origen del mezcal; Guerrero, Oaxaca, Durango, Puebla, San Luis Potosí y Zacatecas (Consejo Mexicano Regulador del Mezcal [COMERCAM], 2022).

El mezcal se ha producido de forma artesanal durante miles de años, pero recientemente ha tomado importancia en eventos internacionales y sus estadísticas son prometedoras (Chávez et al., 2016), desde el 2014 la producción nacional de mezcal ha tenido un crecimiento exponencial, y en 2021 se registró una producción equivalente a 8,099,591.00 litros referido a 45% Alc. Vol., (Figura 1) siendo Oaxaca el principal estado productor con el 85.40% de la producción total (COMERCAM, 2022).

2.3 *Agave potatorum*, especie y distribución

A. potatorum es una especie monocárpica, que tarda de 8 a 12 años en florecer. Por lo general es una planta acaulescente, de rosetas pequeñas con 50 a 80 hojas de color verde glauco, cortamente ovado-lanceoladas, planas, con márgenes ondulados a profundamente crenados, con los dientes y la espina terminal de las hojas de color castaño. La inflorescencia, escapo o quiote se hace evidente en el mes de junio; esto puede alcanzar de 3 a 6 m de altura y presenta alrededor de 11 umbelas, cada una formada por alrededor de 10 flores (García, 2010). Algunas fuentes indican la existencia sólo de reproducción sexual (Delgado et al., 2014; Torres et al., 2013). Las semillas tienen una viabilidad máxima de 24 meses (Caamal et al., 2022).

La especie es endémica de hábitats semiáridos de los estados de Puebla y Oaxaca (Delgado et al., 2014) y se distribuye por el extremo oriental de la cuenca del río Balsas, el Valle de Tehuacán–Cuicatlán, pie de monte de las sierras Mixtecas y montañas que rodean los Valles Centrales de Oaxaca (García, 2010).

2.4 Situación actual de *A. potato* y su uso comercial

Una planta de tobalá tarda de seis a ocho años en alcanzar la madurez reproductiva, en esa etapa la cantidad de azúcares en el tallo llega a su máximo y los productores cosechan los tallos o “piñas” antes que las plantas puedan emitir flores y semillas (Torres et al., 2013). La demanda de *A. potato* aumenta paulatinamente, de tal forma que su comercialización ha alcanzado dimensiones internacionales (Torres et al., 2013). Esta situación ha sido determinante para la extinción de poblaciones locales y para la reducción sustancial de las poblaciones que aún existen (Delgado et al. 2014).

Es por ello por lo que la propagación de esta especie mediante técnicas de cultivo representa una alternativa para la producción masiva que permita abastecer la demanda comercial (Domínguez et al, 2008; Caamal et al., 2022; Correa et al., 2022).

2.5 Cultivo *in vitro* de tejidos vegetales

El cultivo de células, tejidos y órganos vegetales es un conjunto de técnicas diseñadas para el crecimiento y multiplicación de células y tejidos usando soluciones nutritivas en un ambiente aséptico y controlado (Loyola & Vázquez, 2006). Fue desarrollado principalmente a principios de la década de 1960 y hoy en día se ha convertido en un procedimiento común para la biotecnología moderna (Loyola & Vázquez, 2006).

De acuerdo con Sharry, et al., (2015), el proceso de generar de plantas *in vitro* presenta cinco etapas principales:

Etapa 0: Preparación del material vegetal. Involucra la selección y preparación de la planta madre dadora de explantes o planta madre (Sharry et al., 2015).

Etapa 1: Establecimiento del cultivo. El cultivo *in vitro* con la introducción de los explantos en el medio de cultivo en condiciones asépticas. El porcentaje de éxito en esta etapa suele ser bajo por los problemas de adaptación y contaminantes que la planta puede presentar (Sharry et al., 2015).

Etapa 2: Multiplicación. El objetivo de esta etapa es mantener y aumentar la cantidad de brotes para los nuevos ciclos de multiplicación sucesivos y poder destinar parte de ellos a la siguiente etapa de producción. La multiplicación se consigue a través de la organogénesis, la embriogénesis somática y la multiplicación por yemas (Sharry et al., 2015).

Etapa 3: Enraizamiento y obtención de plantas completas. En esta etapa se forman las raíces para constituir una planta completa y hacer más fácil su manejo y adaptación fuera de laboratorio (Sharry et al., 2015).

Etapa 4: Aclimatación y rusticación de las plantas micropropagadas. Las condiciones favorables que proporciona el cultivo *in vitro* ocasionan que las plantas obtenidas no presenten adaptaciones al medio exterior, por lo que, antes de establecer plantaciones definitivas se realiza la transferencia a sustratos por un periodo de aclimatación para corregir esas anomalías (Sharry et al., 2015).

2.5.1 Los reguladores vegetales

Según “la ley de Skoog y Miller” el balance en la concentración de citocininas y auxinas es determinante para la morfogénesis de muchos tejidos (Skoog & Miller, 1957). Las citocininas se utilizan frecuentemente para estimular la división celular y desarrollo, generalmente en compañía de una auxina (Skoog & Miller, 1957). Algunas de las citocininas más utilizadas son la cinetina (KIN), la benciladenina (BA), la 2-isopentiladenina (2 iP) y la zeatina. Por su parte, las auxinas estimulan la división celular y promueven la formación de raíces (Thimann y Went 1934). Uno de los reguladores de crecimiento más utilizado para enraizar en cultivo *in vitro* de agaves es el ácido indolbutírico (AIB) (Enrríquez del Valle et al., 2005).

La naturaleza y cantidad de reguladores de crecimiento en el medio varía según la variedad de planta, la naturaleza del tejido y también la etapa de cultivo, iniciación de callo, inducción de embriogénesis somática, diferenciación o multiplicación de brotes, enraizamiento de brotes, etc. (Bhojwani & Dantu, 2013).

2.5.2 La contaminación *in vitro* como limitante

Uno de los principales problemas que se presentan cuando se tratan de establecer los cultivos *in vitro* es el de la contaminación de los éstos con diversos tipos de microorganismos (hongos, levaduras, bacterias, fitoplasmas, virus), ya que el ambiente creado en laboratorio es altamente propicio para su desarrollo (Sharry et al., 2015).

La contaminación puede provenir del interior del material vegetal o del ambiente externo. Cuando se realiza el establecimiento de material limpio, la contaminación es causada por microorganismos denominados “vitropatógenos” ya que no provienen de la planta si no que están asociados al ambiente, material y personal del laboratorio, sin embargo, pueden modificar el pH, competir por los nutrientes y modificar el medio de cultivo (Sharry et al., 2015).

Por otra parte, cuando el material donante está contaminado con fitopatógenos, es decir, microorganismos que han evolucionado a lo largo del tiempo junto con la planta (Agiros, 2005), el riesgo es el de la propagación clonal y la posible distribución y liberación ambiental de patógenos (Loyola & Vázquez, 2006). Para tener certeza de que el material vegetal que se está propagando está libre de patógenos se deben incluir pruebas patológicas en el proceso de producción *in vitro* (Lagans et al, 1977).

2.5.3 Métodos *in vitro* de erradicación de patógenos

Desde que Morel y Martín en 1952 informaron la regeneración de plantas de dalias libres de virus mediante el cultivo de tejido meristemático de plantas infectadas, el cultivo de meristemos ha sido utilizado ampliamente para la obtención de plantas libres de patógenos (Jiménez, 2015), esta técnica se fundamenta en que la distribución de los fitopatógenos no es uniforme y que su concentración tiende a disminuir progresivamente hacia el meristema apical del tallo, donde las células se encuentran en constante y rápida división (Martínez, 1987).

Hasta la actualidad, los métodos de cultivo *in vitro* más utilizados para la obtención de plantas libres de patógenos son el cultivo de tejidos meristemáticos en combinación con termoterapia o quimioterapia (Martínez, 1987). La liberación de

patógenos se ha logrado en algunos cultivos como caña de azúcar (Leu, 1978), papa (Nascimento et al., 2003), papaya (Solis et al., 2011), entre otros. Además, se ha reportado que la técnica de crioterapia de puntas de brotes tiene alta frecuencia de erradicación de patógenos de cultivos hortícolas (Feng et al., 2012).

2.6 Diagnóstico de fitopatógenos

Anteriormente, la identificación de patógenos de plantas se basaba en la detección visual de síntomas en partes afectadas del huésped, la caracterización morfológica mediante microscopía, medios selectivos, pruebas bioquímicas, plantas indicadoras, entre otras técnicas (López et al., 2013; Gonzáles, 2017). No obstante, las plantas pueden ser atacadas por múltiples patógenos a la vez o diferentes microorganismos logran ocasionar enfermedades con síntomas muy parecidos, por consiguiente, ahora los métodos de diagnóstico más utilizados por su confiabilidad y reproducibilidad son los derivados de técnicas moleculares, principalmente las técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (López et al., 2013).

En los casos en que la planta presenta síntomas que parecen ser causados por un patógeno, pero no existen informes previos que lo respalden (como en el caso de *A. potato*) se toman los pasos descritos en los postulados de Koch para realizar el diagnóstico de la enfermedad (Agrios, 2005).

2.6.1 Postulados de Koch

Robert Koch (1843-1910) fue un médico y bacteriólogo que con base en sus estudios sobre enfermedades humanas (1876-1883,) llegó a la conclusión general de que cada enfermedad es causada por un microorganismo específico, siendo el primero en demostrar la Teoría microbiana de la enfermedad propuesta anteriormente por Luis Pasteur y en 1887 estableció los cuatro pasos que deben cumplirse antes de que un microorganismo aislado de un humano, animal o planta enfermo pueda considerarse como la causa de la enfermedad. Estos cuatro pasos, reglas o criterios se conocen como “postulados de Koch” (Agrios, 2005).

1. El agente causal sospechoso (bacteria u otro microorganismo) debe estar presente en todos los organismos enfermos (p. ej., una planta) examinados (Agrios, 2005).
2. El agente causal sospechoso (bacteria, etc.) debe aislarse del organismo huésped enfermo (planta) y cultivarse en cultivo puro (Agrios, 2005).
3. Cuando se inocula un cultivo puro del agente causal sospechoso en un huésped (planta) sano y susceptible, el huésped debe reproducir la enfermedad específica (Agrios, 2005).
4. El mismo agente causal debe recuperarse nuevamente del huésped experimentalmente inoculado e infectado, es decir, el agente recuperado debe tener las mismas características que el organismo en el paso 2 (Agrios, 2005).

2.7 Enfermedades en Agaves

Una planta se considera enferma cuando las funciones vitales de sus células o de una parte de ella son interrumpidas, alteradas, inhibidas, funcionan mal o mueren en respuesta a un organismo patógeno o factor ambiental adverso; al principio, la infección se localiza en una o unas pocas células por lo que es invisible, luego la reacción se generaliza y las partes afectadas de la planta desarrollan cambios visibles a simple vista conocidos como síntomas y puede conducir a una alteración parcial, deterioro o muerte de la planta entera (Agrios, 2005).

Una diversidad patógenos ocasionan daños a los agaves, en *A. tequilana* se ha reportado que el padecimiento de marchitez y pudrición seca del cogollo es ocasionado por una asociación parasítica especializada de cinco especies de *Fusarium* dentro de tres complejos: La especie *Fusarium oxysporum* dentro del complejo *F. oxysporum* (FOSC); las especies *F. solani*, *F. falciforme* y *Fusarium* sp componen el complejo *Fusarium solani* (FSSC) y *Fusarium* sp. se ubicó en el complejo *Fusarium fujikuroi* (FFSC) (López et al., 2020). Otro análisis molecular de cepas de hongos aislados de hijuelos comerciales de *A. tequilana*, reveló la asociación de 23 cepas dentro de cuatro complejos filogenéticos: *F. oxysporum*, *F. fujikuroi*, *F. solani* y *F. incarnatum-equiseti* (Mendoza et al., 2021). En cuanto a

bacterias, se han identificado *Erwinia cacticida*, *Pantoea agglomerans* y *Pseudomonas* sp. causando la pudrición blanda de la raíz (Jiménez et al., 2004).

2.8 Literatura citada

- Agrios, G.N. 2005. Plant Pathology. 5th Edition. Elsevier. Academic Press. USA. 922p.
- Bautista, M.E., Hernández, S. L., Simpson, J. (2022). Advances in the Micropropagation and Genetic Transformation of Agave Species. *Plants*, 11(13), 1757. <https://doi.org/10.3390/plantas11131757>
- Bhojwani, S. S., and Dantu, P. K. (2013). "Culture Media," in Plant Tissue Culture: An Introductory Text, eds S. S. Bhojwani and K. P. Dantu (New Delhi: Springer). https://doi.org/27-36.10.1007/978-81-322-1026-9_17
- Caamal, V.J., Pérez de León, A. V., Alamilla, M.J., Tejeda, S. O., Chanatasig, V.C. (2022). Cost analysis of Agave potatorum Zucc, produced in vitro by direct organogenesis. *Agro Productividad*, 15(10), 61-68. <https://doi.org/10.32854/agrop.v15i10.2228>
- Chase, M. W., Christenhusz, M. J. M., Fay, M. F., Byng, J. W., Judd, W. S., Soltis, D. E., ... & Weber, A. (2016). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 181(1), 1-20. <https://doi.org/10.1111/boj.12385>
- Chávez, P.M, Hernández, E. P., & Hernández, J. C. (2016). Revisión del agave y el mezcal. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 18(1), 148-164. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v18n1.49552>
- Consejo Mexicano Regulador del Mexcal. (2022a). Denominación de origen. <https://comercam-dom.org.mx/denominacion-de-origen/>
- Consejo Mexicano Regulador del Mexcal. (2022b). Informe estadístico 2022. <https://comercam-dom.org.mx/wp-content/uploads/2022/06/INFORME-2022- II - SINTESIS.pdf>
- Delgado, L. A. (2008). Aprovechamiento y disponibilidad espacial de Agave potatorum en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán. México: *Tesis de maestría*. Universidad Nacional Autónoma de México.

- Delgado, L.A., Casas, A., & Téllez, O. (2014). Distribution, abundance and traditional management of *Agave potatorum* in the Tehuacán Valley, Mexico: Bases for sustainable use of non-timber forest products. *Journal of ethnobiology and ethnomedicine*, 10(63), 1-12.
<https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v18n1.49552>
- Domínguez, R.M., González, J.M., Rosales, G.C., Quiñones V.C., Delgadillo, D.S., Mireles, O.S., Pérez, M.B. (2008). El cultivo in vitro como herramienta para el aprovechamiento, mejoramiento y conservación de especies del género agave. *Investigación y Ciencia*, 16(41), 53-62.
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=67404109>
- Enríquez, del V. J., Carrillo, C.G., & Rodríguez, de la O J.L. (2005). Sales inorgánicas y ácido indolbutírico en el enraizado in vitro de brotes de *Agave angustifolia*. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 28(2), 175-178.
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61028212>
- Farr, D. F., Aime M. C., Rossman, A. Y., Palm, M. E. (2006). Species of *Colletotrichum* on agavaceae. *Mycological research*, 110(12), 1395-1408.
<https://doi.org/10.1016/j.mycres.2006.09.001>
- Feng, C., Wang, R., Li, J., Wang, B., Yin, Z., Cui, Z., Li, B., Bi, W., Zhang, Z., Li, M., & Wang, Q. (2013). Production of pathogen-free horticultural crops by cryotherapy of in vitro-grown shoot tips. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 11013, 463–482. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-074-8_35
- García, M.A. (2007). Los agaves de México. *Ciencias*, (87), 14-23.
<https://www.redalyc.org/pdf/644/64408704.pdf>
- García, M. A., Franco M.I., Sandoval G., D. (2019). Cuatro especies nuevas de *Agave* (Asparagaceae, Agavoideae) del sur de México. *Acta botánica mexicana*, (126), e1461, 1- 18. <https://doi.org/10.21829/abm126.2019.1461>
- García, M.A. (2004). Biodiversidad de Oaxaca. García M., A.J., Ordoñez, M.J., Briones Salas, M., Eds.; Instituto de Biología, UNAM, ciudad de México, Mexico, pp.159–169.

- García M.A. (2010). Revisión taxonómica del complejo *Agave potatorum* Zucc. (Agavaceae): nuevos taxa y neotipificación. *Acta botánica mexicana*, (91), 71-93. <https://doi.org/10.21829/abm91.2010.292>
- Gentry, H. S. (1982). *Agaves of Continental North America*. Arizona, Estados Unidos: University of Arizona Press, pp. 25-47.
- González, G.R. (2017). Evolución de técnicas de diagnóstico de virus fitopatógenos. *Revista mexicana de fitopatología*, 35(3), 591-610. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-1>
- Jiménez, H.I., Virgen, C.G., Martínez, O., Vandemark, G., Portugal, V. (2004). Identification and Characterisation of Bacteria Causing Soft-rot in *Agave tequilana*. *European Journal of Plant Pathology*. 110. 317-331. <https://doi.org/10.1023/B:EJPP.0000019791.81935.6d>
- Jiménez, M.L. (2015). El cultivo de la Dalia. *Cultivos Tropicales*, 36(1), 107-115. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193237111014>
- Jiménez, P.N., Hernández, J.O., García, M. A. (2021). *Agave guadarramae* (Asparagaceae: Agavoideae), una especie nueva del sureste de México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 92(3), 1-8. <https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2021.92.3726>
- Langhans R.W., Horst, R.K. & Earle, E. D. (1997). Disease-free plants via tissue culture propagation. *HortScience*, 8(1), 149-150.
- Leu, L.S. (1972). Freeing sugarcane from Mosaic virus by apical meristem culture and tissue culture. *Taiwan sugar Exp. Sta. Rep.*, 57, 57-63.
- López B.V., Mora, A.G., Gutiérrez, E.M., Mendoza, R.C., Martínez, B.V., Coria, C.J., Acevedo, S.G., Santana, P.B. (2020). Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp. associated to the regional occurrence of wilt and dry bud rot in *Agave tequilana*. *Revista mexicana de fitopatología*, 38(1), 79-106. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1911-4>

- López, V.R., Pérez, L.R., Moreno, V.V., & Basurto, S.M. (2013). Implementación de técnicas moleculares para el diagnóstico de enfermedades de plantas. *Juyyaania*, 1(1), 23-30. <https://link.gale.com/apps/doc/A396138290/IFME?u=anon~2e42db96&sid=google Scholar&xid=242bc93c>
- Loyola, V.M. & Vázquez, F. (2006). "Pathogen and Biological Contamination Management", en *Plant Cell Culture Protocols*. Eds. Loyola, V.M., Vázquez, F. 2 ed. Vol. 318. Humana Press, Totowa. 393 p. ISBN 1-58829-547-8.
- Martínez, R., P. (1987). Obtención de plantas libres de patógenos. *ICA*, 22, 230-248. <https://hdl.handle.net/20.500.12324/30335>
- Mendoza, R.C., Mora, A.G., Coria, C.J., Santana, P.B., Acevedo, S.G., Martínez, B.V., Gutiérrez, E.M., Rubio, C.R. (2021). Fusarium spp. and inoculum load estimation associated to commercial Agave tequilana offsets at different regional epidemic inductivity levels. *Revista mexicana de fitopatología*, 39(1), 94-121. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2006-8>
- Morel, G. & Martin, C. (1952). Cure of dahlias attacked by a virus disease. *CR Hebd Seances Acad Science*, 235 (21), 1324-1325.
- Murashige, T. & Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tabaco tissue cultures". *Physiol Plantarum*, 15, 473-493.
- Nascimento, L.C., Pio, R.G., Willadino, L., Andrade, P.G. (2003). Stock indexing and Potato virus Y elimination from potato plants cultivated in vitro. *Scientia Agricola*, 60(3), 525- 530. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162003000300017>
- NORMA Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-2016. (2016). Bebidas alcohólicas- Mezcal- Especificaciones. Diario Oficial de la Federación.
- Sharry, S. E., Adema, M. y Abedini, W. (2015). Plantas de probeta. Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro. Libros de Cátedra. Editorial de la Universidad Nacional de la Plata, Argentina. La Plata. Argentina. 240 p.

- Skoog, F. & Miller, C.O. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures in vitro. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 11, 118–131.
- Solís L., R., Olivera S., J., & La Rosa L., R.S. (2011). Propagación in vitro de Carica papaya var. PTM-331 a partir de meristemas apicales. *Revista Peruana de Biología*, 18(3), 343-348.
http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-99332011000300012&lng=es&tlng=es.
- Thimann, K., & Went, F. (1934). On the chemical nature of the root-forming hormone. *Proc. Kon. Ned. Akad. Wetensch. Amsterdam*, 37, 456-459.
- Torres I., Casas, A., Delgado Lemus A., Rangel Landa, S. (2013). Aprovechamiento, demografía y establecimiento de *Agave potatorum* en el Valle de Tehuacán, México: Aportes ecológicos y etnobiológicos para su manejo sustentable. *Zonas áridas* 15(1), 92-109.

3. DIAGNÓSTICO FITOSANITARIO EN AGAVE TOBALÁ (*Agave potatorum* Zucc.)

3.1 Resumen

El agave tobalá es una especie endémica de los estados de Oaxaca y Puebla. Posee una alta demanda comercial debido a que es muy apreciada para la elaboración del mezcal. Actualmente no hay reportes de estudios de enfermedades en esta especie. El objetivo de este estudio fue identificar los fitopatógenos presentes en plantas enfermas de *A. potatorum* a partir de una colecta de plantas provenientes del municipio de San Antonio, Huitepec, Oaxaca. Las plantas fueron examinadas y se realizaron aislamientos utilizando tejido de las hojas. Se obtuvieron diferentes colonias de hongos, las cuales se purificaron e inocularon en plantas sanas para determinar su patogenicidad. Se registraron daños ocasionados por los hongos *Fusarium solani*, *F. incarnatum*, *F. equiseti*, *Dothideales* sp., *Pyronemataceae* sp. 1 MJ12 y *Verrucoconiothyrium eucalyptigenum*, los cuales fueron identificados mediante la técnica en reacción de la polimerasa (PCR). La técnica de PCR permite la identificación de microorganismos asociados a plantas enfermas de *A. potatorum*.

Palabras clave: enfermedades, síntomas, postulados de Kotch, PCR.

Tesis de Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Arleth Orozco Duarte

Director de Tesis: José Luis Rodríguez de la O

3.2 Abstract

PHYTOSANITARY DIAGNOSIS IN AGAVE TOBALA (*Agave potatorum* Zucc.)

Agave tobala is an endemic species of the states of Oaxaca and Puebla. It has a high commercial demand because it is highly appreciated to produce mezcal. There are currently no reports of disease studies in this species. The objective of this study was to identify the phytopathogens present in diseased plants of *A. potatorum* from a collection of plants from the municipality of San Antonio, Huitepec, Oaxaca. The plants were examined, and isolations were made using leaf tissue. Different fungi colonies were obtained, purified, and inoculated in healthy plants to determine their pathogenicity. Registered damages caused by the fungi *Fusarium solani*, *F. incarnatum*, *F. equiseti*, *Dothideales* sp., *Pyrenomataceae* sp. 1 MJ12 y *Verrucoconiothyrium eucalyptigenum*, which were identified by the polymerase reaction (PCR) technique. The PCR technique allowed the identification of microorganisms associated with diseased plants of *A. potatorum*.

Keywords: diseases, symptoms, Koch's postulates, PCR.

Master of Science Thesis in Agricultural Biotechnology, Universidad Autónoma Chapingo

Author: Arleth Orozco Duarte

Thesis director: José Luis Rodríguez de la O

3.3 Introducción

El mezcal es una bebida alcohólica destilada de México, su nombre proviene del náhuatl “mexcalli” que significa agave horneado, la bebida se obtiene de los azúcares fermentados de las cabezas cocidas de más 50 especies diferentes del género Agave. En los últimos años el mezcal ha presentado un ascenso en cumbres internacionales y sus estadísticas son prometedoras (Pérez et al., 2016), de acuerdo con el Consejo Mexicano Regulador del Mezcal (COMERCAM), la producción nacional ha tenido un aumento progresivo desde el 2014 hasta la fecha (COMERCAM, 2022). *A. potatorum* es la quinta especie más utilizada para la elaboración del mezcal (COMERCAM, 2022), siendo su principal uso por la alta calidad de la bebida que se obtiene. La planta se caracteriza por presentar rosetas compactas, con gran número de hojas planas con pequeñas mamilas y dientes, inflorescencia paniculada que se presenta de agosto a noviembre (García, 2010).

No se han reportado estudios de diagnóstico de enfermedades en *A. potatorum*. En otras especies emparentadas que se cultivan como en el agave azul (*A. tequilana* var Azul), se ha realizado la identificación de *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *F. falciforme*, *F. fujikuroi* y *Fusarium* sp. (Ávila et al., 2012; Ramírez et al., 2017; López et al., 2020) ocasionando marchitez y pudrición del agave en plantaciones comerciales. En cuanto a bacterias, se han identificado *Erwinia cacticida*, *Pantoea agglomerans* y *Pseudomonas* sp. causando la pudrición blanda de la raíz (Jiménez et al., 2017).

El objetivo de esta investigación fue identificar la etiología asociada a plantas enfermas de *A. potatorum* mediante la realización de los postulados de Kotch y la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

3.4 Materiales y métodos

3.4.1 Colecta de material enfermo

La colecta se realizó en el municipio de San Antonio Huitepec, en el estado de Oaxaca, se seleccionaron plantas visiblemente enfermas en condiciones de campo abierto de dos y tres años. Las muestras fueron extraídas del suelo en campo y trasladadas a la Universidad Autónoma Chapingo.

3.4.2 Examinación

Las plantas fueron sometidas a una observación mediante estereoscopio donde se analizaron las hojas y raíces para descartar la presencia de artrópodos.

3.4.3 Aislamiento

Del total de plantas colectadas se tomaron al azar ocho. Esta sección se realizó siguiendo la metodología descrita en Agrios, (2005) para el aislamiento de hongos. De cada planta se cortaron trozos pequeños de hoja con tejido enfermo y con aspecto sano y enseguida se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio al 3 % durante 3 minutos, vigilando que todas las superficies se humedecieran. Luego, las secciones se lavaron en tres cambios de agua estéril y se secaron sobre sanitas limpias. Posteriormente, se colocaron 5 fragmentos vegetales en una caja Petri con medio PDA (39g / L) estéril. Se sembraron tres repeticiones por planta. Después de 48 horas de incubación a temperatura ambiente se comenzaron a observar diferentes colonias de micelio, a los seis días se observaron colonias desarrolladas.

3.4.4 Purificación

Se prepararon muestras temporales para seleccionar las colonias por su color, crecimiento o producción de esporas, de ellas se obtuvieron cepas puras utilizando dos técnicas: a) la de punta de hifa, que consiste en sembrar micelio en una caja con agua agar (10 g/L) y en cuanto observa crecimiento, tomar un pedazo de la punta de una sola hifa con un agujá estéril utilizando un estereoscopio y pasarla a una caja con medio PDA de nuevo y b) realizando cultivos monospóricos, esto consiste en generar crecimiento del hongo a partir de una conidio, por medio de diluciones seriadas de una suspensión de conidias hasta 10^{-6} . De la última dilución se tomó 100 μ l y se adicionó a medio agar agua. Se incubó a 25 °C, hasta observar la germinación de un conidio (crecimiento) que inmediatamente fue transferida a PDA.

3.4.5 Pruebas de patogenicidad

Siguiendo la metodología establecida en los postulados de Kotch (1890), se realizó la inoculación de las cepas de hongos obtenidas de plantas enfermas de *A. potatorum*, en plantas sanas aproximadamente de dos y tres de edad de *A.*

potatorum. Se utilizaron plantas en macetas y 15 cepas con micelio de 6 días de crecimiento sobre PDA (figura 1).



Figura 1. A. Maceta con planta sana; B. Sacabocados utilizado para marcar círculos; C. Lesiones realizadas con la aguja estéril; D. Cepas en cajas Petri, atomizador con alcohol al 70%, tijeras, cinta, etc.; E. Penca con cinco círculos marcados; F. Penca con cinco discos de micelio; J. Maceta con cubierta de plástico; H. Macetas inoculadas.

Para realizar la inoculación de cada cepa; en una penca limpia se marcaron 5 círculos de un centímetro de diámetro, en su interior se realizaron pequeñas heridas superficiales con una aguja de disección y se colocó un disco de micelio directamente sobre cada círculo en la penca.

Las plantas se conservaron en cajas cubiertas con plástico transparente en condiciones de humedad durante dos semanas. De las pencas con daños se recuperaron ocho cepas (figura 2).

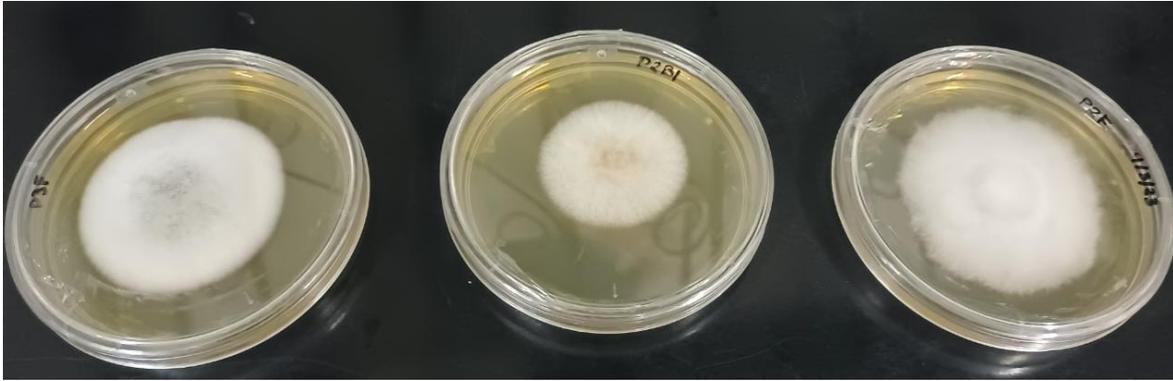


Figura 2. Ejemplo de cepas recuperadas y utilizadas para la prueba PCR.

3.4.6 Identificación molecular: Extracción de ADN, PCR y secuenciación.

De cada aislado se raspó la superficie usando una espátula de acero inoxidable estéril, el micelio se depositó en un mortero estéril, se le agregó nitrógeno líquido, se maceró con un pistilo y se transfirió a un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL con 500 μ L de solución amortiguadora Dellaporta, se mezcló con vórtex por 10 segundos y se incubó por una hora a 65 °C. Se agregaron 700 μ L de Cloroformo-alcohol isoamilico (24:1, v: v) se pasaron por vórtex por 10 segundos y se centrifugó (Centrifuge 5810 R Eppendorf) a 13000 gravedades durante 10 minutos. Con una micropipeta, el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo de microcentrifuga de 1.5 mL y se agregaron 700 μ L de isopropanol. Los tubos se mezclaron por inversión de cuatro a cinco veces y se almacenaron a -20 °C durante 10 minutos, luego se centrifugó a 13 000 g durante 10 minutos, para sedimentar el DNA y desechar el sobrenadante. Se agregó a cada tubo 500 μ L de etanol al 70 %, se centrifugó a 13000 gravedades por 5 minutos y se desechó de nuevo el sobrenadante. En papel absorbente se colocaron los tubos hacia abajo para escurrir el etanol, posteriormente cuando la pastilla estuvo seca se agregó 100 μ L de agua estéril libre de DNAsa y RNAsa. La calidad y concentración del ADN se cuantificó mediante un espectrofotómetro Nanodrop Lite (Thermo Scientific ®, EE. UU.), finalmente el DNA se almacenó a -20°C para su uso posterior.

Para la PCR se utilizaron los primers ITS 5 (GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G) y 4 (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC); EF1-728F (CAT CGA GAA GTT CGA GAA GG) y EF1-986R (ACT TGA AGG AAC CCT TAC C) y mezcla de reacción se preparó a un volumen final de 50 μ L, amortiguador de PCR 1x, 2.5 mM de cloruro de magnesio ($MgCl_2$), 0.2 mM de desoxinucleótido trifosfato (dNTP), 0.8 μ M de cada primer, 0.04 U DNA polimerasa (Promega, EE. UU.) y 4 ng de DNA. La PCR se llevó a cabo en un termociclador C-1000 (Bio-Rad, EE. UU.), se realizó una desnaturalización inicial de 95 °C por 3 min, 35 ciclos de 95 °C por 30 s, 55 °C por 30 s, 72 °C por 1 min; y una extensión final de 72°C por 10 min. Los productos amplificados se verificaron por electroforesis en gel de agarosa al 1 % con buffer de corrida TAE 1X. Se usó de 7 μ L del producto de PCR y 3 μ L de buffer de carga, para llevar a electroforesis a 90 volts. El gel se analizó con luz ultravioleta con un transiluminador M-26X usando un sistema de imágenes GelDoc-It™ 300 (UVP, EE. UU.).

3.4.6 Análisis

El área de daño ocasionado por la inoculación de diferentes cepas en las pencas de *A. potatorum* se midió con el editor de gráficos GIMP versión 2.10.20, utilizando fotografías de las plantas tras un mes de infección.

Los fragmentos amplificados se mandaron a secuenciar a Corea a la empresa Macrogen®. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con la base de datos en NCBI con el BLAST.

3.5 Resultados y discusión

3.5.1 Patogenicidad de cepas inoculadas

De las 15 cepas inoculadas, las indicadas en el Cuadro 1 causaron reacción de hipersensibilidad. A partir de los 4 días se observaron lesiones necróticas. La respuesta sistémica se evidenció por el progreso de daño en las zonas inoculadas (Cuadro 1), además, el color de las plantas disminuyó. Por el contrario, las cepas restantes no se consideraron virulentas, ya que sólo fue notorio el daño mecánico ocasionado por la inoculación.

Cuadro 1. Daño en pencas de *Agave potatorum* después de 30 días de la inoculación.

Cepa inoculada	Área total de la penca (píxeles)	Área de la penca con daños (píxeles)	Porcentaje de daño
P2A	14526	4077	28.066
P2B	19128	4938	25.815
P2F	33072	14048	42.477
P3F	34573	2706	7.826
P5D	35853	1714	4.780
P6A	16012	3566	22.270
P6F	71167	15532	21.824

La cepa P2F ocasionó el mayor porcentaje de daño, 42%, las cepas P2A, P2B, P6A y P6F causaron daños con porcentajes similares entre sí. Por su parte P5D y P3F ocasionaron los menores porcentajes de daño (Figura 3).

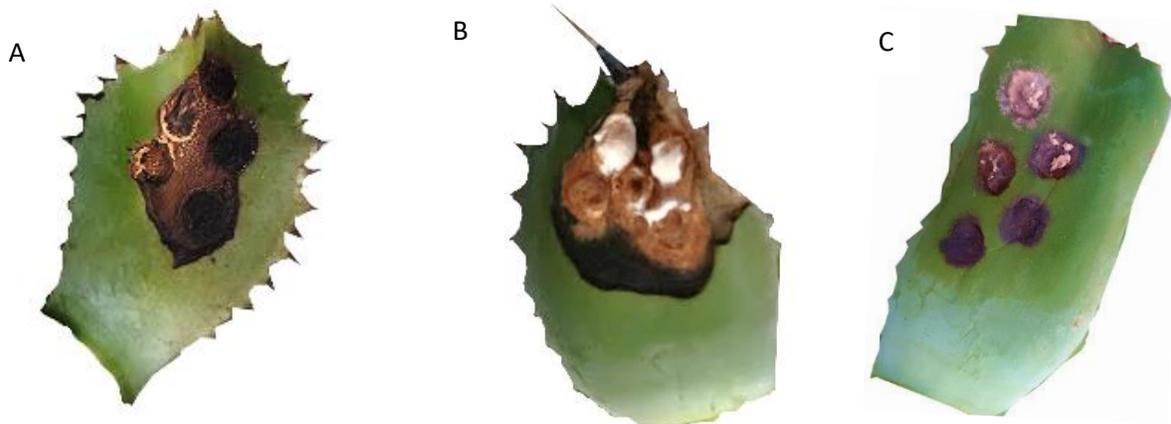




Figura 3. Daños en pencas de agave *Agave potatorum* tras un mes de la inoculación de cepas. A: P2B; B: P2F; C: P3F; D: P5D; E: P6A; F: P6F; G: P2A.

3.5.2 Identificación molecular

La comparación de las secuencias obtenidas con las depositadas en la base de datos de nucleótidos del NCBI revelaron la identidad de los microorganismos presentes en hojas enfermas de *A. potatorum*. Se destaca la presencia del género *Fusarium* (Cuadro 2).

Cuadro 2. Organismos identificados mediante la amplificación de la región ITS y número de accesión en la base de datos Gen Bank.

Cepa original	Organismo	Numero de accesión
P2B	<i>Fusarium solani</i>	KU377471
P2F	<i>Fusarium incarnatum</i>	KT748520

P5D	<i>Dothideales</i> sp.	MF435051
P6A	<i>Pyronemataceae</i> sp. 1 MJ12	KR019790
P6F	<i>Fusarium equiseti</i>	KX196808

La mayoría de los microorganismos identificados mediante la amplificación del factor de elongación 1 alfa resultaron similares a *Fusarium equiseti* (Cuadro 3).

Cuadro 3. Microorganismos identificados mediante la amplificación del factor de elongación 1 alfa (EF1) y número de accesión en el Genk Bank.

Cepa	Organismo identificado	Número de accesión
P2F	<i>Fusarium equiseti</i>	KT213275
P3F	<i>Verrucoconiothyrium eucalyptigenum</i>	KY979904
P6F	<i>Fusarium equiseti</i>	KU554689
P2A	<i>Fusarium equiseti</i>	KT213275

De acuerdo con los resultados, diferentes especies del género *Fusarium* se han identificado en agave azul (*Agave tequilana* var. *azul*) (Ávila et al., 2012; Ramírez et al., 2017;). Aislamientos provenientes de plantas de *A. tequilana* con síntomas de marchitez y pudrición se identificaron molecularmente con cebadores específicos en la secuencia ITS2 y se encontró a *F. solani*, manera coincidente con este estudio. También, López et al., (2020) reportaron que la marchitez y pudrición seca del cogollo del agave azul es ocasionada por tres complejos de hongos del mismo género *Fusarium*, donde se encontró *F. solani*. mediante identificación molecular con ITS y EF-1a.

Recientemente, Mendoza et al. (2021) reportaron que la enfermedad de marchitez del agave azul es ocasionada por complejos de especies de *Fusarium* y de manera coincidente con esta investigación se identificaron molecularmente a *F. solani* y *F. incarnatum-equiseti*, utilizando el gen EF-1a.

Por otra parte, se ha reportado *Dothideales* sp. como un hongo endófito en aislamientos a partir de caña de azúcar (Leme et al., 2013), también se encontró como hospedante en árboles del género *Quercus* (Collado et al., 2000).

Verrucoconiothyrium eucalyptigenum se ha reportado como patógeno de los árboles de eucalipto en Australia, se identificó utilizando el gen β -tubulina (Crous et al., 2017).

Finalmente, *Pyronemataceae* sp. 1 MJ12 no se ha reportado como patógeno de plantas, sin embargo, pertenece a la familia *pyronemataceae*, es una de las familias más diversas genéticamente.

3.6 Conclusiones

Mediante la prueba en reacción de la polimerasa se identificaron los hongos *Fusarium solani*, *F. incarnatum*, *F. equiseti*, *Dothideales* sp., *Pyronemataceae* sp. 1 MJ12 y *Verrucoconiothyrium eucalyptigenum* en plantas de *A. potatorum* colectadas con síntomas de enfermedad en San Antonio Huitepec, Oaxaca.

Se concluye que *Fusarium solani*, *Fusarium incarnatum* y *Fusarium equiseti* son patógenos que ocasionan daños en plantas de *A. potatorum*.

Por otro lado, hacen falta más estudios para determinar la relación exacta de los microorganismos *Pyronemataceae* sp. 1 MJ12, *Dothideales* sp y *Verrucoconiothyrium eucalyptigenum* con las plantas enfermas de *A. potatorum*.

3.7 Literatura citada

- Agrios, G.N. 2005. Plant Pathology. 5th Edition. Elsevier. Academic Press. USA. 922p.
- Ávila M.E., León, C.C., Peña, C.J., Rodríguez, M.A., Mancilla, M.N., González, P.F., Arias, C.C. (2012). Genetic diversity and vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum* cause of wilt symptoms in agave (*Agave tequilana* Weber var. azul). *Gayana – Botanica*, 69, 40-48.
- Collado, J., Platas, G., & Peláez, F. (2000). Host specificity in fungal endophytic populations of *Quercus ilex* and *Quercus faginea* from central Spain. *Nova Hedwigia*, 71(3/4), 421-430. <https://doi.org/10.1127/nova/71/2000/421>
- Jiménez, H.I., Virgen, C.G., Martínez, O., Vandemark, G., Portugal, V. (2004). Identification and Characterisation of Bacteria Causing Soft-rot in *Agave tequilana*. *European Journal of Plant Pathology*. 110, 317-331. <https://doi.org/10.1023/B:EJPP.0000019791.81935.6d>
- Leme, A. C., Bevilaqua, M.R., Rhoden, S. A., Mangolin, C. A., Machado, M.F., Pamphile, J. A. (2013). Molecular characterization of endophytes isolated from *Saccharum* spp based on esterase and ribosomal DNA (ITS1-5.8 S-ITS2) analyses. *Genetics Molecular and Research*, 12(3), 4095-4105. <http://dx.doi.org/10.4238/2013.September.27.11>
- López B.V., Mora, A.G., Gutiérrez, E.M., Mendoza, R.C., Martínez, B.V., Coria, C.J., Acevedo, S.G., Santana, P.B. (2020). Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp. associated to the regional occurrence of wilt and dry bud rot in *Agave tequilana*. *Revista mexicana de fitopatología*, 38(1), 79-106. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1911-4>
- Mendoza, R.C., Mora, A.G., Coria, C.J., Santana, P.B., Acevedo, S.G., Martínez, B.V., Gutiérrez, E.M., Rubio, C.R. (2021). *Fusarium* spp. and inoculum load estimation associated to commercial *Agave tequilana* offsets at different regional epidemic inductivity levels. *Revista mexicana de fitopatología*, 39(1), 94-121. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2006-8>

- Pérez, H.E., Chávez, M.C., González, H.J. (2016) revisión del agave y el mezcal. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 8(1), 148-164. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v18n1.49552>
- Ramírez, R.M., Mancilla, M.A., Meza, Á.L., Turincio, T.R., Guzmán de P.D., Ávila, M.E. (2017): Epidemiology of Fusarium agave wilt in Agave tequilana Weber var. azul. *Plant Protect. Sci.*, 53(3), 144–152. <https://doi.org/10.17221/142/2016-PPS>
- Reyes, Z.J, Lecona, G.A, Gutiérrez, M.A, Santana, B.N, Islas, F.I, Tzec, S.M, Barredo, P.A., Ruiz, L, Ávila, ME (2020). Scanning electron microscopy and enzymatic analysis in Agave americana during Fusarium oxysporum infection. *Revista Mexicana de Fitopatología* 38(3), 408-419. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2005-3>.
- Crous, P.W., Wingfield, M.J., Burgess, T.I., Carnegie, A.J., Hardy, G.E., Smith, D., Summerell, B.A., Cano-Lira, J.F., Guarro, J., Houbraken, J., Lombard, L., Martín, M. P., Sandoval-Denis, M., Alexandrova, A. V., Barnes, C. W., Baseia, I. G., Bezerra, J.D., Guarnaccia, V., May, T.W., Hernández, R.M., ...Groenewald, J.Z. (2017). Fungal Planet description sheets: 625-715. *Persoonia*, 39, 270–467. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2017.39.11>

4. ESTABLECIMIENTO Y MULTIPLICACIÓN *IN VITRO* DE AGAVE TOBALÁ (*Agave potatorum* Zucc.).

4.1 Resumen

Agave potatorum es una especie importante para la elaboración del mezcal, sin embargo, debido a la extracción no regulada, sus poblaciones naturales se encuentran en un estado de vulnerabilidad. Una alternativa de producción masiva y de material vegetal de alta calidad es el uso de la biotecnología agrícola. El objetivo de este estudio fue establecer tratamientos de control y/o erradicación de patógenos en cuatro tipos de explantes durante la etapa de establecimiento *in vitro* y determinar la concentración de bencilaminopurina y ácido indol butírico que permita la multiplicación *in vitro* de *A. potatorum*. A partir de la colecta, se eligieron plantas al azar que fueron transplantadas en macetas y tratadas por seis meses con fungicidas. Para el establecimiento *in vitro* se aplicaron diferentes tratamientos desinfectantes en explantes provenientes de la región apical, proximal, basal y yemas axilares. Los explantes que no presentaron contaminación durante la introducción se utilizaron para establecer tratamientos con diferentes dosis BA y AIB. En los explantes multiplicados se midieron el número de brotes por explante, el grosor de la hoja más larga y la longitud de la hoja más larga. Se observó que la aplicación de productos: Hipoclorito de sodio, Tecto 60 y Bunsan 1129 tuvieron un efecto positivo en la supervivencia de explantes. La región con mayor supervivencia de explantes fue la proximal, mientras que la región que generó más brotes por explante fue la basal, con 13.15, seguida de la proximal con 12.35 brotes/explante. La aplicación de fitoreguladores bencilaminopurina (BAP) y ácido indol butírico a una dosis de 3 mg L⁻¹ de BAP y 1 mg L⁻¹ de AIB fue efectiva para multiplicar explantes. La respuesta *in vitro* en *A. potatorum* está influenciada por el tipo de explante.

Palabras clave: tratamientos, patógenos, región, explante, supervivencia, brotes.

Tesis de Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Arleth Orozco Duarte

Director de Tesis: José Luis Rodríguez de la O

4.2 Abstract

ESTABLISHMENT AND IN VITRO MULTIPLICATION OF AGAVE TOBALA (*Agave potatorum* Zucc.).

Agave potatorum is an important species to produce mezcal, however, due to unregulated extraction, its natural populations are in a state of vulnerability. An alternative for mass production and high-quality plant material is the use of agricultural biotechnology. This study aimed to establish control treatments and/or eradication of pathogens in four types of explants during the in vitro establishment stage and to determine the concentration of benzylaminopurine and indole butyric acid that allows the in vitro multiplication of *A. potatorum*. From the collected plants, random plants were chosen that were transplanted into pots and treated for six months with fungicides. For in vitro establishment, different disinfectant treatments were applied to explants from the apical, proximal, basal, and axillary buds. The explants that did not present contamination during the introduction were used to establish treatments with different BA and AIB doses. In the multiplied explants, the number of shoots per explant, the thickness of the longest leaf, and the length of the longest leaf were measured. It was observed that the application of products: Sodium hypochlorite, Tecto 60[®] and Bunsan 1129[®] had a positive effect on explant survival. The region with the highest survival of explants was the proximal one, while the region that generated the most shoots per explant was the basal one, with 13.15, followed by the proximal one with 12.35 shoots/explant. The application of benzylaminopurine (BAP) phytohormones and indole butyric acid at a dose of 3 mg L⁻¹ of BAP and 1 mg L⁻¹ of AIB was effective to multiply explants. The in vitro response in *A. potatorum* is influenced by the type of explant.

Keywords: treatments, pathogens, region, explant, survival, buds.

Master of Science Thesis in Agricultural Biotechnology, Chapingo University.

Author: Arleth Orozco Duarte

Thesis director: José Luis Rodríguez de la O

4.3 Introducción

El mezcal es una bebida alcohólica que se ha elaborado de forma artesanal durante miles de años en México (Pérez et al., 2016). Para la elaboración del mezcal se utilizan diferentes especies de magueyes tales como espadín (*Agave angustifolia*), cenizo (*A. duranguensis*), verde (*A. salmiana*), papalote (*A. cupreata*), tobalá (*A. potatorum*), azul (*A. tequilana*), cuishe (*A. karwinskii*), entre otros (COMERCAM, 2022b).

Entre ellas, *A. potatorum*, es una de las especies más apreciadas debido a sus propiedades organolépticas suaves (García, 2010). Recientemente el interés comercial por el mezcal de *A. potatorum* ha aumentado y este proceso ha llevado a una reducción de las poblaciones locales (Delgado et al., 2014; Torres et al., 2013). El uso de esta especie no está regulado y la extracción de plantas silvestres se realiza antes de que puedan formar semillas afectando su reproducción (Delgado, 2008; Rangel et al., 2015); se considera que esta especie sólo se reproduce mediante semillas (Aguirre & Eguiarte, 2013; Gutiérrez et al., 2020).

Existen antecedentes en la propagación *in vitro* de esta especie (Aguilar et al., 2018; Ramírez et al., 2022; Bautista et al., 2020; Correa et al., 2022). Sin embargo, una de las mayores limitantes en el cultivo *in vitro* es la contaminación de las plantas madre con fitopatógenos que pueden permanecer latentes en las plantas micropropagadas (Langhans et al., 1977; Loyola & Vázquez, 2006).

Los métodos de cultivo *in vitro* más utilizados para la obtención de plantas libres de patógenos son el cultivo de tejidos meristemáticos en combinación con termoterapia o quimioterapia (Martínez, 1987). Además, se ha reportado que la técnica de crioterapia de puntas de brotes tiene alta frecuencia de erradicación de patógenos de cultivos hortícolas (Feng et al., 2013).

El objetivo de este trabajo fue obtener brotes *in vitro* sanos de a partir de plantas de *A. potatorum* enfermas, mediante el establecimiento *in vitro* de cuatro regiones de tejido y la aplicación de diferentes tratamientos desinfectantes, seguido de la

multiplicación de explantes limpios en medio con diferentes concentraciones de los reguladores de crecimiento 6-Bencilaminopurina (BAP) y ácido indol butírico (AIB).

4.3 Materiales y métodos

4.3.1 Obtención del material vegetal y preparación de plantas madre

Las plantas donantes se obtuvieron de una colecta de plantas enfermas de *A. potatozum* de dos y tres años del municipio de San Antonio Huitepec, en el estado de Oaxaca en agosto de 2021. Las muestras fueron trasladadas a los invernaderos de la Universidad Autónoma Chapingo, donde se establecieron en macetas con sustrato para cactáceas esterilizado y se trataron durante 6 meses con aplicaciones de fungicidas sistémicos y fertilizantes en el riego. Una vez tratadas las plantas, se sacaron de las macetas y se llevaron al Laboratorio de Cultivo de Células y Tejidos Vegetales, del departamento de Fitotecnia.

4.3.2 Desinfestación

De las plantas donantes (figura 4A) se eliminaron las hojas senescentes y raíces; dejando solo el tallo envuelto por hojas jóvenes (fig. 4B). Se lavó con una mezcla de jabón y tween 20, se cepilló y se enjuagó con agua corriente. Bajo la cámara de flujo laminar se insertó un sacabocados de 0.5 cm de diámetro de forma vertical en el tallo (fig. 4C) y del tallo perforado se cortó la base. Posteriormente, los fragmentos vegetales se sumergieron en alcohol al 70 % durante tres minutos y en hipoclorito de sodio al 10 % durante 10-15 minutos; se realizó un triple enjuague con agua destilada después de cada inmersión.



Figura 4. A. plantas extraídas de las macetas. B. tallos limpios sin hojas ni raíces. C. Tejido perforado por el sacabocados.

4.3.4 Desinfección

Los productos utilizados fueron Agrimycin 500® de Pfizer,TECTO 60 WP por Syngenta, hipoclorito de sodio marca Cloralex®, BUSAN 1129 elaborado por SUMMITAGRO, Polivinilpirrolidona (PVP) marca Sigma y Microdyn® comercial.

Se aplicaron los tratamientos indicados en la tabla 1. En el testigo no se agregó algún producto. Para los tratamientos con productos químicos se realizaron soluciones en frascos de vidrio con tapa esterilizados, en cada una de la soluciones o tratamientos se sumergieron los tejidos provenientes de una planta, enseguida, se colocaron en agitador durante el tiempo establecido en cada tratamiento. En la combinación de productos Tecto 60 + Bunsan 1129 y Tecto 60 + Agrimycin 500, cada producto se aplicó la mitad de tiempo. Los tratamientos de luz UV fueron aplicados utilizando una lámpara UV sobre los tejidos dentro de frascos esterilizados. Las muestras se enjuagaron tres veces con agua desionizada.

Cuadro 4. Tratamientos de desinfección con la dosis empleada.

Tratamiento	Dosis
0. Testigo	-
1. Agrimycin 500 + Tecto 60 por 15 minutos	10 g·L ⁻¹ y 15 g·L ⁻¹
2. Agrimycin 500 + Tecto 60 durante 30 minutos	10 g·L ⁻¹ y 15 g·L ⁻¹
3. Agrimycin 500 + Tecto 60 durante 60 minutos	10 g·L ⁻¹ y 15 g·L ⁻¹
4. Luz UV durante 30 segundos	253.7 nm*
5. Luz UV durante 1 minuto	253.7 nm*
6. Luz UV durante 2 minutos	253.7 nm*
7. Hipoclorito de sodio durante 15 minutos	15 mL·L ⁻¹
8. Hipoclorito de sodio durante 30 minutos	15 mL·L ⁻¹
9. Hipoclorito de sodio durante 60 minutos	15 mL·L ⁻¹
10. Microdyn durante 15 minutos	5.25 mL·L ⁻¹
11. Microdyn durante 30 minutos	5.25 mL·L ⁻¹
12. Microdyn durante 60 minutos	5.25 mL·L ⁻¹
13. Bunsan 1129 + Tecto 60 durante 15 minutos	10 mL·L ⁻¹ y 15 g·L ⁻¹
14. Bunsan 1129 + Tecto 60 durante 30 minutos	10 mL·L ⁻¹ y 15 g·L ⁻¹
15. Bunsan 1129+ Tecto 60 durante 60 minutos	10 mL·L ⁻¹ y 15 g·L ⁻¹
16. Polivinilpirrolidona (PVP) durante 15 minutos	70 mg·L ⁻¹
17. PVP durante 30 minutos	70 mg·L ⁻¹
18. PVP durante 60 minutos	70 mg·L ⁻¹

*Longitud de onda de 253.7 nm.

4.3.5 Obtención de explantes

Los fragmentos desinfectados provenientes de cada planta se dividieron en cuatro regiones (A, B, C y D) (figura 5). Los explantes se sumergieron en solución antioxidante durante cinco minutos ($150 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$ de ácido cítrico y $100 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$ de ácido ascórbico).



Figura 5. Tipos de explantes. A. Región distal. B. Región proximal. C. Basal. D. Yemas axilares del tallo.

4.3.6 Establecimiento *in vitro*

Se sembró bajo condiciones asépticas en tubos de ensayo con 15 mL de medio formulado con $4.3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sales Murashige & Sookg (1962) MS al 100% suplementado con $80 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de sulfato de adenina, $0.40 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de tiamina, $60 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de L-cisteína, $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de mio-inositol, agar al 0.7 % (p/v), azúcar al 3 % p/v, el pH fue ajustado a 5.7 ± 0.1 y se esterilizó en autoclave a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 25 minutos. Los explantes permanecieron en un área de incubación por un periodo de tres semanas, con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad.

4.3.7 Multiplicación

Para la multiplicación se utilizaron los explantes de cuatro semanas sin contaminación y se establecieron en frascos Gerber con cuatro medios o tratamientos, cada medio de cultivo se compuso por las sales inorgánicas MS al 100% adicionadas con $0.40 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de tiamina, $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de mio-inositol, $60 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de L-cisteína, $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de extracto de malta, 3 % de sacarosa, 0.7 % de agar y se agregaron diferentes concentraciones de los reguladores BA y AIB indicados el siguiente cuadro.

Cuadro 5. Tratamientos con regulares BAP y AIB.

Reguladores	Testigo	T1	T2	T3
-------------	---------	----	----	----

BAP (g/L)	0	0.1	1	3
AIB (g/L)	0	0.1	0.3	1

*T1 = Tratamiento 1; T2 = Tratamiento 2; T3 = Tratamiento 3.

4.3.8 Diseño experimental

Se establecieron 304 frascos Gerber en total, cada uno con un explante. Para los tratamientos, el diseño experimental fue un completamente al azar. Durante los primeros siete días se midieron las variables contaminación por hongos, por bacterias y oxidación, utilizando una escala de daño (0 = sin daño, 1 = leve, 2 = moderado, 3 = grave). Además, a los 15 días se registró la supervivencia de los explantes (0= muerto, 1=vivo).

Para la multiplicación, se empleó un diseño completamente al azar en el que se probaron tratamientos de reguladores (Cuadro 4) y se cuantificó el número de brotes generados en cada tratamiento. Cada tratamiento fue aplicado a 10 explantes. Finalmente, en las plantas multiplicadas de seis semanas de edad se midió la altura y el grosor de la hoja más grande.

4.3.9 Análisis estadístico

En todos los datos fueron analizados mediante el software estadístico R (versión 4.3.0). El efecto de los 19 tratamientos y 4 regiones sobre las variables: hongos, bacterias y oxidación, fue analizado usando regresión ordinal. Para los datos a la medición de 15 días se utilizó una regresión logística para la variable supervivencia. Los datos de los tratamientos de reguladores fueron evaluados mediante un análisis de varianza (ANOVA) y prueba de comparación de medias Tukey con significancia del 5 %. Con los datos de plantas multiplicadas se realizó un análisis de varianza y prueba de comparación de medias de Tukey para un nivel de significancia del 5 %, para las variables de brotes, longitud de hoja más larga y grosor de la hoja más larga.

4.4 Resultados y discusión

4.4.1 Efecto de tratamientos sobre la contaminación por hongos, bacterias y oxidación

La aplicación de los tratamientos fue significativa para la contaminación *in vitro* en explantes de *A. potatorum*. Los tratamientos con menor contaminación por hongos fueron las combinaciones de Bunsan 1129 + Tecto 60 y Agrimycin 500 + Tecto 60

durante 60 y 30 minutos, respectivamente, la luz UV durante 30 segundos y el hipoclorito de sodio durante 30 minutos. Los tratamientos que no tuvieron algún efecto para la aparición de hongos fueron los compuestos por polivinilpirrolidona, así como los tratamientos con luz UV durante uno y dos minutos (Figura 6). En el testigo se observó la mayor cantidad de contaminación por hongos. De acuerdo con nuestros resultados, Lanna et al. (2016), observaron que las concentraciones de tiabendazol (ingrediente activo del fungicida Tecto 60) afectó el crecimiento micelial de los hongos *Fusarium oxysporum*, *Penicillium oxalicum* y *Aspergillus niger*, también Albuquerque y Gusqui, (2018) realizaron un experimento sobre la eficacia de fungicidas químicos para el control de diferentes fitopatógenos en condiciones controladas donde se observó que el tiabendazol, es capaz de reducir el crecimiento *in vitro* de hongos como *R. solani*, *F. oxysporum*, *L. theobromae* y *Penicillium* sp. En otros tratamientos *in vitro* para el control de la contaminación se observó que Tecto 60 es efectivo para disminuir el crecimiento micelial de hongos (García et al., 2021).

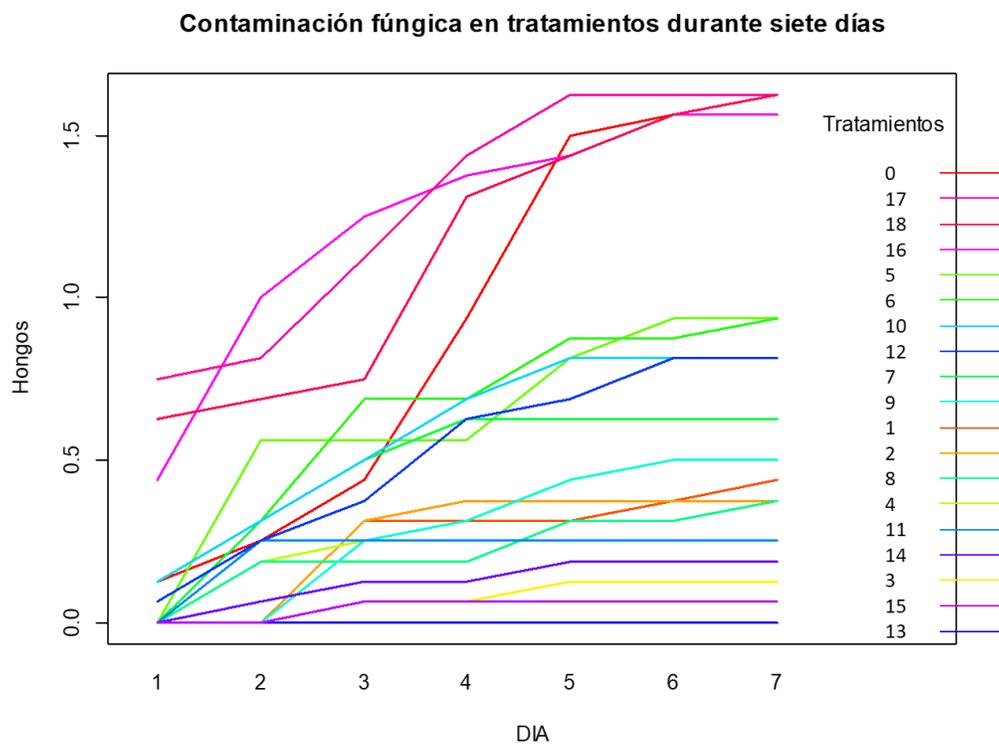


Figura 6. Gráfica de contaminación *in vitro* durante siete días por microorganismos fúngicos

Los mejores resultados sobre la oxidación se obtuvieron con los tratamientos 17 y 18 (PVP durante 15 y 30 minutos respectivamente), 10 (hipoclorito de sodio durante 60 minutos) y 13 (microdyn durante 60 minutos) (Figura 7). De acuerdo con lo anterior, el uso de PVP es frecuente dentro de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales para controlar el oscurecimiento (Gamechu & Amante, 2021). Perales et al., (2016) indicaron que la aplicación de PVP como tratamiento antioxidante obtuvo los mejores resultados en comparación con otros productos en el establecimiento de segmentos nodales de guayaba. También Cabrejo et al., 2022 mencionaron que el uso de polivinilpirrolidona obtuvo bajos niveles de oxidación durante la propagación *in vitro* de cormos de plátano.

Los tratamientos con mayor oxidación fueron los 3, 15, 2 y 14 (Agrimycin 500 + Tecto 60 durante 60 minutos, Bunsan 1129 + Tecto 60 durante 60 minutos Bunsan 1129, Agrimycin 500 + Tecto 60 durante 30 minutos, + Tecto 60 durante 30 minutos, respectivamente). Se notó que estos tratamientos ocasionaron oxidación en el explante ya que superan la oxidación observada en el testigo, esto pudiera deberse al tiempo de exposición de cada tratamiento.

Los tratamientos con mayor efecto de control sobre la contaminación por bacterias fueron 9, 8 y 6 (Hipoclorito de sodio durante 60 minutos, Hipoclorito de sodio durante 30 minutos y Luz UV durante 2 minutos). De manera similar con este resultado, Green et al. (2020) informan que la luz UV, es un método eficaz para la desinfección de las bacterias *E. coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes*, ya que lograron reducciones logarítmicas similares a lavado con hipoclorito de sodio acuoso. Los tratamientos con mayor contaminación bacteriana fueron: 11. Microdyn durante 30 minutos, 2. Agrimycin 500 + Tecto 60 durante 30 minutos y 12. Microdyn durante 60 minutos, respectivamente. Se esperaba que el tratamiento Agrimycin 500 + Tecto 60 durante 30 minutos tuviera mayor efecto de control, sin embargo, Tecto 60 es un fungicida y el Agrimycin no un tuvo efecto significativo. De acuerdo con esto, se ha probado que el sulfato de estreptomycin (compuesto activo de Agrimycin 500) aplicado sobre explantes por inmersión no controla la proliferación bacteriana (Stefanel et al., 2021). La presencia de

bacterias en explantes de *A. potatozum* estuvo influenciada por organismos externos, ya que la contaminación por bacterias en el testigo no fue la más alta (figura 8).

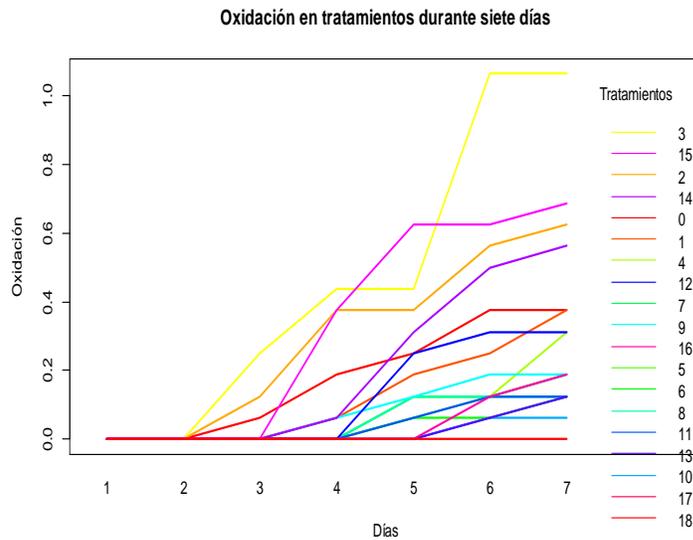


Figura 7. Efecto de tratamientos (0-18), sobre la variable oxidación, durante los primeros siete días de introducción in vitro.

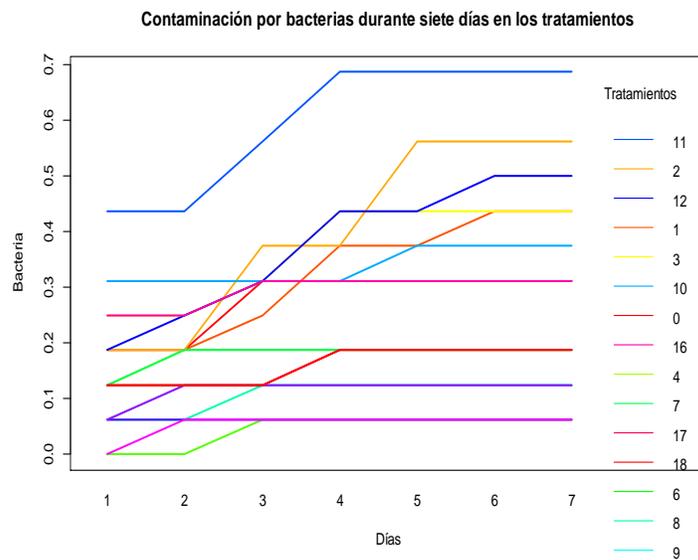


Figura 8. Efecto de tratamientos (0-18) sobre la contaminación bacteriana durante los primeros siete días de introducción in vitro.

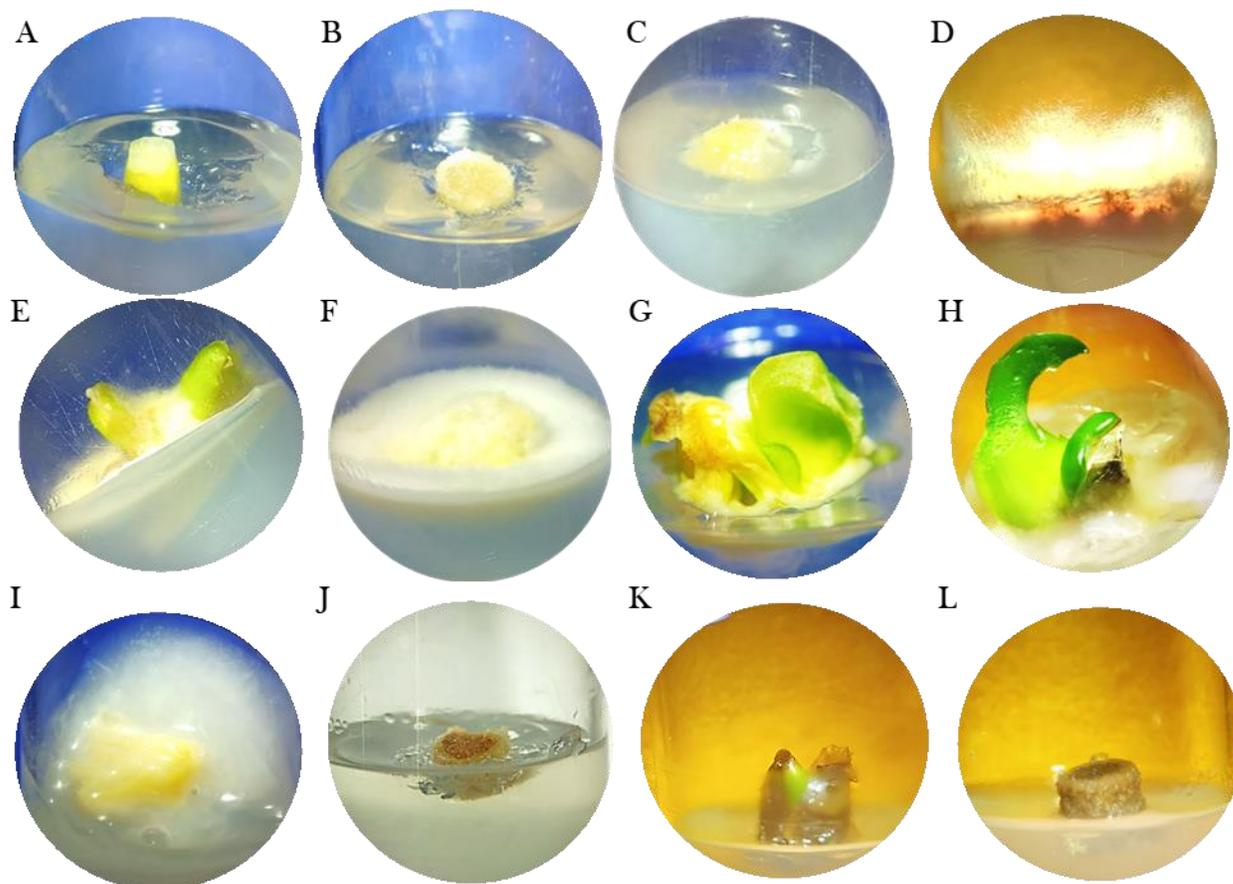


Figura 9. Explantes tratados. A. Sin daño, explante de la región A; B. Sin daño proveniente de la región C; C. Daño leve ocasionado por hongos. D: daño grave por la cantidad de micelio; E: Daño moderado por hongos; F: daño grave provocado por hongos; G: daño leve por contaminación bacteriana; H. Daño moderado por presencia de bacteria; I. Daño grave por bacterias; J: oxidación leve; K. Oxidación moderada; L. oxidación grave.

4.4.2 Regresión ordinal por tratamientos

Los datos se ajustaron a un modelo estadístico de regresión ordinal. Se utilizó el paquete estadístico VGAM (Vector Generalized Linear and Additive Models). Se realizó la regresión ordinal para los niveles de daño por de hongos, bacterias y oxidación (Figura 9) en cada tratamiento y el testigo. En el caso de hongos y bacterias, el daño es ocasionado principalmente por su presencia como contaminantes *in vitro* (Sharry et al., 2015). En los cuadros siguientes un explante sin daño por bacterias u hongos es un explante sin contaminación.

Cuadro 6. Probabilidades estimadas de que el explante corresponda a uno de los cuatro niveles de contaminación por hongos.

Tratamiento	Sin daños	Daño leve	Daño moderado	Daño grave
0. Testigo	0.760	0.164	0.059	0.016
1. Agrimycin 500 + Tecto 60 por 15 minutos	0.750	0.169	0.061	0.017
2. Agrimycin 500 + Tecto 60 durante 30 minutos	0.741	0.175	0.064	0.018
3. Agrimycin 500 + Tecto 60 durante 60 minutos	0.730	0.181	0.068	0.019
4. Luz UV durante 30 segundos	0.720	0.187	0.071	0.020
5. Luz UV durante 1 minuto	0.710	0.194	0.074	0.021
6. Luz UV durante 2 minutos	0.699	0.200	0.078	0.022
7. Hipoclorito de sodio durante 15 minutos	0.688	0.206	0.081	0.023
8. Hipoclorito de sodio durante 30 minutos	0.677	0.212	0.085	0.024
9. Hipoclorito de sodio durante 60 minutos	0.665	0.218	0.089	0.025
10. Microdyn durante 15 minutos	0.654	0.225	0.093	0.027
11. Microdyn durante 30 minutos	0.642	0.231	0.097	0.028
12. Microdyn durante 60 minutos	0.630	0.237	0.101	0.030
13. Bunsan 1129 + Tecto 60 durante 15 minutos	0.618	0.243	0.106	0.031
14. Bunsan 1129 + Tecto 60 durante 30 minutos	0.606	0.249	0.110	0.033
15. Bunsan 1129+ Tecto 60 durante 60 minutos	0.593	0.255	0.115	0.034
16. Polivinilpirrolidona (PVP) durante 15 minutos	0.581	0.261	0.120	0.036
17. PVP durante 30 minutos	0.568	0.266	0.125	0.038
18. PVP durante 60 minutos	0.556	0.272	0.131	0.040

En el cuadro 6. se muestran las probabilidades de que un explante presente uno de los cuatro niveles de daño por hongos, dado que se aplicaron 18 tratamientos.

Las probabilidades de que el explante no sufra daños por la contaminación fueron similares en los tratamientos 0. Testigo, 1. Agrimycin 500 + Tecto 60 por 15 minutos, 2. Agrimycin 500 + Tecto 60 durante 30 minutos, 3. Agrimycin 500 + Tecto 60 durante 60 minutos, 4. Luz UV durante 30 segundos, 5. Luz UV durante 1 minuto. El resto de los tratamientos obtuvieron probabilidades más bajas que el testigo, lo que indica que no hubo una respuesta de control significativa sobre la

contaminación por hongos en los explantes de *A. potatorum* tras la aplicación de los tratamientos.

Anteriormente se ha reportado la presencia de fitopatógenos como virus, viroides, organismos similares a micoplasmas y a rickettsias en tejidos muy jóvenes y en tejidos de meristemas (Martínez, 1987). Además, se ha comprobado que organismos del género *Fusarium* pueden llegar a células meristemáticas apicales. Aldrich y Nilson (1968) aislaron en PDA a *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* de puntas meristemáticas de clavel y Martínez (1984), reportó el paso de *F. oxysporum* a las puntas meristemáticas de clavel. Recientemente Vijayakumar y Ramamoorthy, (2022), aislaron una cepa de hongo endófito de los meristemas de *Delonix regia*, el hongo fue indentificado como *Fusarium solani* por análisis morfológico y molecular. También, con base en la identificación que se realizó previamente, se plantea que los hongos incidentes en explantes de *A. potatorum* pueden llegar acercarse o llegar al tejido meristemático y por ello no se logró su control como contaminantes *in vitro*.

Cuadro 7. Probabilidades estimadas de que el explante corresponda a uno de los cuatro niveles de contaminación por bacterias.

Tratamiento	Sin daños	Daño leve	Daño moderado	Daño grave
0. Testigo	0.768	0.186	0.043	0.001
1. Agrimycin 500 + Tecto 60 por 15 minutos	0.773	0.182	0.042	0.001
2. Agrimycin 500 + Tecto 60 durante 30 minutos	0.778	0.178	0.041	0.001
3. Agrimycin 500 + Tecto 60 durante 60 minutos	0.783	0.174	0.040	0.001
4. Luz UV durante 30 segundos	0.788	0.171	0.039	0.001
5. Luz UV durante 1 minuto	0.793	0.167	0.038	0.001
6. Luz UV durante 2 minutos	0.798	0.163	0.036	0.001
7. Hipoclorito de sodio durante 15 minutos	0.803	0.160	0.035	0.000
8. Hipoclorito de sodio durante 30 minutos	0.807	0.156	0.034	0.000
9. Hipoclorito de sodio durante 60 minutos	0.812	0.152	0.033	0.000
10. Microdyn durante 15 minutos	0.816	0.149	0.032	0.000
11. Microdyn durante 30 minutos	0.821	0.146	0.032	0.000

12. Microdyn durante 60 minutos	0.825	0.142	0.031	0.000
13. Bunsan 1129 + Tecto 60 durante 15 minutos	0.829	0.139	0.030	0.000
14. Bunsan 1129 + Tecto 60 durante 30 minutos	0.833	0.136	0.029	0.000
15. Bunsan 1129+ Tecto 60 durante 60 minutos	0.837	0.132	0.028	0.000
16. Polivinilpirrolidona (PVP) durante 15 minutos	0.841	0.129	0.027	0.000
17. PVP durante 30 minutos	0.845	0.126	0.026	0.000
18. PVP durante 60 minutos	0.849	0.123	0.026	0.000

En el cuadro 7 se muestra que es muy probable que el explante no presente daños por contaminación bacteriana tras la aplicación de los tratamientos: 7. Hipoclorito de sodio durante 15 minutos; 8. Hipoclorito de sodio durante 30 minutos; 9. Hipoclorito de sodio durante 60 minutos; 10. Microdyn durante 15 minutos; 11. Microdyn durante 30 minutos; 12. Microdyn durante 60 minutos; 13. Bunsan 1129 + Tecto 60 durante 15 minutos; 14. Bunsan 1129 + Tecto 60 durante 30 minutos; 15. Bunsan 1129+ Tecto 60 durante 60 minutos, que mostraron probabilidades superiores al 80%. Los tratamientos 1. Agrimycin 500 + Tecto 60 por 15 minutos, 2. Agrimycin 500 + Tecto 60 durante 30 minutos, 3. Agrimycin 500 + Tecto 60 durante 60 minutos, 4. Luz UV durante 30 segundos, 5. Luz UV durante 1 minuto, 6. Luz UV durante 2 minutos obtuvieron valores de probabilidades similares al testigo, indicando una baja respuesta en el control del daño por bacterias. Cabe destacar que las posibilidades mostradas en los tratamientos: 16. Polivinilpirrolidona (PVP) durante 15 minutos, 17. PVP durante 30 minutos y 18. PVP durante 60 minutos, fueron influenciadas por la alta presencia de hongos, cuyo crecimiento micelial no permitió el crecimiento y/o desarrollo de colonias bacterianas, por lo que se infiere que estos tratamientos no tuvieron efecto de control directo sobre el crecimiento bacteriano.

De manera similar con los resultados, en otro experimento sobre la aplicación de tratamientos desinfectantes *in vitro*, se probaron diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio y se encontró que la aplicación de hipoclorito de sodio al 1.5% es la más efectiva para controlar la contaminación sin ocasionar daños a los tejidos vegetales (Borges et al., 2009).

Cuadro 8. Probabilidades estimadas de que el explante corresponda a uno de los cuatro niveles de daño por oxidación.

Tratamiento	Sin daños	Daño leve	Daño moderado	Daño grave
0. Testigo	0.836	0.127	0.030	0.006
1. Agrimycin 500 + Tecto 60 por 15 minutos	0.846	0.119	0.027	0.005
2. Agrimycin 500 + Tecto 60 durante 30 minutos	0.856	0.112	0.025	0.005
3. Agrimycin 500 + Tecto 60 durante 60 minutos	0.866	0.104	0.023	0.004
4. Luz UV durante 30 segundos	0.875	0.097	0.022	0.004
5. Luz UV durante 1 minuto	0.883	0.091	0.020	0.004
6. Luz UV durante 2 minutos	0.891	0.085	0.019	0.003
7. Hipoclorito de sodio durante 15 minutos	0.899	0.079	0.017	0.003
8. Hipoclorito de sodio durante 30 minutos	0.906	0.074	0.016	0.003
9. Hipoclorito de sodio durante 60 minutos	0.912	0.069	0.015	0.002
10. Microdyn durante 15 minutos	0.919	0.064	0.013	0.002
11. Microdyn durante 30 minutos	0.924	0.059	0.012	0.002
12. Microdyn durante 60 minutos	0.930	0.055	0.011	0.002
13. Bunsan 1129 + Tecto 60 durante 15 minutos	0.935	0.051	0.011	0.002
14. Bunsan 1129 + Tecto 60 durante 30 minutos	0.939	0.047	0.010	0.002
15. Bunsan 1129+ Tecto 60 durante 60 minutos	0.944	0.044	0.009	0.001
16. Polivinilpirrolidona (PVP) durante 15 minutos	0.948	0.041	0.008	0.001
17. PVP durante 30 minutos	0.952	0.038	0.008	0.001
18. PVP durante 60 minutos	0.955	0.035	0.007	0.001

En el cuadro 8. Se observa que los tratamientos 8. Hipoclorito de sodio durante 30 minutos; 9. Hipoclorito de sodio durante 60 minutos; 10. Microdyn durante 15 minutos ;11. Microdyn durante 30 minutos; 12. Microdyn durante 60 minutos; 13. Bunsan 1129 + Tecto 60 durante 15 minutos; 14. Bunsan 1129 + Tecto 60 durante 30 minutos; 15. Bunsan 1129+ Tecto 60 durante 60 minutos; 16. Polivinilpirrolidona (PVP) durante 15 minutos; 17. PVP durante 30 minutos; 18. PVP durante 60 minutos obtuvieron probabilidades arriba del 90% de que el explante no presente daños por oxidación.

En general, se puede notar que los tratamientos tienen posibilidades más altas de obtener un explante sin daño por oxidación que el testigo por lo pensamos que la aplicación de tratamientos desinfectantes no ocasionó daños en el tejido vegetal.

4.4.3 Regresión ordinal por regiones

De la misma manera que para los tratamientos, los datos se ajustaron a un modelo estadístico de regresión ordinal y realizó la regresión ordinal para los niveles de daño por de hongos, bacterias y oxidación en casa región.

Cuadro 9. Probabilidades estimadas de que el explante corresponda a uno de los cuatro niveles de daño por la presencia de micelio.

Región	Sin daños	Daño leve	Daño moderado	Daño grave
A. Distal	0.812	0.133	0.042	0.011
B. Proximal	0.725	0.188	0.067	0.018
C. Basal	0.617	0.249	0.103	0.029
D. Yemas axilares	0.496	0.303	0.152	0.047

Los explantes provenientes de la región distal y la región proximal obtuvieron la mayor probabilidad de estar libre de hongos, con probabilidades de explantes sin daños de 81% y 72%, respectivamente, (Cuadro 9). Los explantes de yemas axilares obtuvieron 50.4% de probabilidad de sufrir diferentes niveles de daños ocasionados por hongos.

Cuadro 10. Probabilidades estimadas de que el explante corresponda a uno de los cuatro niveles de daño por la presencia de bacterias.

Región	Sin daños	Daño leve	Daño moderado	Daño grave
A. Distal	0.937	0.052	0.009	0.000
B. Proximal	0.880	0.100	0.018	0.000
C. Basal	0.781	0.180	0.037	0.000
D. Yemas axilares	0.636	0.288	0.072	0.002

Las probabilidades de que un explante no presente daños son el 93% para la región distal, del 88% cuando proviene de la región proximal, del 78% utilizando la región basal y del 63% cuando se siembran yemas axilares (cuadro 10).

Cuadro 11. Probabilidades estimadas de que el explante corresponda a uno de los cuatro niveles de daño por oxidación

Región	Sin daños	Daño leve	Daño moderado	Daño grave
A. Distal	0.811	0.146	0.034	0.007
B. Proximal	0.895	0.082	0.017	0.003
C. Basal	0.945	0.044	0.009	0.001
D. Yemas axilares	0.971	0.022	0.004	0.000

Las yemas axilares obtuvieron un 97% de probabilidades de tener explantes sin daños, seguido de la región basal obtuvo una probabilidad de presentar daños del 94% mientras que región distal y proximal mostraron probabilidades del 81% y 89% (cuadro 11).

4.4.4 Efecto de los tratamientos en la supervivencia de explantes

Se calcularon los promedios de los datos para obtener el porcentaje de supervivencia. La aplicación de tratamientos fue significativa para la supervivencia (Cuadro 12).

Cuadro 12. Análisis de varianza. Efecto de tratamientos sobre la supervivencia de explantes

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F valor	Pr(>F)	Significancia
Tratamientos	18	3.0493	0.169408	3.9363	3.861e-05	*
Residuos	57	2.4531	0.043037			

* $\alpha = 0.05$

De manera similar con nuestros resultados, la aplicación de productos químicos ha influido positivamente en la supervivencia de material vegetal en otros experimentos. Tradicionalmente, el fungicida thiabendazol se ha utilizado como pre-tratamiento para material de siembra en campo, en el replante de espárrago se han obtenido buenos promedios de establecimiento de la planta en suelos con especies patógenas de Fusarium y mayor rendimiento, en comparación con las plantas no tratadas (Fallon & Fraser, 1996). Por otro lado, Borges et al., (2009), trataron segmentos uninodales de ñame con distintas concentraciones de hipoclorito de sodio y observaron que una concentración del 1,5% durante un

tiempo de inmersión 30 minutos obtuvo altos porcentajes de supervivencia en condiciones *ex vitro*. Castillo et al., (2018), observaron que el mejor tratamiento para romper la latencia de *N. cespitifera* fue el hipoclorito de sodio que además actúa como fungicida.

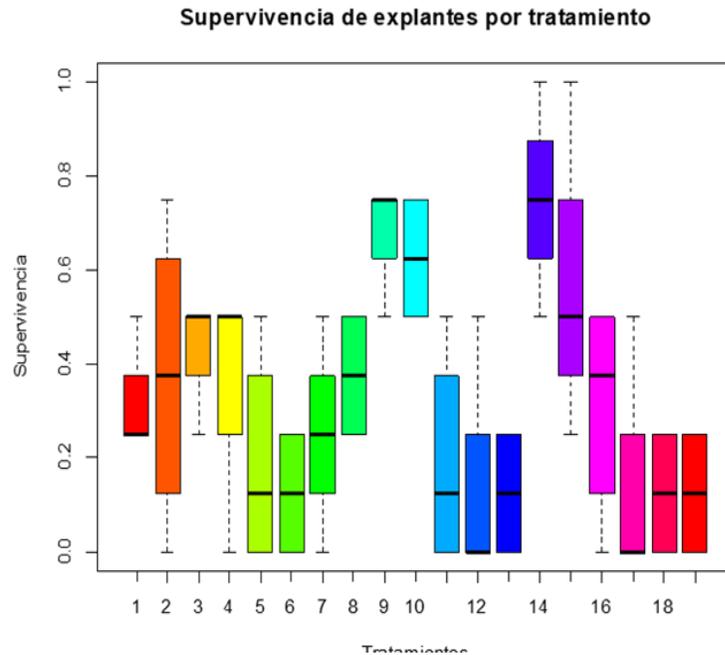


Figura 10. Supervivencia de explantes en los tratamientos (0-18), a los 15 días de introducción *in vitro*.

El tratamiento con mayor promedio de supervivencia fue el 14: Bunsan 1129 + Tecto 60 durante 30 minutos, con un promedio de 75% de supervivencia, seguido del tratamiento 9: Hipoclorito de sodio durante 30 minutos con 68.7% de supervivencia de explantes (Cuadro 13). Los tratamientos con menos explantes vivos fueron los que contuvieron PVP: 16, 17 y 18 (Figura 10).

Cuadro 13. Comparación de medias Tukey HSD de supervivencia en los tratamientos.

Tratamientos	Supervivencia	Tratamientos	Supervivencia
14. Bunsan 1129 + Tecto 60 durante 15 minutos	0.750 a	7. Luz UV durante 2 minutos	0.250 abc
9. Hipoclorito de sodio durante 30	0.6875 ab	11. Microdyn durante 15 minutos	0.187 bc

10. Hipoclorito de sodio durante 60 minutos	0.625 abc	5. Luz UV durante 30 segundos	0.187 bc
15. Bunsan 1129 + Tecto 60 durante 30 minutos	0.562 abc	12. Microdyn durante 15 minutos	0.125 c
3. Agrimycin 500 + Tecto 60 durante 30 minutos	0.437 abc	13. Microdyn durante 15 minutos	0.125 c
2. Agrimycin 500 + Tecto 60 por 15 minutos	0.375 abc	17. PVP durante 15 minutos	0.125 c
4. Agrimycin 500 + Tecto 60 durante 60 minutos	0.375 abc	18. PVP durante 30 minutos	0.125 c
8. Hipoclorito de sodio durante 15 minutos	0.375 abc	19. PVP durante 60 minutos	0.125 c
1. Testigo	0.3125 abc	6. Luz UV durante 1 minuto	0.125 c
16. Bunsan 1129 + Tecto 60 durante 60 minutos	0.312 abc		

De acuerdo con lo anterior, Lanna et al. (2016), mencionaron que el tiabendazol (Tecto) tiene una baja toxicidad y es efectivo para reducir la pudrición en ñame ocasionada por hongos. También se ha reportado que uso del hipoclorito de sodio en los protocolos de desinfestación aumentó la supervivencia de explantes (Ramírez et al., 2002; Ramírez et al., 2014; Ticona & Trigera, 2019). Por su parte, Bunsan 1129 no se ha reportado como fitotóxico.

Cuadro 14. Razón de probabilidades de supervivencia en cada tratamiento.

Tratamiento	Sup	Tratamiento	Sup
Intercepto	0.454	10. Microdyn durante 15 minutos	0.507
1. Agrimycin 500 + Tecto 60 por 15 minutos	1.320	11. Microdyn durante 30 minutos	0.314
2. Agrimycin 500 + Tecto 60 durante 30 minutos	1.711	12. Microdyn durante 60 minutos	0.314
3. Agrimycin 500 + Tecto 60 durante 60 minutos	1.320	13. Bunsan 1129 + Tecto 60 durante 15 minutos	6.600
4. Luz UV durante 30 segundos.	0.507	14. Bunsan 1129 + Tecto 60 durante 30 minutos	2.828
5. Luz UV durante 1 minuto.	0.314	15. Bunsan 1129+ Tecto 60	1.000

		durante 60 minutos	
6. Luz UV durante 2 minutos.	0.733	16. PVP durante 15 minutos	0.314
7. Hipoclorito de sodio durante 15 minutos	1.320	17. PVP durante 30 minutos	0.314
8. Hipoclorito de sodio durante 30 minutos	4.840	18. PVP durante 60 minutos	0.314
9. Hipoclorito de sodio durante 60 minutos	3.666		

*Sup: Supervivencia

Al analizar el efecto de los tratamientos sobre los explantes mediante la regresión logística de la variable supervivencia, se obtuvo que los tratamientos Bunsan 1129 + Tecto 60 durante 15 minutos y el Hipoclorito de sodio durante 30 minutos tienen 6.6 y 4.8 más probabilidades de supervivencia respecto al testigo que no contiene algún producto. Los tratamientos con posibilidades de sobrevivencia menores al testigo fueron los que contuvieron PVP.

4.4.5 La supervivencia de explantes en las regiones

Se encontró que las regiones de explantes no tuvieron un efecto altamente significativo en la supervivencia de explantes. La región con más explantes sobrevivientes fue la proximal, seguida de la basal (Figura 11). Mientras que las yemas axilares presentaron la menor sobrevivencia.

Cuadro 15. Análisis de varianza para el efecto de las regiones de explantes sobre la supervivencia de explantes.

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F valor	Pr(>F)	Significancia
Regiones	3	0.7196	0.239857	3.6107	0.01726	*
Residuos	72	4.7829	0.066429			

* $\alpha = 0.05$

Cuadro 16. Comparación de medias Tukey HSD supervivencia en cada región.

Región	Supervivencia
B. Proximal	0.447 a
C. Basal	0.395 ab
A. Distal	0.236 ab
D. Yemas axilares	0.223 b

De acuerdo con lo obtenido, la baja supervivencia de las yemas axilares en *A. potatoorum* podría deberse a la biología reproductiva de esta especie, ya que se informó que no presenta reproducción asexual (Delgado et al., 2014; Torres et al., 2013).

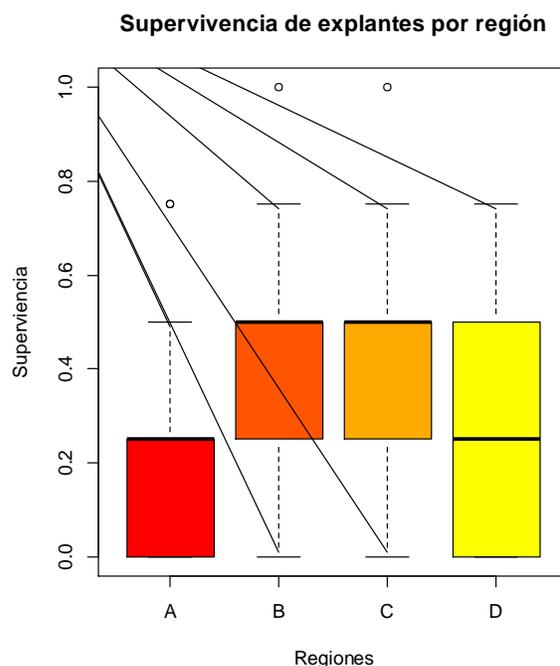


Figura 11. Supervivencia de explantes en cada región de tejido A = región apical, B=región proximal, C = región basal y D = yemas axilares.

Cuadro 17. Razón de probabilidad supervivencia en las diferentes regiones

Regiones	Supervivencia
Intercepto	0.310
B. Proximal	2.608
C. Basal	2.101
D. Yemas axilares	0.928

Al analizar el efecto de las regiones mediante la regresión logística se encontró que la región proximal alcanzó 2.6 probabilidades más de sobrevivir que el testigo, y la región basal obtuvo 2.1 más probabilidades. Por otro lado, las yemas axilares obtuvieron probabilidades de supervivencia menores que el testigo.

4.4.6 Efecto de tratamientos y regiones en la supervivencia

Los datos se ajustaron a un modelo estadístico de regresión logística. Se identificaron como factores significativamente asociados a la supervivencia a los tratamientos y las regiones.

Cuadro 18. Razones de probabilidad de supervivencia por tratamiento.

Tratamiento	Razón de probabilidad	Tratamiento	Razón de probabilidad
Intercepto	0.333		
1. Agrimycin 500 + Tecto 60 por 15 minutos	1.000	10. Microdyn durante 15 minutos	0.000
2. Agrimycin 500 + Tecto 60 durante 30 minutos	3.000	11. Microdyn durante 30 minutos	0.000
3. Agrimycin 500 + Tecto 60 durante 60 minutos	0.000	12. Microdyn durante 60 minutos	0.000
4. Luz UV durante 30 segundos.	1.000	13. Bunsan 1129 + Tecto 60 durante 15 minutos	9.000
5. Luz UV durante 1 minuto.	1.000	14. Bunsan 1129 + Tecto 60 durante 30 minutos	1.000
6. Luz UV durante 2 minutos.	1.000	15. Bunsan 1129+ Tecto 60 durante 60 minutos	1.000
7. Hipoclorito de sodio durante 15 minutos	1.000	16. PVP durante 15 minutos	0.000
8. Hipoclorito de sodio durante 30 minutos	9.000	17. PVP durante 30 minutos	0.000
9. Hipoclorito de sodio durante 60 minutos	3.000	18. PVP durante 60 minutos	0.000

Las probabilidades más altas de supervivencia respecto al testigo se obtuvieron con los tratamientos 8. Hipoclorito de sodio durante 30 minutos y 13. Bunsan 1129 + Tecto 60 durante 15 minutos, que mostraron 9 veces más de probabilidad de supervivencia. Nótese que los valores en rojo del cuadro 18 pertenecen a los tratamientos que obtuvieron probabilidades más bajas de supervivencia en comparación con el testigo.

Cuadro 19. Razón de probabilidades para la supervivencia de tipos de explante

Región	Razón de probabilidad
Intercepto	0.333
B. Región proximal	3.000
C. Región basal	1.000
D. Yemas axilares	1.000

De acuerdo con el cuadro 19., la región proximal muestra tres veces más de probabilidad de supervivencia que el testigo, mientras que la región basal y las yemas axilares presentan las mismas probabilidades.

Cuadro 20. Razón de probabilidades de las interacciones entre tratamientos y regiones para la supervivencia.

Interacción	Razón de probabilidad	Interacción	Razón de probabilidad	Interacción	Razón de probabilidad
Intercepto	0.333				
TR1: REB	3.000	TR1: REC	3.000	TR1: RED	0.000
TR2: REB	0.333	TR2: REC	1.000	TR2: RED	0.333
TR3: REB	104788700	TR3: REC	314336000	TR3: RED	314336000
TR4: REB	1.000	TR4: REC	0.000	TR4: RED	0.000
TR5: REB	0.333	TR5: REC	0.000	TR5: RED	0.000
TR6: REB	1.000	TR6: REC	1.000	TR6: RED	0.000
TR7: REB	1.000	TR7: REC	3.000	TR7: RED	1.000
TR8: REB	0.333	TR8: REC	1.000	TR8: RED	0.333
TR9: REB	1.000	TR9: REC	1.000	TR9: RED	3.000
TR10: REB	105000000	TR10: REC	104788700	TR10: RED	1.000
TR11: REB	0.333	TR11: REC	314366610	TR11: RED	1.000
TR12: REB	0.333	TR12: REC	104788700	TR12: RED	104788700
TR13: REB	34929560	TR13: REC	1.000	TR13: RED	0.333
TR14: REB	1.000	TR14: REC	943098000	TR14: RED	3.000
TR15: REB	0.000	TR15: REC	3.000	TR15: RED	3.000
TR16: REB	104788600	TR16: REC	1.000	TR16: RED	1.000
TR17: REB	34929560	TR17: REC	104788700	TR17: RED	1.000
TR18: REB	34929560	TR18: REC	104788700	TR18: RED	1.000

La supervivencia de explantes en tratamientos con PVP fue más baja que la del testigo ya que se observó que los tratamientos con PVP no controlaron la contaminación, sin embargo, tuvo un efecto positivo sobre la oxidación, lo que provocó una interacción positiva con la región proximal, ya que esta región por sí sola tiene las mayores posibilidades de supervivencia. De manera similar ocurre con los tratamientos con Microdyn durante 15, 30 y 60 minutos. Sin embargo, se puede notar en el Cuadro 14.2 que el tratamiento químico que tuvo las probabilidades más altas de supervivencia manera constante en todos los tipos de explante fue el Agrimycin 500+ Tecto 60 durante 60 minutos. Este tratamiento tuvo efecto sobre la contaminación por hongos. Lo que indica que un buen tratamiento de control de contaminación es capaz de influir positivamente en la supervivencia de cualquier tipo de explante.

Las diferentes regiones de explantes también son determinantes para la supervivencia, ya que cuando los tratamientos con baja supervivencia, pero poca oxidación se combinan con la región proximal aumentaron sus posibilidades de supervivencia en comparación a cuando se analizó el efecto de los tratamientos por separado. Las posibilidades de supervivencia de explantes de la región basal aumentan notablemente cuando se aplicaron los tratamientos.

4.4.7 Efecto de tratamientos reguladores en la multiplicación

El análisis de varianza determinó que la aplicación de los diferentes tratamientos de reguladores tuvo un efecto altamente significativo sobre la generación de brotes.

Cuadro 21. Análisis de varianza del efecto de los tratamientos de reguladores sobre la generación de brotes.

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F valor	Pr(>F)	Significancia
Tratamientos	3	312.88	104.292	16.466	6.718e-07	*
Residuos	36	228.10	6.336			

* $\alpha = 0.05$

Los tratamientos de reguladores tuvieron un efecto altamente significativo sobre la variable respuesta brotes.

Cuadro 22. Comparación de medias Tukey HSD de brotes en los tratamientos de reguladores.

Tratamientos	Brotes
3	6.8 a
2	0.7 b
1	0.4 b
0	0.0 b

El mejor tratamiento fue el 3: $3\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BA y $1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de AIB, resultando efectivo para la generación de brotes (figuras 12 y 13). De manera similar con este experimento, Aguilar et al. (2018) indicaron que la aplicación de BA al medio MS 100 % logró inducción de callo con alta capacidad regenerativa en brotes y con

excelente vigor. Además, en *Agave angustifolia*, Enrríquez del Valle et al. (2005), reencontraron que la aplicación de AIB es efectiva para la promoción de brotes.

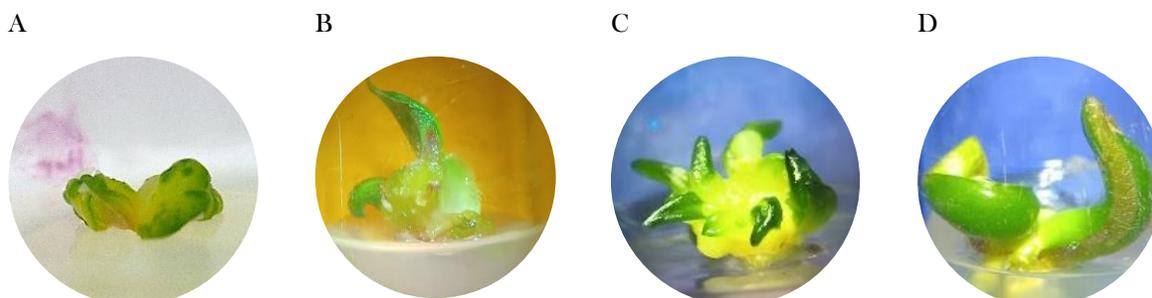


Figura 12. Brotes en diferentes regiones. A. Brote proveniente de la región A. B. Brote proveniente de la región B. C. Brote proveniente de la región C. Brote proveniente de la región D.

4.4.8 Influencia de las regiones en el número de brotes

El análisis de varianza determinó que las regiones de explantes (A, B, C, D) tienen un efecto significativo sobre el número de brotes. La región C obtuvo el mayor número de brotes por explante: 13.15, seguido por la región B que obtuvo 12.35 brotes por explante (figura 12). La región D presentó el menor número de brotes.

Cuadro 23. Análisis de varianza de brotes generados a partir de las diferentes regiones.

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F valor	Pr(>F)	Significancia
Regiones	3	529.44	176.481	10.56	3.998e-05	*
Residuos	36	601.66	16.713			

* $\alpha = 0.05$

Las regiones (A, B, C, D) tienen un efecto altamente significativo sobre la variable respuesta brotes.

Cuadro 24. Efecto de las regiones sobre el vigor.

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F valor	Pr(>F)	Significancia
--	--------------------	-------------------	----------------	---------	--------	---------------

Regiones	3	0.032467	0.0108224	3.3796	0.0286	*
Residuos	36	0.115283	0.0032023			

* $\alpha = 0.05$

Las regiones no tuvieron un efecto altamente significativo sobre la variable respuesta grosor de la hoja más larga.

Cuadro 25. Efecto de las regiones sobre el crecimiento en longitud.

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F valor	Pr(>F)	Significancia
Regiones	3	3.263	1.08766	2.5251	0.07293	NS
Residuos	36	15.507	0.43074			

* $\alpha = 0.05$

Las regiones no tuvieron efecto sobre la variable longitud de la hoja más larga.

Cuadro 26. Comparación de medias Tukey HSD de brotes, longitud de hoja más larga (LMHL) y grosor de la hoja más larga (GHML).

Regiones	Brotes	LHML*	GHML
A	6.25 bc	1.475 b	0.125 ab
B	12.35 ab	1.747 b	0.118 b
C	13.15 a	1.88 b	0.123 b
D	3.33 c	2.50 ^a	0.2 a

* Se utilizó $\alpha=0.01$

En otros experimentos de multiplicación en *A. potatorum* se han reportado tasas de multiplicación de 6.9 brotes por explante con 3 mg L⁻¹ Cin (Domínguez et al., 2008) de 9.87 brotes por explante, utilizando 3.0 mg L⁻¹ BA + 3.0 mg L⁻¹ IAA (Ramírez et al., 2022) y de 14.5 brotes por explante aplicando 10 mg L⁻¹ BA y 0.3 mg L⁻¹ AIA (Aguilar et al., 2018) en ocho semanas. Observamos que el número de brotes por explante de la región proximal y basal (figura 13) obtenidos en seis semanas se encuentran dentro de los promedios reportados en otros experimentos de multiplicación en *A. potatorum*.

Es posible que el promedio de brotes por explante de la región D se deba a que la cantidad de células meristemáticas en los tejidos disminuye hacia la raíz de la planta (Augstein & Carlsbecker, 2018).

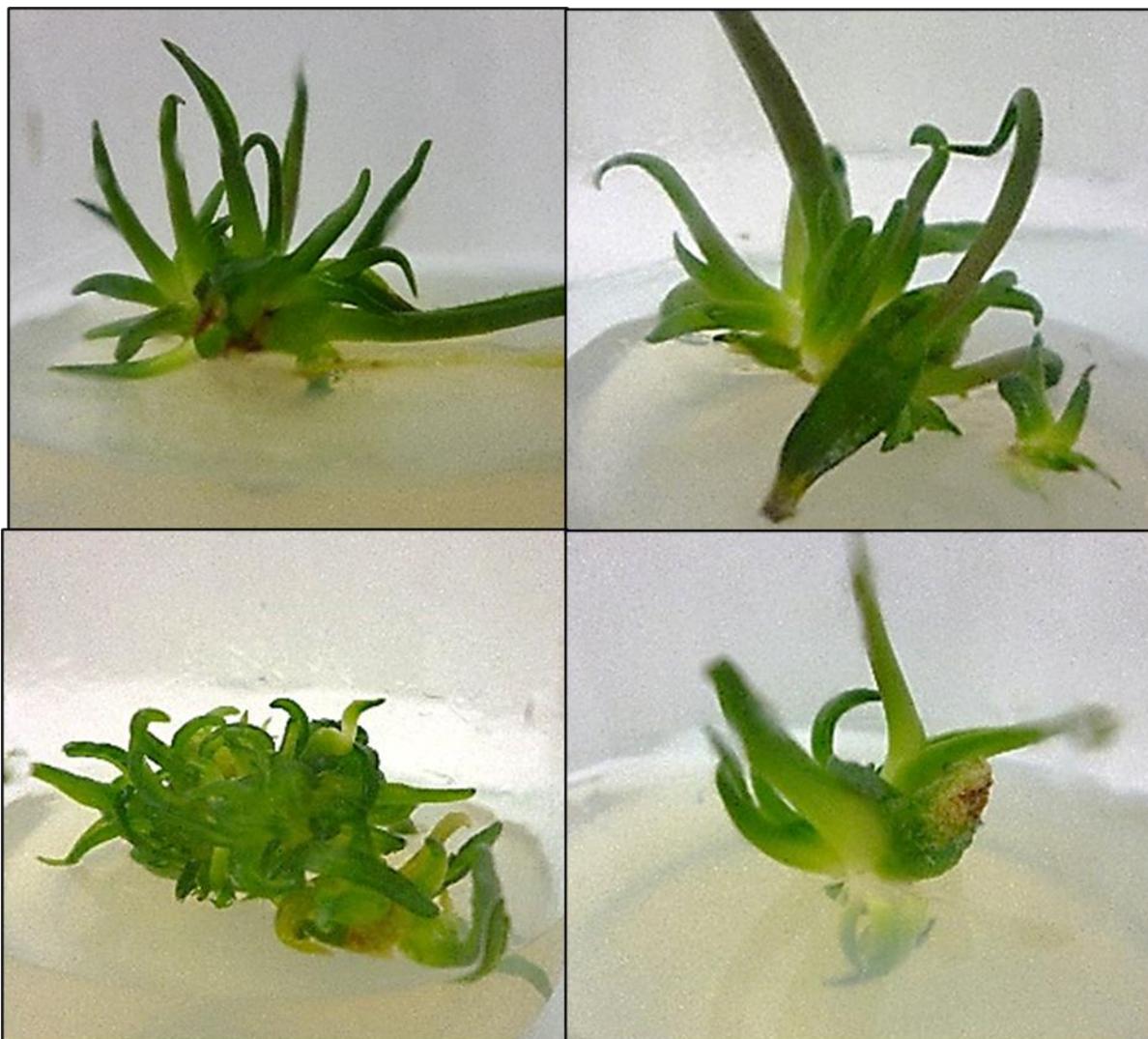


Figura 13. Explantes de *Agave potatorum* provenientes de la región proximal y basal en medio MS al 100 % más 3mg·L⁻¹ de BA y 1mg·L⁻¹ de AIB.

4.5 Conclusiones

Los tratamientos de desinfección evaluados presentaron diferentes efectos en la contaminación por hongos, bacterias y la oxidación. Los tratamientos con Bunsan 1129 + Tecto 60 y Agrimicyn 500 + Tecto mostraron la menor contaminación por hongos, aunque ningún tratamiento controló totalmente la incidencia de hongos. La presencia de bacterias en explantes de *A. potatorum* estuvo influenciada por factores externos. El hipoclorito de sodio al 1.5% durante 30 y 60 minutos obtuvo la menor cantidad de contaminación por bacterias. Los tratamientos con PVP fueron efectivos para evitar la oxidación de explantes.

No se detectaron efectos fitotóxicos por la aplicación de tratamientos. El hipoclorito de sodio al 1.5% y las combinaciones de Agrymicin 500 + Tecto 60 y Bunsan 1129+Tecto 60 aumentaron la supervivencia de explantes. La supervivencia y el número de brotes fue mayor en las regiones proximal y basal.

Las interacciones de la región proximal y el antioxidante PVP aumentaron la supervivencia. La aplicación de tratamientos de control de contaminación sobre explantes de la región basal aumentó su supervivencia.

Las concentraciones de 3 mg L⁻¹ BA y 1 mg L⁻¹ AIB permitieron la multiplicación de explantes, con hasta 13.1 brotes por explante en 6 semanas.

4.6 Literatura citada

- Aguilar, D., Rodríguez, de la O J. & Herrera, H. (2018) Obtención de brotes *in vitro* en *Agave potatorum* Zucc. *Universo de la Tecnológica*, 10(2), 5-7.
- Aguirre D.X. & Eguiarte L.E. (2013). Genetic diversity, conservation and sustainable use of wild *Agave cupreata* and *Agave potatorum* extracted for mezcal production in Mexico. *Revista de ambientes áridos* 90, 36–44.
<https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2012.10.018>
- Alburquerque, A.D, & Gusqui, M.R. (2018). Effectiveness of Chemical Fungicides for *in Vitro* Control of Different Phytopathogens in Controlled Conditions. *Arnaldoa*, 25(2), 489-498.
<https://dx.doi.org/http://doi.org/10.22497/arnaldoa.252.25209>
- Aldrich, J.M & Nilson. (1968). The distribution of *Fusarium oxysporum* in shoot of Carnation. Green-house Growers Association. Colorado State University. Colorado. (Bulletin no 223).
https://hortscans.ces.ncsu.edu/uploads/t/h/the_dist_535921f3132d4.pdf
- AlKhazindar M. (2015). Elimination of Tomato Spotted Wilt Virus (genus *Tospovirus*) From Infected Tomato Plants by Meristem Tip Culture. *Egypt Journal Botanical*, 55(1), 149-159. <https://doi.org/10.21608/ejbo.2015.229>
- Augstein F., Carlsbecker, A. (2018). Getting to the Roots: A Developmental Genetic View of Root Anatomy and Function From *Arabidopsis* to *Lycophytes*. *Frontiers in plant sciences*,9 (1410), 1-15.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01410>
- Bautista, C.A., Enríquez del V.J., Velasco, VA., Rodríguez, O.G. (2020). Enraizado de brotes *in vitro* y aclimatación de plantas de *Agave potatorum* Zucc. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 7(3), e2618.
<https://doi.org/10.19136/era.a7n3.2618>
- Bettoni, J.C, Mathew, L., Pathirana, R., Wiedow, C., Hunter, D.A, McLachlan, A., Khan, S., Tang, J., Nadarajan, J. (2022). Eradication of Potato Virus S, Potato Virus A, and Potato Virus M From Infected *in vitro*-Grown Potato

- Shoots Using in vitro Therapies. *Front Plant Science*, 13(878733), 1-16.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2022.878733>
- Borges, G.M., Estrada, A.E., Pérez, R. I., Meneses, R.S. (2009). Uso de distintos tratamientos de desinfección en el cultivo in vitro de *Dioscorea alata* L. clon caraqueño. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 9(2), 127-135.
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-34752009000200013&lng=en&tlng=es.
- Cabrejo, C.L., Ávila, C.C., Tovar, Q.A., & Quintero, S.M. (2022). Propagación in vitro de cormos de plátano (*musa x paradisiaca*. L. Var hartón) en el laboratorio de biotecnología vegetal del centro de formación agroindustrial la angostura (sena), campoalegre (huila, colombia). *Revista Agropecuaria Y Agroindustrial La Angostura*, 4, 1-9.
<https://revistas.sena.edu.co/index.php/raaa/article/view/4724>
- Castillo, Q.D., Antonio, B.A., Ávila, F.D., Sáenz, R.J., Castillo, R.F. (2018). Tratamientos químicos y biológicos para estimular la germinación en semillas de *Nolina cespitifera* Trel. *Polibotánica*, (45), 147-156.
<https://doi.org/10.18387/polibotanica.45.11>
- Christen L, Lai C, Hartmann B, Hartmann P, Geddes D. (2013). Ultraviolet-C radiation: a novel pasteurization method for donor human milk. *PLoS One*. 8(6), e68120. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068120>
- Consejo Mexicano Regulador del Mexcal. (2022a). Denominación de origen.
<https://comercam-dom.org.mx/denominacion-de-origen/>
- Consejo Mexicano Regulador del Mexcal. (2022b). Informe estadístico 2022.
<https://comercam-dom.org.mx/wp-content/uploads/2022/06/INFORME-2022- II -SINTESIS.pdf>
- Correa, H.L., Baltazar, B.O., Sánchez, P.R., Bello, B.J. (2022). In vitro multiplication of agave tobala (*Agave potatorum* Zucc.) using Ebb-and-Flow bioreactor. *South African Journal of Botany*, 147, 670-677.
<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.03.009>

- Cruz, G.E., Hernández, F.L., Gómez, R.L. (2020). Uso de L-Cisteína para el control de oxidación in vitro de *Annona muricata* L. *Revista Multidisciplinaria de Avances de Investigación*, 6(3), 1-6.
<https://www.remai.ipn.mx/index.php/REMAI/article/view/75/71>
- Delgado, L.A., Casas, A. & Téllez, O. (2014). Distribution, abundance and traditional management of *Agave potatorum* in the Tehuacán Valley, Mexico: bases for sustainable use of non-timber forest products. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 10(63), 1-12.
<https://doi.org/10.1186/1746-4269-10-63>
- Domínguez Rosales, MS, Alpuche Solís, Á. G., Vasco Méndez, NL, & Pérez Molphe Balch, E. (2008). Efecto de citocininas en la propagación in vitro de agaves mexicanos. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 31(4), 317-322.
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61031403>
- Falloon, P.G. y Fraser-Kevern, HA (1996). Effect of thiabendazole (tecto 20s) and metalaxyl (ridomil mz72) on asparagus establishment in replant soil. *Acta Horticulturae*, 415, 289-296.
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1996.415.41>
- Gemechu, EC y Amante, G. (2021). Control del oscurecimiento en cultivo de tejidos vegetales: una revisión. *Revista de Investigación Científica e Innovadora*, 10(4), 89-93.
- Green, A., Popović, V. & Warriner, K., Koutchma, T. (2020). The efficacy of UVC LEDs and low pressure mercury lamps for the reduction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* on produce. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 64 (102410), 1-11.
<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102410>
- Gutiérrez Hernández, G.F., Ortiz Hernández, Y. D., Corzo Ríos, L. J., y Aquino Bolaños, T. (2020). Composición química y germinación de semillas de tobalá (*Agave potatorum*). *Interciencia*, 45(6), 223-228.

https://www.interciencia.net/wp-content/uploads/2020/06/02_6712_Com_Ortiz_v45n5_6.pdf

Karan Y.B., Scheuring D.C, Chapell A.L. (2021). Eradication of PVX, PVY, PVS, PVM and PLRV from Potato by Chemotherapy, Thermoherapy and Their Combinations. *Journal of Agricultural Faculty of Gaziosmanpasa University*, 38(3), 117-122. <https://doi.org/10.13002/jafag4677>

Langhans R.W., Horst R.K. & Earle E. D. (1997). Disease-free plants via tissue culture propagation. *HortScience*, 8(1), 149-150.

Lanna, NDBL, Cardoso, All, Silva, PN, Colombari, LF, Pierozzi, CG, do Santos, PL, & Kronka, AZ (2016). Germinação, vigor e incidência de fungos em sementes de melancia tratadas com tiabendazol. *Core*, 13(2), 263-270. <https://doi.org/10.3738/1982.2278.1624>

López B.V., Mora, A.G., Gutiérrez, E.M., Mendoza, R.C., Martínez, B.V., Coria, C.J., Acevedo, S.G., Santana, P.B. (2020). Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp. associated to the regional occurrence of wilt and dry bud rot in *Agave tequilana*. *Revista mexicana de fitopatología*, 38(1), 79-106. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1911-4>

Loyola, V.M. & Vázquez, F. (2006). "Pathogen and Biological Contamination Management", en *Plant Cell Culture Protocols*. Eds. Loyola, V.M., Vázquez, F. 2 ed. Vol. 318. Humana Press, Totowa. 393 p.

Martínez, R., P. (1987). Obtención de plantas libres de patógenos. *ICA*, 22, 230-248. <https://hdl.handle.net/20.500.12324/30335>

Martínez, P. (1984). Erradicación de *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi mediante el cultivo de puntas meristemáticas de clavel. *Revista ICA*, 21,181-185. https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/33297/60354_1.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Mendoza, R.C., Mora, A.G., Coria, C.J., Santana, P.B., Acevedo, S.G., Martínez, B.V., Gutiérrez, E.M., Rubio, C.R. (2021). *Fusarium* spp. and inoculum load

- estimation associated to commercial Agave tequilana offsets at different regional epidemic inductivity levels. *Revista mexicana de fitopatología*, 39(1), 94-121. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2006-8>
- Millán, V.D., Romero, G.L., Brito, M., Ramos, V.A. (2015). Luz ultravioleta: inactivación microbiana en frutas. *Revista Multidisciplinaria del Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente*, 27(3), 454-469. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=427743080011>
- Mokbel, S. & Kheder, A. (2020). In vitro Propagation of Phytoplasma-Free Strawberry Plants and Molecular Characterization of the Pathogen. *Middle East Journal of Applied Sciences*, 10(3), 490-500. <https://doi.org/10.36632/mejas/2020.10.3.43>
- Murashige, T. & Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tabaco tissue cultures". *Physiol Plantarum*, 15, 473-493.
- Nascimento L., C., Pio R., G., Willadino, L., Andrade P., G., (2003). Stock indexing and Potato virus Y elimination from potato plants cultivated in vitro. *Scientia Agricola*, 60(3), 525- 530. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162003000300017>
- Niubó, E., Díaz, P., Oliva, O., Portieles, R., Díaz, A., Ancheta, O., Rodríguez, S., Soto, A., & Sánchez, C. (2004). Metodología para la obtención in vitro de plantas y tejidos de la caña de azúcar libres de contaminantes exófitos y endófitos. *Ciencias Biológicas*, 35(3), 155-161. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181225915004>
- Oliveira, H.S, Lemos, O.F, Miranda, V.S, Moura, H.C, Campelo, M.F., Santos, L.R. (2011). Establishment and in vitro multiplication of banana (*Musa* spp.) cultivars with the use of PVP (Polyvinylpyrrolidone). *Acta Amazónica*, 41(3), 369-376. <https://doi.org/10.1590/S0044-59672011000300006>
- Perales, A.L., Silos, E.H., Valera, M.L., Perales, S.C., Flores, B.S. (2016). Propagación in vitro de guayaba (*Psidium guajava* L.) a partir de segmentos nodales. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 7(2), 375-386.

http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342016000200375&lng=es&tlng=es.

- Pérez, H.E., Chávez, P.M., González, H.J. (2016). Revisión del agave y el mezcal. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 18(1), 148-164.
<https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v18n1.49552>
- Ramírez, C.L., Granados, J.E. & Carreño, G.E. (2014). Evaluación del efecto de tratamientos de desinfección con hipoclorito de sodio sobre segmentos nodales de *Guadua angustifolia* Kunth para el establecimiento del cultivo in vitro. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 5(1), 155-169.
<https://doi.org/10.22490/21456453.944>
- Ramírez, MA. & Cárcamo, C.R., Aguilar, J.D., Bello, B.J. (2022). Micropropagation of Agave (*Agave potatorum* Zucc.) through Direct Organogenesis. *Agrociencia*, 56(6), 1-10. <https://doi.org/10.47163/agrociencia.v56i6.2823>
- Ramírez, V.M., Urdaneta, A., León de S.S. (2002). Establecimiento in vitro de explantes adultos del guanábano (*Annona muricata* L.) tratados con hipoclorito de sodio. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 19(1), 48-55.
http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-78182002000100005&lng=es&tlng=es.
- Sánchez, C.M. & Salaverría, J.L. (2004). Control de la oxidación y la contaminación en el cultivo in vitro de fresa (*Fragaria X ananassa* Duch.). *Revista Científica UDO Agrícola*, 4(1) ,21-26.
- Stefanel, C. M., Reiniger, L. R. S., Serrote, C. M. L., & Ziegler, A. C. da F. (2021). Uso del antibiótico sulfato de estreptomycin para controlar la contaminación in vitro de los segmentos nodales de *Eugenia involucrata*. *Investigación Agraria*, 23(1), 01–07.
<https://doi.org/10.18004/investig.agrar.2021.junio.2301683>
- Stone, O.M. (1968). The elimination of four viruses from Carnation and sweet William by meristem-tip culture. *Annals of Applied Biology*, 101(1),79-84.

- Ticona, A.J. & Triguero, T.M. (2019). Evaluación de tres métodos de desinfección para el establecimiento in vitro de papaya (*Carica papaya* L.) En la estación experimental Sapecho. *Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales*, 6(1), 24-29.
http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2409-16182019000100005&lng=es&tlng=es.
- Torres I., Casas, A., Delgado Lemus A., Rangel Landa, S. (2013). Aprovechamiento, demografía y establecimiento de *Agave potatorum* en el Valle de Tehuacán, México: Aportes ecológicos y etnobiológicos para su manejo sustentable. *Zonas áridas* 15(1), 92-109.
- Vijayakumar, S., & Ramamoorthy, S. (2022). Endophytism of *Fusarium Solani* in Meristems of *Delonix Regia* (Bojer ex Hook.) Raf. *Indian journal of microbiology*, 62(1), 142–145. <https://doi.org/10.1007/s12088-021-00968-w>