

***Fusarium* spp. and inoculum load estimation associated to commercial *Agave tequilana* offsets at different regional epidemic inductivity levels**

***Fusarium* spp. y estimación de carga de inóculo asociados a hijuelos de *Agave tequilana* en diferentes niveles de inductividad epidémica regional**

Coral Mendoza-Ramos, Gustavo Mora-Aguilera*, ¹Programa Fitosanidad-Fitopatología; Juan José Coria-Contreras, Baldemar Santana-Peñaloza, Gerardo Acevedo-Sánchez, Verónica Martínez-Bustamante, ²Laboratorio de Análisis de Riesgo Epidemiológico Fitosanitario (CP-LANREF); María Alejandra Gutiérrez-Espinosa, ³Programa Fruticultura. ^{1,2,3}Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado México, CP 56230, México; Ramón Rubio-Cortés, Área de Investigación, Casa Sauza, Francisco Javier Sauza #80, Tequila, Jalisco, C.P. 46400. *Autor de Correspondencia: morag@colpos.mx

Recibido: 28 de Junio, 2020.

Aceptado: 10 de Diciembre, 2020.

Mendoza-Ramos C, Mora-Aguilera G, Coria-Contreras JJ, Santana-Peñaloza B, Acevedo-Sánchez G, Martínez-Bustamante V, Gutiérrez-Espinosa MA and Rubio-Cortés R. 2021. *Fusarium* spp. and inoculum load estimation associated to commercial *Agave tequilana* offsets at different regional epidemic inductivity levels. Mexican Journal of Phytopathology 39(1): 94-121.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2006-8>

Primera publicación en línea: 30 de Diciembre, 2020.

First published on line: December 30, 2020.

Resumen. Esta investigación tuvo como objetivos identificar la especie(s) de *Fusarium* asociada(s) a hijuelos comerciales de *Agave tequilana* y desarrollar una metodología para cuantificar la carga de inóculo en hijuelos provenientes de plantaciones madre de Jalisco con inductividad epidémica

Abstract. The research objective was to identify the *Fusarium* specie(s) associated with commercial offsets of *Agave tequilana* and to develop a methodology to quantify the inoculum load in offsets from Jalisco mother plantations with differential epidemic inductivity to wilt and dry bud rot syndrome (SMAP). The purpose was to provide criteria for the certification of mother plantations. The samples were collect between March and May in 2018 and 2019, from 21 commercial plantations of 14 municipalities of Los Altos, South, and Valley of Jalisco. The number of diseased plants (PE) and SMAP severity (S) were estimated in 63 and 200 plants/plantation using App-SIVEA for 2018 and 2019 respectively. The CIFUSAG method was developed and applied in 7055 offsets and 46656 fungal colonies obtained from 2364 basal ‘piña’ wash isolates, internal tissue sections, and offset total maceration. Colony

diferencial al síndrome marchitez y pudrición seca del cogollo (SMAP). La finalidad fue proporcionar criterios para la certificación de plantaciones madre. La fase de campo se realizó entre marzo-mayo 2018 y 2019 en 21 plantaciones comerciales en 14 municipios de Los Altos, Sur y Valles de Jalisco. Se estimó el número de plantas enfermas (PE) y severidad SMAP (S) en 63 y 200 plantas/plantación mediante App-SIVEA para 2018 y 2019 respectivamente. Se desarrolló y aplicó el método CIFUSAG en 7055 hijuelos y 46 656 colonias fungosas obtenidas de 2364 siembras de lavado basal de la 'piña', secciones de tejido interno y macerado total de hijuelo. Unidades formadoras de colonia de *Fusarium* spp. (Fsp) y hongos totales (HT), purificación, monospóricos, caracterización morfológica y cultural se realizó con los medios Komada, agua-agar, Sabouraud, SNA y Sabouraud, respectivamente, diferenciando 557 aislados. La mayor inductividad epidémica en Los Altos significó moderado Índice de *Fusarium* [(IF) = (\sum Fsp) / (\sum HT)] (0.30 y 0.40) y Fsp (20 y 72UFC) respecto al Sur que tuvo valores más altos (0.69, 0.50; 23, 84UFC, respectivamente) (Tukey $p=0.05$). Calibre de hijuelo no tuvo influencia en IF y Fsp ($p=0.183$). IF y Fsp de lavado basal no estuvieron correlacionadas con S de plantas madres ($r^2 = 0.036$ y 0.13), mientras que PE únicamente se correlacionó con Fsp ($r^2 = 0.94$). La carga de inóculo obtenida por lavado fue superior al de tejido interno con un total de 17,828 UFC (93%) e IF=0.42. Análisis molecular con el gen EF-1a evidenció asociación de 23 cepas con cuatro complejos filogenéticos: *Fusarium oxysporum*, *F. fujikuroi*, *F. solani* y *F. incarnatum-equiseti* con identidad superior al 98%. El hijuelo comercial de *Agave tequilana* constituye un factor de dispersión de al menos cuatro especies de *Fusarium* spp. en el rango de 3.3 ± 3 y 6.83 ± 4.2 UFC/hijuelo.

Palabras clave: Agave azul, marchitez, pudrición seca, suelo, supresividad.

Forming Units (CFU) of *Fusarium* spp. (Fsp) and total fungi (HT), purification, monosporic, morphological and cultural characterization was made with Komada, water-agar, Sabouraud, SNA, and Sabouraud media, respectively, selecting 557 contrasting isolates. The highest epidemic inductivity in Los Altos was associated to moderate *Fusarium* Index [(FI) = (\sum Fsp) / (\sum HT)] (0.30 and 0.40) and Fsp (20 and 72 CFU) compared to South, which had higher values (0.69, 0.50; 23, 84 CFU, respectively) (Tukey $p=0.05$). The offset base-size had no influence on FI and Fsp ($p=0.183$). FI and Fsp of basal 'piña' washing were not correlated with S in mother plants ($r^2 = 0.036$ and 0.13), while PE only was correlated with Fsp ($r^2 = 0.94$). The inoculum load obtained by washing was higher than internal tissue with a total of 17,828 CFU (93%) and FI=0.42. Molecular analysis with the EF-1a gene showed an association of 23 isolates with four phylogenetic complexes: *Fusarium oxysporum*, *F. fujikuroi*, *F. solani* and *F. incarnatum-equiseti* with identity greater than 98%. Offsets of *Agave tequilana* constitutes a dispersal factor of at least four species of *Fusarium* spp. in the range of 3.3 ± 3 y 6.83 ± 4.2 CFU/offset.

Key words: Blue Agave, wilt, dry rot, soil, supresive.

Agave tequilana variety Blue is the raw material used to produce tequila. Mexico is the only tequila producer in the world and holds the Denomination of Origin of Tequila (DOT) since 1977. This beverage is also supported by NOM-006-SCFI-2012. Its DOT condition restricts the growing of *Agave tequilana* var. Blue for tequila production in five Mexican states, of which Jalisco represents 77% of the total production (SIAP, 2020; López-Bautista *et al.*, 2020; Coria-Contreras *et al.*, 2019). According to records of Mexico's Consejo Regulador del

El *Agave tequilana* variedad Azul, se utiliza como materia prima para la elaboración del tequila. México es el único productor de ésta bebida a nivel mundial, contando con la Denominación de Origen del Tequila (DOT) desde 1977. Esta bebida también se encuentra respaldada por la NOM-006-SCFI-2012. La condición DOT restringe la siembra de *Agave tequilana* var. Azul para producción de tequila en cinco estados del país, de los cuales Jalisco representa el 77% de producción total (SIAP, 2020; López-Bautista *et al.*, 2020; Coria-Contreras *et al.*, 2019). Acorde a datos del CRT, en 2018 y 2019, la superficie plantada de agave aumentó aproximadamente 31% implicando un máximo histórico de 96 millones de hijuelos plantados (3,200 hijuelos ha⁻¹), sin incluir hijuelos para restitución de hectáreas jimadas (CRT, 2020).

En la actualidad existe consenso empírico que el material propagativo de agave contribuye en la diseminación de plagas en general, entre las que se incluye *Fusarium* sp., agente de gran impacto productivo (SENASICA-DGSV, 2017; NOM-083-FITO-2003). Sin embargo, no existen estudios que demuestren en hijuelos de *A. tequilana* la asociación de *Fusarium* spp. ni la carga de inóculo que pueden diseminar y constituir un factor de riesgo para el establecimiento de nuevas plantaciones. Considerando la existencia de zonas con diferente nivel de inductividad y nivel de daño por el síndrome marchitez y pudrición seca del cogollo (SMAP) (López-Bautista *et al.*, 2020), y que algunos predios se emplean como plantaciones madre, con limitada o nula regulación, p.e. la certificación sanitaria genérica se realiza en Guanajuato, pero no en otros estados productores de la DOT, se justifican estudios etiológicos y epidemiológicos a nivel de planta madre-hijuelo con el fin de fortalecer y justificar el establecimiento de plantaciones certificadas para producir y comercializar hijuelos de bajo riesgo sanitario. A nivel de plantaciones comerciales

Tequila (CRT), in 2018 and 2019, the area planted with agave increased approximately 31%, which represents an all-time-record of 96 million of planted offsets (3,200 offsets ha⁻¹), not including offsets to replant harvested hectares (CRT, 2020).

At present, there is an empirical consensus that the agave propagative material contributes to pests dissemination, such as *Fusarium*, an agent of great productive impact (SENASICA-DGSV, 2017; NOM-083-FITO-2003). However, there are no studies to demonstrate, using *A. tequilana* offsets, that these are associated with *Fusarium* spp. nor the inoculum load that they can disseminate and become a risk factor for the establishment of new plantations. Considering the existence of areas with different levels of epidemic inductivity and damage caused by the wilt and dry bud rot syndrome (SMAP) (López-Bautista *et al.*, 2020), and that some plantations are used as mother plantings, with limited or null regulation, for example, the generic sanitary certification is carried out in Guanajuato, but not in any other producing states of DOT, etiological and epidemiological studies at mother plant-offset level are justified to strengthen and justify the establishment of certified plantations where low sanitary risk offsets can be produced and marketed. At commercial plantations of adult plants, which are commonly used as offset mother plants, López-Bautista and collaborators carried out a comprehensive regional study in Jalisco with emphasis on *Fusarium* species (López-Bautista *et al.*, 2020). In that study, agave wilt and dry bud rot were identified as a syndrome (SMAP) associated with a *Fusarium* species complex. These researchers reported a total of 16 binomial and phylogenetic species, plus six non-identified species isolated from soil, root and aerial tissue, which belong to four phylogenetic complexes: *Fusarium oxysporum* [FOSC], *F. solani* [FSSC], *F. fujikuroi* [FFSC] and *F. incarnatum-equiseti*

de plantas adultas, normalmente empleadas como plantas madre de hijuelos, López-Bautista y colaboradores realizaron un trabajo exhaustivo regional en Jalisco con énfasis en las especies de *Fusarium* (López-Bautista *et al.*, 2020). En este trabajo se identificó a la marchitez y pudrición seca del cogollo del agave como un síndrome (SMAP) asociado con un complejo de especies de *Fusarium*. Éstos investigadores reportaron un total de 16 especies binomiales y filogenéticas, y otras seis no identificadas aisladas de suelo, raíz y tejido aéreo pertenecientes a cuatro complejos filogenéticos: *Fusarium oxysporum* [FOSC], *F. solani* [FSSC], *F. fujikuroi* [FFSC] y *F. incarnatum-equiseti* [FIESC]. Al menos dos especies binomiales ya se habían reportado previamente: *F. oxysporum* y *F. solani* (Vega-Ramos *et al.*, 2013; Ramírez-Ramírez *et al.*, 2017).

La implicación de la sanidad de planta madre y la inductividad parasítica del suelo en la salud del hijuelo es importante para determinar estrategias de certificación y manejo de riesgos productivos regionales. La extensiva asociación de complejos de especies de *Fusarium* SMAP en plantaciones comerciales de *Agave tequilana* (López-Bautista *et al.*, 2020), permite postular como base racional del presente trabajo que la asociación diferencial cuantitativa y composicional de *Fusarium*, tanto en condición externa no parasítica, como en forma internalizada en tejidos de hijuelos de agave azul, está en función del tiempo de crecimiento del hijuelo y del nivel de inductividad epidémica regional en la cual estén establecidas las plantación madre. En este contexto, este trabajo se propuso con el objetivo de desarrollar y aplicar una metodología que permitiera establecer la asociación parasítica de *Fusarium* spp. con hijuelos de *A. tequilana* y estimar la carga de inóculo en función de regiones epidémicas inductivas SMAP en Jalisco y al estado de desarrollo del hijuelo al momento del corte con fines comerciales.

[FIESC]. At least two binomial species had been previously reported: *F. oxysporum* and *F. solani* (Vega-Ramos *et al.*, 2013; Ramírez-Ramírez *et al.*, 2017).

The implication of mother plant healthiness and the soil parasitic inductivity in the offset health is important to determine certification strategies and risk management of agave production at regional level. The extensive association of *Fusarium* species complexes with SMAP in commercial plantations of *Agave tequilana* (López-Bautista *et al.*, 2020) allows to postulate, as the rational basis of the present work, that the differential quantity and compositional association of *Fusarium*, both in a non-parasitic external condition and in an internalized form in tissues of blue agave offsets, is dependent upon the offset growth time as well as of the epidemic inductivity level in the region where mother plantations are established. In this context, the purpose of this study was to develop and apply a methodology to demonstrate the parasitic association of *Fusarium* spp. with *A. tequilana* offsets, and to estimate the inoculum load based on SMAP inductive epidemic regions in Jalisco and the status of the offsets development by the time they are cut for commercial purposes.

MATERIALS AND METHODS

Establishment of the experimental site in the field. Samples were collected from offsets for commercial use in 2018 and 2019 with nine and 12 commercial plantations of *A. tequilana* variety Blue between 3-4-years-old, respectively. The samples were collected in 14 municipalities distributed across the agave production regions of Los Altos, Valley, and South Jalisco. The plantations were selected based on the regional epidemic inductivity level represented by diseased plants or showing

MATERIALES Y MÉTODOS

Establecimiento del sitio experimental en campo. La colecta de muestras a partir de hijuelos para uso comercial se realizó en 2018 y 2019 con nueve y 12 plantaciones comerciales de *A. tequilana* variedad azul entre 3-4 años de edad, respectivamente. Las muestras se obtuvieron de 14 municipios, distribuidas en las regiones agaveras de Los Altos, Valles y Sur de Jalisco. Las plantaciones se seleccionaron con base al nivel de inductividad regional representado por plantas enfermas o sintomáticas a marchitez del agave en el ciclo epidémico 2017. Se utilizaron datos de la campaña contra plagas reglamentadas del agave de SENASICA y del Sistema Integral de Protección y Vigilancia Epidemiológica del Agave (SIVEA) (Cuadro 1).

Características de plantaciones madre. Las plantaciones madre se caracterizaron por edad de 3-4 años en periodo de arranque comercial de hijuelos según los criterios regionales aplicados por los productores, apariencia asintomática y manejo agronómico estándar consistente en aplicación de herbicidas (junio-julio), fertilización, “barbeo” (despunte de las hojas laterales para permitir el paso al surco) previo al corte de hijuelos, aporques en los primeros dos años y desquiete en plantaciones que lo presentaron.

Diseño experimental. El diseño experimental seleccionado para análisis de varianza fue un parcelas subdivididas en factorial 3x3x3 correspondiente a Altos, Valles y Sur, el factor región en parcela grande; inductividad alta, moderada y baja, del factor Intensidad epidémica de marchitez y pudrición seca, en parcela mediana; y tres calibres de hijuelos en parcela chica. Por región, las parcelas se seleccionaron con registros programados de arranque de hijuelos de empresas y productores cooperantes,

SMAP symptoms in the 2017 epidemic cycle. Data from SENASICA and Sistema Integral de Protección y Vigilancia Epidemiológica del Agave (SIVEA) campaign against agave regulated pests were used for that purposes (Table 1).

Mother plantation characteristics. Mother plantations were 3-4-year-old and offsets were commercially uprooting during the experiment development. These plantations conformed the regional criteria applied by producers including asymptomatic appearance and good standard agronomic management, which consists in the application of herbicides (June-July), fertilization, “trimming” (removal of side-leaf tips to access the rows) before offsets are cut, hillings in the first two years and removal of flower stalks when found.

Experiment design. The experiment design selected for the analysis of variance consisted in subdivided plots in factorial 3x3x3 that corresponded to Los Altos, Valley and South, the region factor in large plots; high, moderate, and low inductivity, the epidemic intensity factor of wilt and dry rot (SMAP) in medium-size plots; and three offset base-size in small plots. By region, the plantations were selected according to offset uproot scheduled records from cooperative companies and producers and based on their regional distribution to have two sites/inductivity/region available. Each plot was divided into three blocks with three rows each (3 m apart) with an approximated distribution in one hectare. Offsets for each base-size to obtain samples were taken from the site of field “temporary” harvest collection where offsets are stored after uprooting. In each plot, samples of the three base-size were collected: Lime, Orange, and Grapefruit (8-10, 10-12 and 12-15 cm in diameter of base-size or ‘piña’, respectively.) The total sample of 270 offsets plot⁻¹ was made up of 15

Cuadro 1. Localización y caracterización tecnológica de 21 plantaciones comerciales de *Agave tequilana* seleccionadas en 2018 y 2019 para estudios etiológicos y carga de inóculo de hijuelos asociado con el síndrome de marchitez y pudrición seca del cogollo de planta madre en Jalisco.**Table 1. Location and technological characterization of 21 commercial plantations of *Agave tequilana* with agave wilt and dry bud rot syndrome (SMAP) selected in 2018 and 2019 to study the etiology and inoculum load in commercial offsets.**

Año	Región	Inducti- vidad	Municipio	Latitud	Longitud	Altitud (msnm)	Tecnifi- cación	Manejo	ID Plantación	
2018	Altos	Alta	Atotonilco	20.51509	-102.6127	1556	Medio	Inorgánico	A-ATO-P4	
		Moderada	Jesús María	20.59527	-102.15688	2180	Medio	Inorgánico	A-JM-M2	
		Baja	Jesús María	20.76863	-102.14421	2279	Medio	Inorgánico	A-JM-M1	
	Sur	Baja	Juchitlán	Juchitlán	20.08979	-104.08275	1245	Alto	Inorgánico	S-JUC-PM6
			Juchitlán	Juchitlán	20.09765	-104.07422	1199	Alto	Inorgánico	S-JUC-PM7
			Juchitlán	Juchitlán	20.05530	-104.06809	1324	Alto	Inorgánico	S-JUC-PM8
	Valles	Moderada	Amatitán	Amatitán	20.83527	-103.66876	1224	Medio	Inorgánico	V-AMA-P9
			El Arenal	El Arenal	20.78533	-103.71006	1387	Medio	Inorgánico	V-ARE-PM4
		Baja	Amatitán	Amatitán	20.87292	-103.76204	1229	Medio	Inorgánico	V-AMA-PM5
2019	Altos	Alta	Zapotlanejo	Zapotlanejo	20.5677961	-102.891988	1856	Alto	Inorgánico	AZAP-A01
			Arandas	Arandas	20.6467737	-102.273707	2078	Alto	Inorgánico	AARA-A02
		Moderada	Tepatitlán	Tepatitlán	20.8714019	-102.685529	1979	Medio	Inorgánico	Atep-M01
			Jesús María	Jesús María	20.5994848	-102.15713	2186	Alto	Inorgánico	AJM-M02
	Baja	Ixtlahuacan del río	Ixtlahuacan del río	21.0554448	-103.192341	1674	Alto	Inorgánico	AIXT-B01	
		Cañadas de Obregón	Cañadas de Obregón	21.1631611	-102.675379	1829	Bajo	Orgánico	ACDO-B02	
	Sur	Alta	Pihuamo	Pihuamo	19.1997579	-103.426473	707	Medio	Inorgánico	SPIH-A01
			Pihuamo	Pihuamo	19.2114215	-103.481563	655	Medio	Inorgánico	SPIH-A02
		Moderada	Juchitlan	Juchitlan	20.1064934	-104.061595	1190	Medio	Inorgánico	SJUC-M01
			Pihuamo	Pihuamo	19.2475873	-103.430513	681	Medio	Inorgánico	SPIH-M02
Baja		Tecolotlán	Tecolotlán	20.1694819	-104.042434	1177	Medio	Orgánico	STEC-B01	
		Tuxcacuesco	Tuxcacuesco	19.7303572	-103.906454	927	Alto	Inorgánico	STUX-B02	

y con base en su distribución regional para contar con dos sitios/inductividad/región. Cada parcela se dividió en tres bloques separados por tres surcos (3 m de distancia), con representatividad aproximada de una hectárea. La muestra de hijuelos por tipo de calibre para toma de muestra se realizó de los sitios de acopio “temporal” parcelario donde se acomodan después arrancados. En cada parcela se colectaron muestras de los tres tamaños de calibre de hijuelos: Lima, Naranja y Toronja (8-10, 10-12 y 12-15 cm de diámetro de piña, respectivamente).

offsets per base-size in two replications per block. In 2018, three composite samples per base-size/block were selected, and two samples only in 2019, mainly in Los Altos and South regions, to widen the internalization sampling. Per plot, for external tissue samples from the 2018 production cycle, 27 samples/plot were obtained for a total of 243 total composite samples, and in 2019, 18 samples/plot for a total of 216 samples. For internal tissue samples, in 2018, 30 offsets were collected in a high-inductivity plot in Los Altos, and in 2019, 140

La muestra total de 270 hijuelos parcela¹ estuvo constituida de 15 hijuelos por calibre en dos repeticiones por bloque. En 2018, se seleccionaron tres muestras compuestas por calibre/bloque y en 2019 únicamente dos muestras principalmente en la región Los Altos y Sur para ampliar el muestreo de internalización. Por parcela, en tejido externo del ciclo productivo 2018 se obtuvieron 27 muestras/parcela para un total de 243 muestras compuestas totales; y en 2019, 18 muestras/parcela para un total de 216 muestras. En tejido interno en 2018, se colectaron 30 hijuelos de una parcela de alta inductividad en Los Altos, y en 2019 se colectaron 140 hijuelos (20 por predio), 120 de Los Altos y 20 de una parcela de baja inductividad en la región Sur.

Método CIFUSAG para obtención de lavados basales. Para seleccionar los hijuelos con base a su tamaño correcto de calibre se usaron aros metálicos con diámetros correspondientes a cada calibre; Lima 10 cm, Naranja 12 cm y Toronja 14 cm. Se realizó un lavado del cuello y base de las hojas de todos los hijuelos de la muestra compuesta. El lavado se realizó en una cubeta plástica de 15 L, con 1 L de agua desmineralizada estéril. Los hijuelos se sumergieron parcialmente y se tallaron con un cepillo plástico para desprender la mayor cantidad de suelo adherido. Una vez obtenido el lavado éste se agitó con un taladro modificado para homogenizar la muestra y con una malla plástica (abertura 2x2 mm) se filtró a otro recipiente de 2 L. El filtrado se dejó reposar durante 10-15 min para eliminar el excedente de agua y recuperar el suelo en tubos Falcon estériles de 50 mL (Figura 1 A1-A8). Las muestras se transportaron a laboratorio en hieleras con geles refrigerantes para conservación de temperatura y realizar su secado inmediato. La Figura 1 explica la metodología CIFUSAG. La descripción de literales y numerales (A1-E5) se indica a continuación: (A1) Distribución de hijuelos

offsets (20 per plot), 120 in Los Altos, and 20 in a low-inductivity plot in the South region.

CIFUSAG method to obtain basal washings. To select offsets based on their base-size, metallic rings with diameters were used: Lime 10 cm, Orange 12 cm and Grapefruit 14 cm. The base (neck) and leaf base per offset of the composite sample were washed. This was done with sterile demineralized water in a 15 L plastic bucket. The offsets were partially submerged and scrubbed with a plastic brush to remove as much adhered soil as possible. Once the wash liquid was obtained, it was agitated with a modified drill to homogenize the sample, and then filtered to another 2 L container with a plastic mesh (2x2 mm opening). The filtrate was left stand for 10-15 min to remove water excess and recover the soil in 50 mL sterile Falcon tubes (Figure 1 A1-A8). The samples were taken to the laboratory in coolers with cooling gels to maintain the temperature and dry them immediately. Figure 1 explains the CIFUSAG methodology: (A1) Offsets distribution in the field. (A2) Composite sample of 15 offsets for Lime, Orange, and Grapefruit base-size. (A3) 1L of sterile demineralized water. (A4) Offset basal washig. (A5) Modified drill. (A6) Sedimentation for 10-15min of washing. (A7) Removal of excess water and collection of solid phase. (A8) Sample of basal external tissue (whasing) in 50 mL sterile Falcon tubes. (B1) Sample of 20 Orange base-size offsets. (B2) Cut of leaves. (B3) Individual washing with soap and tap water to remove residues. (B4) Offset drying. (B5) Removal of external tissue. (B6) Individual cut of offsets. (C1) Scheme of the internal tissue selected per offset. (C2) Selection of tissue for direct *in vitro* medium-plated. (D1) Offset remaining tissue in disinfection process. (D2) Tissue maceration at 3000 rpm for 30s. (D3) Tissue of macerated offset. (D4) Bagasse filtering using plastic mesh. (D5) 50 ml homogeneous sample in a sterile Falcon tube. (E1)

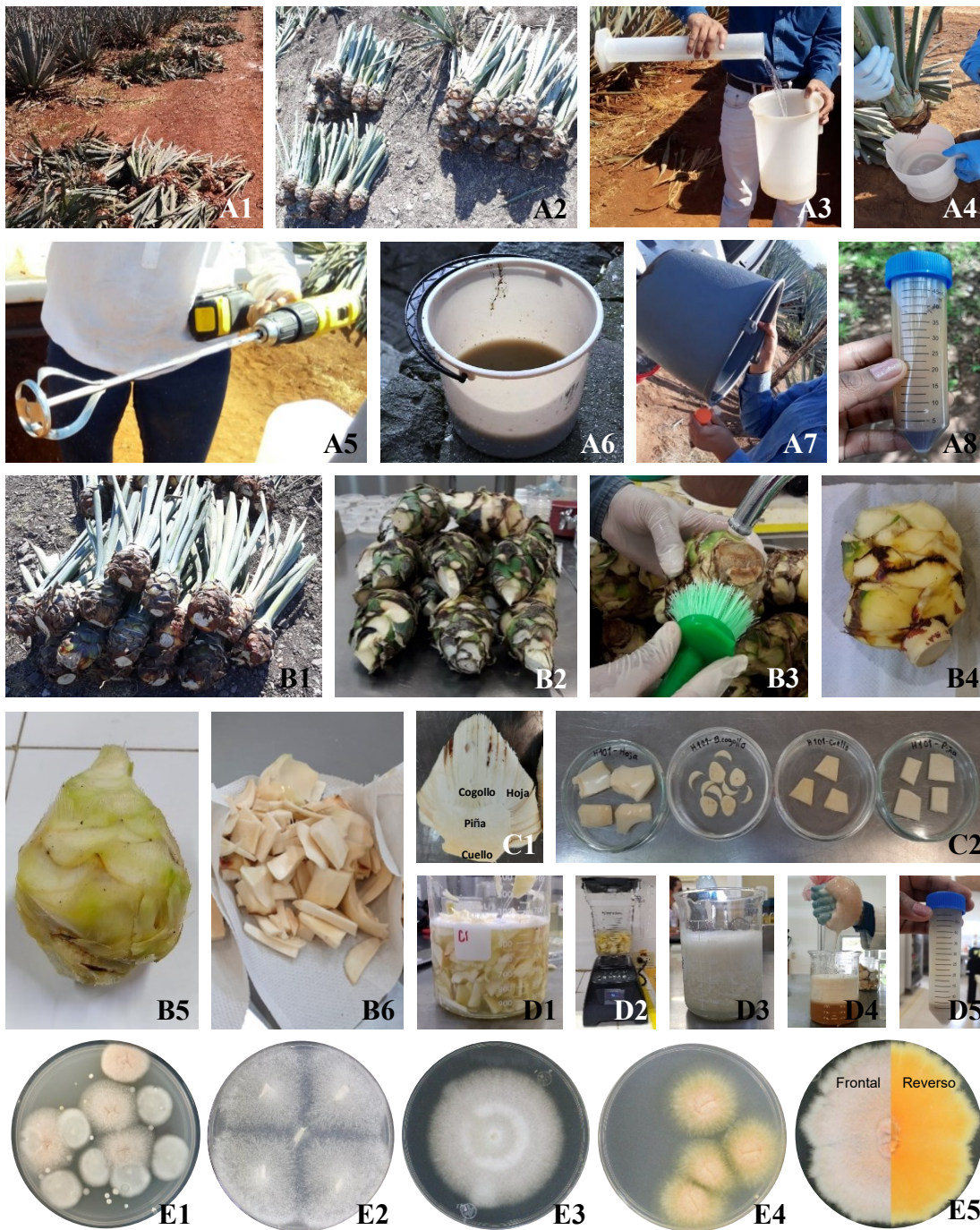


Figura 1. Método CIFUSAG para el procesamiento de toma de muestras de hijuelos de plantas madre de *Agave tequilana* para tejido externo basal (lavado) (A), tejido interno (B y C), tejido macerado (B y D) y metodología de laboratorio (E). La explicación de literales y numerales (A1-E5) se indica en la sección Método CIFUSAG para obtención de lavados basales (Páginas 7 y 9).

Figure 1. CIFUSAG method to collect samples of *Agave tequilana* mother plants for basal external tissue (A), internal tissue (B and C), macerated tissue (B and D) and laboratory methodology (E). Letters and numerals explanation can be found in CIFUSAG method to obtain basal washings (Pages 7 and 9).

en campo. (A2) Muestra compuesta de 15 hijuelos para calibre Lima, Naranja y Toronja. (A3) 1L de agua desmineralizada estéril. (A4) Lavado basal del hijuelo. (A5) Taladro modificado. (A6) Lavado en reposo 10-15min. (A7) Eliminación de agua excedente y recolección de material sólido. (A8) Muestra de tejido externo basal en tubo Falcon estéril de 50mL. (B1) Muestra de 20 hijuelos calibre Naranja. (B2) Corte de hojas del cogollo alto. (B3) Lavado individual con jabón y agua del grifo para eliminación de residuos. (B4) Secado del hijuelo. (B5) Eliminación de tejido externo. (B6) Corte individual de hijuelos. (C1) Esquematación de tipos de tejido interno en hijuelo. (C2) Selección de tejido para siembras directas. (D1) Tejido restante del hijuelo en proceso de desinfestación. (D2) Macerado de tejido a 3000 rpm. durante 30s. (D3) Tejido de hijuelo macerado. (D4) Filtrado de bagazo con malla plástica. (D5) Muestra homogénea de 50ml en Tubo Falcon estéril. (E1) Siembra de tejido externo en medio Komada. (E2) Siembra de tejido interno. (E3) Cepa en purificación en agua-agar. (E4) Monospórico y (E5) Caracterización en medio Sabouraud.

Selección de hijuelos para estudios de internalización y carga de inóculo interno (CII). En adición a las muestras de tejido externo, en 2018 se colectaron 30 hijuelos distribuidos en calibre Lima, Naranja y Toronja de un predio de alta inductividad para estudios de internalización y en 2019 se seleccionaron hijuelos para disección individual y obtención de aislamientos de tejido interno. De las 12 parcelas totales, se seleccionaron seis de Los Altos, dos por cada nivel de inductividad (alta, moderada y baja inductividad) y una de Sur (baja inductividad). Por parcela, se seleccionaron 20 hijuelos de tamaño Naranja distribuidos en los tres bloques del diseño experimental (Figura 1 B1). En total se colectaron y procesaron 140 hijuelos los cuales

External tissue in Komada medium. (E2) Internal tissue in culture medium. (E3) Purification of isolates in water-agar. (E4) Monosporic culture (E5) and Culture characterization in Sabouraud medium.

Offset selection for internalization and internal inoculum load studies (IIL). In addition to the external tissue samples, 30 offsets were collected in 2018 from a high-inductivity plot for internalization studies distributed in Lime, Orange, and Grapefruit base-sizes. In 2019, offsets were also selected for individual dissection and collection of internal tissue isolates: Of the 12 total plantations, six from Los Altos were selected, two per inductivity level (high, moderate, and low inductivity) and one from the South region (low inductivity). Per plot, 20 Orange-size offsets were selected and distributed in the three experiment design blocks (Figure 1B1). A total of 140 offsets were collected and processed, and then used to obtain different internal tissue (neck, piña, and leaves and bud base), the rest of the tissue was macerated to evaluate the total internal inoculum load.

Mother plants evaluation. To estimate the commercial plantations phytosanitary status, the phytosanitary mother plants condition at the sampling and collection offsets plot was evaluated using the diagrammatic scale proposed by Jiménez-González *et. al.* (2017) (Figure 1B-C) and the sampling system (<3 ha) proposed by SIVEA.

The *in situ* evaluation was performed with App-SIVEA v4.1 (Guzmán-Hernández *et al.*, 2017). The sampling started with the third plant of each row to prevent edge effects. In 2018, 63 plants/plots were evaluated divided in three rows, one per block, with 21 plants each. In 2019, 20 quadrants divided in the three experiment blocks were evaluated using 20 continuous plants for each one, which totaled 200

se utilizaron para obtener diferente tejido interno (cuello, piña, base de las hojas y base del cogollo), el tejido restante, se maceró para evaluar carga de inóculo interno total.

Evaluación de plantas madre. Con la finalidad de registrar el estatus fitosanitario de plantaciones comerciales en la parcela de muestreo y colecta de hijuelos se evaluó la condición fitosanitaria de plantas madre mediante la escala diagramática propuesta por Jiménez-González y colaboradores (2017) (Figura 1B-C) con el sistema de muestreo (<3 ha) propuesto por SIVEA.

La evaluación *in situ* se realizó con App-SIVEA v4.1 (Guzmán-Hernández *et al.*, 2017). El muestreo comenzó a partir de la tercera planta de cada surco para evitar efecto orilla. En 2018 se evaluaron 63 plantas/parcela, divididos en tres surcos, uno por bloque, con 21 plantas cada uno. En 2019 se evaluaron 10 cuadrantes distribuidos en los tres bloques del experimento, con 20 plantas continuas por cada uno, dando un total de 200 plantas evaluadas por plantación para marchitez del agave y pudrición seca del cogollo (Figura 1A). Los datos se enviaron en tiempo-real a la plataforma www.sivea.org.mx desde los módulos respectivos de App-SIVEA, posteriormente se realizó la descarga de la matriz epidemiológica para análisis.

Procesamiento en Laboratorio. Secado de muestras de tejido externo. Las muestras colocadas en tubos Falcon tuvieron un periodo de 8-48 h para su traslado al laboratorio debido a las distancias de los predios para toma de muestra. Durante este tiempo se mantuvieron en hieleras con geles refrigerantes. Una vez en laboratorio se mantuvieron en refrigeración a 4 °C por 6-8 h para dejar precipitar la muestra y eliminar el exceso de agua. Posteriormente, las muestras se colocaron sobre toallas interdoblas (Sanitas®) estériles por 12 h en una

evaluated plants per plantation for agave wilt and dry bud rot (SMAP) (Figure 1A). The data were sent in real time to the platform www.sivea.org.mx from the corresponding App-SIVEA modules and then the epidemiological matrix data was downloaded for analysis.

Laboratory Processing: Drying of external tissue samples. The samples placed in Falcon tubes arrived to the laboratory after a 8-48 h period because of the distance from the plantations where the samples were taken. During the transportation time, samples were kept in coolers with cooling gels. Once in the laboratory, they were refrigerated at 4 °C for 6-8 h for further precipitation and removal of water excess. Then, the samples were placed on sterile interfolded paper towels (Sanitas®) for 12 h in a laminar flow chamber for dried-out (Figure 1 B2-B4).

External tissue cultivation. Once the samples were dried-out, a mother dilution was prepared in 15 mL Falcon tubes using 1 g in 9 mL (1:9 ratio) of sterile demineralized water. After 15 min left standing, the mixture was manually homogenized for 1 min and diluted at $1 \times 10^{0.5}$. For that 1 mL of the mother dilution and 1 ml of sterile water were mixed to optimize colony counting. Using a Drigalsky spatula, an aliquot of 0.1 mL was distributed in a Petri dish plate containing Komada medium (Leslie and Summerell, 2006) (Figure 1 E1). The plates were left at room temperature for seven days for counting of colonies of *Fusarium* spp. and total fungi.

Isolation of internal and macerated tissue for III. The 140 Orange base-size offsets were washed in the laboratory to remove as much soil from the outside as possible. Using a machete deep cleaned with sodium hypochlorite (3%) and alcohol (70%),

cámara de flujo laminar para su secado (Figura 1 B2-B4).

Siembra de tejido externo. Con la muestra seca, se realizó una dilución madre utilizando 1 g en 9 mL de agua desmineralizada estéril (proporción 1:9) en tubos Falcon de 15 mL. Después de un reposo de 15 min, la mezcla se homogenizó por 1 min de manera manual y se realizó una dilución $1 \times 10^{0.5}$, donde se utilizó 1 mL de la dilución madre y 1 mL de agua estéril, a fin de optimizar el conteo de colonias. Mediante una espátula Drigalsky se distribuyó una alícuota de 0.1 mL en cajas de Petri con medio Komada (Leslie y Summerell, 2006) (Figura 1 E1). Las muestras crecieron durante siete días para realizar los conteos de colonias de *Fusarium* spp. y hongos totales.

Aislamiento de tejido interno y macerado para CII. Los 140 hijuelos tamaño Naranja colectados se lavaron en laboratorio para eliminar la mayor cantidad de suelo del exterior. Con un machete rambo desinfectado con hipoclorito de sodio (3%) y alcohol (70%) se eliminó el exterior del hijuelo hasta dejar solo tejido interno (piña blanca) (Figura 1 B5). El tejido interno se dividió en trozos con la finalidad de separar muestras de cuello, piña, base de hoja y base de cogollo (Figura 1 B6). De cada tipo de tejido se cortaron 25 trozos de 0.5x0.5 cm para siembras directas. Estos, se desinfectaron en la campana de flujo laminar con hipoclorito (3%) seguido de alcohol (70%) por dos minutos cada uno, finalmente se realizaron dos enjuagues de dos minutos con agua desmineralizada estéril (Figura 1 C2). Los trozos de tejido se colocaron sobre toallas interdobradas durante 24 h para su secado con la finalidad de reducir crecimiento bacteriano. El resto de tejido interno se desinfectó en vasos de precipitado bajo el procedimiento previo para posteriormente macerarlo. Este proceso se realizó por cada hijuelo trabajado.

the external parts of the offset was removed until only internal tissue (white 'piña') was left (Figure 1 B5). The internal tissue was divided in pieces to take samples of neck, 'piña', leave-base and bud-base (Figure 1 B6). Per type of tissue, 25 pieces of 0.5x0.5 cm were cut for direct medium plating. These pieces were disinfested in the laminar flow chamber with hypochlorite (3%), followed by alcohol (70%) for two minutes each, and, finally, rinsed twice with sterile demineralized water (Figure 1 C2). The tissue pieces were placed on interfolded paper towels for 24 h for dry out to reduce bacterial growth. The rest of internal tissue was disinfested in beakers using the previously mentioned procedure to be later macerated. This process was performed independently per each offset.

For maceration, an industrial blender was used (Blendtec®, model TB-621-26) at 3000 rpm for 30 s. The macerated was poured in a beaker using a plastic mesh (0.5 x 0.5 cm opening) to remove bagasse, and a 50 mL sample was taken in sterile Falcon tubes. The samples were left to sediment for approximately 2-3 h to obtain supernatant (Figure 1 D1-D5). This was selected over the solid phase due to the abundant colonies growth in preliminary tests.

Five pieces of each type of tissue (neck, 'piña', and leave-base and bud-base) were placed independently in Petri dishes containing Komada medium (Leslie and Summerell, 2006). Similarly, 100 µL of the supernatant obtained from maceration were distributed in Petri dishes with Komada medium. A total of five Petri dishes per offset were obtained (four of tissues and one of supernatant) (Halfeld-Vieria and Nechet, 2005). The Petri dishes were incubated at room temperature for seven days and then Colony Forming Units (CFU) were counted and the *Fusarium* index was estimated (López-Bautista *et al.*, 2020)..

El macerado se realizó en una licuadora industrial (Blendtec®, modelo TB-621-26) a 3 mil revoluciones durante 30 s. El macerado se vertió en un vaso de precipitado a través de una malla plástica (abertura 0.5 x 0.5 cm) con la finalidad de eliminar el bagazo, se homogenizó y se tomó una muestra de 50 mL en tubos Falcon estériles. Las muestras reposaron durante 2-3 h aproximadamente, para obtener el sobrenadante (Figura 1 D1-D5). Este último se eligió debido a que presentó el mayor crecimiento de colonias en pruebas preliminares, en las cuales también se probó bagazo y precipitado de la muestra homogénea.

En diferentes cajas de Petri con medio de cultivo Komada, se sembraron cinco trozos de cada tipo de tejido (cuello, piña, base de las hojas y base del cogollo) (Leslie y Summerell, 2006). Similarmente, 100 µL del sobrenadante resultado del macerado, se distribuyeron en caja de Petri con medio Komada. En total se obtuvieron cinco cajas de Petri por hijuelo (cuatro de tejido y uno de sobrenadante) (Halfeld-Vieria y Nechet, 2005). Las siembras se incubaron a temperatura ambiente por siete días y posteriormente se realizó el conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) y se calculó el índice de *Fusarium* (López-Bautista *et al.*, 2020).

Extracción de ADN, PCR y análisis filogenético.

Se empleó el gen EF-1a, previamente identificados por su consistencia con especies de *Fusarium* en agave azul y otros sistemas (O'Donnell *et al.*, 2015; López-Bautista *et al.*, 2020). La extracción se realizó con el protocolo AP modificado (SDS 1%) (Green y Sambrook, 2012). Se cuantificó y determinó la calidad del ADN por espectrofotometría con Nano Drop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA), posteriormente se ajustó a 40 ng µL⁻¹. Para PCR el volumen final del mix de reacción fue de 25 µL [1X de buffer de PCR (10X), 1.6 mM de MgCl₂, 0.16 mM de desoxinucleótidos trifosfato

DNA extraction, PCR, and phylogenetic analysis.

The EF-1a gene was used for DNA extraction; this gene has been previously identified because of its consistency with *Fusarium* species in blue agave and other systems (O'Donnell *et al.*, 2015; López-Bautista *et al.*, 2020). Extraction was carried out following the AP protocol with modifications (SDS 1%) (Green and Sambrook, 2012). The DNA quality was quantified and determined using a Nano Drop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA), which was previously adjusted to 40 ng µL⁻¹. For PCR, the final volume of the reaction mixture was of 25 µL [1X of PCR buffer (10X), 1.6 mM of MgCl₂, 0.16 mM of deoxynucleotide triphosphates (dNTPs), 200 nM of each primer, EF1* (5'-ATG GGT AAG GAR GAV AAG AC) / EF2* (5'-GGA DGT ACC AGT RAT CAT G), 0.5 U of Platinum® *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), and 2.5 µl of DNA (40 ng µL⁻¹). A T-100 thermocycler from BioRad was used. The thermocycler program consisted in an initial denaturation at 94 °C for 5 min and 30 denaturation cycles at 94 °C for 30 s, alignments at 58 °C for 40 s, extension at 72 °C for 55 s and a final extension at 72 °C for 7 min. The amplified fragments were analyzed in 1.5% agarose gel and TBE 1X. Each gel deposit was loaded with 4 µL of the PCR product and 4 µL of load buffer (PROMEGA). The molecular weight marker (MMP) 1KB plus from Invitrogen was used with 1.5 µL+4 µL buffer. Bands of 760 bp were visualized with ethidium bromide and UV light. The corresponding PCR product was sequenced by Macrogen Inc. from Korea.

The amplicon sequences were edited with the SeqAssem program (v07/2008) and blasted at the GenBank for preliminary identification and to obtain reference sequences for phylogenetic analyses. For alignments, the MEGA X program (v10.1.8) was used with the ClustalW algorithm. The phylogenetic relation was established using the *maximum likelihood* model of the General Time

(dNTP's), 200 nM de cada iniciador, EF1* (5'-ATG GGT AAG GAR GAV AAG AC) / EF2* (5'-GGA DGT ACC AGT RAT CAT G), 0.5 U de Platinum® *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen) y 2.5 µl de ADN (40 ng µL⁻¹). Se utilizó el termociclador T-100 de BioRad. El programa de termociclaje consistió en: desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min y 30 ciclos con desnaturalización a 94 °C por 30 s, alineamiento a 58 °C por 40 s, extensión a 72 °C por 55 s y una extensión final de 72 °C por 7 min. Los fragmentos amplificados se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y TBE 1X. Cada depósito del gel se cargó con 4 µL del producto de PCR y 4 µL de buffer de carga (PROMEGA). Se usó el marcador de peso molecular (MMP) 1KB plus de Invitrogen con 1.5 µL+4 µL buffer. Las bandas de 760 pb se visualizaron con bromuro de etidio y luz UV. El producto de PCR respectivo se secuenció con el servicio comercial de Macrogen Inc., Korea.

Las secuencias de los aislados se editaron en el programa SeqAssem (v07/2008) y se blastearon en GenBank para una identificación previa y la obtención de secuencias de referencia para análisis filogenético. En el programa MEGA X (v10.1.8) se realizaron los alineamientos utilizando el algoritmo ClustalW. Se construyó la relación filogenética con el modelo de *máxima verosimilitud* del *General Time Reversible Model (GTR) + Gama Distributed With Invariant (G+I)* con 1000 repeticiones *Bootstrap*.

RESULTADOS

Validación del método de muestreo. El método CIFUSAG se validó con diferentes herramientas y métodos en 2018 para estandarización del proceso descrito en la Figura 2. La revisión exhaustiva sugiere que en la actualidad, no existen trabajos re-

versible Model (GTR) + Gama Distributed With Invariant (G+I) with 1000 Bootstrap replications.

RESULTS

Validation of the sampling method. The CIFUSAG method was validated with different tools and methods in 2018 to standardize the process described in Figure 2. A thorough review suggests that, up until now, there are no reports of studies of agave or similar crops to quantify *Fusarium* spp. in propagating material, such as offsets, corms or bulbs. For external washing in the field, the use of brushes helped remove most of the soil and tissue adhered to the offset base, which includes the neck and leaves base; the modified drill added with a paint-mixture tool was also a useful method in sites where sandy soils prevail and the obtained sample was limited to 5-15 g of soil, unlike plantations with clay soils where up to 30 g of soil were collected. The CFU per plate reached an average of 129 total fungi colonies (Min=3, Máx=422) and six *Fusarium* colonies (Min=0, Máx=269).

Washing and removal the external green tissue of 'piñas' for the internal tissue and macerated processing in the laboratory prevent contamination and ensure that only internalized organisms are grown. In addition, maceration and mother dilution used for plating to obtain IIL ensured a greater number of CFU of total fungi (TF) (4 617), of which 22.5% (1 038) belonged to *Fusarium* spp. Colonies (Fsp). Thus CIFUSAG allowed CFU of TF and Fsp, enabling their analysis for management and control of this and other pathogenic organisms present in the crop.

Colony forming units by region in external tissue. The analysis of subdivided plots did not show effects on the large-intermediate and small plot interaction (Tukey $p>0.05$) and, therefore, they

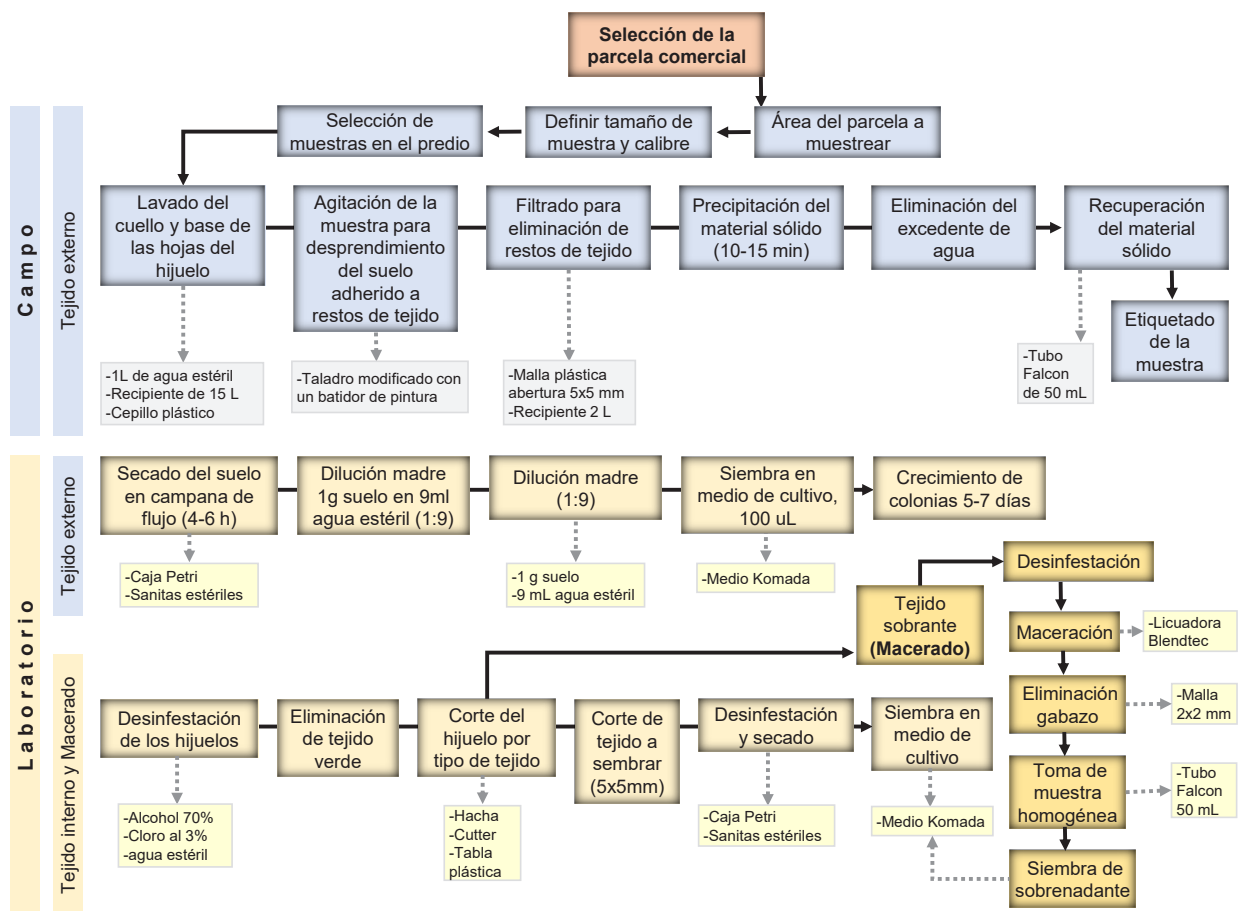


Figura 2. Esquemización del método CIFUSAG desarrollado para estimar carga de inóculo de *Fusarium* spp. a partir de hijuelos de *A. tequilana* con fases de campo y laboratorio. Las muestras incluyeron lavado basal, secciones de tejido interno y macerado total del hijuelo.

Figure 2. Scheme of the CIFUSAG method developed to estimate the *Fusarium* spp. inoculum load using *A. tequilana* offsets with field and laboratory phases. Samples included basal washing, internal tissue sections and total maceration of the offset.

portados en agave o cultivos similares que permita la cuantificación de *Fusarium* spp. en estructuras propagativas como hijuelos, cormos, bulbos u otros mediante métodos análogos. En lavado externo en campo el uso de cepillos permitió mayor desprendimiento del suelo y tejido adherido a la base del hijuelo conformado por el cuello y base de las hojas, así como el taladro modificado con un mezclador de pintura, resultaron un método útil para zonas con suelos arenosos donde la muestra obtenida es solamente de 5-15 g de suelo, contrastante

were individually analyzed. Overall, the *Fusarium* index $[(FI) = (\sum F_{sp}) / (\sum HT)]$ showed differences by region and year. At regional level, in 2018 and 2019, the South region had lower epidemic inductivity level compared to the other regions, but its IF was statistically higher (0.5-0.7) compared to that of Los Altos (0.3-0.4) and Valley regions (0.2) (Tukey $p < 0.05$) (Figure 3A).

In external tissue, the *Fusarium* CFU was statistically different ($p < 0.05$) *inter*-regions for 2018, but not in 2019, despite the double of CFU

con predios arcillosos donde alcanzó los 30 g. Las UFC de éstas muestras alcanzaron un promedio de 129 (Min=3, Máx=422) colonias de hongos totales por siembra y *Fusarium* en seis colonias (Min=0, Máx=269) promedio.

En tejido interno y macerado en laboratorio el lavado y eliminación del tejido verde externo de la piña del hijuelo evita contaminaciones y asegura la siembra de únicamente organismos internalizados. Además, la maceración y siembra de dilución madre para la obtención de CII aseguró un alto número de UFC de HT (4 617) de los cuales el 22.5% (1 038) perteneció a colonias de *Fusarium* spp. Conclusivamente el método CIFUSAG asegura altos crecimientos de HT y UFC de Fsp, permitiendo realizar análisis para el manejo y control adecuado de éste u otros organismos patógenos presente en el cultivo.

Comportamiento de unidades formadoras de colonias por región en tejido externo. El análisis de parcelas subdivididas no mostró efectos en la interacción de parcela grande, mediana y chica (Tukey $p>0.05$), por lo que se analizaron de forma independiente. En general el índice de *Fusarium* [(IF) = $(\sum F_{sp}) / (\sum HT)$] presentó diferencia por región y año. A nivel regional en 2018-2019 Sur reporta nivel de inductividad más bajo con respecto a otras regiones, sin embargo, el IF fue estadísticamente mayor (0.5-0.7) respecto a Los Altos (0.3-0.4) y Valles (0.2) (Tukey $p<0.05$) (Figura 3A).

En tejido externo, UFC *Fusarium* fue estadísticamente diferente ($p<0.05$) *inter*-regiones para 2018, pero no así en 2019 a pesar que contabilizó el doble de UFC para las dos regiones (Figura 3B). Las plantas enfermas en 2018 reportaron menos de cinco plantas enfermas promedio por parcela comercial y 2019 entre 15-20 plantas con marchitez (Figura 3C). Por su parte, el porcentaje de severidad en planta de 2018 fue de 4.0-19.32%

obtaind in the two regions (Figure 3B). The diseased plants in 2018 were less than five, in average, per assessed plot whereas in 2019, 15-20 plants showed SMAP with predominance of wilt symptoms (Figure 3C). The range percent of plant disease severity was 4.0-19.32% in 2018 being statistically different in Los Altos compared to that of the South and Valley regions ($p<0.05$), while in 2019 the disease severity ranged 29-31% in Los Altos and South regions with not statistical difference (Figure 3D).

Overall, the analyses of variance did not show significant interaction effects of base-size offset with region in 2018 and 2019 for CFU and *Fusarium* index (FI) ($p>0.05$) (Figure 4B, C and D), but there were differences in CFU of other fungi ($p<0.05$), mainly in offset samples collected in 2019, where Grapefruit base-size had the greatest average of CFU (107.1) (Figure 4A).

These results suggest that there is a significant diversity in the amount of fungi per region and base-size offsets. Although the pathogenic capacity per regional epidemic inductivity was not known in *Fusarium*, through the analysis conducted it can be inferred that there is a higher risk when offsets are mobilized.

Colony forming units per region in internal and macerated tissue. Initial preliminary tests were done for macerated tissue. The results showed that the supernatant, from a homogeneous sample, had the greatest amount of CFU of total fungi and *Fusarium*, especially in selective culture medium, with 62% of total colonies. The CFUs were greater in plantation with moderate inductivity in Tepatitlán, with a total counting of 378 ($min=0$, $máx= 42$, $std=59.5$ / plate), followed by Zapotlanejo with 206 ($min=0$, $máx= 32$, $std=31.2$ / plate). The plantation with lower inductivity in the South region, corresponding to Tuxcacuesco, was

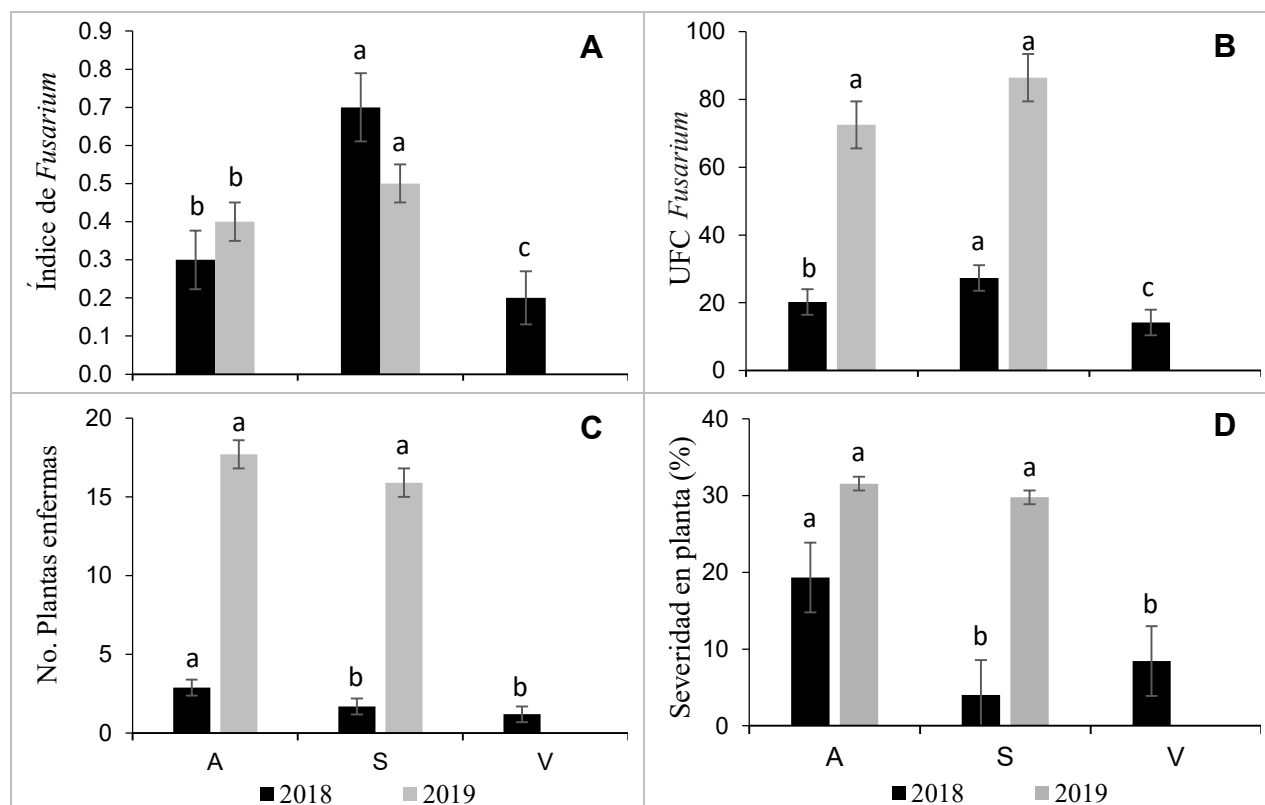


Figura 3. Carga de inóculo de *Fusarium* spp. en tejido externo (lavado) de hijuelos, número de plantas enfermas y severidad de planta madre con síndrome de marchitez y pudrición seca del cogollo en Los Altos (A), Sur (S) y Valles (V) de Jalisco en 2018 y 2019. A) índice de *Fusarium* spp., B) Unidades formadoras de colonias de *Fusarium* spp. C) Plantas enfermas, D) Porcentaje de severidad en planta. Al menos una letra en común por año son estadísticamente iguales (Tukey $p < 0.05$).

Figure 3. *Fusarium* spp. inoculum load in offsets external tissue (washing), number of infected plants and severity in mother plants with wilt and dry bud rot syndrome in Los Altos (A), South (S) and Vally regions (V) of Jalisco in 2018 and 2019. A) *Fusarium* spp. Index; B) *Fusarium* spp. colony forming units; C) Infected plants; D) Percent of disease severity in plants. At least one letter in common per year is statistically equal (Tukey $p < 0.05$).

y estadísticamente diferente principalmente en Altos respecto a Sur y Valles ($p < 0.05$); mientras que en 2019 con severidad de 29-31% Altos y Sur no fueron diferentes (Figura 3D).

En general los análisis varianza no mostraron efecto de interacción calibre+región en 2018 y 2019 para UFC e índice de *Fusarium* ($p > 0.05$) (Figura 4B, C y D), pero si presentó diferencias en UFC de otros hongos ($p < 0.05$) principalmente para muestras de hijuelo de 2019, siendo calibre Toronja el tamaño con promedio mayor UFC de otros hongos (107.1) (Figura 4A).

ranked third regarding *Fusarium* CFU with 188 total counting ($min=0$, $máx=37$, $std=61.8$ / plate). The samples of Cañadas de Obregón plantation, with lower inductivity, in did not produced *Fusarium* colonies, a fact that could be attributed to the seasonal climatic conditions, where frosts were registered during the experiment. The offset weight, which was of 158 g in average, the lowest of all the plantations in Los Altos region, could also support the effect of the cold stress.

The *Fusarium* inoculum load in internal tissue compared to the inoculum load in external tissue

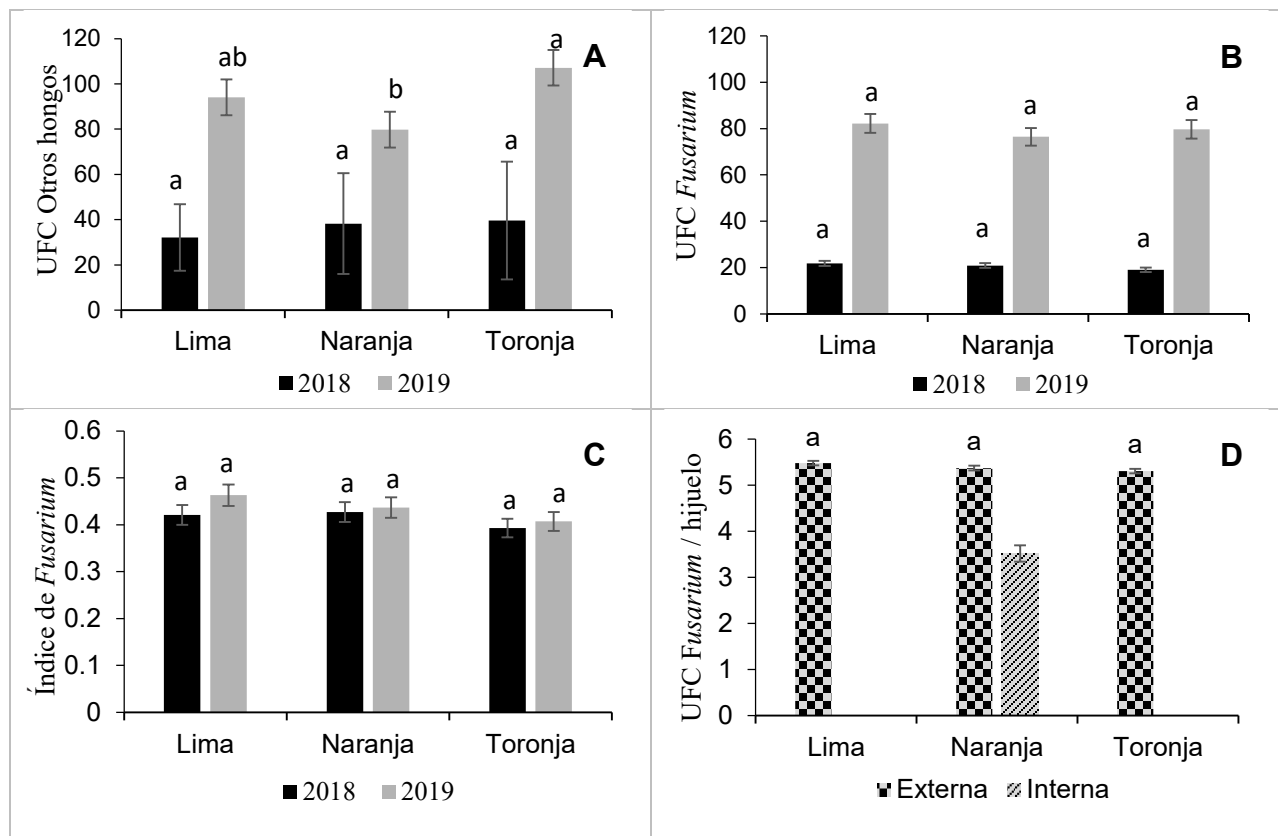


Figura 4. Carga de inóculo por calibre Lima, Naranja y Toronja de hijuelos de agave en experimentos 2018 y 2019. A) Unidades formadoras de colonia (UFC) de otros hongos, B) UFC *Fusarium* spp., C) Índice de *Fusarium* spp. y D) UFC de *Fusarium*/hijuelo por tipo de tejido externo o interno y calibre de hijuelos. Lima y Toronja sin datos. Al menos una letra en común por año (A-C) o entre tejido externo (D) son estadísticamente iguales (Tukey $p<0.05$).

Figure 4. Inoculum load per Lime, Orange and Grapefruit base-size of agave offsets in experiments conducted in 2018 and 2019. A) Colony forming units (CFU) of other fungi; B) *Fusarium* spp. CFU; C) *Fusarium* spp. index; and D) *Fusarium*/offset per type of external or internal tissue and offsets base-size. Lime and Grapefruit base-size without data. At least one letter in common per year (A-C) or among external issue (D) are statistically equal (Tukey $p<0.05$).

Esto sugiere diversidad significativa en la cantidad de hongos por región y calibre. En *Fusarium* a pesar de no conocer la capacidad patogénica por inductividad regional, a través de los análisis se infiere un riesgo mayor en la movilización de hijuelos.

Unidades formadoras de colonias por región en tejido interno y macerado. En tejido macerado se realizaron pruebas preliminares iniciales. Los resultados mostraron que el sobrenadante, a partir de una muestra homogénea, presentó la mayor canti-

per offset was lower (3.52 CFU) in Orange base-size. The inoculum load in external tissue was similar among base-size offsets. Orange base-size had a 5.37 CFU average. These results suggest a higher dispersion of *Fusarium* through external tissue. However, the CFU found internally are not to different so it may require both a systemic and contact product that help reduce the offset inoculum load (Figure 4D).

In internal tissue, *Fusarium* colonies had a significantly different behavior with 75% of total

dad de hongos totales y *Fusarium*, principalmente en el medio de cultivo selectivo, con un 62% de crecimientos totales. Las UFC fueron mayor en la parcela de moderada inductividad de Tepatitlán con valor total de 378 ($min=0$, $máx=42$, $std=59.5$), seguido de Zapotlanejo con 206 ($min=0$, $máx=32$, $std=31.2$). El predio de baja inductividad de la región sur, correspondiente a Tuxcacuesco, obtuvo el tercer lugar en UFC de *Fusarium* con 188 ($min=0$, $máx=37$, $std=61.8$). El predio de baja inductividad de Cañadas de obregón no presentó crecimientos de *Fusarium*, esto podría atribuirse a las condiciones climáticas de la temporada invernal, donde reportaron heladas (comunicación personal). El peso del hijuelo también podría respaldar el efecto de éste estrés, encontrándose en un promedio de 158 g, el más bajo de todos los predios de la región altos.

La carga de inóculo en tejido interno respecto al externo, en calibre Naranja y a nivel de hijuelos independientes fue menor (3.52 UFC). La carga de inóculo en tejido externo fue similar entre calibres, siendo en Naranja el tamaño que obtuvo un crecimiento promedio de 5.37 UFC. Estos resultados sugieren un mayor riesgo de dispersión de *Fusarium* por tejido externo. Sin embargo, las UFC encontradas de manera interna no son tan distantes del anterior, por lo que se sugieren un control sistémico y de contacto que ayude a reducir las cargas de inóculo presentes en los hijuelos (Figura 4D).

En tejido interno los crecimientos de *Fusarium* se comportaron significativamente diferente. En la base de las hojas se encontró el 75% de las cepas totales, con una mínima, por parcela, de 18 y máxima de 51. Le siguió el tejido de la base del cogollo (15%), piña (8%), y finalmente cuello (2%). Esto sugiere una posible especialización en tejidos a nivel de hijuelo, como lo reportado por López-Bautista *et al.* (2020), donde se reportan cepas diferentes de *Fusarium* en tejido aéreo y raíces y suelo. Así mismo estos datos sugieren que no existe un

isolates found in the leaf base, with a minimum of 18, and a maximum of 51 per plantation, followed by bud base (15%), 'piña' (8%) and neck (2%). This suggests a possible *Fusarium* species tissue specialization at offset level, as reported by López-Bautista *et al.* (2020), where different *Fusarium* isolates were reported in aerial tissue, roots and soil. These data also suggest that there is not ascendant fungus movement from the neck to exposed aerial tissue as leaves but rather there are multiple entrance ways.

Molecular identification and phylogeny. From 30 offsets used to obtain *Fusarium* isolates in internal and external tissue, 16 and seven isolates were collected respectively. Basal leaves represented 56% of the total, followed by neck (19%), bud (12.5%) and 'piña' (12.5%). The phylogenetic analysis of the amplicon sequences with the EF-1a gene determined the presence of three *Fusarium* binomial species belonging to different complexes; *F. oxysporum* (FOSC), *F. verticillioides* (FFSC), *F. solani* (FSSC), two phylogenetic species previously associated with adult plants (FIESC 9, FIESC 12) and one that was not identified also associated with adult plants (*Fusarium* 2-Agave) (López-Bautista *et al.*, 2020) (Table 2).

The *Fusarium* FOSC and FFSC complexes were found in both tissues (internal and external), while FSSC was isolated only from internal tissue and FIESC# on external tissue. The leaf base had the greatest diversity and number of species: *F. verticillioides* (five), *F. oxysporum* (two) and *F. solani* (two). In bud, only *F. oxysporum* (one) and *F. solani* (one) were found, whereas in neck, *F. oxysporum* was consistent (three). However, in 'piña' tissue, the two sequences were aligned with a maximum of 97% identity with a *Fusarium* sp. species of the GenBank but had 99.7-100% identity with the non-identified species *Fusarium* 2-agave

movimiento ascendente de cuello a tejido aéreo expuesto como las hojas, sino que existen múltiples vías de entrada.

Identificación molecular y filogenia. De los 30 hijuelos utilizados para aislamientos de *Fusarium* en tejido interno y externo se obtuvieron 23 cepas, 16 y siete respectivamente. En *Ti* de la Base de hojas se obtuvo el 56% del total, seguido de tejido de cuello (19%), Cogollo (12.5%) y Piña (12.5%). El análisis filogenético de las secuencias con el gen EF-1a determinó la presencia de tres especies binomiales de *Fusarium* pertenecientes a complejos diferentes; *F. oxysporum* (FOSC), *F. verticillioides* (FFSC), *F. solani* (FSSC), dos especies filogenéticas asociadas a planta madre; FIESC 9, FIESC 12 y una sin identificar; *Fusarium* 2-Agave, reportado por López-Bautista *et al.*, 2020 (Cuadro 2).

Los complejos de *Fusarium* FOSC y FFSC se encontraron en ambos tejidos (interno y externo), mientras que FSSC sólo se aisló de tejido interno y FIESC de tejido externo. En *Ti*, *Bh* mostró la mayor diversidad y cantidad de especies; *F. verticillioides* (cinco), *F. oxysporum* (dos) y *F. solani* (dos). En Cogollo sólo se encontró a *F. oxysporum* (uno) y *F. solani* (uno), mientras que Cuello fue específico a *F. oxysporum* (tres). Sin embargo, en tejido de Piña las dos secuencias se alinearon con un máximo de 97% de identidad a especies de *Fusarium* sp. del GenBank, pero de 99.7-100% con la especie sin identificar *Fusarium* 2-agave, de planta adulta de *A. tequilana*. En tejido externo se encontró a *F. verticillioides* y *F. oxysporum*. El análisis filogenético con el gen EF-1a mostró la agrupación por complejo con un soporte estadístico mayor a 96% y por especie a 80%. También se observó la variabilidad entre clados, principalmente en los complejos FIESC y FSSC, donde se encuentran las especies filogenéticas y sin identificar de *Fusarium* spp. (Figura 5).

from *A. tequilana* adult plants. *F. verticillioides* and *F. oxysporum* were found in external tissue. The phylogenetic analysis using the EF-1a gene showed groups by complex with a statistical support higher than 96% and of 80% by species. Variability was also observed on clades, especially in the FIESC and FSSC complexes, where *Fusarium* spp. phylogenetic and non-identified species are placed (Figure 5).

DISCUSSION

The wilt and dry rot bud syndrome (SMAP) in *A. tequilana* represents one of the greatest challenges in blue agave production in DOT areas. The investigative work with this disease, which is caused by a complex of *Fusarium* species, is limited and mainly focused on commercial plantations with adult plants exhibiting the syndrome due to productive stress predisposition (Vega-Ramos *et al.*, 2013; Ramírez-Ramírez *et al.*, 2017; López-Bautista *et al.*, 2020). Usually, this type of plantations, between 3-4 years-old, can be used as a source of offsets to establish new plantations, a fact that rise key phytosanitary questions because of the close relation among mother plant-offset-soil. Under this rational framework, this study provides three lines of knowledge: **1).** Development and validation of a field and laboratory methodology, named as CIFUSAG (acronym of *Carga de Inóculo Fusarium en Agave*), to estimate the *Fusarium* spp. inoculum load, external and internalized in offsets; **2).** Demonstrates the existence of differential inoculum load with strong regional effect; **3).** Provides etiological basis by showing associative evidence of a complex of *Fusarium* species with offsets, both at external and internal tissue level.

The regional coverage of 14 municipalities in Jalisco with two years field data, a total of

Cuadro 2. Identificación molecular PCR de 23 aislados de *Fusarium* obtenidos de 30 hijuelos en 2018 por fuente de aislamiento utilizando el gen EF-1a.
Table 2. PCR molecular identification of 23 *Fusarium* isolates of 30 offsets in 2018 through source isolation using the EF-1a gene.

Fuente de aislamiento	Especie/Complejo	ID aislado	%Identidad	Secuencia Referencia
Base de la hoja	<i>F. verticillioides</i> [FOSC]	NF2bh	100	MH582325
		NF3bh	99.70	MH582331
		NF4bh	99.85	MH582331
		PF1bh	99.41	JF740737
		PF8bh	100	MH582325
	<i>F. oxysporum</i> [FOSC]	LF6bh	99.23	AF008497
		PF7bh	99.39	AF008497
		LF5bh	99.85	JF740774
	<i>F. solani</i> [FSSC]	NF21bh	99.86	JF740846
		LF9b	99.23	AF008497
Cuello	<i>F. oxysporum</i> [FOSC]	NF10b	100	AF246837
		PF11b	99.85	JF740855
		NF12cb	99.85	AF008497
Cogollo	<i>F. solani</i> [FSSC]	NF22ca	99.86	JF740846
	<i>Fusarium</i> sp. [FSSC]	PF23d	-	-
Piña	<i>Fusarium</i> sp. [FSSC]	PF24d	-	-
	<i>F. verticillioides</i> [FOSC]	PF17s	99.85	MH582325
PF19s		100	MH582325	
NF13s		99.54	AF008497	
PF20s		99.85	AF008497	
LF14s		97.92	MH582434	
Tejido externo	<i>F. oxysporum</i> [FOSC]	NF16s	-	-
		NF18s	97.73	MH582433
		<i>Fusarium</i> sp. [FIESC]		

DISCUSION

El síndrome marchitez y pudrición seca del cogollo (SMAP) en *A. tequilana* representa uno de los principales retos en la producción de agave azul en la DOT. Los trabajos de investigación con esta enfermedad, causada por un complejo de especies de *Fusarium*, son limitados y enfocados principalmente a plantaciones comerciales con plantas adultas que exhiben el síndrome por predisposición del estrés productivo (Vega-Ramos *et al.*, 2013; Ramírez-Ramírez *et al.*, 2017; López-Bautista *et al.*, 2020). Comúnmente este tipo de plantaciones, entre

7055 offsets tested and 46 656 fungal colonies counted, support the inoculum load results and proof the CIFUSAG methodology applicability. Conversely, the molecular characterization was limited to *Fusarium* isolates obtained from 30 offsets collected at a high inductivity plantations in Los Altos. Interestingly, the composition and diversity of the species complex found was analogous to the one found by López-Bautista and associates (López-Bautista *et al.*, 2020). However, it is necessary to expand the studies of molecular characterization, with greater regional coverage, including other genes in addition to the elongation

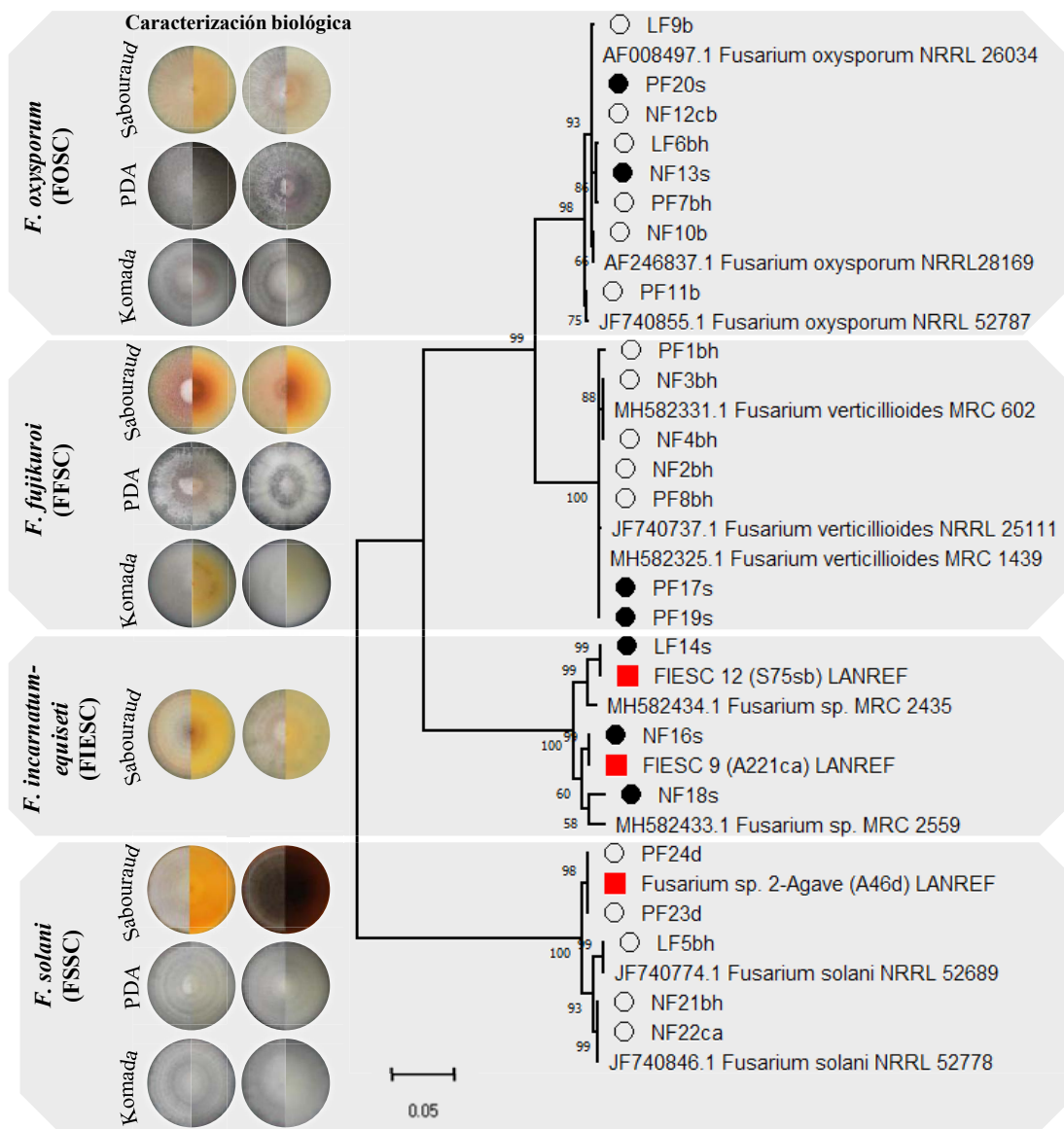


Figura 5. Filogenia de 23 cepas de *Fusarium* spp. asociadas a tejido externo (lavado) e interno de hijuelos de *Agave tequilana* basada en el gen EF-1a, máxima verosimilitud y *general time reversible model* (GTR) + *gama distributed with invariant* (G+I), con 1000 repeticiones *bootstrap*. Viñeta negra indica cepas de suelo, viñeta blanca cepas de tejido interno, en rojo especies filogenéticas y sin identificar de planta adulta de *A. tequilana* reportada por López-Bautista *et al.*, 2020. El resto, sin marcas, son secuencia de referencia del GenBank.

Figure 5. Phylogeny of 23 *Fusarium* spp. isolates associated with external (washing) and internal tissue of *Agave tequilana* offsets based on the EF-1a gene, maximum likelihood, and general time reversible model (GTR) + gamma distributed with invariant (G+I), with 1000 bootstrap replications. The black bullet indicates isolates from external tissue; the white indicates isolates from internal tissue; the red are the phylogenetic species and the non-identified species of *A. tequilana* adult plants (López-Bautista *et al.*, 2020). The rest, non-marked, are reference sequences from the GenBank.

3-4 años de edad, pueden ser empleadas como proveedoras de hijuelos para establecer nuevas plantaciones, lo cual impone interrogantes fitosanitarios por la estrecha relación planta madre-hijuelo-suelo. Con este marco racional, este trabajo aporta tres líneas de conocimiento: **1)** Desarrollo y validación de una metodología de campo y laboratorio, denominado CIFUSAG (acrónimo de *Carga de Inóculo Fusarium en Agave*), para estimar la carga de inóculo de *Fusarium* spp. externo e internalizado en hijuelos; **2)** Demuestra la existencia de carga de inóculo diferencial con fuerte efecto regional; y **3)** Aporta bases etiológicas presentando evidencias asociativas de un complejo de especies de *Fusarium* con hijuelos tanto a nivel externo como a nivel de tejido interno.

La cobertura regional de 14 municipios de Jalisco y dos años de investigación con un total 7055 hijuelos y 46 656 colonias fungosas proporcionan buen soporte a los resultados de carga de inóculo y prueban la aplicabilidad de la metodología CIFUSAG. En contraste, la caracterización molecular se limitó a la población de *Fusarium* obtenida de 30 hijuelos de un predio de alta inductividad de Los Altos. Interesantemente, la composición y diversidad del complejo de especies encontrado fue análogo al encontrado por López-Bautista y colaboradores (López-Bautista *et al.*, 2020). Sin embargo, es necesario ampliar los estudios de caracterización molecular con mayor cobertura regional y con otros genes adicionales al factor de elongación empleado en este trabajo. De particular interés son las especies de *Fusarium* con capacidad de internalización ya que pueden ser diseminadas con mayor eficiencia y representar un mayor reto de control. Sistemas productivos similares a agave, respecto al uso de material propagativo asociado con *Fusarium* spp. se ha reportado en cultivos como *Musa paradisiaca* (Bermúdez, 2014), *Tulipa* sp. (Bergman and Bekker, 1978) y *Aloe vera* (Avasthi *et al.*, 2018).

factor used in this study. Of particular interest are the *Fusarium* species with internalization capacity because they can be more efficiently disseminated and may represent a greater control challenge. Productive systems similar to agave, regarding the use of propagative material associated with *Fusarium* spp. have been reported in crops such as *Musa paradisiaca* (Bermúdez, 2014), *Tulipa* sp. (Bergman and Bekker, 1978) and *Aloe vera* (Avasthi *et al.*, 2018). However, in general, a qualitative association with *Fusarium* is reported without any estimation of inoculum loads to establish actionability criteria with preventive purposes. Similarly, the studies of taxonomic diversity are usually limited to identify the species or race of interest.

With more than 96 million *A. tequilana* offsets planted between 2018 and 2019, this is the main propagation approach and therefore represents a potential pathway for *Fusarium* spp mobilization, and possibly of other pests, due to operational, agronomic and/or phytosanitary restrictions of other multiplication strategies such as botanical seed or *in vitro* culture. In this context, the results of this research address the importance to improve our understanding of the offset role in the productive sustainability of a region with designation of origin and limited margin for land expansion. It has been widely documented that *Fusarium* exhibits several adaptation strategies to ensure its establishment and parasitic fitness once settled in a new agroecological niche. A recent example of this is *F. oxysporum* f. sp. *cubence* Race 4 Tropical (FOCR4T), with effective mobilization paths and adaptation to most soils where banana is cultivated in the world (Bermúdez, 2014). Similarly, it has been postulated based on phylogenetic and structural studies that *Fusarium* can go through divergent-convergent evolution processes in *A. tequilana* and other crops (Liew *et*

Sin embargo, en general se reporta la asociación cualitativa de *Fusarium* sin estimar cargas de inóculo que permitan establecer criterios de accionabilidad con propósitos preventivos. Similarmente, estudios de diversidad taxonómica están generalmente acotados a la identificación de la especie o raza de interés.

Con más de 96 millones de hijuelos de *A. tequilana* plantados entre 2018 y 2019, este es el principal medio de propagación y por tanto de movilización potencial de *Fusarium* spp. y posiblemente de otras plagas, debido a restricciones operativas, agronómicas y/o fitosanitarias del empleo de semilla botánica o del cultivo *in vitro*. En este contexto, los resultados de esta investigación obligan a profundizar en la comprensión del rol del hijuelo en la sostenibilidad productiva de una región con denominación de origen y limitado margen de expansión territorial. Está ampliamente documentado que *Fusarium* exhibe diversidad de estrategias adaptativas que garantizan su establecimiento y éxito parasítico una vez introducido en un nuevo nicho agroecológico. Un ejemplo reciente lo representa *F. oxysporum* f. sp. *cubense* Raza 4 Tropical (FOCR4T) con efectiva movilización y adaptación a suelos bananeros del mundo (Bermúdez, 2014). Similarmente se ha postulado, con base en estudios poblacionales filogenéticos y estructurales que *Fusarium* puede presentar procesos evolutivos divergentes-convergentes en *A. tequilana* y otros cultivos (Liew *et al.*, 2016; López-Bautista *et al.*, 2020). El síndrome SMAP en planta adulta es justamente una evidencia de la capacidad parasítica adaptativa de *Fusarium* spp. en la cual el hijuelo puede tener una implicación importante al movilizar haplotipos de diferentes especies del hongo propiciando cambios dinámicos en la estructura de prevalencia regional.

La experiencia mundial en el manejo de *Fusarium* evidencia que la prevención es la estrategia

al., 2016; López-Bautista *et al.*, 2020). The SMAP syndrome in adult plants is a clear evidence of the adaptive and parasitic capacity of *Fusarium* spp., where offsets may have an important implication by moving haplotypes of different species of this fungus, thus favoring dynamic changes of the prevailing prevalence structure at regional level.

Worldwide experience in *Fusarium* management shows that prevention is the most profitable and biologically viable alternative under an imposing regulatory or voluntary scheme yet general adopted among the productive sectors. Australia was able to contain a regional outbreak of FOCR4T for more than 20 years by taking severe preventive measures that included offsets movement restrictions for planting as their main strategy (M. Dita. 2017. Personal communication). However, since studies conducted in the DOT region of Jalisco suggest that haplotypes of different *Fusarium* species are widely distributed (Vega-Ramos *et al.*, 2013; Ramírez-Ramírez *et al.*, 2017; López-Bautista *et al.*, 2020), the concept of free area as the basis for establishment of mother plantations and restriction of commercial offset mobilization appear to be unreliable. The alternative would be to optimize the principle of low prevalence with the pathogenic knowledge at the haplotypes level and their regional prevalence levels. This also implies a thorough knowledge of the physico-chemical and biological mechanisms of suppressive soil to operate on the soil health as a mitigation strategy (Fang *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2019). For example, neutral-alkaline pH and organic matter greater than 2.5 do not promote high *Fusarium* indexes (FI) in soils where agave is grown in Jalisco and are considered low inductive soils (López-Bautista *et al.*, 2020). Although the offset maintains its physiological connection with the mother plant until it is cut with commercial purposes, there also exists an interaction with the soil that must be fully understood. In this study,

más rentable y biológicamente viable bajo un esquema impositivo regulatorio o voluntario, pero de adopción generalizada entre sectores productivos. Australia logró confinar un brote regional de FO-CR4T por más de 20 años con fuertes medidas preventivas con restricción del movimiento de hijuelos para siembra como estrategia principal (M. Dita, 2017. Comunicación Personal). Sin embargo, estudios regionales en la región DOT de Jalisco sugiere la amplia distribución de haplotipos de diferentes especies de *Fusarium* por lo que el concepto de área libre como base de establecimiento de plantas madre y restricción en movilidad de hijuelos podría tener poca viabilidad (Vega-Ramos *et al.*, 2013; Ramírez-Ramírez *et al.*, 2017; López-Bautista *et al.*, 2020). La alternativa sería optimizar el principio de baja prevalencia con el conocimiento patogénico a nivel de haplotipos y sus niveles de prevalencia regional. Así mismo, implica el profundo conocimiento de los mecanismos físico-químicos y biológicos de supresividad de suelos para operar sobre la salud de suelo como estrategia de mitigación (Fang *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2019). Por ejemplo, pH neutros-alcalinos y materia orgánica superiores a 2.5 no favorece altos índices de *Fusarium* spp. (IF) en suelos agaveros de Jalisco siendo tipificados con inductividad baja (López-Bautista *et al.*, 2020). Si bien el hijuelo mantiene su conexión fisiológica con la planta madre hasta su corte con fines comerciales existe también una interacción con el suelo que debe ser entendida integralmente. En este trabajo, el calibre del hijuelo, definido por el tamaño de su base ‘bulbar’, pretendía demostrar que a más joven (Lima) menor exposición microbiológica del suelo y mayor vigor conferido por factores maternos, y por tanto menor presencia de *Fusarium* justificando su uso en nuevas plantaciones. Los resultados demostraron que calibre no tuvo efecto sobre carga de inóculo ni sobre la composición de especies. La condición infectiva o endofítica, sin embargo, aun

the offset base-size criterion, which is defined by the size of its “bulbar” base, was intended to demonstrate that the younger the shoot (Lima), the least the exposure to microbial soil and the highest the vigor conferred by maternal factors, and therefore the least presence of *Fusarium*, thereby justifying its use in new plantations. The results demonstrated that it has no effect on the inoculum load nor on the species composition. The infective or endophytic condition however still needs to be elucidated. On the contrary, the epidemic inductivity of SMAP had an effect on the offset inoculum load. Surprisingly, the region considered as moderate (South, 6.83 ± 4.22) marginally surpassed the most inductive region (Los Altos, 5.58 ± 2.42) in CFU/offset. The less inductive region (Valley, 3.3 ± 3) had 59 and 48% less inoculum load. Nonetheless, Los Altos lowest level of CFU variability suggests that *Fusarium* spp. have higher prevalence and endemicity. In this region, the establishment of mother plantations from commercial plantations could pose a greater mitigation challenge and soil health recovery.

Considering the importance of the agave industry and the epidemic history of SMAP, official phytosanitary campaigns and regulatory initiatives have been carryout and proposed with preventive purposes (SENASICA-DGSV, 2017). In 2003 it was presented the Norma Oficial Mexicana project NOM-083-FITO-2003 focused on delimiting the phytosanitary requirements for production and mobilization of propagative material of *Agave tequilana* Weber Blue variety in the DOT region. This norm project has not been published and its approval is uncertain. The objective of NOM-083 is as follow: ‘Establish phytosanitary requirements for the production and mobilization of propagative material of *Agave tequilana* Weber Blue variety, to protect its phytosanitary condition and prevent the spread of economically important

requiere ser dilucidado. Por el contrario, la inductividad epidémica SMAP si tuvo un efecto en la carga de inóculo de hijuelos. Sorpresivamente, la región considerada como moderada (Sur, 6.83 ± 4.22) superó marginalmente a la más inductiva (Los Altos, 5.58 ± 2.42) en la cantidad de UFC/hijuelo. La región menos inductiva (Valles, 3.3 ± 3) tuvo 59 y 48% menos carga de inóculo. No obstante, la menor variabilidad de UFC en Los Altos sugiere mayor prevalencia y endemicidad de *Fusarium* spp. En esta región, la selección de plantaciones madre a partir de plantaciones comerciales podría representar un mayor reto de mitigación y restitución de la salud de suelo.

Considerando la importancia de la industria del agave y los antecedentes epidémicos de SMAP se han implementado campañas fitosanitarias oficiales y se han propuesto iniciativas regulatorias con fines preventivos (SENASICA-DGSV, 2017). En 2003 se propuso la NOM-083-FITO-2003, un proyecto de la Norma Oficial Mexicana que tiene como fin delimitar los requisitos fitosanitarios para la producción y movilización de material propagativo de *Agave tequilana* Weber variedad azul en la región DOT. Éste proyecto de norma no se ha publicado y su aprobación es incierta. La NOM-083 tiene como objetivo: ‘Establecer los requisitos fitosanitarios para la producción y movilización de material propagativo de *Agave tequilana* Weber variedad Azul, con la finalidad de proteger su condición fitosanitaria y evitar la dispersión de plagas de importancia económica que lo afectan’. En este contexto plaga tiene una acepción amplia e implica principalmente a *Cercospora agavicola*, *Fusarium* spp. y *Scyphophorus acupunctatus* (Coleoptera: Curculionidae). La propuesta normativa tiene como eje rector la certificación de plantaciones madre, la cual se define como: ‘Condición temporal de un sitio de producción cultivado con *Agave tequilana* variedad azul, ubicada dentro de la zona con Deno-

pests affecting it’. In this context, pest has a wide meaning and mainly refers to *Cercospora agavicola*, *Fusarium* spp. and *Scyphophorus acupunctatus* (Coleoptera: Curculionidae). The guiding principle of the normative proposal is the certification of mother plantations, which is defined as ‘The temporary condition of a site where *Agave tequilana* Blue variety is cultivated within an area with Designation of Origin of Tequila from where offsets can be extracted, or tissue be donated for agave *in vitro* culture’. This regulatory framework may be a fundamental option for a sustainable phytosanitary management of the DOT, provided that comprehensive understanding of the offset pests risk and the integration of mother plantations into an epidemiological surveillance program to optimize monitoring, prevalence thresholds and phytosanitary actionability criteria are fully incorporated. This study, as well as previous research conducted as part of the regional surveillance network SIVEA (SENASICA-DGSV, 2017), which is currently operated only by the state of Guanajuato, provides biological and epidemiological criteria for identification of risk zones and low prevalence as baseline for establishment of mother plantations (Coria-Contreras *et al.*, 2019; López-Bautista *et al.*, 2020). The emerging global parasitic behavior of *Fusarium* spp., its taxonomic complexity and adaptive plasticity requires effective exclusion and mitigation strategies based on sound etiological, epidemiological and agroecological criteria, as well as a holistic and systemic vision in the DOT region to ensure its sustainability and resilience.

CONCLUSIONS

This is the first study that demonstrates the association of four *Fusarium* spp. species complexes with *Agave tequilana* commercial offsets. The

minación de Origen Tequila de la cual se pueden extraer hijuelos o donación de tejido para la producción in vitro de agave'. Este marco regulatorio podría ser una opción fundamental para la gestión fitosanitaria sustentable de la DOT si se incorpora la comprensión científica del riesgo que representa el hijuelo y la integración de plantaciones madre en un programa de vigilancia epidemiológica para optimizar el monitoreo, umbrales de prevalencia y criterios de accionabilidad fitosanitaria. Este trabajo e investigaciones previas desarrolladas en la red regional de vigilancia SIVEA (SENASICA-DGSV, 2017), la cual actualmente es operada únicamente por el estado de Guanajuato, proporcionan criterios biológicos y epidemiológicos para la identificación de zonas de riesgo y baja prevalencia como línea base para el establecimiento de plantaciones madre (Coria-Contreras *et al.*, 2019; López-Bautista *et al.*, 2020). El carácter mundial emergente de *Fusarium* spp., su complejidad taxonómica y plasticidad adaptativa obliga a buscar estrategias efectivas de exclusión y mitigación con base en sólidos criterios etiológicos, epidemiológicos y agroecológicos. Un visión holística y sistémica es obligada en la región DOT para garantizar su sustentabilidad y resiliencia.

CONCLUSIONES

Este es el primer trabajo que demuestra la asociación de cuatro complejos de especies de *Fusarium* spp. con hijuelos comerciales de *Agave tequilana*. Se desarrolló y validó el método CIFUSAG para estimar la carga de inóculo en hijuelo el cual puede ser aplicable a estudios de prevalencia microbiológica, manejo de riesgos, control y certificación con énfasis en *Fusarium* spp. La inductividad epidémica al síndrome de marchitez y pudrición seca del agave (SMAP) tuvo una tendencia

CIFUSAG method was developed and validated to estimate the inoculum load in offsets; this method can be applied to studies on microbiological prevalence, risk management, control, and certification with emphasis on *Fusarium* spp. The epidemic inductivity to the wilt and dry bud rot syndrome (SMAP) showed a proportional tendency with *Fusarium* spp. inoculum load, while the offset base-size did not have any differential effect. It is necessary to integrate the study of soil physico-chemical and biological factors to understand the risks associated with the inoculum load in offsets. Selective pathogenicity tests are required to determine the *Fusarium* specie(s) that represent the highest level of survival, infectivity, and colonization in commercial offsets. This research justifies the scientific, technical, and regulatory analysis of commercial mother plantations and the offsets movement for propagative purposes to effectively manage the dispersion risk, establishment and/or intensity of potential damage to at least four *Fusarium* species associated with *A. tequilana* offsets. It is important to implement biological and chemical preventive management strategies that allow effective sanitary management of the Designation of Origin of Tequila (DOT) region.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank CNRF-DGSV for the financial support provided through the SENASICA-COLPOS agreement for conducting this project. To COLPOS and CONACYT for granting the scholarship that allowed the first author to obtain her M.Sc. degree. To Casa Sauza and CESAVEJAL for the logistics and/or infrastructure support. To the CP-LANREF team for their dedicated support during the development of this research.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

proporcional con carga de inóculo de *Fusarium* spp., mientras que el calibre de hijuelo no tuvo un efecto diferencial. El estudio de factores físico-químicos y biológicos del suelo requieren integrarse para comprender los riesgos asociados a la carga de inóculo en hijuelo. Se recomiendan pruebas de patogenicidad selectivas para establecer la especie(s) de *Fusarium* que representan mayor sobrevivencia, infectividad y colonización en hijuelos comerciales. Esta investigación justifica el análisis profundo a nivel científico, técnico y regulatorio de plantaciones madre con propósito comercial y el movimiento de hijuelos con fines propagativos que permita en forma efectiva manejar el riesgo de dispersión, establecimiento y/o intensidad de daño potencial de al menos cuatro especies de *Fusarium* asociadas a hijuelos de *A. tequilana*. Es importante establecer estrategias biológicas y químicas de manejo de hijuelos con fines preventivos que permitan una efectiva gestión sanitaria de la región Denominación de Origen del Tequila (DOT).

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al CNRF-DGSV por el apoyo financiero a través de convenio SENASICA-COLPOS para ejecución del proyecto. Al COLPOS y CONACYT por la beca de maestría del primer autor. A Casa Sauza y CESAVEJAL por el apoyo logístico y/o infraestructura. Al equipo CP-LANREF por su apoyo incondicional en el desarrollo de esta investigación.

#### LITERATURA CITADA

- Avasthi S, Gautam AK and Bhaduar R. 2018. Isolation and characterization of *Fusarium* species causing leaf spot and root rot diseases on *Aloe vera*. Journal on New Biological Reports 7(1): 1-9. <https://www.researchgate.net/publication/323320545>
- Bergman BHH and Bekker-Van Der Voort, AMM. 1978. Latent infection in tulip bulbs by *Fusarium oxysporum*. Netherlands Journal of Plant Pathology 85: 187-195. <https://doi.org/10.1007/BF01976820>
- Bermúdez CI. 2014. Herramientas biotecnológicas para el combate de la raza 4 tropical de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* en *Musa* spp. Biotecnología vegetal 14(4): 195-202. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/82>
- Coria-Contreras JJ, Mora-Aguilera G, Yañez-Morales MJ, Acevedo-Sánchez G, Santana-Peñaloza B, Mendoza-Ramos C, Jiménez-González L, Martínez-Bustamante VI, García-Martínez DC and Rubio-Cortés R. 2019. Applied regional epidemiology to inductive characterization and forecasting of blue agave gray spot (*Cercospora agavicola*) in Jalisco, Mexico. Mexican Journal of Phytopathology 37(1): 71-94. <http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1809-4>
- CRT, Consejo Regulador del Tequila. 2020. Geografía de la DOT. <https://www.crt.org.mx/index.php/es/> (consulta, enero 2019).
- Fang X, You MP and Barbetti MJ. 2012. Reduced severity and impact of *Fusarium* wilt on strawberry by manipulation of soil pH, soil organic amendments and crop rotation. European Journal of Plant Pathology 134: 619-629. <https://doi.org/10.1007/s10658-012-0042-1>
- Green MR and Sambrook J. 2012. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1881p. [www.cshprotocols.org](http://www.cshprotocols.org)
- Guzmán-Hernández E, Flores-Colorado OE, Acevedo-Sánchez G, Mora-Aguilera G, López-Javier MA y González-Gómez R. 2017. Apps como herramientas de soporte epidemiológico aplicado a sistemas regionales de vigilancia epidemiológica. Revista Mexicana de Fitopatología 35(S): 178.
- Halfeld-Vieria BA y Nechet KL. 2005. Morte de plântulas de *Acácia mangium* por *Fusarium solani* no Brasil e estudo da sua associação com sementes. Summa Phytopathologica 31: 383-385. <https://www.researchgate.net/publication/233391880>
- Huang J, Pang Y, Zhang F, Huang Q, Zhang M, Tang S, Fu H and Li P. 2019. Suppression of *Fusarium* wilt of banana by combining acid soil ameliorant with biofertilizer made from *Bacillus velezensis* H-6. European Journal of Plant Pathology 154: 585-596. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01683-5>
- Jiménez-González LR, Mendoza-Ramos C, Santana-Peñaloza B, Coria-Contreras JJ, Delgado-Mora F, Acevedo-Sánchez G, Guzmán-Hernández E y Mora-Aguilera G. 2017. Escala logarítmica diagramática de severidad para medición de pudrición seca del cogollo, marchitez y mancha gris del agave azul. Revista Mexicana de Fitopatología. 35(S): 177.
- Leslie JF and Summerell BA. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Ames, Iowa: Blackwell Publishing. 388p. [https://www.researchgate.net/publication/321385629\\_The\\_Fusarium\\_Laboratory\\_Manual](https://www.researchgate.net/publication/321385629_The_Fusarium_Laboratory_Manual)
- Liew ECY, Laurence MH, Pearce CA, Shivas RG, Johnson GI, Tan YP, Edwards J, Perry S, Cooke AW and Summerell BA. 2016. Review of *Fusarium* species in association with mango malformation in Australia. Australasian Plant

- Pathology 45: 547-559. <https://doi.org/10.1007/s13313-016-0454-z>
- López-Bautista V, Mora-Aguilera G, Gutiérrez-Espinosa MA, Mendoza-Ramos C, Martínez-Bustamante VI, Coria-Contreras JJ, Acevedo-Sánchez G and Santana-Peñaloza B. 2020. Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp. associated to the regional occurrence of wilt and dry bud rot in *Agave tequilana*. Mexican Journal of Phytopathology 38: 79-106. DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1911-4
- NOM-083-FITO-2003. 2003. Proyecto de Norma Oficial Mexicana NOM-083-FITO-2003, Requisitos fitosanitarios para la producción y movilización de material propagativo de *Agave tequilana* Weber variedad azul. <http://187.191.71.192/expedientes/1901>
- O'Donnell K, Ward T, Robert V, Crous P, Geiser D and Kang S. 2015. DNA sequence-based identification of *Fusarium*: Current status and future directions. Phytoparasitica 43: 583-595. <https://doi.org/10.1007/s12600-015-0484-z>
- Ramírez-Ramírez MJ, Mancilla-Margalli NA, Meza-Álvarez L, Turincio-Tadeo R, Guzmán-de Peña D and Ávila-Miranda ME. 2017. Epidemiology of *Fusarium* agave wilt in *Agave tequilana* Weber var. azul. Plant Protection Science 53: 144-152. <https://doi.org/10.17221/142/2016-PPS>
- SENASICA-DGSV. 2017. Manual operativo de la campaña contra plagas reglamentadas del agave. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, Dirección General de Sanidad Vegetal-Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria. 28p. [http://www.sivea.org.mx/web/files/vista\\_principal/ManualOperativoPlagasReglamentadasdelAgave2016septiembreFINAL.pdf](http://www.sivea.org.mx/web/files/vista_principal/ManualOperativoPlagasReglamentadasdelAgave2016septiembreFINAL.pdf)
- SIAP. 2020. Servicio de Información Agrícola y Pesquera. SAGARPA. <https://www.gob.mx/siap> (Consultado marzo 2020).
- Vega-Ramos KL, Uvalle-Bueno JX and Gómez-Leyva JF. 2013. Molecular variability among isolates of *Fusarium oxysporum* associated with root rot disease of *Agave tequilana*. Biochemical Genetics 51: 243-255. <https://doi.org/10.1007/s10528-012-9559-4>