

## Colonización de *Trichoderma* y *Bacillus* en Plántulas de *Agave tequilana* Weber, var. Azul y el Efecto Sobre la Fisiología de la Planta y Densidad de *Fusarium*

### Colonization of *Trichoderma* and *Bacillus* in Seedlings of *Agave tequilana* Weber, var. Azul and the Effect on the Plant Physiology and *Fusarium* Density

Bertha Tlapal Bolaños, Héctor González Hernández, Emma Zavaleta Mejía, Prometeo Sánchez García, Gustavo Mora Aguilera, Cristian Nava Díaz, Postgrado Fitopatología, Entomología y Nutrición Vegetal. Colegio de Postgraduados Km. 36.5 Carretera México-Tezcoco, Montecillo, Edo. De México, CP 56230, México; José Ignacio Del Real Laborde, Ramón Rubio Cortes, Área de Investigación de Tequila Sauza S.A. de C.V., “Rancho El Indio”, Tequila, Jalisco, México. Correspondencia: cnav@colpos.mx, navadias57@prodigy.net.mx

(Recibido: Agosto 16, 2013 Aceptado: Diciembre 11, 2014)

Tlapal Bolaños B, González Hernández H, Zavaleta Mejía E, Sánchez García P, Mora Aguilera G, Nava Díaz C, Del Real Laborde JI y Rubio Cortes R. 2014. Colonización de *Trichoderma* y *Bacillus* en plántulas de *Agave tequilana* Weber, var. Azul y el efecto sobre la fisiología de la planta y densidad de *Fusarium*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 32: 62-74.

**Resumen.** Un problema fitosanitario en agave (*Agave tequilana* var. Azul) es la marchitez, provocado por varios organismos en plantaciones de dos años de edad después de trasplante. Entre los patógenos se reportan varias especies de *Fusarium* spp. y *Thielaviopsis paradoxa*. Se planteó el presente trabajo con el objetivo de introducir organismos benéficos en plantas de micropropagación como manejo preventivo en vivero. Los tratamientos fueron T1 *Trichoderma harzianum* (Th), T2 *T. virens* (Tv), T3 *T. aureoviride* (Ta), T4 *Bacillus subtilis* (Bs), T5 Tv + Bs, T6 Ta + Bs, T7 testigo absoluto (Tabs) y T8 testigo regional (Treg). Se estableció un diseño en bloques al azar con dos repeticiones, la unidad experimental (UE) consistió de 122 plántulas; el tamaño mínimo de muestra comprendió 26. Las variables evaluadas fueron altura de planta, unidades formadoras de colonias (UFC) de *Trichoderma*, *Fusarium* y *Bacillus* en sustrato y raíz, determinación de clorofila, y área bajo la curva (ABC); los muestreos fueron seis con intervalo de 30 días de octubre 2008 a mayo 2009. Los resultados indican que los tratamientos T1, T3, T4 y T6, son los que presentaron mayor capacidad de establecimiento, generando un ambiente de equilibrio con densidades de *Fusarium* spp. en sustrato y raíz que oscilaron de 2 y 2.5 log (UFC mL<sup>-1</sup>); el ANAVA para ABC de *Fusarium* spp. no reportó diferencias estadísticas, sin embargo fue menor que la de los antagonistas en suelo T8 Treg con nivel de 120 y T7 Tabs 75.75, el resto osciló por debajo de 50;

**Abstract.** One of the most important phytosanitary problems in two-year plantations of *Agave tequilana* var. Azul is agave wilt, that is caused by several organisms, among those pathogens are reported several species of *Fusarium* and *Thielaviopsis paradoxa*. The main goal of this research was to introduce beneficial organisms in micropropagation plants as control measure. Inoculated treatments were T1 *Trichoderma harzianum* (Th), T2 *T. virens* (Tv), T3 *T. aureoviride* (Ta), T4 *Bacillus subtilis* (Bs), T5 Tv + B, Ta + B T6, T7 absolute control (Tabs) and T8 regional control (Treg). Treatments were established in a randomized block design with two replications, the experimental unit (EU) consisted of 122 plants; the minimum sample size was 26 plants. Evaluated variables were colony forming units (CFU) of *Trichoderma*, *Fusarium* spp. and *Bacillus* from roots and substrate and plant height, chlorophyll from plants. Variables were evaluated every 30 days from October 2008 to May 2009. Area under curve (AUC) was calculated for each variable. Our results show that microorganism in the treatments T1, T3, T4 and T6 colonized agave roots and maintain high levels, creating a balance to *Fusarium* spp. in soil and roots. Under these conditions *Fusarium* density ranged from 2 to 2.5 log (CFU/mL<sup>-1</sup>). Analysis of variance did not detect any significant difference among treatments. However, *Fusarium* spp. density on soil (AUC) was higher in treatments T8 Treg (120) and T7 Tabs (75.75) compared with the rest of treatments (50 or less). *Fusarium* density on roots was higher on treatments T6 Ta + B (375) and T7 Treg (262.5) compared to T3 Ta (105), T5 Tv + B (187.5), and T1 T4 Th B (210). No significant differences were found on chlorophylls and plant heights.

Keywords: balance, density, *Trichoderma*, *Fusarium*,

en raíces el nivel alto fue T6 Ta+Bs 375, T7 Treg 262.5 y los valores menores se encontraron en T3 Ta 105, T5 Tv+Bs 187.5, T4 Bs 187.5 y T1 Th 210. No se observaron diferencias estadísticas en clorofilas y alturas.

Palabras clave: equilibrio, densidad, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Bacillus*.

El tequila ha adquirido importancia por la demanda creciente nacional e internacional, siendo la actividad de campo un componente importante y decisivo para el abastecimiento de la materia prima, el agave tequilero *Agave tequilana* Weber var. Azul para la producción de tan importante bebida (Pérez y Del Real, 2007). Las plantaciones de agave tequilero dentro de la zona de Denominación de Origen del Tequila (DOT) integran un inventario de 253,033,239 plantas sembradas (CRT, 2010). La industria del tequila ha crecido en forma sostenida durante los últimos años y su potencial de crecimiento es aún grande, por lo que se requiere de un abasto sostenido y predecible de materia prima para asegurar su producción (Byerly, 2007).

La Norma Oficial Mexicana para la producción de tequila NOM-006-SCFI- 2005, especifica la variedad azul de *Agave tequilana* como la única autorizada para elaborar tequila, lo que implica que los métodos de propagación deben cumplir el requisito, por lo que se desecha la reproducción sexual que traería variación genética o segregación entre las plantas hijas. La reproducción asexual se da a través de la propagación vegetativa; los individuos obtenidos mediante este tipo de reproducción constituyen un clon y estos clones, a excepción de mutaciones naturales, son genéticamente idénticos a la planta madre. Para la propagación de *A. tequilana* Weber, var. Azul, existen los siguientes métodos de multiplicación asexual: bulbillos, rizomas (hijuelos) y micropropagación. Este último método tiene la ventaja de producir grandes cantidades de plantas en espacios relativamente reducidos durante todo el año. La propagación *in vitro* permite controlar la condición sanitaria de las plantas a lo largo de su producción y constituir grupos de plantas de la misma edad para su manejo agrícola (Vicente y Del Real, 2007).

El mejoramiento de la condición sanitaria y proliferación de raíces en muchas plantas de vivero se ve fortalecida con el uso de organismos como *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. (Kloepper *et al.*, 1992; Van Veen *et al.*, 1997) en diversos cultivos hortícolas, ornamentales y forestales; en los cuales se ha observado el desarrollo de múltiples mecanismos que reportan incremento en resistencia a enfermedades, crecimiento y productividad de las plantas, así como tolerancia al estrés provocado por diversas situaciones en los cultivos (Hartman *et al.*, 2004; Harman, 2006; Lorito *et al.*, 2010). En el cultivo del agave *Agave tequilana* weber var. Azul. se reportan varios problemas fitosanitarios, uno de los cuales es la marchitez, síntoma que puede ser provocado por varios organismos y el Consejo Regulador del Tequila (CRT) le atribuye incidencias elevadas en plantaciones que superan los dos

*Bacillus*.

Tequila has acquired importance as a result of the growing national and international demand, with field activity being an important and decisive component for the supply of the raw material, the tequila agave *Agave tequilana* Weber var. Azul for the production of this important beverage (Pérez and Del Real, 2007). The tequila agave plantations within the zone of Denomination of Origin of Tequila (DOT) integrate an inventory of 253,033,239 sown plants (CRT, 2010). The tequila industry has grown sustainably during recent years and its growth potential is even higher, therefore it requires a sustained and predictable supply of raw material to insure its production (Byerly, 2007).

The Official Mexican Norm for tequila production NOM-066-SCFI-2005 specifies the blue variety of *Agave tequilana* as the only one authorized for making tequila, which implies that the propagation method should comply with the requirement. Therefore, sexual reproduction is discarded, which would result in genetic variation or segregation among the daughter plants. Asexual reproduction takes place through vegetative propagation; the individuals obtained through this type of reproduction constitute a clone, and these clones, except for natural mutations, are genetically identical to the mother plant. For the propagation of *A. tequilana* Weber, var. Azul, the following methods of asexual multiplication exist: bulbils, rhizomes (offspring) and micro-propagation. The latter method has the advantage of producing large quantities of plants in relatively small spaces throughout the year. *In vitro* propagation makes it possible to control the sanitary condition of the plants throughout their production and constitute groups of plants of the same age for their agricultural management (Vicente and Del Real, 2007).

The improvement of the sanitary condition and root proliferation in many nursery plants is strengthened with the use of organisms such as *Trichoderma* spp. and *Bacillus* spp. (Kloepper *et al.*, 1992; Van Veen *et al.*, 1997) in diverse horticultural, ornamental and forest crops. With this technique the development of multiple mechanisms has been observed, which increment resistance to diseases, growth and productivity of the plants, as well as tolerance to stress provoked by diverse situations in the crops (Hartman *et al.*, 2004; Harman, 2006; Lorito *et al.*, 2010). In the crop of agave *Agave tequilana* Weber var. Azul several phytosanitary problems are reported, one of which is wilting, a symptom which can be caused by various organisms. The Tequila Regulating Council (TRC) documents high incidence of this problem in plants of more than two years after transplant (CRT, 2010). The wilting which appears in any crop is due to tissue dehydration, which occurs because of reduction, death or destruction of the root system, or from destruction or blockage of vascular bundles (CRT, 2005). Various investigators such as Luna-Hernández (1996), Virgen-Calleros (2000) and Fucikovsky-Zak (2001), among others, reported as agents causing this symptom *Fusarium oxysporum* and *Thielaviopsis paradoxa*. In 2007 Cuevas and Domínguez reported that the species complex of *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. oxysporum*,

años de edad después del trasplante (CRT, 2010). ). La marchitez que se presenta en cualquier cultivo se debe a una deshidratación de los tejidos y esto se da a su vez porque hay una reducción, muerte o destrucción del sistema radical, o bien porque hay destrucción o taponamiento de haces vasculares (CRT, 2005). Múltiples investigadores como Luna-Hernández (1996), Virgen-Calleros (2000) y Fucikovsky-Zak (2001), entre otros reportaron como agentes causantes de este síntoma a *Fusarium oxysporum* y *Thielaviopsis paradoxa*. En 2007 Cuevas y Domínguez, reportaron que el complejo de especies *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. oxysporum*, *F. solani* y *F. verticillioides*, podría ser el causante de la marchitez del cultivo. También, el mismo síntoma puede ser ocasionado por insectos que se alimentan del agave y su acción puede provocar heridas aprovechadas por los patógenos para acceder a la planta (CRT, 2005); entre estos esta la gallina ciega, que al alimentarse de la raíz, hace que la planta tenga menos área para absorber agua y nutrientes, a la vez que provoca heridas que son una fuente de entrada potencial para patógenos de la raíz, como *Fusarium* spp. Otro insecto que puede ocasionar marchitez es el gusano blanco del maguey, ya que al barrenar la piña, afecta diversas zonas del tallo, incluyendo haces vasculares, y aunque tal vez no haya invasión de microorganismos, si puede observarse encarrujamiento de hojas, así como una detención del crecimiento. Cuando una planta esta estresada por algún otro factor (manejo, nutrición, herbicidas o enfermedad), es fácilmente atacada por el picudo, el cual además de alimentarse dentro de la planta, también puede provocar marchitez, pudrición y muerte de la misma (CRT, 2005).

Como parte de un manejo integrado del cultivo, se planteó el presente trabajo con el objetivo de adicionar organismos benéficos que se establezcan en el sustrato y raíces de plantas de micropropagación durante la etapa previa al establecimiento en campo. Lo anterior bajo la hipótesis de que los organismos antagonistas presentan beneficios fisiológicos en plántulas que reducen el estrés causado por factores abióticos y patógenos como *Fusarium* spp.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Localización.** El experimento de vivero fue establecido en el “Rancho El Indio” de la empresa Sauza S.A. de C.V. en la localidad de Tequila, Jalisco.

**Plántulas.** Las plántulas de micropropagación usadas en el experimento fueron de cuatro hojas y una altura de 10cm, con una edad de doce meses.

**Tratamientos.** Los tratamientos considerados fueron tres cepas nativas de la región productora de agave de Jalisco, las cuáles fueron obtenidas de investigaciones previas realizadas por Cuevas y Domínguez (2007), y Carballo y Díaz (2008). Las especies corresponden a *Trichoderma harzianum*, *T. virens* y *T. aureoviride*, que fueron identificadas morfológica y molecularmente en los trabajos citados; una cepa comercial de *Bacillus subtilis* (Serenade®), las mezclas de *T. virens* + *B. subtilis*, *T. aureoviride* + *B. subtilis*; y los testigos absoluto y comercial (Cuadro 1).

*F. solani* and *F. verticillioides* could be the cause of crop wilting. Furthermore, the same symptom can be caused by insects that feed on the agave and their action can cause lesions used by the pathogens to accede to the plant (CRT, 2005). These include white grub, which feeds on the root, thus reducing the area of the plant for absorbing water and nutrients, and provoking lesions which are a potential entrance point for root pathogens, such as *Fusarium* spp. Another insect that can cause wilting is the white maguey worm, given that as it bores into the center of the plant, affecting diverse zones of the stem, including vascular fascia. Although perhaps there is no invasion of microorganisms, leaf curling can be observed, as well as growth retardation. When the plant is stressed by some other factor (management, nutrition, herbicides or disease), it is easily attacked by the weevil, which besides feeding within the plant, can also provoke wilting, rotting and plant death (CRT, 2005).

As part of an integrated crop management, the present work was carried out with the objective of adding beneficial organisms which are established in the substrate and roots of micro-propagation plants during the stage prior to establishment in the field. The above is based on the hypothesis that the antagonistic organisms present physiological benefits in shoots that reduce stress caused by abiotic factors and pathogens such as *Fusarium* spp.

## MATERIALS AND METHODS

**Location.** The nursery experiment was established in “Rancho del Indio” of the firm Sauza S.A. de C.V. in the locality of Tequila, Jalisco.

**Shoots.** The micro-propagation shoots used in the experiment were of four leaves with a height of 10 cm, and an age of twelve months.

**Treatments.** The treatments considered were three native strains of the agave production region of Jalisco, which were obtained from previous investigations made by Cuevas and Domínguez (2007), and Carballo and Díaz (2008). The species correspond to *Trichoderma harzianum*, *T. virens* and *T. aureoviride*, which were morphologically

Cuadro 1. Tratamientos considerados dentro de la fase experimental de vivero sobre plantas de micropropagación, establecida en el “Rancho El Indio”, en Tequila Jalisco, México.

Table 1. Treatments considered within the nursery experimental phase on micro-propagation plants, established in the “Rancho El Indio”, in Tequila, Jalisco, Mexico.

Tratamientos	
T1	Sustrato enriquecido con <i>Trichoderma harzianum</i> (Th)
T2	Sustrato enriquecido con <i>T. virens</i> (Tv)
T3	Sustrato enriquecido con <i>T. aureoviride</i> (Ta)
T4	<i>Bacillus subtilis</i> (Serenade®) (Bs)
T5	<i>T. virens</i> + <i>B. subtilis</i> (Tv + Bs)
T6	<i>T. aureoviride</i> + <i>B. subtilis</i> (Ta + Bs)
T7	Sustrato sin enriquecimiento (testigo absoluto) (Tabs)
T8	Sustrato comercial + fungicida (Testigo regional) (Treg)

Los tratamientos correspondientes a las tres especies de *Trichoderma* fueron adicionadas en medio líquido papa dextrosa (papa 200g; dextrosa 11g; agua destilada 1000mL) a una concentración de  $1 \times 10^4$  UFC mL<sup>-1</sup>, y 10mL por plántula al cuello de la misma. *Bacillus subtilis* cepa QST 713 se agregó en la dosis comercial de 1g L<sup>-1</sup> de agua del producto comercial Serenade® que reportó en la etiqueta una concentración de  $8 \times 10^9$  UFC g<sup>-1</sup>, la aplicación fue similar a *Trichoderma* spp. así como el volumen por plántula. El experimento se estableció en octubre de 2008 y se hicieron cuatro aplicaciones de los tratamientos cada 30 d. Se realizaron seis muestreos de diciembre de 2008 a mayo de 2009 a intervalos de 30 d. En los testigos regional y absoluto no se adicionó ningún organismo.

El sustrato empleado fue una mezcla de composta de bagazo de piña de agave (5%), fibra de coco (80%) y corteza de pino (15%) (Crespo *et al.*, 2013). Las macetas usadas fueron de fibra de coco con capacidad de 1kg.

**Diseño experimental.** El diseño establecido fue un bloques completamente al azar con dos repeticiones, constituido por dos naves comerciales, las cuales correspondían a dos áreas de condiciones similares en sombreado y riego, pero de tamaño diferente.

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \beta_j + \epsilon_{ij}$$

$Y_{ij}$  es el valor de la variable respuesta;  $\mu$  es la media general; T efecto que produce el tratamiento, T1, T2, ..., T<sub>i</sub>;  $\beta_j$  es bloque;  $\epsilon_{ij}$  error experimental.

La unidad experimental (UE) se conformó por 122 plántulas por repetición con un total de 244 por tratamiento y 1952 en el experimento; se muestrearon 26 plántulas en cada UE. Las variables evaluadas fueron altura de planta, unidades formadoras de colonias (UFC) de *Trichoderma*, *Fusarium* y *Bacillus* en sustrato y raíz, determinación de clorofila y carotenos; en ellas se determinó el área bajo la curva (ABC), de acuerdo a lo reportado por Madden *et al.* (2007).

$$ABCPE = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{y_i - y_{i-1}}{2} * t_{i-1} \quad t_i$$

Donde, n es el número de mediciones,  $y_i$  es la variable evaluada, y  $t_i$  es el número de días desde el inicio del experimento a la fecha de medición.

Los datos se sometieron a un análisis de varianza y comparación de medias de diferencia mínima significativa ( $\alpha=0.05$ ), con el paquete estadístico SAS.

**Cuantificación de UFC en sustrato.** Para *Trichoderma* spp. y *Fusarium* spp., la cuantificación de UFC provenientes de suelo se hizo a través del procedimiento siguiente: se pesaron 10g de una muestra de sustrato y se agregaron en 90mL de agua destilada estéril en un matraz de 125mL, se hicieron diluciones hasta 10<sup>-3</sup>. Se empleó el medio de cultivo Papa Dextrosa Agar Penetrex Estreptomycin (PDA-PS) con 0.5mL del surfactante comercial Penetrex®, 0.01g de estreptomycin y 0.0075g de clorhidrato de tetraciclina, se agitó el medio suavemente para no formar burbujas. De la dilución 10<sup>-3</sup> se tomaron 10 muestras de 0.1mL, que se agregaron al medio PDA-PS. El

and molecularly identified in the works cited; a commercial strain of *Bacillus subtilis* (Serenade®), the mixtures of *T. virens* + *B. subtilis*, *T. aureoviride* + *B. subtilis*; and the absolute and commercial controls (Table 1).

The treatments corresponding to the three species of *Trichoderma* were added in liquid medium of potato dextrose (potato 200g; dextrose 11g; distilled water 1000mL) at a concentration of  $1 \times 10^4$  CFU mL<sup>-1</sup>, and 10mL per shoot at the neck. *Bacillus subtilis* strain QST 713 was added in the commercial dose of 1 g L<sup>-1</sup> of water of the commercial product Serenade® which reported in the label a concentration of  $8 \times 10^9$  CFU g<sup>-1</sup>; the application was similar to *Trichoderma* spp., as well as the volume per shoot. The experiment was established in October of 2008 and four applications were made of the treatment every 30 d. Six samplings were carried out from December of 2008 to May of 2009 at 30 d intervals. In the regional and absolute control no organisms were added.

The substrate employed was a mixture of agave head bagasse compost (5%), coconut fiber (80%) and pine bark (15%) (Crespo *et al.*, 2013). The pots used were of coconut fiber with a capacity of 1 kg.

**Experimental design.** The design established was of completely randomized blocks with two replicates, comprised of two commercial naves, which corresponded to two areas of conditions similar in shading and irrigation, but of different size.

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \beta_j + \epsilon_{ij}$$

$Y_{ij}$  is the value for the response variable;  $\mu$  is the general mean; T the effect produced by the treatment, T1, T2, ..., T<sub>i</sub>;  $\beta_j$  is block;  $\epsilon_{ij}$  is experimental error.

The experimental unit (EU) was comprised of 122 plantlets per replicate with a total of 244 per treatment and 1952 in the experiment; 26 plantlets were sampled in each EU. The variables evaluated were plant height, colony forming units (CFU) of *Trichoderma*, *Fusarium* and *Bacillus* in substrate and root, and determination of chlorophyll; in which the area below the curve was determined (ABC), according to what was reported by Madden *et al.* (2007).

$$ABCPE = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{y_i - y_{i-1}}{2} * t_{i-1} \quad t_i$$

Where n is the number of measurements,  $y_i$  is the variable evaluated, and  $t_i$  is the number of days from the start of the experiment to the date of measurement.

The data were subjected to an analysis of variance and comparison of means of minimum significant difference ( $\alpha=0.05$ ), with the SAS statistical package.

**Quantification of CFU in substrate.** For *Trichoderma* spp. and *Fusarium* spp., the quantification of CFU from soil was made using the following procedure: 10 g of a substrate sample were weighed, and were added in 90 mL of sterile distilled water in a flask of 125mL, dilutions to 10<sup>-3</sup> were made. Potato Dextrose Agar Penetrex Streptomycin (PDA-PS) was employed with 0.5mL of

material se incubó por siete días a temperatura ambiente de 22 a 24°C. La determinación de UFC de *Bacillus subtilis* se realizó con la misma técnica anterior solo que empleando la dilución  $10^{-8}$  en medio de cultivo agar nutritivo (AN Bioxon® 38g L<sup>-1</sup>) y cuantificando la densidad de población en base a la morfología de la colonia y la prueba de Gram (Schaad *et al.*, 2001).

En el sustrato empleado se cuantificaron las UFC g<sup>-1</sup> de sustrato de *Trichoderma* spp., *Fusarium* spp. y *Bacillus* spp., presentes ya que fue una composta natural que se emplea por la empresa para su material de micropropagación y no pasa por esterilización.

**Cuantificación sobre raíces.** Se pesó un gramo de raíces a partir de 26 plántulas de agave de cada UE y se lavaron con agua común. Las muestras destinadas a determinar *Trichoderma* sp. y *Fusarium* sp., se desinfectaron en hipoclorito de sodio al 3% por tres minutos y al final se enjuagaron con agua destilada esterilizada y secaron para sembrarse en medio de cultivo PDA e incubarse en cámara de crecimiento a temperatura de 22 a 24°C. El número de colonias de *Trichoderma* y *Fusarium* se evaluaron a los siete y 10 días. Para cuantificar *B. subtilis* se siguió el procedimiento anterior solo sin la desinfección con hipoclorito de sodio. Las raíces se sembraron en medio AN incubándose a la misma temperatura indicada arriba y se evaluaron a las 24 y 48h tomando en cuenta la morfología de la colonia y la prueba de Gram (Schaad *et al.*, 2001).

**Determinación de clorofila.** Se tomaron 10g de hojas de agave por tratamiento y se introdujeron en 80mL de acetona al 70%, se dejaron reposar por 24h en oscuridad y posteriormente se llevaron al espectrofotómetro para su cuantificación (Porra *et al.*, 1989).

## RESULTADOS

**Cuantificación de flora microbiana fungosa en sustrato.** El resultado de la cuantificación de flora microbiana fungosa en el sustrato empleado en las plántulas reportó la presencia de *Trichoderma* sp. en 1.2 ufc(x1000) g<sup>-1</sup>, *Penicillium* sp. 21.4 ufc(x1000) g<sup>-1</sup>, *Aspergillus* sp. 7.7 ufc(x1000) g<sup>-1</sup>, *Mucor* sp. 12.1 ufc(x1000) g<sup>-1</sup> y *Chalaropsis* sp. 0.4 ufc(x1000) g<sup>-1</sup> (Figura 1), las cuales se identificaron a género con ayuda de las claves para hongos imperfectos de Barnett y Hunter (1998). Estos resultados no sorprenden ya que se trató de un sustrato natural y sentó referencia de los organismos con los cuales convivirían los organismos de los diferentes tratamientos introducidos para enriquecer el mismo.

**Dinámica de UFC en sustrato y raíz.** El establecimiento de las especies de *Trichoderma* spp. ocurrió desde la primera evaluación a los 30 d después de la inoculación (ddi) en todos los tratamientos como se puede apreciar en la Figura 2, y se mantuvo constante durante el tiempo (60, 90, 120, 150 y 180ddi) en valores de 3.5 a 4 log (UFC mL<sup>-1</sup>) en todos los tratamientos.

Los propágulos de *Fusarium* spp. tuvieron un comportamiento diferente en sustrato y raíz. En raíz los tratamientos T1 Th, T2 Tv y T4 Bs no reportaron UFC en los primeros 30 d, sin embargo a los 60 ddi ya oscilaban entre 2 y 2.5 log (UFC mL<sup>-1</sup>), el tratamiento T3 Ta alcanzó los mismos

commercial surfactant Penetrex®, 0.01g of streptomycin and 0.0075g of tetracycline hydrochloride; the medium was agitated gently so as not to form bubbles. From the dilution  $10^{-3}$ , 10 samples of 0.1 mL were taken, which were added to the PDAA-PS medium. The material was incubated for seven days at room temperature of 22 to 24°C. Determination of CFU of *Bacillus subtilis* was made with the above technique, but using dilution  $10^{-8}$  in nutritive agar culture (NA Bioxon® 38g L<sup>-1</sup>) and quantifying the population density based on the morphology of the colony and the Gram test (Schaad *et al.*, 2001).

In the substrate employed the UFC g<sup>-1</sup> of substrate of *Trichoderma* spp., *Fusarium* spp. and *Bacillus* spp. present were quantified, given that it was a natural compost employed by the firm for its propagation material and is not sterilized.

**Quantification on roots.** A gram of roots was weighed from 26 agave shoots from each EU and washed with common water. The samples destined for determining *Trichoderma* sp. and *Fusarium* sp. were disinfested in sodium hypochlorite 3% for three minutes and then were rinsed with sterilized distilled water and dried to be sown in PDA culture medium and incubated in a growth chamber at 22 to 24°C. The number of colonies of *Trichoderma* and *Fusarium* were evaluated at seven and 10 days. To quantify *B. subtilis* the above procedure was followed, but without the disinfestations with sodium hypochlorite. The roots were sown in NA medium and incubated at the same temperature indicated above, and evaluated at 24 and 48 h, considering the morphology of the colony and the Gram test (Schaad *et al.*, 2001).

**Determination of chlorophyll.** 10g of agave leaves were taken for treatment and were introduced in 80mL of acetone at 70%, were left to rest for 24h in darkness and later were taken to the spectrophotometer for quantification (Porra *et al.*, 1989).

## RESULTS

**Quantification of fungal microbial flora in substrate.** The result of the quantification of fungal microbial flora in the substrate employed in the plantlets reported the presence of *Trichoderma* sp. in 1.2 cfu(x1000) g<sup>-1</sup>, *Penicillium* sp. 21.4 CFU (x1000) g<sup>-1</sup>, *Aspergillus* sp. 7.7 CFU (x1000) g<sup>-1</sup>, *Mucor* sp. 12.1 CFU (x1000) g<sup>-1</sup> and *Chalaropsis* sp. 0.4 CFU (x1000) g<sup>-1</sup>, which were identified to genus with the aid of the imperfect fungi codes of Barnett and Hunter (1998). These results are not surprising, given that it was a natural substrate and gave a reference of the organisms with which the organisms of different treatments would coexist, introduced to enrich the substrate.

**Dynamic of CFU in substrate and root.** The establishment of the species of *Trichoderma* spp. occurred since the first evaluation 30 d after inoculation (dai) in all of the treatments, as can be seen in Figure 2, and was maintained constant during the time (60, 90, 120, 150 and 180 dai) at values of 3.5 to 4 log (CFU mL<sup>-1</sup>) in all of the treatments.

The propagules of *Fusarium* spp. had a different behavior in substrate and root. In root the treatments T1

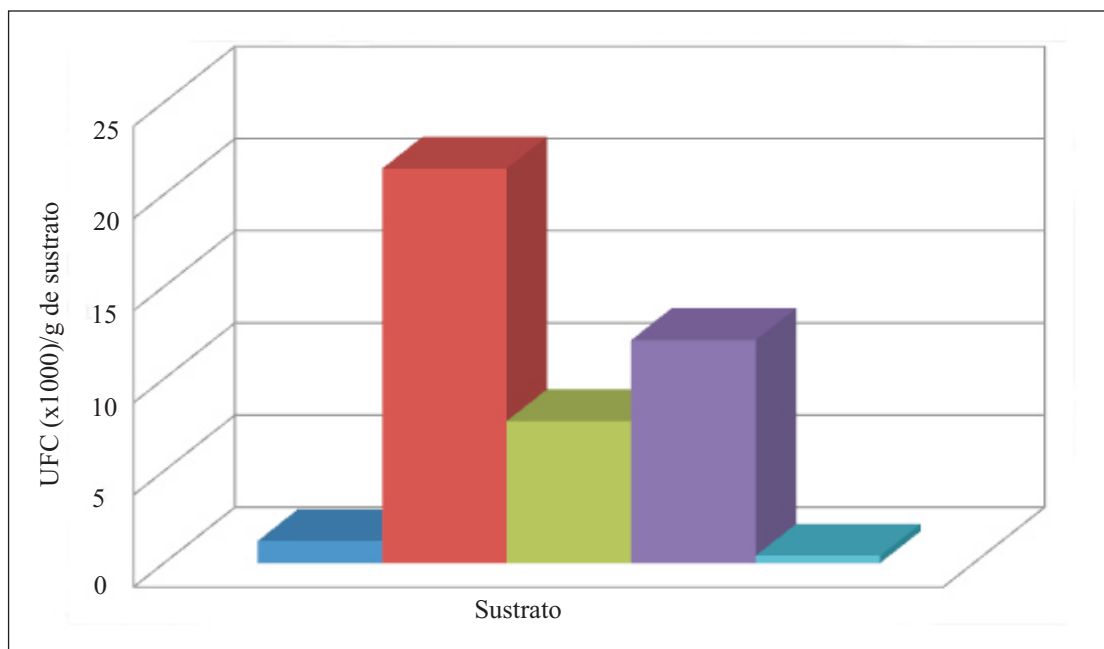


Figura 1. Resultados de UFC (x1000) por gramo de sustrato determinados en la composta empleada en la etapa de vivero con plántulas de micropropagación.

Figure 1. Results of CFU (x1000) per gram of substrate determined in the compost used in the nursery adaptation stage with micro-propagation plantlets.

niveles entre los 100 y 120 ddi; para T5 Tv + Bs se lograron a los 90 ddi; T6 Ta + Bs, T7 Tabs y T8 Treg iniciaron con los niveles desde los 30 ddi. En sustrato la colonización ocurrió desde los 30 ddi alcanzando niveles de 2 y 2.5 log (UFC mL<sup>-1</sup>) en todos los tratamientos, sin embargo en los tratamientos T3 Ta y T7 Tabs, ocurrió un descenso de UFC a los 150 ddi y coincidió con la evaluación de marzo de 2009. El tratamiento T5 Tv + Bs reportó un descenso de UFC de *Fusarium* spp. a los 60 ddi (enero 2009), no obstante alcanzó los niveles de 2 y 2.5 log (UFC mL<sup>-1</sup>) posteriormente.

La colonización de *B. subtilis* en los tratamientos T4 Bs, T5 Bs + Tv y T6 Bs + Ta, reportaron niveles elevados de UFC de la bacteria en raíces y su población se mantuvo entre 6.5 a 7.0 log (UFC/mL). En los tratamientos T1 Th, T2 Tv, T3 Ta, T4 Bs, T7 Tabs y T8 Treg, la bacteria descendió en sus niveles de densidad a los 180 ddi en la raíz; sin embargo, en los tratamientos T5 Tv+Bs y T6 Ta+Bs se mantuvo constante en los niveles de 6.5 a 7.0 log (UFC/mL) (Figura 2). El establecimiento de la bacteria en sustrato no ocurrió en los tratamientos T2 Tv y T8 Treg; mientras que en T1 Th, T3 Ta y T7 Tabs, su densidad se empezó a incrementar a los 150 ddi; los tratamientos que incluyeron a la bacteria desde el inicio T4 Bs, T5 Tv+Bs y T6 Ta+Bs, se establecieron en suelo desde los 30 ddi y se mantuvieron en densidades similares que los de raíz.

**Análisis de varianza de área bajo la curva (ABC) y comparación de medias *Trichoderma* sp. sustrato.** Los resultados del ANAVA mostraron diferencias entre tratamientos con una  $P=0.0003$  respecto a la colonización de UFC de *Trichoderma* sp. en sustrato, donde la prueba de comparación de medias de LSD (diferencia mínima

Th, T2 Tv and T4 Bs did not report CFU in the first 30 d, however, at 60 dai they fluctuated between 2 and 2.5 log (CFU mL<sup>-1</sup>), Treatment T3 Ta reached the same levels between 100 and 120 dai; for T5 Tv + Bs, they were reached at 90 dai; T6 Ta + Bs, T7 Tabs and T8 Treg initiated with these levels from 30 dai. In substrate the colonization occurred from 30 dai, reaching levels of 2 and 2.5 log (CFU mL<sup>-1</sup>) in all of the treatments, however, in treatments T3 Ta and T7 Tabs, a decrease of CFU occurred at 150 dai and coincided with the evaluation of March 2009. Treatment T5 Tv + Bs reported a decrease of CFU of *Fusarium* spp. at 60 dai (January 2009), although it reached the levels of 2 and 2.5 log (CFU mL<sup>-1</sup>) later.

The colonization of *B. subtilis* in treatments T4 Bs, T5 Bs + Tv and T6 Bs + Ta, reported high levels of CFU of the bacteria in roots and its population remained between 6.5 and 7.0 log (CFU/mL<sup>-1</sup>). In treatments T1 Th, T2 Tv, T3 Ta, T4 Bs, T7 Tabs and T8 Treg, the bacteria descended in density levels at 180 dai in the root. However, in treatments T5 Tv+Bs and T6 Ta+Bs, it remained constant at levels of 6.5 to 7.0 log (CFU/mL<sup>-1</sup>) (see Fig. 2). The establishment of the bacteria in substrate did not occur in treatments T2 Tv and T8 Treg; while in T1 Th, T3 Ta and T7 Tabs, its density began to increase at 150 dai; the treatments that included the bacteria from the start T4 Bs, T5 Tv+Bs and T6 Ta+Bs, were established in soil from 30 dai and remained in densities similar to those of root.

**Analysis of variance of area below the curve (ABC) and comparison of means *Trichoderma* sp. substrate.** The results of ANAVA showed differences among treatments with a  $P=0.0003$  with respect to the

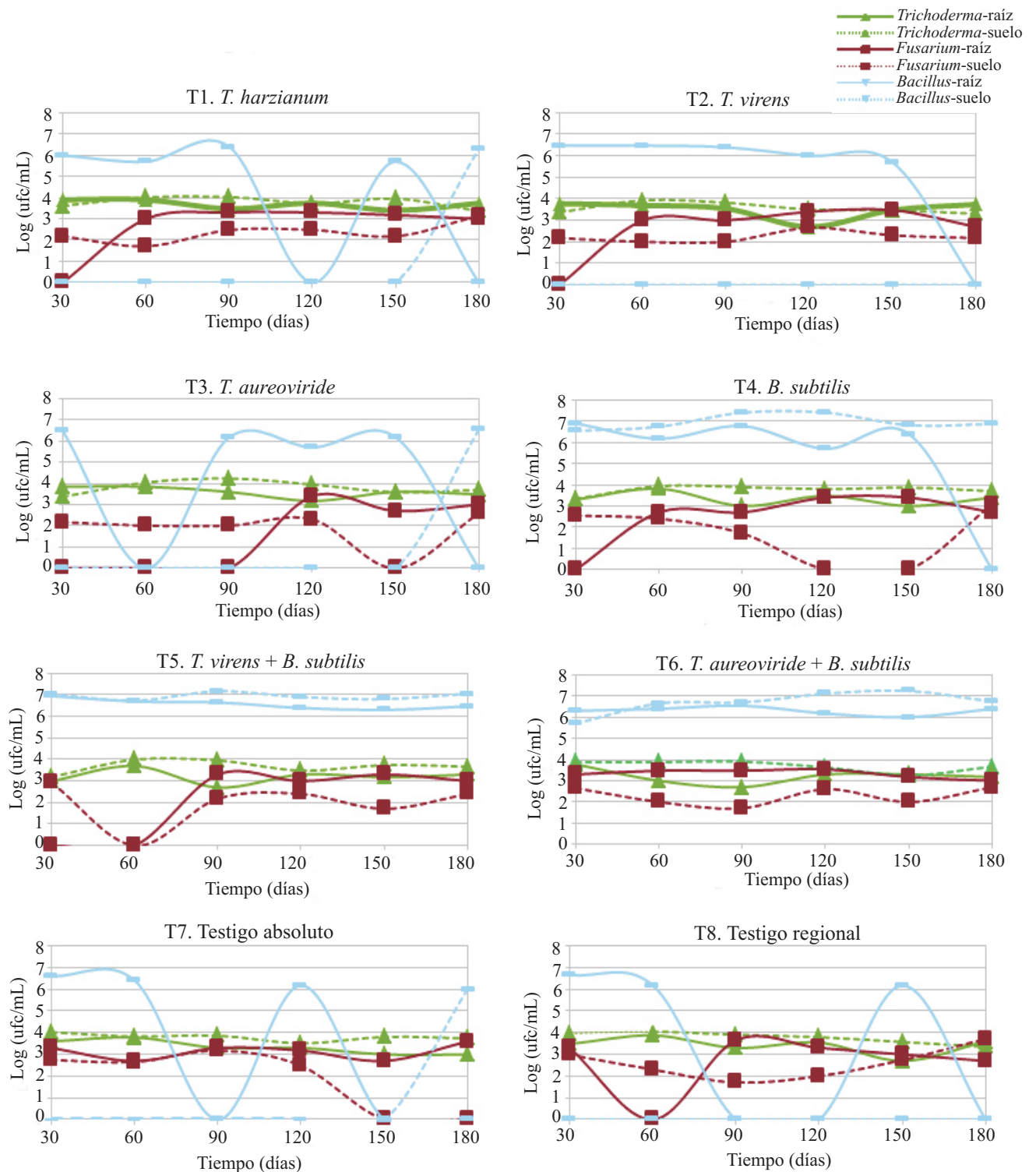


Figura 2 Comportamiento de los tratamientos T1 *T. harzianum* (Th), T2 *T. virens* (Tv), T3 *T. aureoviride* (Ta), T4 *B. subtilis* (Bs), T5 *T. virens* + *B. subtilis* (Tv + Bs), T6 *T. aureoviride* + *B. subtilis* (Ta + Bs), T7 Testigo absoluto (Tabs) y T8 Testigo regional (Treg), durante seis meses de diciembre 2008 a mayo de 2009, inoculados al sustrato durante la etapa de adaptación de vivero del agave (*Agave tequilana* weber var. Azul) en el “Rancho el Indio”, Tequila, Jalisco.

Figure 2. Behavior of treatments T1 *T. harzianum* (Th), T2 *T. virens* (Tv), T3 *T. aureoviride* (Ta), T4 *B. subtilis* (Bs), T5 *T. virens* + *B. subtilis* (Tv + Bs), T6 *T. aureoviride* + *B. subtilis* (Ta + Bs), T7 Absolute control (Tabs) and T8 (Regional control), during six months from December of 2008 to May of 2009, inoculated to the substrate during the nursery adaptation stage of the agave (*Agave tequilana* weber var. Azul) in “Rancho el Indio”, Tequila, Jalisco.

significativa  $\alpha=0.05$ ) reportó al T3 Ta con la mayor ABC 1338.75; el T1 Th alcanzó niveles de 1160.25, le siguieron T4 Bs con 1012.50 y T8 Treg 1048.50. El resto de los tratamientos estuvieron por debajo de mil, T7 Tabs 951.00, T5 Tv + Bs 921.00, T6 Ta + Bs 836.25 y T2 Tv 703.50 (Cuadro 2).

**Trichoderma sp. raíz.** El ANAVA de las UFC en raíz de *Trichoderma* sp. reportó diferencias en los tratamientos con una P = 0.0325. La prueba de comparación de medias de LSD ( $\alpha=0.05$ ) señaló que el ABC mayor fue obtenida por T1 Th 772.5, seguido de un grupo de cinco tratamientos donde se agruparon T3 Ta 645.0, T2 Tv 532.5, T8 Treg 518 y T4 Bs 412.5, que pese a reportarse como iguales estadísticamente presentan diferencias de más de 100 puntos entre algunos de ellos. Las áreas menores las obtuvieron los tratamientos T5 Tv + Bs y T6 Ta + Bs, con 315.0 y 277.5, respectivamente (Cuadro 2).

**Bacillus subtilis sustrato.** El ANAVA del ABC indicó diferencias entre tratamientos con una P de 0.016. La prueba de comparación de medias LSD ( $\alpha=0.05$ ) resaltó a los tratamientos donde se encontró la bacteria como los de mayores niveles de ABC. El T4 Bs fue el de niveles altos con una ABC de 2055.0, seguido de aquellos tratamientos que tuvieron interacción con *Trichoderma* como el T5 Tv + Bs 1387.50 y T6 Ta + Bs 1290.0. Niveles menores se encontraron en T1 Th 30.0, T3 Ta 52.5 y T7 Tabs 15.0. Los tratamientos T2 Tv y T8 Treg no reportaron colonización en suelo de *B. subtilis* (Cuadro 3).

**Bacillus subtilis raíz.** Un comportamiento similar al de *B. subtilis* en sustrato se observó en raíces, donde también se mostró la existencia de diferencias estadísticas entre tratamientos del ANAVA del ABC con una P de 0.0135. Los

Cuadro 2. Comparación de medias de LSD (diferencia mínima significativa  $\alpha=0.05$ ) del área bajo la curva (ABC) de las UFC de *Trichoderma* sp. detectadas en sustrato y raíces en los tratamientos establecidos en la etapa de vivero en agave de micro-propagación después de seis muestreos de diciembre de 2008 a abril de 2009 con intervalo de muestreo de 30 d.

Table 2. Comparison of means of LSD (least significant difference  $\alpha=0.05$ ) of the area below the curve (ABC) of the CFU of *Trichoderma* sp. detected in substrate and roots in the treatments established during the nursery stage in micro-propagation agave after six samplings from December of 2008 to April of 2009 with sampling interval of 30 d.

Tratamiento	ABC de UFC <i>Trichoderma</i> sp.	
	Sustrato*	Raíces*
T1 Th	1160.25 b	772.5 a
T2 Tv	703.50 e	532.5 abc
T3 Ta	1338.75 a	645.0 ab
T4 Bs	1012.50 be	412.5 bc
T5 Tv + Bs	921.00 cd	315.0 c
T6 Ta + Bs	836.25 de	277.5 c
T7 Tabs	951.00 cd	405.0 bc
T8 Treg	1048.50 bc	518.0 bc

\* Valores con la misma letra son estadísticamente iguales

Cuadro 3. Comparación de medias de LSD (diferencia mínima significativa  $\alpha=0.05$ ) del área bajo la curva (ABC) de las UFC de *B. subtilis* detectadas en sustrato y raíces en los tratamientos establecidos en la etapa de vivero en agave de micro-propagación después de seis muestreos de diciembre de 2008 a abril de 2009 con intervalo de muestreo de 30 d.

Table 3. Comparison of means of LSD (least significant difference  $\alpha=0.05$ ) of the area below the curve (ABC) of the CFU of *B. subtilis* detected in substrate and roots in the treatments established in the nursery stage of micro-propagation agave after six samplings from December of 2008 to April of 2009 with sampling interval of 30 d.

Tratamiento	ABC de UFC de <i>Bacillus subtilis</i>	
	Sustrato	Raíces
T1 Th	30.00 b	120.0 c
T2 Tv	0.00 b	255.0 bc
T3 Ta	52.50 b	150.0 c
T4 Bs	2055.00 a	435.0 ab
T5 Tv + Bs	1387.50 a	600.0 a
T6 Ta + Bs	1290.00 a	322.5 bc
T7 Tabs	15.00 b	180.0 c
T8 Treg	0.00 b	157.5 c

\* Valores con la misma letra son estadísticamente iguales

colonization of CFU of *Trichoderma* sp. in substrate, where the comparison of means test of LSD (least significant difference  $\alpha = 0.05$ ) reported T3 Ta with the highest ABC 1338.75; T1 Th reached levels of 1160.25, followed by T4 Bs with 1012.50 and T8 Treg 1048.50. The rest of the treatments were below one thousand, T7 Tabs 951.00, T5 Tv + Bs 921.00, T6 Ta + Bs 836.25 and T2 Tv 703.50 (Table 2).

**Trichoderma sp. root.** The ANAVA of the CFU in root of *Trichoderma* sp. reported differences in treatments with P = 0.0325. The comparison of means LSD test ( $\alpha = 0.05$ ) indicated that the highest ABC was obtained by T1 Th 772.5, followed by a group of five treatments where T3 Ta 645.0, T2 Tv 532.5, T8 Treg 518 and T4 Bs 412.5, which despite being statistically equal present differences of more than 100 points among some of them. The lowest areas were obtained by treatments T5 Tv+Bs and T6 Ta+Bs, with 315.0 and 277.5, respectively (Table 2).

**Bacillus subtilis substrate.** The ANAVA of the ABC indicated differences among treatments with a P of 0.016. The comparison of means LSD test ( $\alpha = 0.05$ ) highlighted the treatments where the bacteria was found as those of the highest levels of ABC. The T4 Bs had high levels with an ABC of 2055.0, followed by those treatments that had interaction with *Trichoderma* such as T5 Tv + Bs 1387.50 and T6 Ta + Bs 1290.0. Lower levels were found in T1 Th 30.0, T3 Ta 52.5 and T7 Tabs 15.0. Treatments T2 Tv and T8 Treg did not report colonization in soil of *B. subtilis* (Table 3).

**Bacillus subtilis root.** A similar behavior to that of *B. subtilis* in substrate was observed in roots, where there was also the existence of statistical differences among treatments



resultados arrojados por la prueba de comparación de medias de LSD ( $\alpha=0.05$ ) señalaron que *B. subtilis* reportó presencia en todos los tratamientos en sus raíces. El ABC mayor la alcanzó el T5 Tv + Bs 600.0, seguido del T4 Bs 435.0 y T6 Ta + Bs 322.5; T2 Tv reportó 255.0. T1 Th, T3 Ta, T7 Tabs y T8 Treg, obtuvieron las ABC más bajas con valores de 120.0, 150.0, 180.0 y 157.5 (Cuadro 3).

***Fusarium* sp. sustrato.** Las UFC de *Fusarium* sp. en sustrato no reportaron diferencias estadísticas entre tratamientos en el ANAVA, sin embargo se apreciaron niveles por debajo de 50 para la mayoría de los tratamientos, excepto para el T7 Tabs y T8 Treg, donde se reportaron ABC de 75.75 y 120 (Cuadro 4).

***Fusarium* sp. raíz.** No hubo diferencias estadísticas de tratamientos en el ANAVA del ABC de UFC de *Fusarium* sp. en raíces. Sin embargo se tuvieron valores de más de 200 entre varios de los tratamientos (Cuadro 4). T6 Ta + Bs obtuvo niveles de ABC de 375.0, mientras que los valores de T1 Th, T2 Tv, T7 Tabs y T8 Treg, fueron de 210, 235.5, 225.0 y 262.5, respectivamente. Los valores bajos se encontraron en los tratamientos T3 Ta 105.0, T4 Bs 187.5 y T5 Tv + Bs 165.0.

**Clorofila y Altura.** No se reportaron diferencias estadísticas entre tratamientos en el ANAVA de estas dos variables (Cuadro 5).

## DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo demuestran que los microorganismos como *Trichoderma* spp. y *Bacillus subtilis* son capaces de establecerse en suelo y algunos de estos tienen la capacidad de hacer a las raíces su nicho; con esto tienen la cualidad de equilibrar las densidades de población

Cuadro 4. Comparación de medias de LSD (diferencia mínima significativa  $\alpha=0.05$ ) del área bajo la curva (ABC) de las UFC de *Fusarium* sp. detectadas en suelo y raíces en los tratamientos establecidos en la etapa de vivero en agave de micro-propagación después de seis muestreos de diciembre de 2008 a abril de 2009 con intervalo de muestreo de 30 d.

Table 4. Comparison of means of LSD (least significant difference  $\alpha=0.05$ ) of the area below the curve (ABC) of the CFU of *Fusarium* sp. detected in soil and roots in the treatments established during the nursery stage in micro-propagation agave after six samplings from December of 2008 to April of 2009 with sampling interval of 30 d.

Tratamiento	ABC de UFC de <i>Fusarium</i> sp.	
	Sustrato*	Raíces*
T1 Th	48.00 a	210.0 a
T2 Tv	30.00 a	232.5 a
T3 Ta	20.25 a	105.0 a
T4 Bs	32.25 a	187.5 a
T5 Tv +Bs	30.00 a	165.0 a
T6 Ta + Bs	33.75 a	375.0 a
T7 Tabs	75.75 a	225.0 a
T8 Treg	120.00 a	262.5 a

\* Valores con la misma letra son estadísticamente iguales

Cuadro 5. Comparación de medias de LSD (diferencia mínima significativa  $\alpha=0.05$ ) del área bajo la curva (ABC) de las variables altura y clorofilas en los tratamientos establecidos en la etapa de vivero en agave de micro-propagación después de seis muestreos de diciembre de 2008 a abril de 2009 con intervalo de muestreo de 30 d.

Table 5. Comparison of means of LSD (least significant difference  $\alpha=0.05$ ) of the area below the curve (ABC) of the variables height and chlorophylls in the treatments established in the nursery stage in micro-propagation agave after six samplings from December of 2008 to April of 2009 with sampling interval of 30 d.

Tratamiento	Área bajo la curva	
	Altura*	Clorofila*
T1 Th	4160.4 a	119.69 a
T2 Tv	4313.9 a	107.42 a
T3 Ta	4336.1 a	115.29 a
T4 Bs	4469.6 a	116.67 a
T5 Tv + Bs	4212.6 a	107.16 a
T6 Ta + Bs	4292.4 a	110.89 a
T7 Tabs	4325.2 a	108.55 a
T8 Treg	4271.4 a	112.80 a

\* Valores con la misma letra son estadísticamente iguales

of the ANAVA of the ABC with a P of 0.0135. The results from the comparison of means test of LSD ( $\alpha=0.05$ ) indicated that *B. subtilis* reported presence in all of the treatments in roots. The highest ABC was reached by T5 Tv + Bs 600.0, followed by T4 Bs 435.0 and T6 Ta + Bs 322.5; T2 Tv reported 255.0. T1 Th, T3 Ta, T7 Tabs and T8 Treg obtained the lowest ABC with values of 120.0, 150.0, 180.0 and 157.5 (Table 3).

***Fusarium* sp. substrate.** The CFU of *Fusarium* sp. in substrate did not report statistical differences among treatments in ANAVA. However, values of more than 200 were obtained among various treatments (Table 4). T6 Ta + Bs obtained ABC levels of 375.0, while the values of T1 Th, T2 Tv, T7 Tabs and T8 Treg were 210, 235.5, 225.0 and 262.5, respectively. The low values were found in treatments T3 Ta 105.0, T4 Bs 187.5 and T5 Tv + Bs 165.0.

**Chlorophyll and height.** No statistical differences were reported among treatments in the ANAVA of these two variables.

## DISCUSSION

The results of this work show that the microorganisms such as *Trichoderma* spp. and *Bacillus subtilis* are capable of establishing themselves in soil, and some have the ability to nest in roots. Thus, they have the quality of balancing the population densities of pathogenic organisms such as various species of *Fusarium* common in most soils of the world and regulating the populations of microorganisms in the soils or substrates used. Smith *et al.* (2001) indicate that the CFU levels below 100 CFU g<sup>-1</sup> can be considered low and of reduced risk for causing disease from this fungus. However, above this level, precautions

de organismos patógenos como varias de las especies de *Fusarium* comunes en la mayoría de los suelos del mundo las poblaciones de microorganismos en los suelos o sustratos que se empleen; Smith *et al.* (2001) indican que los niveles de UFC por debajo de 100 UFC g<sup>-1</sup> pueden considerarse bajos y de riesgo reducido para causar enfermedad por este hongo, sin embargo, por arriba de ese nivel se deben tomar precauciones ya que se consideran niveles elevados (Valiuskaite *et al.*, 2008). El control biológico de patógenos de plantas comúnmente involucra el mejorar o aumentar el antagonismo alrededor de las plantas o en el suelo pero en poblaciones bajas que permitan un adecuado equilibrio. Este tipo de herramientas prácticas permiten la protección contra infecciones que pudieran establecerse; la protección del material que se plantará puede protegerse vía raíces, suelo o en semilla. Gnanamanickan *et al.* (2002) reportaron el éxito de tratamiento de la semilla en millones de hectáreas de algodón en china con *Streptomyces* 5406 como un ideal de forma en la protección de cultivos desde el punto de vista preventivo. La capacidad que se observó en este trabajo de T1 Th para establecerse en suelo y raíz, también lo reportó Harman (2000) para la especie *T. harzianum* T-22 donde señalo además que la cualidad de colonizar el área de la rizósfera en las plantas trae el beneficio de poder actuar como un inductor de mecanismo de resistencia sistémica adquirida, lo que conlleva a prolongar la protección de las plantas hacia patógenos. El tratamiento T3 Ta tuvo un comportamiento similar a T1 Th; Howell (2002) y Harman *et al.* (2004) reportaron que son varias las especies de *Trichoderma* que tienen la capacidad de poder colonizar el área del sistema de raíces de plantas donde se aplica con la finalidad de conferir protección y que los organismos pueden actuar contra los patógenos a través de la producción o liberación de varios compuestos que pueden inducir respuestas de resistencia sistémica adquirida o localizada y así perdida de patogenicidad en las plantas; señalando que dicha asociación microorganismo-raíz causa sustanciales cambios en el metabolismo y proteoma de la planta. El poder establecerse en suelo también trae como beneficio que las especies puedan actuar a través de competencia por espacio o por micoparasitismo que son algunos de los mecanismos reportados desde los 70's para algunas de las especies del genero *Trichoderma* (Harman, 2006; Harman *et al.*, 2004 y Howell, 2002). La aplicación preventiva también fue reportada por Horst *et al.* (2005) quienes mencionan que varios de los aislamientos y especies de *Trichoderma* spp. pueden reducir la severidad de enfermedades en plantas cuando se aplicaron en tratamiento a la semilla o trasplante entre ellas reportan a *T. asperellum* T-203, *T. hamatum* GT3-2, *T. hamatum* T382, *T. harzianum* T39, *T. harzianum* T22 y *T. virens* G6.

Respecto al comportamiento de *B. subtilis* los resultados de este trabajo demuestran la capacidad que tiene de establecimiento donde se adiciona sea en suelo o sustrato, así como en las raíces. El género *Bacillus* está considerado como promotor del crecimiento con potencial para incrementar el rendimiento en las plantas. Varias especies han sido objeto de investigación para su implementación

should be taken, as they are considered high (Valiuskaite *et al.*, 2008). The biological control of plant pathogens commonly involves improving or increasing the antagonism around the plants or in the soil but in low populations which permits an adequate balance. This type of practical tool allows protection against infections that could be established; the protection of the material to be planted can be protected via roots, soil or seed. Gnanamanickan *et al.* (2002) reported the success of treatment of seed in millions of hectares of cotton in China with *Streptomyces* 5406 as an ideal form of crop protection from the preventive viewpoint. The capacity that was observed in this work of T1 Th for establishment in soil and root was also reported by Harman (2000) for the species *T. harzianum* T-22, where he also pointed out that the quality of colonizing the area of the rhizosphere in the plants has the benefit of acting as an inductor of acquired systemic resistance mechanism, which prolongs the protection of the plants from pathogens. Treatment T3 Ta had a behavior similar to that of T1 Th; Howell (2002) and Harman *et al.* (2004) reported that various species of *Trichoderma* have the capacity to colonize the area of the root system of plants where it is applied, in order to confer protection and so that the organisms can act against the pathogens through the production or release of various compounds which can induce acquired or localized systemic resistance, and thus, the loss of pathogenicity in the plants. These authors point out that this association of microorganism-root causes substantial changes in the metabolism and proteome of the plant. The capacity to be established in soil also has the benefit that the species can act through competition for space or for myco-parasitism, which are some of the mechanisms reported since the 1970's for some of the species of the genus *Trichoderma* (Harman, 2006; Harman *et al.*, 2004 and Howell, 2002). Preventive application was also reported by Horst *et al.* (2005), who mention that several of the isolates and species of *Trichoderma* spp. can reduce the severity of diseases in plants when they are applied in treatment to seed or transplant, among which *T. asperellum* T-203, *T. hamatum* GT3-2, *T. hamatum* T382, *T. harzianum* T39, *T. harzianum* T22 and *T. virens* G6 were reported.

With respect to the behavior of *B. subtilis*, the results of this work demonstrate its capacity for establishment where it is added in soil or substrate, as well as in roots. The genus *Bacillus* is considered to be a growth promoter with potential for increasing plant yield. Various species have been the object of investigation for their implementation as biological control agents due to their characteristics of high colonization in roots and survival conferred by the spores (Klopper *et al.*, 1992; Van Veen *et al.*, 1997). It is a group of bacteria found in diverse ecological niches, including soil, water and air (Pankaj *et al.*, 2012). Jacobsen *et al.* (2004) point out that *Bacillus* spp. are biological control agents with high potential as a tool in an integrated pest management system with tendencies toward sustainable management. One of the investigations that demonstrated the findings of Jacobsen *et al.* (2004) are the results obtained by Zhang *et al.* (2009), who applied *B. subtilis* in treatment to seed and

como agentes de control biológico debido a sus características de alta capacidad de colonización de la raíz y de supervivencia que le confieren las esporas (Kloepper *et al.*, 1992; Van Veen *et al.*, 1997); es un grupo de bacterias que se encuentran en diversos nichos ecológicos incluyendo suelo, agua y aire (Pankaj *et al.*, 2012). Jacobsen *et al.* (2004) señalaron que *Bacillus* spp. son agentes de control biológico que tienen un gran potencial como herramienta en un sistema de manejo integrado de plagas con tendencias hacia un manejo sustentable. Una de las investigaciones que demostró lo señalado por Jacobsen *et al.* (2004) son los resultados obtenidos por Zhang *et al.* (2009) quienes aplicaron *B. subtilis* en tratamiento a semilla y directo al suelo, en cultivo de soya contra *Fusarium oxysporum* y *F. graminearum*, y reportaron que reduce la severidad de pudrición de raíces por 68 a 74% e incrementa la emergencia en 13 a 17%, la altura en 9 a 18%, y el peso seco de raíz de 8.4 a 19%. Veerubommu *et al.* (2011) encontraron que una mezcla de rizobacterias (*Bacillus atrophaeus* + *Burkholderia cepacia*) reducen la incidencia de *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* bajo condiciones de producción en invernaderos y en experimentos de campo fue de 48.6 y 46.1%, comparado con el tratamiento con fungicida (carbendazim) que reportó una reducción de 51.5 a 47.1%. Turner y Backman (1991) mostraron que *B. subtilis* podía colonizar consistentemente el sistema radical de cacahuete. El tratamiento a las semillas de cacahuete reportó una emergencia mayor que los no tratados y los resultados de vivero se repitieron en ensayos de campo. Dukare *et al.* (2011) señalaron resultados similares a los autores anteriores en el tratamiento de semilla y en composta con *B. subtilis* contra el ahogamiento ocasionado en plántula por *Pythium aphanidermatum*, *P. debaryanum*, *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum*, donde sus resultados mostraron reducción de la incidencia y severidad de la enfermedad. Chae *et al.* (2006) evaluaron una composta conteniendo diversas bacterias con capacidad de producir chitinasas, entre ellas *B. subtilis*, como enmienda de suelo contra la marchitez del chile ocasionada por *Phytophthora capsici* y concluyeron que se abate el efecto del patógeno creando condiciones supresivas en el área de la rizósfera.

## CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo indican que el uso de *Trichoderma* spp., *B. subtilis* o la mezcla de ambos, en algunos casos, debe ser un tratamiento preventivo en el material de propagación en el cultivo de *Agave tequilana* Weber var. Azul, ya que se establecen las poblaciones de antagonistas creando un ambiente de equilibrio en el área de la rizósfera que no permite que las poblaciones de *Fusarium* spp. se disparen y se mantengan densidades de UFC que no superen las 100 UFC g<sup>-1</sup>; también esta colonización será de apoyo cuando las plantas sean llevadas a campo y sean sometidas al estrés del trasplante y enfrentadas a la población nativa de organismos habitantes de los diferentes suelos.

## LITERATURA CITADA

Barnett, H. L. and Hunter, B. B. 1998. Illustrated genera of

directly to soil, in a soybean crop against *Fusarium oxysporum* and *F. graminearum*, and reported that it reduces the severity of rotting in roots by 68 to 74% and increases emergence by 13 to 17%, height by 9 to 18%, and dry weight of root by 8.4 to 19%. Veerubommu *et al.* (2011) found that a mixture of rhizobacteria (*Bacillus atrophaeus* + *Burkholderia cepacia*) reduces the incidence of *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* under greenhouse production conditions and in field experiments was 48.6 and 46.1 %, compared with fungicide (carbendazim) treatment that reported a reduction of 51.5 to 47.1%. Turner and Backman (1991) demonstrated that *B. subtilis* could consistently colonize the root system of peanut. The treatment to peanut seeds reported a higher emergence than those untreated, and the nursery results were repeated in field assays. Dukare *et al.* (2011) indicated similar results to those of the abovementioned authors in the treatment of seed and in compost with *B. subtilis* against the seedling damping-off caused by *Pythium aphanidermatum*, *P. debaryanum*, *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum*, where results showed reduction of incidence and severity of the disease. Chae *et al.* (2006) evaluated a compost containing diverse bacteria with capacity to produce chitinase, among them *B. subtilis*, as soil improvement against the withering of chili produced by *Phytophthora capsici* and concluded that the effect of the pathogen is abated, creating suppressive conditions in the area of the rhizosphere.

## CONCLUSIONS

The results of this work indicate that the use of *Trichoderma* spp., *B. subtilis* or the mixture of both, in some cases, should be a preventive treatment in the propagation material in the cultivation of *Agave tequilana* Weber var. Azul, given that the populations of antagonists are established, creating an environment of equilibrium in the area of the rhizosphere which does not permit the populations of *Fusarium* spp. to multiply, and maintains CFU densities that do not surpass 100 CFU g<sup>-1</sup>. In addition, this colonization will serve as support when the plants are taken to the field and subjected to the stress of transplanting and faced with the native population of organisms inhabiting the different soils.

- imperfect fungi. Fourth edition. APS-Press The American Phytopathological Society. St. Paul Minnesota. 218p.
- Byerly, M. K. F. 2007. Prólogo. P 7-8 in Pérez y Del Real (ed). Conocimiento y prácticas agronómicas para la producción de *Agave tequilana* Weber en la zona de denominación de origen del tequila. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Pacífico Centro. Libro técnico No. 4, Tepatitlán, Jalisco.
- Carballo, S.M. y Díaz, C. A. 2008. Evaluación de agentes de biocontrol contra la marchitez del agave causada por *Fusarium* spp. bajo condiciones de invernadero en agave tequilero (*Agave tequilana* Weber var. Azul) en Tequila, Jalisco. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo.

- Chae, D.H., Jin, R.D., Hwangbo, H., Kim, Y.W., Kim, Y.C., Park, R.D., Krishnan, H.B. and Kim, K.Y. 2006. Control of late blight (*Phytophthora capsici*) in pepper plant with compost containing multitude of chitinase producing bacteria. *Biocontrol* 51: 339-351.
- Crespo, G. M. R., González, E.D.R., Rodríguez, M. R., Rendón, S.L.A., Del Real L. J. I. y Torres, M.J.P. 2013. Evaluación de la composta de bagazo de agave como componente de sustratos para producir plántulas de agave azul tequilero. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, vol. 4:1161-1173.
- CRT, Consejo Regulador del Tequila. 2005. Plagas y enfermedades del *Agave tequilana* Weber var Azul. Ed. Pandora. Impreso en México. 123p.
- CRT, Consejo Regulador del Tequila. 2010. Actualización de la base de datos y diagnóstico fitosanitario: *Agave tequilana* Weber Var. Azul. Comité técnico agronómico-Subcomite de fitosanidad. 10p.
- Cuevas, A.F. y Domínguez, V. X. 2007. Evaluación *in vitro* de aislados de *Trichoderma* spp. Encontrados en la region de Tequila, Jalisco contra *Fusarium* spp. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo.
- Dukare, A.S., Prasanna, R., Dubey, S. Ch., Nain, L., Chaudhary, V., Singh, R. and Saxena, A. K. 2011. Evaluating novel microbe amended composts as biocontrol agents in tomato. *Crop Protection* 30: 436-442
- Fucikovsky-Zak, L. 2001. Tristeza and death of *Agave tequila* Weber, var .azul. Ed. De Boer, S.H., In: Plant Pathogenic Bacteria. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Boston, London. 454p.
- Gnanamanickan, S. S. 2002 . Biological control of crop diseases. Merce Dekker, Inc. USA. 468p.
- Harman, G.E. 2000. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derive from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease* 84: 393.
- Harman, G.E., Lorito, M., and Lynch, J. M.2004. Uses of *Trichoderma* spp. To remediate soil and water pollution. *Advances in Applied Microbiology* 56:313-330.
- Harman, G.E. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 96:190-194.
- Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M., 2004. *Trichoderma* Species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology* 2:43-56.
- Horst, L. E., Locke, J., Krause, C. R., McMahon, R. W., Madden, L. V., and Hoitink, H. A. J. 2005. Suppression of *Botrytis* blight of begonia by *Trichoderma hamatum* 382 in peat and compost-amended potting mixes. *Plant Disease* 89:1195-1200.
- Howell, C. R. 2002. Cotton seedling pre-emergence damping-off incited by *Rhizopus oryzae* and *Pythium* spp. and its biological control with *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 92:177-180.
- Jacobsen, B. J., Zidack, N. K., and Larson, B. J. 2004. The role of *Bacillus*-based biological control agents in integrated pest management systems: Plant diseases. *Phytopathology* 94:1272-1275.
- Klopper J.W, Tuzun S, Kuc J. 1992. Proposed definitions related to induced disease resistance. *Biocontrol Science Technology* 2:349-351.
- Lorito, M., Woo, S. L., Harman, G. E. and Monte, E. 2010. Translational research on *Trichoderma*: from 'omics to the field. *Annual Review of Phytopathology*. 48: 395-417.
- Luna-Hernández G.1996. Pudrición de tallo de Agave tequila Weber, var.azul en el estado de Jalisco, México. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Chapingo.
- Madden, L. V., Hughes, G., and van den Bosch, F. 2007. The study of plant disease epidemics. APS Press, The American Phytopathological Society St. Paul, Minnesota U.S.A. 421 p.
- Pankaj, K., Dubey, R.C. and Maheshwari, D.K. 2012. *Bacillus* strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. *Microbiological Research* 167: 493-499.
- Pérez, D.J.F y Del Real, J.I. 2007. Conocimiento y prácticas agronómicas para la producción de *Agave tequila* Weber en la zona de denominación de origen de tequila. Prometeo editores e INIFAP, Guadalajara, Jalisco México. 195 p.
- Porra, R.J., Thompson, W.A. and Kriedemann, P.E. 1989. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying *chlorophylls* a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of *chlorophyll* standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 975: 384-394.
- Schaad, N. W., Jones, J. B. and Chun, W. 2001. Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria. 3th ed. St. Paul, Minnesota. APS Press. 370 pp.
- Smith, N. S, J. E. DeVay and W. Hsieh. 2002. Soilborne populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, a cotton wilt fungus in California fields. *Mycologia* 93: 737-743.
- Turner, J. T., and Backman, P. A. 1991. Factors relating to peanut yield increases after seed treatment with *Bacillus subtilis*. *Plant Disease* 75:347-353.
- Valiuskaite, A., Surviliene, E. and Raudonis, L. 2008. Effect of Mycostop on *Fusarium* root-rot agents of raspberry. *Sodininkyste ir Darzininkyste* 27 : 47-51.
- Van Veen , J. A., Van Oberbeek, L. S . and Van Elsas, J.D. 1997. Fate and activity of microorganisms introduced into soil. *Microbiology Molecular Review* 61: 121-135.
- Veerubommu, S., Nandina, K., Markandey S., Sukhjinder, S. and Ramdeen, P. 2011. Biocontrol of vascular wilt and corm rot of gladiolus caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* using plant growth promoting rhizobacterial mixture. *Crop Protection* 30:807-813.
- Vicente, R. I., y Del Real, J.I. 2007. Métodos de propagación del *Agave tequilana* Weber var. Azul. P 57-67 in Rulfo V., F.O., Pérez, D. J.F., Del Real, L. J. I. y Byerly, M. K. F. 2007. (ed). Conocimiento y prácticas agronómicas para la producción de *Agave tequilana* Weber en la zona de denominación de origen del tequila. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Pacífico Centro.
- Virgen-Calleros, G. 2000. Epidemiología y manejo

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

Zhang, J.X., Xue, A.G., and Tambong, J.T. 2009. Evaluation of seed and soil treatments with novel *Bacillus subtilis* strains for control of soybean root rots caused by *Fusarium oxysporum* and *F. graminearum*. Plant Disease 93:1317-1323.