

**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**

**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y**

**AGROPECUARIAS**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS AGRONÓMICAS**



**“AGENTE CAUSAL DE ANILLO ROJO EN AGAVE  
(*Agave tequilana* Weber variedad azul)**

**TESIS PROFESIONAL**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
INGENIERO AGRÓNOMO**

**PRESENTA:**

**VERÓNICA AZUCENA IBARRA MEDINA**

**LAS AGUJAS, ZAPOPAN, JAL., MARZO 2005**



**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**  
**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS**  
**BIOLOGICAS Y AGROPECUARIAS**  
**CARRERA DE INGENIERO AGRONOMO**  
**COMITE DE TITULACION**

**M.C. SALVADOR MENA MUNGUIA**  
**DIRECTOR DE LA DIVISION DE CIENCIAS AGRONOMICAS**  
**PRESENTE**

Con toda atención nos permitimos hacer de su conocimiento, que habiendo sido aprobada la modalidad de titulación TESIS E INFORMES, opción TESIS, con el título:

**"AGENTE CAUSAL DE ANILLO ROJO EN AGAVE (Agave tequilana Weber variedad azul)"**

El cuál fue presentado por él (los) pasante(s):

**VERÓNICA AZUCENA IBARRA MEDINA**

El Comité de Titulación, designó como director y asesores, respectivamente, a los profesores:

<b>DR. JOSE LUIS MARTINEZ RAMIREZ</b>	<b>DIRECTOR</b>
<b>DR. PEDRO POZOS PONCE</b>	<b>ASESOR</b>
<b>M.C. SALVADOR HURTADO DE LA PEÑA</b>	<b>ASESOR</b>
<b>DR. LEOPOLD FUCIKOVSKY ZAK</b>	<b>ASESOR</b>

Una vez concluido el trabajo de titulación, el Comité de Titulación designó como sinodales a los profesores:

<b>M.C. RAMON RODRIGUEZ RUVALCABA</b>	<b>PRESIDENTE</b>
<b>DR. JUAN FRANCISCO CASAS SALAS</b>	<b>SECRETARIO</b>
<b>M.C. CARLOS MANUEL DURAN MARTINEZ</b>	<b>VOCAL</b>

Se hace constar que se han cumplido los requisitos que establece la Ley Orgánica de la Universidad de Guadalajara, en lo referente a la titulación, así como el Reglamento del Comité de Titulación.

**ATENTAMENTE**  
**"PIENSA Y TRABAJA"**

Las Agujas, Zapopan, Jal. a 7 de marzo de 2005.

M.C. SALVADOR GONZALEZ LUNA  
PRESIDENTE DEL COMITE DE TITULACION

DRA. MARIA LUJSA GARCIA SAHAGUN  
SECRETARIO DEL COMITE DE TITULACION

*“NO PREGUNTEIS QUE PUEDE HACER  
VUESTRO PAIS POR VOSOTROS...  
PREGUNTAD QUE PODEIS HACER  
VOSOTROS, POR NUESTRO PAIS.”*

**JOHN F. KENNEDY.**

*“LA INVESTIGACIÓN SE ASEMEJA  
A LOS LARGOS MESES DE GESTACION  
Y LA SOLUCIÓN DEL PROBLEMA  
AL DÍA DE NACIMIENTO.  
INVESTIGAR UN PROBLEMA  
ES RESOLVERLO”*

**MAO TSE-TUNG.**

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Guadalajara, mi Alma Mater y especialmente al departamento de Producción Agrícola por darme la oportunidad de formarme profesionalmente, gracias.

Al Consejo Regulador del Tequila (CRT), por las facilidades otorgadas para que este trabajo tendiera bien a realizarse.

Al Dr. José Luis Martines Ramírez, por su amistad, sus valiosos y acertados comentarios para que este trabajo saliera lo mejor posible y por darme la oportunidad de cumplir una meta más en mi vida.

Al MC. Salvador Hurtado de la Peña, al Dr. Pedro Posos Ponce y al Dr. Leopoldo Fucikovsky, por su amistad, su valiosa asesoría y sugerencias.

A los profesores MC. Ramón Rodríguez, Dr. Juan Francisco Casas y MC. Carlos Duran, por revisar el presente trabajo y por sus acertadas sugerencias para la corrección del mismo.

A los profesores MC. Luz Elena Claudio, Dr. José Sánchez, MC. Diego Vargas, MC. Francisco Bernal, MC. Fernando Sánchez Santana y todos aquellos maestros por brindarme su amistad, su apoyo, una formación y la oportunidad de ejercer una carrera profesional, gracias.

A todas aquellas personas que de alguna forma intervinieron para cumplir este objetivo fundamental en mi vida, a todos aquellos que me brindaron su amistad y confiaron en mí.

# DEDICATORIA

## A DIOS:

Por permitir que terminara una carrera profesional y por darme las fuerzas necesarias para superar todos los momentos difíciles de mi vida.

## A MIS PADRES:

Javier Ibarra Ortiz y Ana Rosa Medina Ramírez por haber confiado en mi y porque seguirá siendo la principal satisfacción y motivación para vivir, por ser cimiento fundamental de mi persona, por todos esos momentos de alegrías que me ofrecen, por todo eso y muchas cosas más, gracias.

## A MIS HERMANOS:

José Alberto, Jacobo Israel, Francisco Javier y mis cuñadas Melina y Nadia, por ser mis más sinceros y fieles compañeros, en las buenas y en las malas, por ser mi razón de vivir y porque gracias a ellos cumplí mis objetivos. Para ellos.

## A MI ABUELITA:

Por su cariño y por enseñarme a vivir con alegría y optimismo.

## A MI TIO:

Alfredo Ibarra, por todo su cariño y por formarme como una persona con principios, decente y honrada. Gracias.

## A CHEMA:

Por cuando estuvo con migo, me apoyo y me quiso de tal forma.

## A TODOS MIS AMIGOS:

Gris, Lilia, Aurora, Trini, Ivan, Fernando, Cesar, Erica, Cristian, Elizabet, Verito, Pepe, Carlos, Diego, Onofre y todos aquellos que no menciono pero no dejan de ser importantes, para todos ellos, muchas gracias.

## INDICE

AGRADECIMIENTOS.....	I
DEDICATORIA.....	II
INDICE.....	1
RESUMEN.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 Hipótesis:.....	5
1.2 Objetivo:.....	6
1.3 Objetivos Particulares:.....	6
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	7
2.1. Origen del cultivo.....	7
2.2. Descripción Botánica del agave.....	7
2.3. Anillo Rojo.....	8
2.4. Género Erwinia.....	9
2.5. Erwinia amylovora.....	10
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
3.1. Características agroclimáticas de la región.....	12
3.1.1. Localización del municipio de Tequila.....	12
3.1.2. Delimitación.....	12
3.2. Localidad de estudio.....	13
3.3. Materiales.....	14
3.4. Metodología experimental.....	15
3.4.1. Aislamiento del patógeno.....	15
3.4.2. Pruebas de Identificación del Patógeno.....	16
3.5 Pruebas de Patogenicidad en Invernadero.....	17
3.5.1 Preparación de soluciones.....	17
3.5.2 Preparación de macetas.....	18
4. RESULTADOS.....	19
4.1 Pruebas de laboratorio y Aislamiento de los Patógenos.....	19
4.1.2. Bacterias.....	19
4.1.3. Hongos.....	21
4.2. Pruebas de patogenicidad en invernadero.....	24
5. CONCLUSIONES.....	36
6. BIBLIOGRAFÍA.....	37

## RESUMEN

La enfermedad conocida como "Anillo Rojo" que es de etiología desconocida; hasta el momento se ha especulado sobre la posibilidad de una o varias bacterias del género *Erwinia*, En el caso específico de anillo rojo, no se reconoce con exactitud el patógeno (s) y los factores que predisponen o disparan el desarrollo de la misma, así como el avance o dispersión que muestra entre plantas a nivel de parcela, Por lo que el objetivo de este trabajo fue identificar y caracterizar el agente patógeno que causa anillo rojo en el cultivo de agave tequilero. La primera conclusión de este estudio de acuerdo a la sintomatología de los patógenos encontrados es que anillo rojo no es provocado por una bacteria del género *Erwinia sp.*, sino por un hongo del género *Aspergillus sp.*

Con estos antecedentes, se proporciona la información básica que puede ser de utilidad en futuros estudios, para entender el manejo y control de la enfermedad de Anillo rojo en *Agave tequilana* Weber variedad azul.

# 1. INTRODUCCIÓN

El término agave cuyo significado en griego es “*admirable*” fue clasificado por Carlos Lineo en 1753. “Su centro de origen es México, ya que en nuestro país se encuentran la mayor variabilidad y número de especies” (Castorena, 1985). En la actualidad en el agave se han clasificado y reconocido 136 especies, 26 subespecies, 29 variedades y 7 formas” (Gentry, 1982). Bustamante, citado por Luna, (1998), indica que en la zona donde se cultiva *A. tequilana* para producción de tequila se reportan las siguientes especies: *Agave longisepala* Tod (mezcal grande), *Agave pismulae* Trel. (Mezcal pata de mula), *Agave pseudotequilana* Trel. (Mezcal blanco) y *Agave subtilis* Trel. (Maguey chato), entre otras. De estas especies, *A. tequilana* Weber var azul es la que se cultiva en mayor escala en la región de Jalisco, ya que es de importancia en la elaboración del tequila. (Luna, 1998). El tequila está reconocido y protegido por México como un producto con Denominación de Origen. (Luna, 1991)

La preocupación de los últimos años radica en que el cultivo del agave va teniendo mayor cantidad de problemas fitosanitarios haciendo necesario un aprovechamiento más eficiente del cultivo, un adecuado manejo y protección, reduciendo el rendimiento por problemas provocados por patógenos (hongos, bacterias, virus y nemátodos principalmente) los que atacan al cultivo provocando daños, teniendo reportes de varias enfermedades por ejemplo marchitez bacteriana (*Erwinia spp.*), pudrición de raíz (*Fusarium oxysporum*), y anillo rojo; reportado por Valenzuela como Anillo Rojo provocado por la bacteria *Erwinia amylovora* que causa grandes problemas para la producción de agave, sin embargo, el desarrollo de cualquier enfermedad está fuertemente influenciado por factores medioambientales, además de la condición del hospedero.

En el caso específico de anillo rojo, no se reconoce con exactitud los factores que predisponen o disparan el desarrollo del mismo, así como el avance o dispersión que muestra entre plantas a nivel de parcela, por lo que se analizarán las condiciones bióticas (sintomatología de los patógenos encontrados) y abióticas (humedad y temperatura) durante la inoculación en la zona de muestreo.

Por su parte Granados, (1993) menciona a la bacteria del género *Erwinia* spp, como el agente causal de Anillo Rojo y como un problema fitosanitario importante del *Agave tequilana* Weber var. Azul en años recientes.

La enfermedad conocida como “Anillo Rojo” es de etiología desconocida; hasta el momento se ha especulado sobre la posibilidad de una o varias bacterias del género *Erwinia*, pero sin tener la evidencia completa. A pesar de lo anterior, la enfermedad se sigue desarrollando en campo; la velocidad de desarrollo es alta, y se pueden observar nuevos predios de producción de agave con plantas enfermas. (Ireta, 2002).

Es prioritario identificar al organismo causal de este problema como punto de partida para solucionar el grave daño que esta enfermedad representa, por lo que el conocimiento primario de cualquier enfermedad en este caso anillo rojo, es la identificación de patógeno causante, ya que esto nos permite implementar las medidas adecuadas para su prevención y control.

## 1.1 Hipótesis:

- La enfermedad *Anillo rojo* es provocada por una bacteria del género *Erwinia* sp. en el *Agave tequilana* Weber var. Azul
- La enfermedad Anillo rojo es provocada por un hongo, en el *Agave tequilana* Weber var. Azul

## 1.2 Objetivo:

- Identificar y caracterizar el agente patógeno que causa anillo rojo en *Agave tequilana* Weber var. Azul.

## 1.3 Objetivos Particulares:

- Definir cual o cuales son los agentes patógenos causantes de Anillo Rojo
- Describir los agentes patógenos en base a sus características morfológicas.
- Delimitar el rango climático en los cuales se desarrollan los patógenos causantes de Anillo Rojo.

## **2. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **2.1. Origen del cultivo**

El origen del agave se distribuye en el continente Americano específicamente en México según consta en el código boturini (sobre la peregrinación azteca); que data de 1576 en el código Cruz-Badiano, así como otras evidencias que indican que este cultivo es originario de México (Murray, 1994).

El *Agave tequilana* Weber var. Azul, pertenece a una gran cantidad de especies de donde se obtienen fibras y bebidas, que se extienden desde México a Centro América, este grupo es fácilmente reconocible por las formas de sus hojas las cuales son angostas y muy rígidas (Gentry, 1982).

### **2.2. Descripción Botánica del agave**

La planta de agave es suculenta, ya que se extiende radicalmente de 1.2 a 1.8 m, de profundidad, teniendo tallos gruesos y cortos de 30 a 50 cm. de altura al madurar. Con hojas de 90 cm. a 1.20 m, lanceoladas y acuminadas de fibras firmes, casi siempre rígidas, estiradas, cóncavas de ascendentes a horizontales, lo más ancho se encuentra en la mitad de la hoja angosta y gruesas en la base, generalmente de color azulado a verde grisáceo, el margen es recto a ondulado los dientes de tamaño regular de espacios entre ellos de 3 a 6 mm, los ápices delgados curvos o flexos desde poca altura de la base piramidal de color café claro a oscuro de 1 a 2 cm. de largo, raramente larga achatada o abiertamente surcada de la parte superior, la base ancha café oscura decurrente o no. (Valenzuela, 1997; Diódoro, 1993).

La inflorescencia es una panícula de 4 m de altura tensamente ramosa, con 20 a 25 umbelas largas difusas de flores verdes y estambres rosados; flores de 68 a 75 mm de largo, cilíndricas de cuello corto inconstricto, casi terminado en punta sobre la base tubo floral de 10 mm de ancho, funeliforme surcado, de pétalos desiguales de 25 a 28 mm de longitud por 4 mm de ancho lineales erectos pero rápidamente flojos en anthesis, cambiando a café seco filamentosos de 45 a 50 mm de largo, dobladas hacia dentro, junto al pistilo, inserto de 5 a 7 mm cerca de la base del tubo; anteras de 25 mm de largo. El fruto es una cápsula ovalada y brevemente custida. (Gentry, 1982; Valenzuela, 1997).

### **2.3. Anillo Rojo**

A su vez Valenzuela (1997) considera a esta enfermedad como una deficiencia nutricional que está ampliamente extendida en la región centro y en suelos conocidos como barriles (barriales) en la región alteña. Los síntomas inician con la presencia de una constricción basal en el cogollo acompañada por exudaciones de un líquido blanco y gomoso; las hojas que se desprenden del cogollo quedan marcadas y adelgazadas en el área dañada.

Los daños son graves cuando los tejidos constrictos están delgados y cubiertos por costras suberosas de color rojo. La sintomatología depende de la edad del cultivo si la plantación es reciente causara replante o un debilitamiento general crónico, de las plantas afectadas. La enfermedad es muy agresiva en tejidos tiernos, si el desarrollo de las plantas continua con altibajos llega a los cuatro años con un desarrollo pobre, enconstramiento general, deformaciones y su rendimiento es bajo, (Valenzuela, 2003).

## 2.4. Género *Erwinia*

Las *Erwinias* son las únicas bacterias fitopatógenas que son aerobias facultativas, son bacilos gram negativos, rectos con dimensiones de 0.5 a 1.0 x 1.0 a 3 µm, desplazándose por flagelos peritricos, no forman esporas y son fermentadoras activas, son catalasa activa y oxidasa negativa, no hidrolizan almidón ni la urea, producen ácido de glucosa, galactosa, fructosa y sacarosa, (Luna, 1998).

La mayoría de las bacterias fitopatógenas producen uno o varios tipos de sustancias o macromoléculas que intervienen directa o indirectamente en la patogenicidad, (Callow, 1983). Entre las más importantes se incluyen fitotoxinas, exoenzimas, fitohormonas, exopolisacáridos, sideróforos y antimetabolitos.

La producción de exoenzimas es frecuente en algunos grupos bacterianos (*Erwinia* y *Pseudomonas*), las cuales degradan las capas más externas de los tejidos. (Bayley, 1986; Collmer, 1986, Hilderbrand, 1989).

La producción de exopolisacáridos está asociada generalmente a condiciones desfavorables de crecimiento bacteriano, siendo implicado en la formación de cavidades hidroceles y en la obstrucción del sistema conductor. La producción de exopolisacáridos está muy extendida entre los patógenos de *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas campestris* y *Erwinia* spp. En las especies del género *Erwinia* en especial *E. amylovora* se producen galactanos que son componentes del poder patógeno de esta especie (Bennett, 1980).

El género *Erwinia* fue propuesto para bacterias con morfología bacilar, móviles mediante flagelación peritrica y anaerobias facultativas; con excepción de *Erwinia herbicola* y *E. persicinus*. En 1945 Waldee consideró que el género *Erwinia* podría abarcar *E. amylovora* y especies patógenas que causan enfermedades con síntomas de necrosis. (Waldee, 1945).

Las especies de *Erwinia* han sido subdivididas en 3 grupos mediante estudios fenotípicos (Verdonck, 1987):

- Grupo Amylovora: *E. amylovora*, *E. tracheiphila*, *E. quercina*, *E. rubrifaciens*, *E. salicis* y *E. estewartii*.
- Grupo Herbícola: *E. herbicola*, *E. ananas* y *E. uredovora*.
- Grupo carotovora: *E. carotovora* y diversas subespecie, y *E. crysanthemii*.

## 2.5. *Erwinia amylovora*

Las especies que afecta *E. amylovora* son de las familias de las Rosáceas subfamilia Pomoideas, aunque se ha descrito el ciruelo japonés, frambuesa y zarzamora (Van Der Zwet, 1995), lo que sugiere que en zonas con elevada presión de inóculo la bacteria puede afectar a nuevos huéspedes.

Los géneros de las plantas más afectadas por *E. amylovora* son *Pyrus* (peral), *Malus* (manzano), *Cydonia* (membrillo) y *Eryobotria* (níspero). Entre las plantas ornamentales y silvestres destaca el *crataegus* (epino albar). (Paulin, 1993).

A su vez Van Der Zwet, (1995) considera que *E. amylovora* puede invernar en los canchros formados en el periodo vegetativo anterior, pero se carece de suficiente datos sobre la existencia de otras fuentes de inóculo primaveral aunque se sabe que esta bacteria puede encontrarse como epífita endófito en distinta partes de la planta.

Por su parte Berr, (1976) reporta que en primavera, en condiciones climáticas favorables se multiplican en algunos de los chancros y en los tejidos adyacentes y la bacteria es diseminada por insectos, lluvias o vientos, donde puede permanecer cierto tiempo como epífita, y presentar los primeros síntomas.

De otra manera, Vanneste, (1995) afirma que si las condiciones son favorables y el huésped sensible las bacterias avanzan invadiendo los tejidos, las células son destruidas debido a los mecanismos todavía no definidos, además se producen exudados debido a los exopolisacáridos que produce *E. amylovora*.

Lo que a su vez Steiner, (1992) confirma que la influencia de la humedad y temperatura es determinante en las fases de contaminación e infección.

## **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1. Características agroclimáticas de la región**

#### **3.1.1. Localización del municipio de Tequila**

El municipio de Tequila se localiza casi al centro del estado ligeramente al poniente, en las coordenadas 20 25' 00" a 21° 12' 30" de latitud norte y los 103° 36' 00" a los 104° 03' 30" longitud oeste con alturas que van de los 700 a 2,900 m.s.n.m. (INEGI, 1988).

#### **3.1.2. Delimitación**

Limita al norte con el estado de Zacatecas y con el municipio de San Martín de Bolaños; al sur con los municipios de Ahualulco de Mercado, Teuchitlán y Amatitán; al este con San Cristóbal de la Barranca, Zapopan y Amatitán; al oeste con el municipio de Hostotipaquillo, Magdalena y San Juanito de Escobedo, (INEGI, 1988).

#### **3.1.3. Clima**

El municipio es semiseco con invierno y primavera secos, y semicálido sin estación invernal definida. La temperatura media anual es de 23.2 °C y tiene una precipitación media anual de 1,073.1 milímetros de régimen de lluvia en los meses de junio a octubre. Los vientos dominantes son en dirección noreste y sureste. El promedio de días con heladas al año es de 0.4. (INEGI, 1988).

#### **3.1.4. Suelos**

Los suelos dominantes pertenecen al tipo luvisol crómico y órtico, y regosol eútrico; y como suelo asociado se encuentra el feozem lúvico y litosol. (INEGI, 1988).

### 3.1.5. Vegetación

La flora está compuesta de pino, roble, madroño, agave tequilero (*Agave tequilana* Weber var azul), encino, mezquite, guamúchil, nopal (*Opuntia Picus-indica* L.), pitayo (*Stenocereus queretaroensis*), plátano (*Musa paradisiaca* L.), mango (*Mangifera indica* L.), huizache, limón (*Citrus limon* L.), ciruelo (*Prunas salicina* Lindl) y aguacate (*Persea americana* Mill). (INEGI, 1988)

### 3.2. Localidad de estudio

Se tomaron muestras de tejido de dos plantaciones comerciales de agave tequilero (*Agave tequilana* Weber variedad azul) con síntomas de la enfermedad conocida como "anillo rojo", para aislar el patógeno. Así mismo se tomó una muestra de suelo y sus características son las siguientes:

Cuadro 1. Análisis de suelo predio Huizizilapa municipio de Tequila, Jal.

Concepto	valores	Concepto	valores
Textura	Franco arcilloso	CIC meq/100gr.	21,9
Arenas	34.56	N. Total %	8
Arcillas	39.8	P (valor/kg/ha)	MED. 25
Limos	25.64	Ca (valor/kg/ha)	BAJO 500
Ph	5,5	Mg (valor/kg/ha)	M.A. 50
M.O. %	1,6	K (valor/kg/ha)	M.A. 180
Da. Gr/cc.	1	% Humedad	14,66
Dr. Gr/cc.	2,6		

Los sitios de muestreo, ambos del municipio de Tequila, Jal, fueron:

- a) Localidad: El Medineño, ubicado a una latitud Norte 20° 51' 51" y una longitud Oeste 103° 46' 54" y altitud de 1250 m.s.n.m.
- b) Localidad: de Huizizilapa ubicado a una latitud norte 20° 53' 47" longitud oeste 103° 53' 28" y altitud de 1250 m.s.n.m.



Figura 1. Fotografía satelital de la ubicación del predio Huizizilapa en el municipio de Tequila Jalisco. (CRT 2004).

### **3.3. Materiales**

Para realizar este tipo de pruebas, se tomaron varias plantas con daños severos, de las cuales se recolectaron muestras de tejido de las partes más tiernas con actividad microbiológica (cogollo), cortándolos y envolviéndose en periódico y se introducen en una bolsa de polipapel, extrayendo la mayor parte del aire para evitar una contaminación de muestra, una vez las en el laboratorio se procedió al aislamiento e incubación del patógeno.

Los registros de condiciones climáticas dentro del invernadero se realizaron con dos sensores (HOBO RH, Relative Humidity Logger y HOBO XT, Temperatura Logger) a nivel de planta.

### **3.4. Metodología experimental**

#### **3.4.1. Aislamiento del patógeno**

##### **3.4.1.1. Preparación de muestra**

Se realizó una suspensión en la cual se requirió una porción de tejido infectado (tejido sano-enfermo) de .5 cm<sup>2</sup> aproximadamente, los trocitos se trataron con una solución de hipoclorito al 1.5% durante 1 min., transcurrido el tiempo, se estiló para quitar el exceso de hipoclorito, pasándolos a tubos de ensayo con 9 ml. de agua bidestilada estéril, se agitaron durante 2 min, para que las bacterias se difundieran en el agua.

##### **3.4.1.2 Técnica de estriado**

Después de obtener la suspensión, se realizaron placas de agar nutritivo (AN) y papa-dextrosa-agar (PDA), preparadas con un día de anticipación para que la superficie se encuentre solidificada; con una asa de nicromo esterilizada en el mechero se tomó una gota de la suspensión, se inoculó la superficie de la placas con movimientos en zig-zag, este procedimiento se repitió en varias placas, variando un poco el ángulo de estriado y la cantidad de inóculo inicial. Las muestras obtenidas se incubaron en posición invertida a temperatura ambiente del laboratorio.

##### **3.4.1.3 Selección de colonias**

Para la selección de las colonias se observó el crecimiento y las características cualitativas de las mismas (forma, relieves, color, olor, grados de sinuosidad marginal entre otras) llevándose un control cada 24 horas, posteriormente se realizaron aislamientos de cada una de las colonias para inocularlas a nuevas placas, teniendo un proceso de purificación continuo, las observaciones se iniciaron al tercer día de incubación.

Una vez obtenido la purificación de las colonias de microorganismos se procedió con las técnicas de microscopía, se tomó en cuenta las características de los cultivos puros de todos los tipos distinguibles de colonias.

### **3.4.2. Pruebas de Identificación del Patógeno**

#### **3.4.2.1 Tinción de Gram**

Se utilizaron colonias de 1 ó 2 días de edad, con la finalidad de descartar a todos los microorganismos no patógenos ya que la mayoría de las bacterias fitopatógenas son Gram negativas.

Se preparó un frotis con las sepas purificadas, fijando al calor de la flama del mechero, se cubrió el frotis con unas gotas de cristal violeta durante 1 min., transcurrido el tiempo se lavó con agua corriente, se procedió a cubrir el frotis con solución de lugol durante 1 min., se lavó con agua corriente se realizó una decoloración con alcohol – cetona, gota a gota hasta la decoloración completa, se lavó con agua corriente, se cubrió el frotis con safranina durante 30 seg, se lavó con agua corriente, dejándose secar para observa al microscopio.

#### **3.4.2.2 Reacción de Riu (Hidróxido de potasio)**

Se preparó una solución de KOH 3%, de la cual se colocó una gota en un portaobjetos, se mezcló con una muestra de colonias jóvenes de 2 a 3 días de crecimiento hasta obtener una mezcla homogénea, si al levantarse se forma un hilillo, se tomará como negativo si por lo contrario no se forma será positivo.

### **3.4.2.3. Preparación en fresco.**

En un porta objeto se colocó una gota de lactóglícerol, de una colonia joven de micelio se tomó una muestra y se mezcló con la solución; Se colocó el cubreobjetos, presionándolo hasta eliminar el exceso de aire sellándolo con esmalte traslúcido para su conservación, y se observó en el microscopio.

## **3.5 Pruebas de Patogenicidad en Invernadero**

Este trabajo se desarrolló bajo condiciones de invernadero en el Vivero del Departamento de Producción Agrícola del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA), de la Universidad de Guadalajara durante el período de abril a septiembre del 2004

### **3.5.1 Preparación de soluciones**

Las mezclas se prepararon utilizando colonias puras de los microorganismos a evaluar en una solución de 200 ml. de agua bidestilada estéril realizando un raspado a la placa para incorporar los microorganismos a la solución

Tratamiento:

- T1: Testigo agua estéril
- T2: Hongo café + agua bidestilada estéril
- T3: Hongo blanco + agua bidestilada estéril
- T4: Bacteria + agua bidestilada estéril
- T5: combinación de los tres microorganismos + agua bidestilada estéril (solo se aplicó en la segunda inoculación).

### 3.5.2 Preparación de macetas

Se seleccionaron plantas sanas (Bulbillos) de *Agave tequilana* Weber var. azul, los cuales se colocaron en macetas de 6" (de fibra de coco) con un sustrato de peat-most y estopa de coco a una proporción 1:2, las cuales fueron colocadas en un invernadero ventilado continuamente, para el acomodo de las plantas se ubicaron al nivel de piso para su adaptación, se colocaron sensores para el registro de humedad y temperatura (HOBO RH, Relative Humidity Logger y HOBO XT, Temperatura Logger).

Los tratamientos se organizaron de acuerdo a la orientación del invernadero siendo esta de norte a sur, cada tratamiento cuenta con diez repeticiones, ordenadas en dos filas de cinco plantas.

Las inoculaciones se aplicaron mediante un aspersor manual con las soluciones previamente elaboradas; asperjando totalmente a la planta cubriéndola posteriormente con una bolsa de polipropileno humedecida, a manera de una cámara húmeda durante setenta y dos horas.

Al término de las setenta y dos horas se retiran las cámaras húmedas e iniciamos con el registro de los síntomas comparando las condiciones de las plantas con los datos climáticos obtenidos de los sensores.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Pruebas de laboratorio y Aislamiento de los Patógenos

#### 4.1.2. Bacterias

De las pruebas de laboratorio se aislaron dos bacterias las cuales se caracterizaron como: 1) Colonia blanca y 2) Colonia amarilla. Para el caso de la colonia amarilla (fig. 2a) se encontró en simbiosis con la cepa 2, correspondiente al hongo no identificado, el tiempo que duro purificada fue de 72 hrs., debido a que el medio de cultivo no fue el adecuado para mantenerla pura durante mas tiempo. Para el caso de la colonia blanca (fig. 2b) fue de crecimiento lento, tardando en su desarrollo de 32 a 48 hrs. Lo que permitió su multiplicación e inoculación.

En el cuadro 2, se puede observar las características morfológicas de los dos grupos de bacterias donde se describen morfológicamente y al parecer estas son bastantes diferentes, sin embargo las dos son fitopatógenas de acuerdo a las pruebas bioquímicas realizadas.

Cuadro 2. Características morfológicas de las bacterias.

CARACTERISTICAS	COLONIA A (BLANCA)	COLONIA B (AMARILLA)
TAMAÑO DE COLONIA(mm)	VARIABLE	≤ 1mm
FORMA	IRREGULAR	CIRCULAR
BORDE	ONDULADO /RIZADO	ENTERO
COLOR	BLANCO CREMOSO	AMARILLO CLARO
SUPERFICIE	MATE	BRILLANTE
DENCIDAD	OPACA	TRASLUCIDO
CONSISTENCIA	CREMOSA	BISCOSA
FORMA	BACILAR	BACILAR
AGRUPAMIENTO	SOLO	SOLO
TINCIÓN GRAM	NEGATIVO	NEGATIVO
PRUEBA DE RIU	NEGATIVO	NEGATIVO

De acuerdo a las dos pruebas realizadas bajo las condiciones de laboratorio, se considera que la prueba de RIU es la más fácil de implementar y de obtener resultados confiables en comparación con la tinción de GRAM. Lo que se puede observar en la Figura. 2c

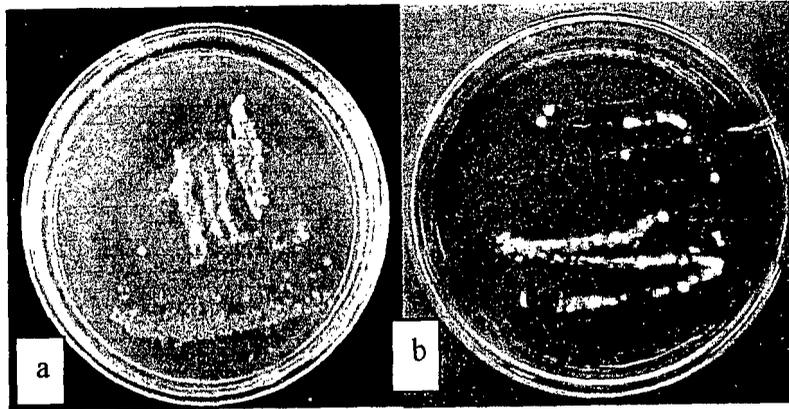


Figura. 2a, Crecimiento de colonias, de bacteria blanca, 2b colonia amarilla en medio PDA

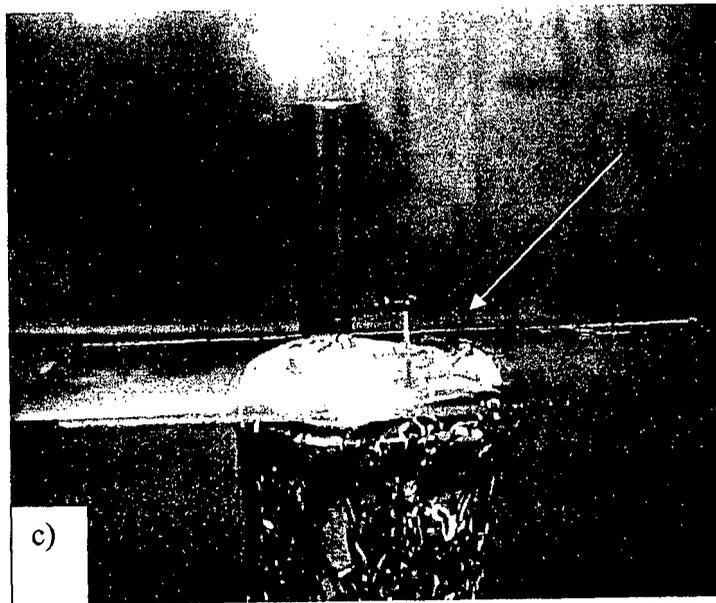


Figura. 2c, Crecimiento de colonias con formación de hilillo, prueba de RIU, negativa bacteria A.

### 4.1.3. Hongos

Los resultados obtenidos con el crecimiento de los hongos se encontraron dos cepas, siendo la de mayor incidencia la cepa B que presenta conidióforos, lo que se observa en la figura 3.

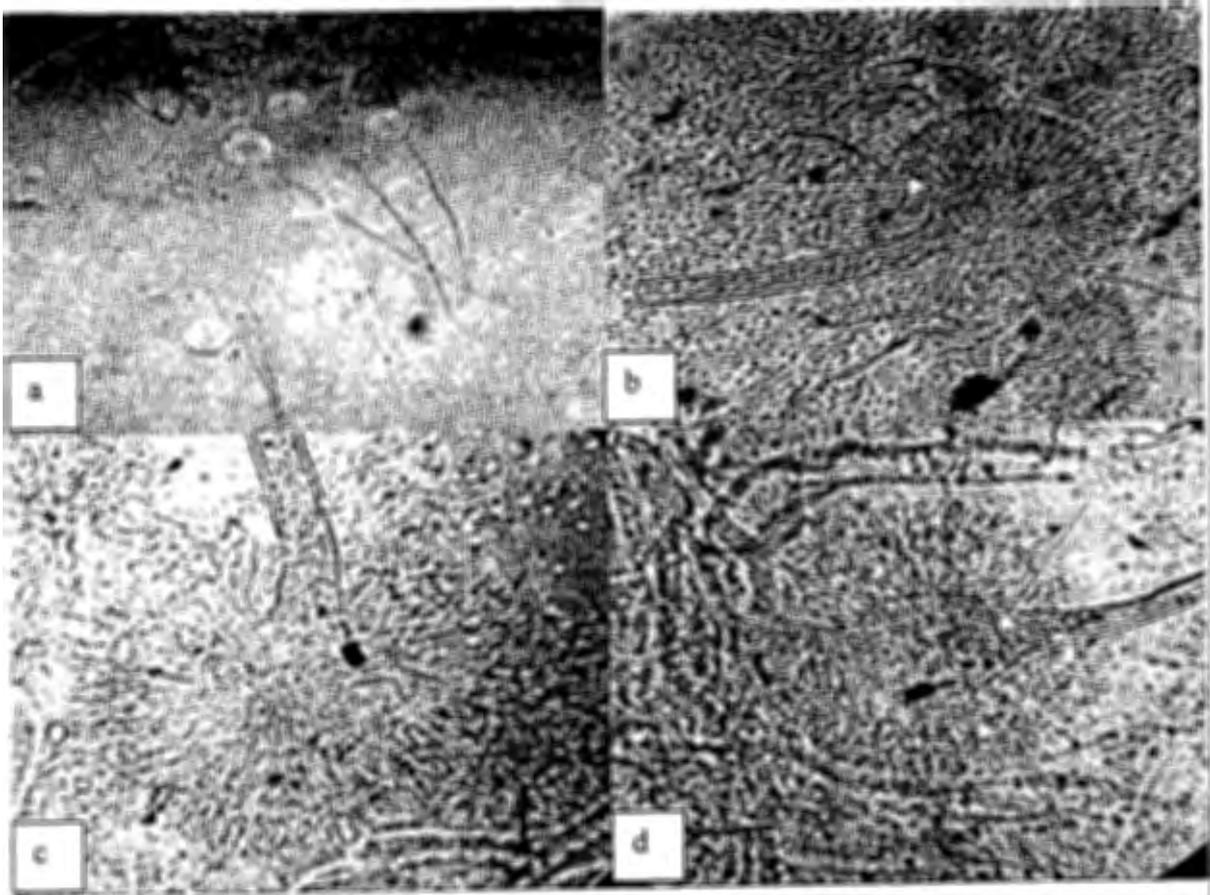


Figura 3, Cepa B, observada al microscopio compuesto donde se observan las estructuras del hongo a estudiar, a)Objetivo 10X conidióforos, b)objetivo 100X sterigma, c)Objetivo 40X filides y conidiosporas, d) objetivo 100X conidia y columella.

El crecimiento en PDA correspondió a una colonia con crecimiento radial de color ocre; al pasar el tiempo el micelio creció en promedio de 2mm al día, notándose conidióforos, en forma de arbolitos y la producción masiva de esporas. (Fig. 4).

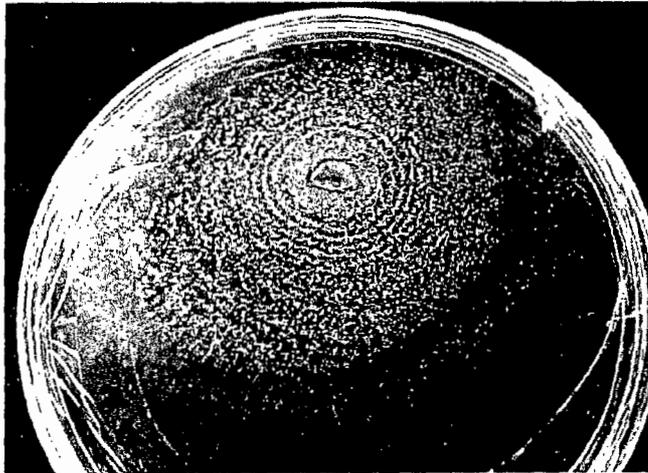


Figura 4. Hongo ocre, Donde se nota el crecimiento radial muy marcado siendo una cepa de 72 h.

En el cuadro 3, se describen de manera detallada las características de los hongos aislados pertenecientes a diferentes géneros, correspondiendo al género *Aspergillus sp* al Ocre (fig 5. b) y no se identificó el de color blanco ya que en ningún momento presentó fructificación, (fig. 5 a).

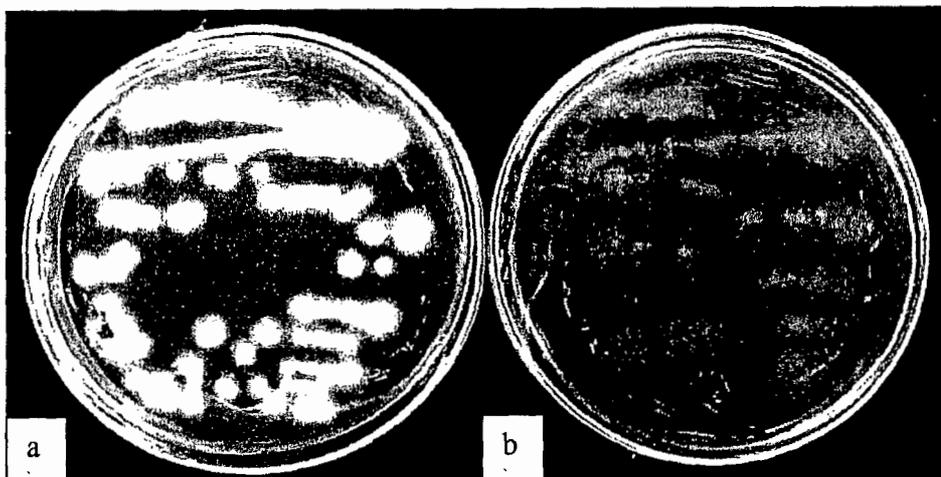


Figura 5. hongos con mayor frecuencia aislados en muestras de tejido infectado por anillo rojo en agave tequilero, a) hongo blanco, no forma esporas, b)hongo ocre, con formación de conidióforos.

**Cuadro 3. Características morfológicas de los hongos aislados**

<b>COLOR DE COLONIA</b>	<b>OCRE A</b>	<b>BLANCA B</b>
HIFAS	CAFÉ CLARO	TRASLUCIDA
COLOR	OCRE/ CAFÉ OBSCURO	BLANCO
DELGADAS / GRUESAS	GRUESAS	MUY DELGADAS
SEPTOS	SI	NO
ESPORAS	SI ABUNDANTES	NO PRESENTA
COLOR	PARDO	
FORMA	ESFERICAS	
CONIDIOFOROS	SI FORMA DE ARBOLITOS	AUSENTES
COLOR	PARDO OBSCURO	

## **4.2. Pruebas de patogenicidad en invernadero**

De las inoculaciones que se realizaron los síntomas que se presentaron a los 30 días fueron los siguientes:

- Tratamiento 1: correspondiente al testigo, las plantas se desarrollaron sin ningún síntoma, con un crecimiento normal y un color característico del cultivo, verde azulado, sin presentar apertura de cogollo.
- Tratamiento 2: no se presentaron síntomas en el área foliar severos solo un ligero amarillamiento en el segundo tercio de las hojas, que formaron pequeños puntos de color café oscuros, quedando como estructuras rígidas de color rojizas, no muy notorias, presentaron un 30% en el tratamiento, algunas lesiones como pequeñas estrías color paja las cuales se necrosarán.
- Tratamiento 3: Solo presentó un pequeño amarillamiento en la base de las hojas más viejas, mostrando las mismas estrías y la necrosis del tejido, que en el tratamiento 2.
- Tratamiento 4: no presentó ninguna lesión aérea, sin embargo tampoco demostró un desarrollo vigoroso como el testigo, no hay presencia de estriados ni de ablandamientos de tejido.
- Todos los tratamientos presentaron encarrujamiento y decoloración de las hojas a un color cenizo, el sustrato se encostró por falta de humedad, por lo que en las plantas manifestaron marchitamiento.

Cabe mencionar que durante los primeros 45 días de inoculadas las plantas se presentó una variación drástica en las temperaturas, alcanzando temperaturas de hasta 47<sup>o</sup>C provocando un estrés severo en las plantas por lo que mostraron síntomas de encarrujamiento, decoloración, marchitamiento y finalmente alcanzaron la muerte, (fig. 6).

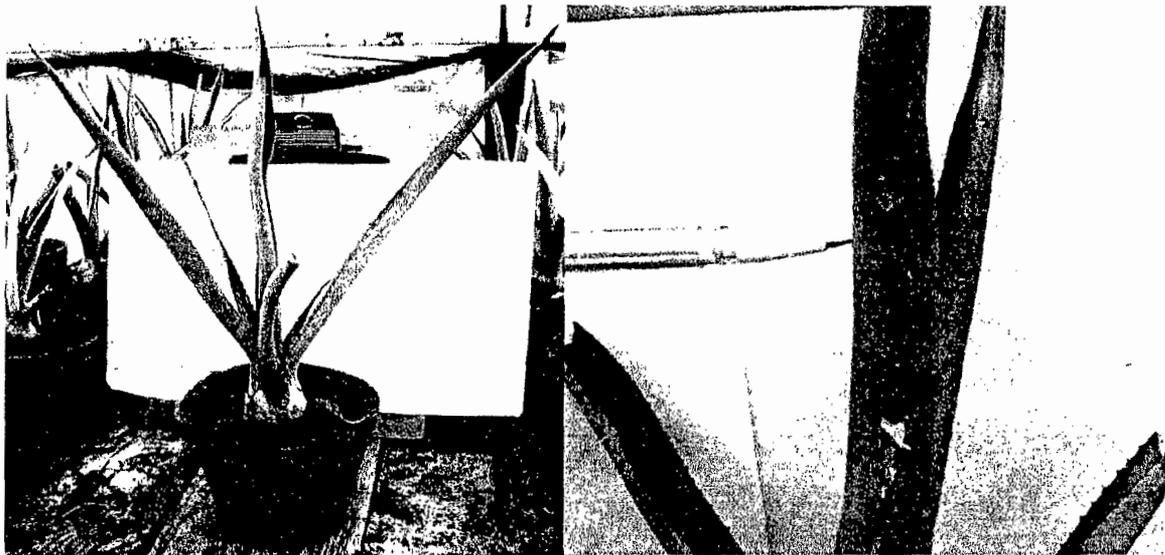


Figura 6. Encarrujamiento y desprendimiento de la capa cerosa, causados en la primera etapa de inoculación, donde las temperaturas que se registraron fueron elevadas.

La primera fase de inoculación se realizó del 14 de mayo al 28 de junio del 2004, en la primera fase, las condiciones ambientales son adversas y las plantas no resistieron la etapa de adaptación. Los cambios drásticos presentados no concuerdan con las necesidades óptimas de propagación de la bacteria (*Erwinia amylovora*), Steiner, (1992).

Segunda fase de pruebas de patogenicidad en invernadero. Se realizó del 28 de junio al 9 de agosto del 2004, en esta etapa la temperatura juega un papel importante ya que la variación en temperaturas máximas se establecieron de 30 a 45 °C, mientras que las mínimas se presentaron más estables de 16 a 14 °C, las plantas no presentaron estrés, ya que se manifestó en el crecimiento del tratamiento testigo.

Debido a lo anterior, se realizaron algunos cambios en el invernadero: colocación de una malla sombra al 70%, riegos cada tercer día y la aplicación de un agroquímico, H24 a base de Propoxur, Praletrina y Deltamentrina, para así tener una condición favorable para el desarrollo de los patógenos y a su vez de las plantas. Posteriormente se inoculó por segunda ocasión, teniendo un tratamiento

adicional siendo el T5 (combinación de los tres microorganismos + agua bidestilada estéril). Los síntomas que se observaron se describen a continuación:

Tratamiento 1 (testigo): se desarrollo satisfactoriamente teniendo un color verde azulado brillante su etapa fonológica de crecimiento vegetativo tuvo un aumento 10 a 15 cm. de altura, en comparación con los demás tratamientos, a si mismo la apertura del cogollo dando origen a varias pencas (2 a 3) por planta. (fig. 7).

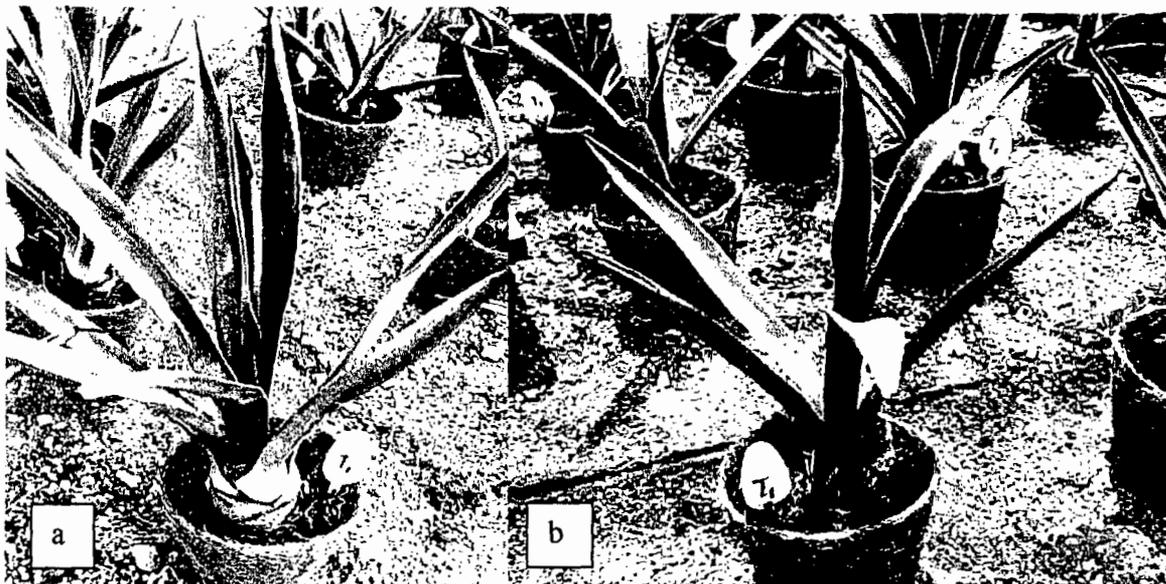
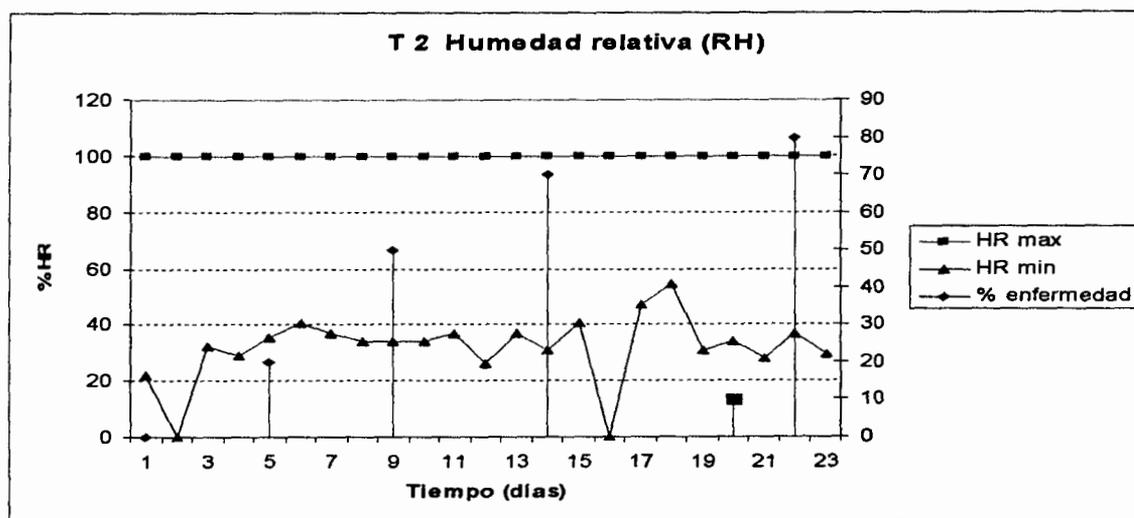


Figura 7. Tratamiento 1, plantas vigorosas y sanas a) planta antes del tratamiento, b) planta al concluir la etapa experimental.

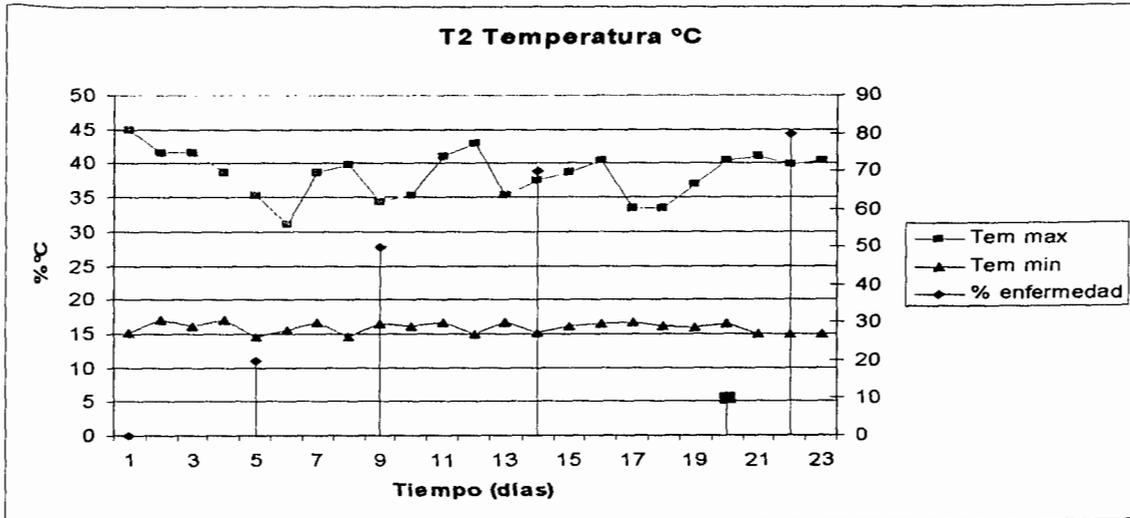
El tratamiento 2, cambió de coloración de un verde azul a uno más pálido hasta llegar gradualmente a un verde pardo, presentó las mismas aglomeraciones de manchas en la parte basal de las pencas, simulando una sola mancha. En forma simultánea se presento una marchitez de las pencas, las cuales muestran como un arrugamiento del tejido en forma de estría en el cogollo. Al igual que en la primera fase de inoculación presentó un ligero amarillamiento en el segundo tercio de las pencas, simultáneamente el 20% de las plantas inoculadas, mostraron una pudrición blanda en la base del cogollo, al quinto día de inoculación los daños fueron muy marcados; el 50% de las plantas presentaron clorosis amarillentas con algunas tonalidades café oscuras, se notó un pequeño hundimiento, sin embargo

esta pudrición no corresponde al daño típico de la pudrición del cogollo ni de anillo rojo. En algunas plantas se observaron con marchitamiento debido a posibles daños por el agroquímico (Fig., 7 a), décimo día, los hijuelos tienen el 70% de pudrición de cogollo muy avanzado con manchas alargadas amarillo brillante en las hojas secundarias, en el centro de estas manchas se nota una coloración rojiza. Décimo cuarto día, lo más notorio en las lecciones amarillentas se vuelven totalmente rojizas oscuras con apariencia acuosa al inicio y volviéndose rígida; décimo séptimo día, 1 de 10 plantas presenta esporulación del hongo que se inoculó en la base del cogollo, algunos cogollos (4) se muestran rígidos y el resto muy flexibles, las manchas amarillentas se volvieron color marrón, el avance de la pudrición blanda avanzó lentamente afectando al 70% de las plantas. (grafica. 1)

Humedad relativa y temperatura (máximas y mínimas) correspondiente al T2, con respectó al comportamiento de la infección en la segunda fase de inoculación.(grafica 1 y 2).



Grafica. 1, T2 Humedad relativa (RH) Se encuentra poca variabilidad que en la primera etapa de evaluación, notando algunos picos en la HR mínima, inicio de inoculación y días evaluados con cambio significativo en los síntomas de las plantas a evaluar. , □ esporulación en plantas enfermas.



Grafica 2. T2 Temperatura °C. Temperaturas con poca variación térmica, ♦ avancé del patógeno inoculado, □ esporulación en plantas enfermas y días evaluados con cambio significativo en los síntomas de las plantas a evaluar.

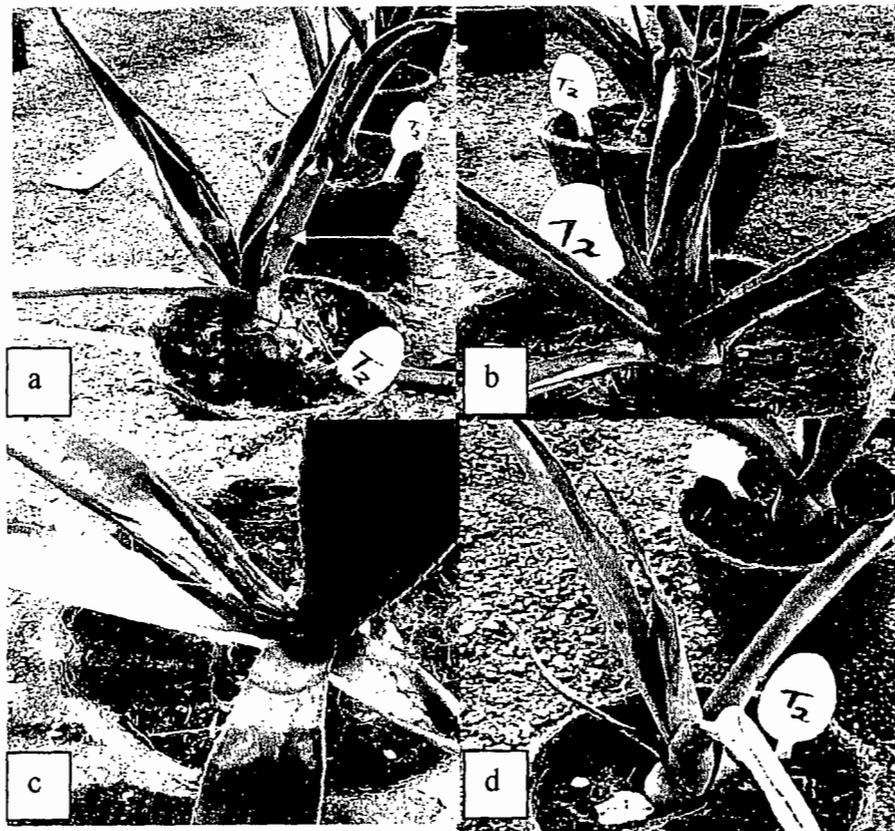


Figura 8. Tratamiento 2, a) pudrición blanda en la base y punta de cogollo con exudados en las pencas secundarias, b) daño en el cogollo y pencas adjuntas, c) presenta esporulación en la base del cogollo y manchas amarillentas con centro rojizo, d) .otros síntomas como encarrujamiento.

En este caso se puede afirmar que los síntomas que se observaron en un inicio son muy similares al síntoma conocido como “anillo rojo”.

Tratamiento 3, el 20% de las plantas mostraron síntomas de amarillamiento, las hojas del cogollo con marchitamiento y contracción de tejidos, al quinto día las pencas intermedias de la planta se observó lesiones amarillentas volviéndose de color café en forma de franjas verticales, los síntomas avanzaron lentamente, manteniéndose las manchas rojizas las que se volvieron de color café y a su vez se acentuó el marchitamiento del cogollo, las pencas más viejas no presentan ningún síntoma, al décimo día las manchas color café se tienen son más oscuras y las lesiones del cogollo son más notorias inicia a secarse; al décimo segundo día el 100% de las plantas presentan pudrición del cogollo atípica y solo el 2% con daño severo, 50% con daño en la parte superior del cogollo y en la base del cogollo, el resto 3% sin presentar ablandamiento en la base, solo se observó amarillamiento en la parte media del cogollo, las plantas presentan encarrujamiento y un tono verde cenizo, solo 10% tiene diminutas manchas amarillas (1 a 2 mm) en la piña de la planta, al décimo séptimo día, las pencas se tornaron de color verde cenizo y el avance de los daños fue lento, las lesiones en la base del cogollo son secas de tal manera que al moverlas se escucha un crujido, ninguna planta tiene síntomas de lesiones blandas, (fig. 9).

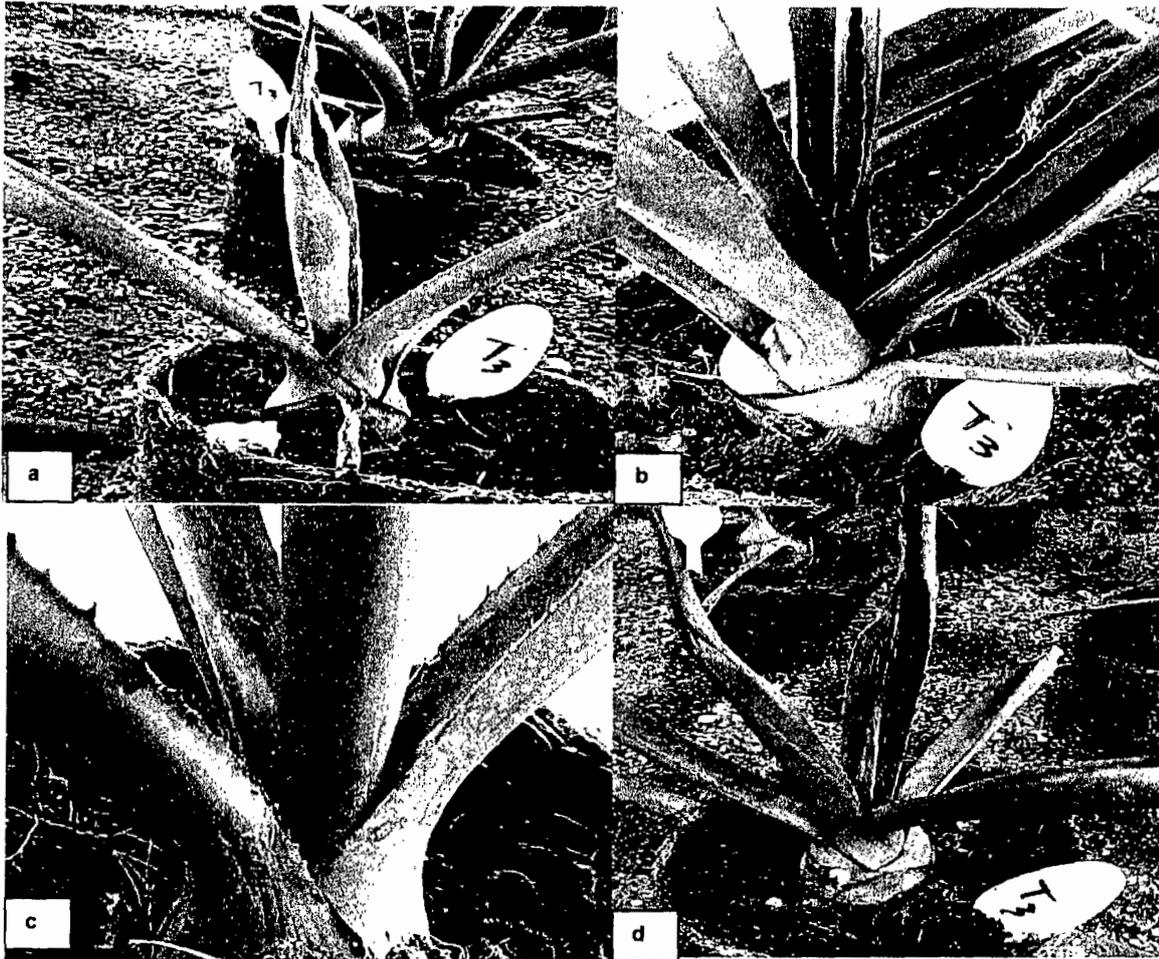


Figura 9. Tratamiento 3, a) pudrición no blanda en la punta del cogollo, b) planta aparentemente sana y cogollo con pudrición, c) inicio de la pudrición en la base del Cogollo des pues de 15 días de inoculación, d) planta en estado de putrefacción de piña.

En el caso del tratamiento 4, se observó una pudrición blanda en la base del cogollo ascendiendo rápidamente hasta la punta de este, la coloración amarillenta en el borde de las lesiones acuosas, que fueron muy pequeñas, notándose con mayor incidencia una coloración café cobrizo, las pencas más tiernas se desprendieron rápidamente hasta dejar a simple vista el centro de crecimiento de la plántula (fig. 10). Considerando estos síntomas muy parecidos a lo que se conoce como pudrición del cogollo causado por un complejo de patógenos entre los que se encuentra *Erwinia* sp.

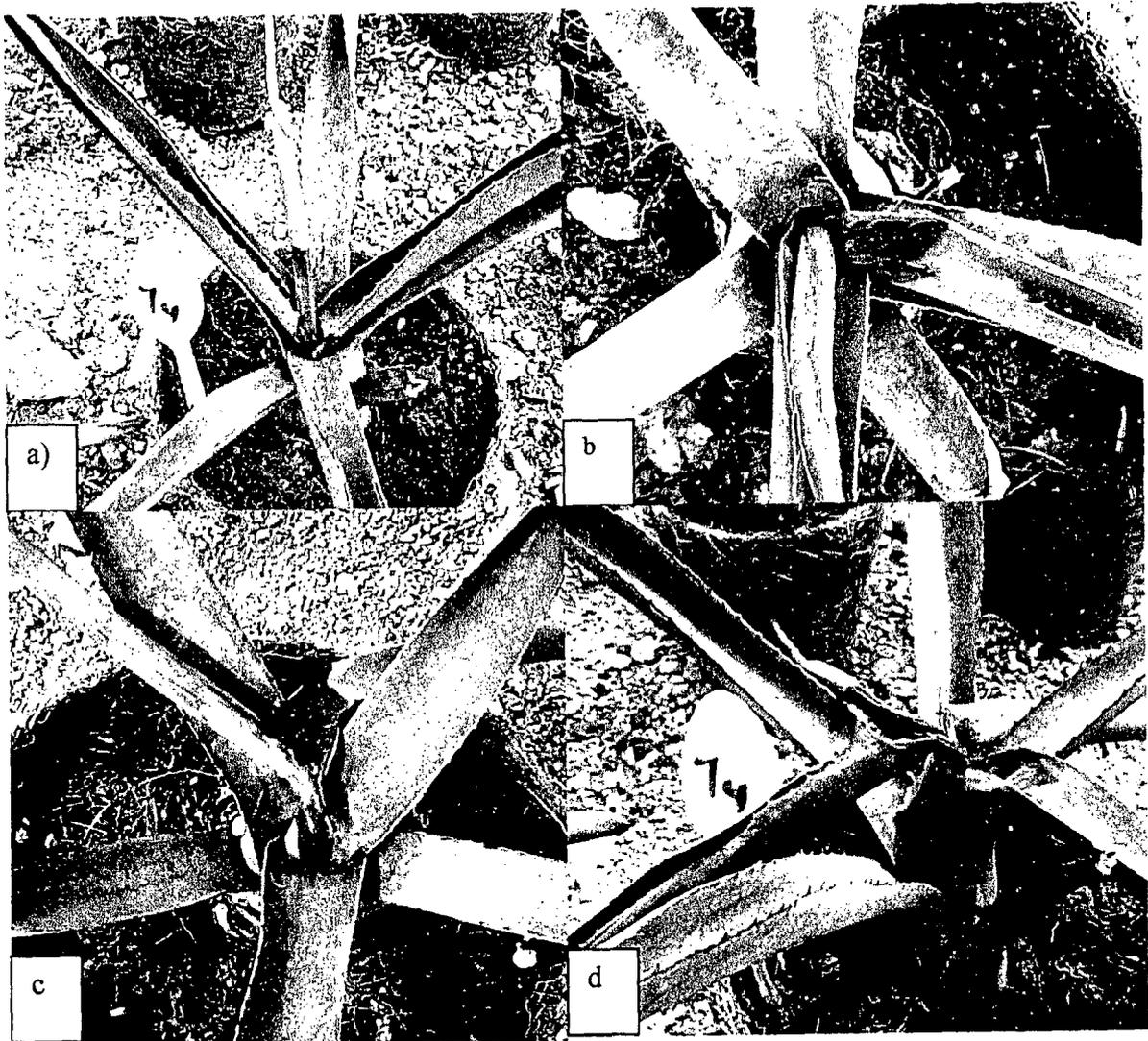
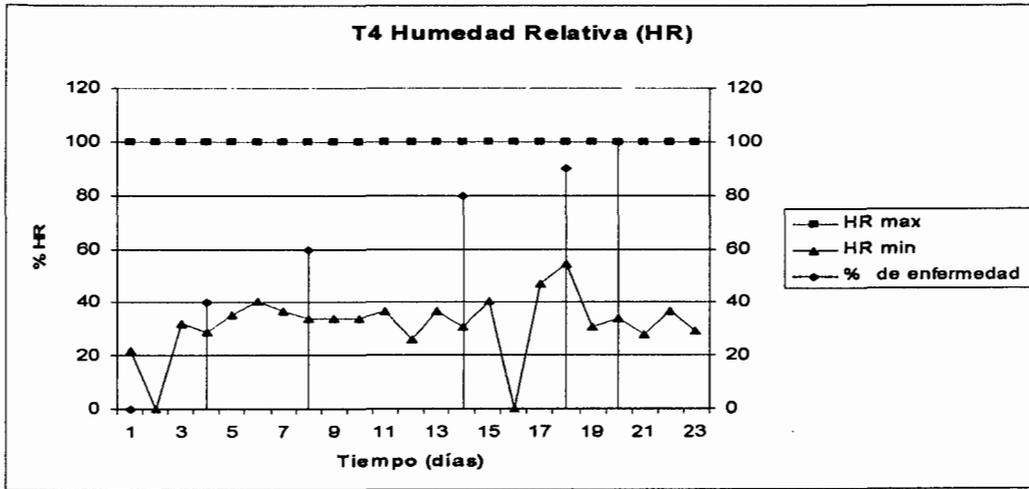


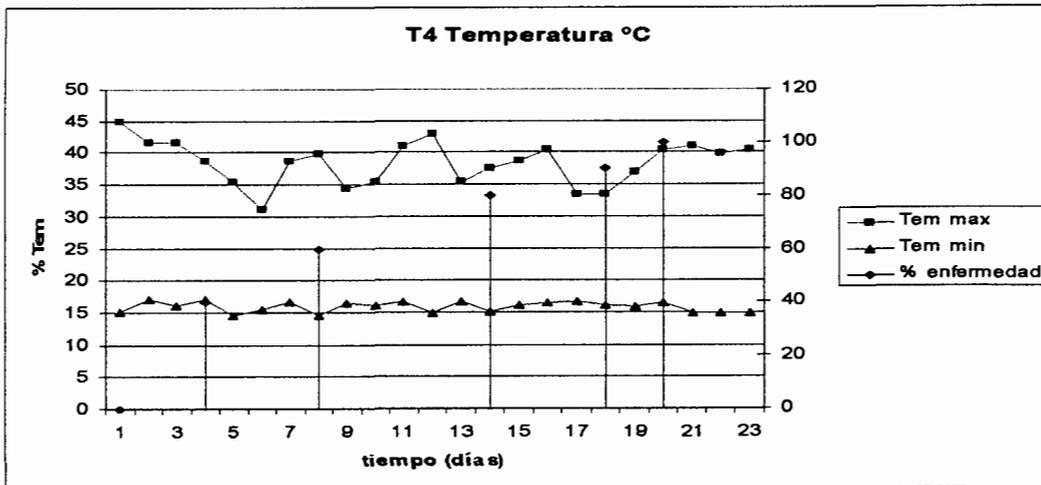
Figura 10. Tratamiento 4, a) síntoma al momento de quitar la cámara húmeda, b) y avance de síntomas del cogollo en forma ascendente, c) daño irreversible en el cogollo, pudrición total.

Humedad relativa y temperatura, con respectó al comportamiento de la infección en la segunda fase de inoculación en el T4. (graficas 3 y 4)



Grafica. 3. T4 Humedad Relativa (HR).

Variabilidad en la primera etapa de evaluación, notando algunos picos en la HR mínima, inicio de inoculación y días evaluados con cambio significativo en los síntomas de las plantas, ♦ % de avancé del patógeno inoculado.



Grafica 4. T4 Temperatura °C.

Temperaturas con poca variación térmica, ♦ avancé del patógeno inoculado, Días evaluados con cambio significativo en los síntomas de las plantas a evaluar.

En el tratamiento 5 los síntomas que se observaron fueron, costras pequeñas de color paja y en forma de estrías en las pencas intermedias de la plántula, siendo estas muy similares a las mismas lesiones del tratamiento 2, consistiendo en lo siguiente; los hijuelos cambiaron de un verde azul a uno más pálido hasta llegar gradualmente a un verde pardo, presentó aglomeraciones de manchas en la parte basal de las pencas, se mostró un encarrujamiento del tejido en forma de estría verticales, las plantas presentan clorosis amarillentas con algunas tonalidades café oscuras con hundimiento en el tejido, sin embargo esta pudrición no corresponde al daño típico de pudrición del cogollo, en el centro de estas manchas se nota una coloración rojiza, lo más notorio en las lesiones amarillentas se vuelven totalmente rojizas oscuras con apariencia acuosa al inicio y volviéndose rígida. Hay que señalar que a diferencia del tratamiento 2 adicionalmente se observó un notorio desprendimiento de la piña en la parte basal de la planta en el 50% de las plantas y el avance de la pudrición en el cogollo fue lento. (fig. 11).

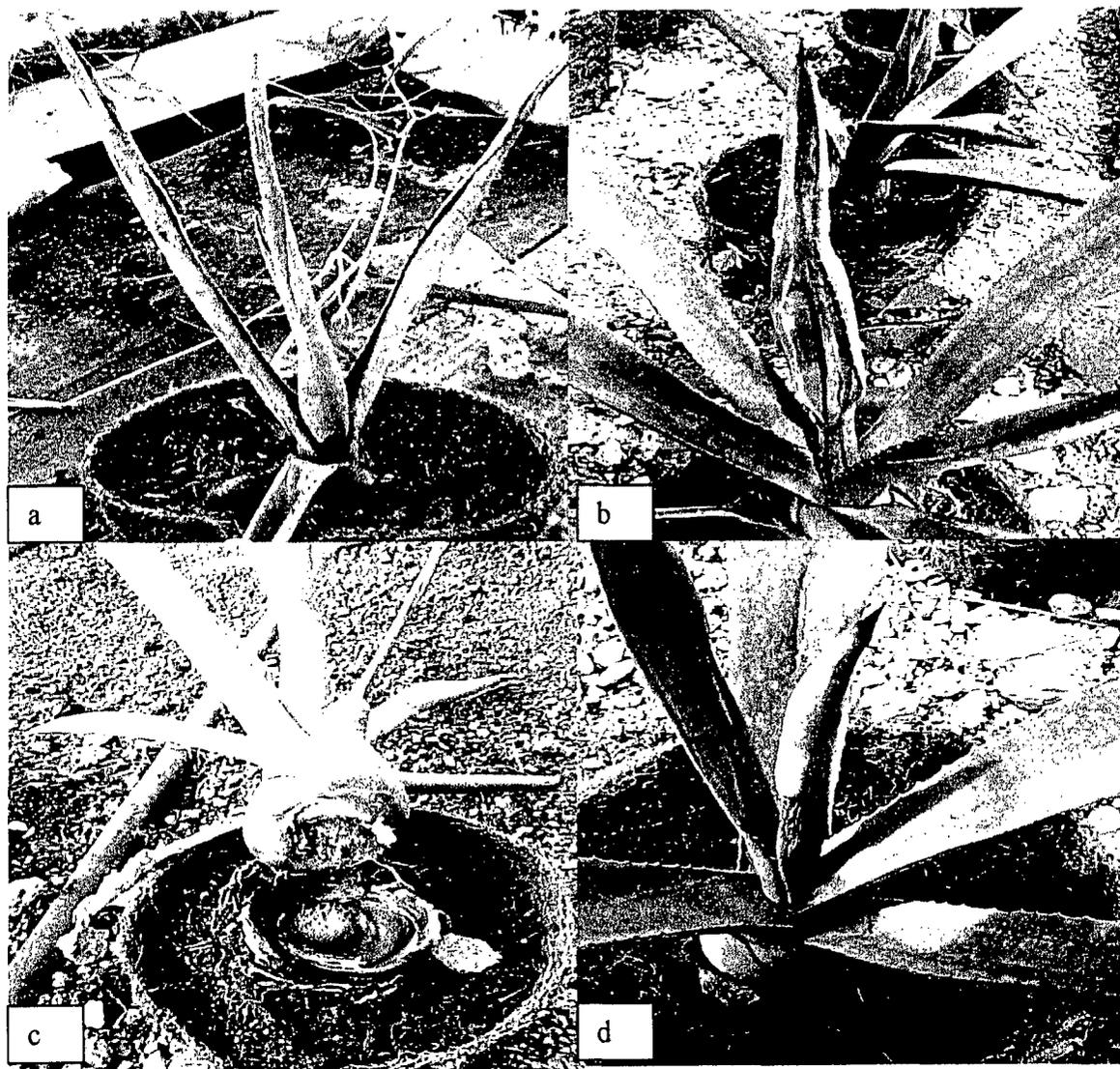


Figura 11. Tratamiento 5, a) lesiones como pequeños canchros y síntomas de encarrujamiento, b) avance de la pudrición completa en el cogollo, lesiones rojizas en las hojas secundarias, c) cogollo y base de piña totalmente con pudrición severa. , planta fácilmente desprendible, d) pudrición en la base del cogollo y costras color paja en las hojas secundarias.

En la figura 12 se observan el desarrollo fisiológico de los 5 tratamientos después de 40 días de inoculados por segunda ocasión.



Figura 12: Comparativo visual al termino de la etapa experimental en la segunda fase de inoculación de izquierda a derecha tratamiento 1 al 5.

## 5. CONCLUSIONES

- De acuerdo con la descripción de los daños de cada uno de los tratamientos, se descarta la hipótesis de que anillo rojo es provocado por una bacteria del genero *Erwinia* puesto que el estudio indica que Anillo rojo es por causa del hongo de género *Aspergillus sp.*
- No se determinó las condiciones optimas a las cuales se favorece la presencia de los patógenos descritos, sin embargo las características únicas de la zona centro del estado de Jalisco favorece la propagación de anillo rojo.
- El tratamiento dos que consiste en la cepa del hongo identificado del genero *Aspergillus sp.*, mostró una sintomatología parecida a la de Anillo rojo lo que sugiere que este pueda ser el causante de enfermedad.
- En los tratamientos 4 y 5 los síntomas se presentaron con mayor rapidez, por lo que el efecto de las bacterias es el más rápido y devastador.
- El abuso en la aplicación de agroquímicos esta relacionado en trastornos metabólicos, físicos y químicos lo que facilita la penetración de los patógenos a las plantas y causan enfermedades.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- AGRIOS GEORGE N.; Fitopatología; Ed, UTEHA Noriega editors; México 1998; pag. 538.
- BAILEY, J. A. (ED). 1986. Biology and molecular biology of plant-pathogen interaction, New York, Springer Verlag. pp 415.
- BENNET, R.A., BILLING, E. 1980. Origin of the polysaccharide component of ooze from plants infected. With *Erwinia amylovora*. J. Gen. Microbiol. 116:341-49.
- BERR, S. V; OPGENORTH, J. 1976. *Erwinia amylovora* on FIRE blight canker surfaces and blossoms in relation to disease occurrence. Phytopathology. 66:317-22.
- CALLOW, J.A. (ED) 1983. Biochemical plant pathology. New York. John Wiley and Sons. Pp 640
- COLLMER, A, KEEN, N.T. 1986 The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. Annu. Rev. Phytopathol. 24:383-09.
- CONSEJO REGULADOR DEL TEQUILA (C.R.T.) 2000. Manual de Enfermedades de Agave . Guadalajara , Jalisco.
- DIÓDORO G. S. 1993. Los agaves en México, Universidad Autónoma de Chapingo.
- HILDERBRAND, D.C. CAESAR, A. 1989. The widespread occurrence of rutin glycosidase in fluorescent phytopathogenic pseudomonads. Lett. Appl. Microbiol, 8:117-19
- INEGI; 1988. Los Municipios de Jalisco. Colección: Enciclopedia de los Municipios de México. Secretaría de Gobernación y Gobierno del Estado de Jalisco.
- LAROCHE, M. 1987. Specific identification of *E. amylovora* through their metabolites. Technical communication of international Society for Horticultural Science fourth international workshop on fire blight. Acta Horticulturariae 217: 43-51.
- LUNA HERNÁNDEZ GREGORIO; 1998, Hacia un manejo integrado de plagas, fundamentos y recomendaciones prácticas, Agave tequilana; Ed. Cheminova, México, pag. 156-7, 179-183.

- MINISTERIO AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACION; 1991, Manual de laboratorio: diagnóstico de hongos, bacterias nemátodos fitopatogenos. España, pp 485.
- MURRAY, P. G. 1994. Las plantas que México aportó al mundo. Muy Interesante. Año X, No. 9 D.F. México.
- PAULIN, J. P. PRIMAULT, J. 1993. Feu bactérien et culture du pommier a cidre. París: CTIFLINRA, CFC USDA.
- STEINER, P. W; LIGHTNER, G. 1992. MARYBLYT. A predictive program for forecasting fire blight disease in apples and pears. Version 4.0 computer program. University of Maryland, college. Park.
- VALENZUELA ZAPATA A. G.; 1994, El agave tequilero su cultivo e industria; Monsanto, Litteris editores; México, pag. 133-134.
- . VALENZUELA Z. A. G., 1997. El agave tequilero su cultivo e industria;ed. Lteris editores Monsanto, Jalisco, México, pp 130-33.
- VAN DER ZWET, T; BERR, S. V. 1995. FIRE blight A. practical guide to integrated disease management, Agricultura Information Bolletin No. 631. Washington:
- VANNESTE, J. L. 1995. *Erwinia amylovora* en; Pathogenesis and host specificity in plant Diseases: Histopathological, biochemical, genetic and molecular Basic, pp 21-41, vol 1.
- VERDONCK. E. L; MERGAERT, J. RIJCKAERT, C; SWINGS, J. KESTERS; ET AL. 1987. Genus *Erwinia*: numerical analysis of phenotypic fea tures, int. J. Syst. Bacterial. 37:4-18.
- WALDEE, E. L. 1945. Comparative studies of some peritrichous phytopatogenic. Bacteria. Iowa stata Coll. J. Sci. 19:435-84.