



UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO

CAMPUS GUANAJUATO

DIVISIÓN DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS

**“CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS DEL HONGO
Metarhizium PROVENIENTES DEL SUR DEL ESTADO
DE GUANAJUATO CON POTENCIAL DE PROMOVER
EL CRECIMIENTO VEGETAL”**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOLOGÍA)

PRESENTA

BIOL. FABIOLA DÁVILA BERUMEN

ASESORES

DR. ISRAEL ENRIQUE PADILLA GUERRERO

DR. JUAN CARLOS TORRES GUZMÁN



UNIVERSIDAD
DE GUANAJUATO

Guanajuato, Gto., 13 de noviembre de 2017

DR. AGUSTÍN RAMÓN URIBE RAMÍREZ
Director de la División de Ciencias Naturales y Exactas
Campus Guanajuato
Universidad de Guanajuato

PRESENTE

Por medio de la presente hacemos constar que el trabajo de tesis titulado **“Caracterización de aislados del hongo *Metarhizium* provenientes del sur del estado de Guanajuato con potencial de promover el crecimiento vegetal”**, fue realizado por la alumna **B. FABIOLA DÁVILA BERUMEN** para obtener el grado de **Maestría en Ciencias (Biología)**. Este trabajo de tesis fue realizado en el laboratorio de Genética Molecular de Hongos del Departamento de Biología de esta División bajo nuestra dirección.

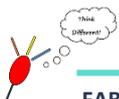
Hacemos constar que el trabajo es original, se realizó con la calidad y rigor científico requerido y está concluido, de manera que la estudiante puede presentar su examen de grado.

Atentamente

Padilla Guerrero
Dr. Israel Enrique Padilla Guerrero.

Juan Carlos Torres Guzmán
Dr. Juan Carlos Torres Guzmán.

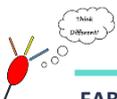
Co-Directores de tesis





AGRADECIMIENTOS

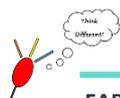
Al soporte financiero del CONACyT (PDCPN2014-248622) y a la Universidad de Guanajuato (CIFOREA 89/2016) para la realización de este proyecto.





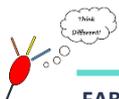
ÍNDICE GENERAL

| | |
|--|------------|
| ÍNDICE DE FIGURAS | I |
| ÍNDICE DE TABLAS | III |
| ABREVIATURAS | IV |
| RESUMEN | V |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1. Relación Planta-Hongo | 1 |
| 1.2. Generalidades del género <i>Metarhizium</i> | 1 |
| 1.3. Interacción de <i>Metarhizium</i> con plantas y su papel en la rizósfera | 3 |
| 1.4. Aislamiento y caracterización de <i>Metarhizium</i> | 7 |
| 1.5. Características del estado de Guanajuato | 8 |
| 1.6. Áreas naturales protegidas del estado de Guanajuato | 9 |
| 2. JUSTIFICACIÓN | 11 |
| 3. OBJETIVOS | 12 |
| 4. MATERIAL Y MÉTODOS | 13 |
| 4.1. Cepas utilizadas | 13 |
| 4.2. Semillas utilizadas: (semillas de sorgo) <i>Sorghum bicolor</i> | 14 |
| 4.3. Medios de cultivo | 14 |
| 4.4. Plásmido empleado (Vector pGEM®-T Easy) | 16 |
| 4.5. Oligonucleótidos empleados | 17 |
| 4.6. Aislamiento de <i>Metarhizium</i> | 17 |
| 4.6.1. Colecta y procesamiento de muestras de suelo | 17 |
| 4.6.2. Condiciones de incubación e identificación de <i>Metarhizium</i> | 18 |
| 4.6.3. Obtención de los cultivos puros de <i>Metarhizium</i> | 18 |
| 4.7. Obtención de conidios | 18 |
| 4.8. Determinación de las características morfológicas de la colonia | 19 |
| 4.9. Métodos de Biología Molecular | 19 |
| 4.9.1. Extracción de DNA genómico | 19 |
| 4.9.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la amplificación de un fragmento del gen del factor de elongación | |



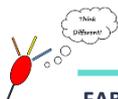


| | |
|--|-----------|
| 1 α (EF-1 α). | 20 |
| 4.9.3. Purificación de los productos de PCR | 21 |
| 4.9.4. Clonación en el vector pGEM®-T Easy | 21 |
| 4.9.5. Transformación de <i>E. coli</i> DH5 α por choque térmico | 22 |
| 4.9.6. Extracción de DNA plasmídico de <i>E. coli</i> | 22 |
| 4.9.7. Tratamiento con endonucleasas de restricción | 23 |
| 4.9.8. Secuenciación y análisis de las secuencias | 23 |
| 4.10. Ensayo <i>in vitro</i> de la interacción <i>Metarhizium-Sorghum bicolor</i> | 24 |
| 4.11. Ensayo en condiciones semicontroladas (invernadero) | 24 |
| 4.12. Determinación del desarrollo de las plántulas | 25 |
| 4.13. Ensayos <i>in vitro</i> de la interacción de <i>Metarhizium</i> y <i>Fusarium oxysporum</i> | 25 |
| 4.14. Determinación del antagonismo entre <i>Metarhizium</i> y <i>Fusarium oxysporum</i> | 26 |
| 4.15. Efecto de los metabolitos excretados por <i>Metarhizium</i> sobre <i>F. oxysporum</i> | 27 |
| 4.16. Efecto protector de <i>Metarhizium</i> hacia <i>F. oxysporum in vitro</i> e <i>in planta</i> (<i>Sorghum bicolor</i>) | 28 |
| 4.17. Efecto protector de <i>Metarhizium</i> hacia <i>F. oxysporum in planta</i> (<i>Solanum lycopersicum</i>) | 29 |
| 5. RESULTADOS | 30 |
| 5.1. Aislamiento de <i>Metarhizium</i> | 30 |
| 5.2. Caracterización morfológica de los aislados de <i>Metarhizium</i> | 35 |
| 5.3. Caracterización molecular de los aislados de <i>Metarhizium</i> | 39 |
| 5.3.1. Distribución geográfica de los aislados obtenidos | 44 |
| 5.4. Interacción de los aislados de <i>Metarhizium</i> con semillas de sorgo (<i>in vitro</i>) | 46 |
| 5.5. Interacción de los aislados de <i>Metarhizium</i> con la planta de sorgo en condiciones semicontroladas (invernadero) | 49 |
| 5.5.1. Efecto de los aislados de <i>Metarhizium</i> sobre la germinación de las semillas de sorgo en un ambiente semicontrolado | 51 |
| 5.5.2. Efecto de los aislados de <i>Metarhizium</i> sobre la longitud de la raíz de las plántulas de sorgo en un ambiente semicontrolado | 52 |





| | |
|---|-----------|
| 5.5.3. Efecto de los aislados de <i>Metarhizium</i> sobre la longitud total de la planta de sorgo en un ambiente semicontrolado | 53 |
| 5.5.4. Efecto de los aislados de <i>Metarhizium</i> sobre el peso seco de la planta de sorgo en un ambiente semicontrolado | 55 |
| 5.6. Antagonismo de los aislados de <i>Metarhizium</i> a <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> en cultivo dual. | 56 |
| 5.7. Efecto de los metabolitos excretados por <i>Metarhizium</i> sobre <i>F. oxysporum</i> | 66 |
| 5.8. Efecto protector de <i>Metarhizium</i> hacia <i>F. oxysporum</i> <i>in vitro</i> e <i>in planta</i> (<i>Sorghum bicolor</i>) | 68 |
| 5.9. Efecto protector de <i>Metarhizium</i> hacia <i>F. oxysporum</i> <i>in planta</i> (<i>Solanum lycopersicum</i>) | 71 |
| 6. DISCUSIÓN | 75 |
| 7. CONCLUSIONES | 84 |
| 8. PERSPECTIVAS | 85 |
| 9. BIBLIOGRAFÍA | 86 |
| ANEXOS | 93 |

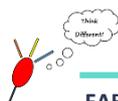




ÍNDICE DE FIGURAS

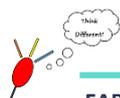
Página

| | | |
|-----------|---|----|
| Figura 1 | Representación esquemática del ciclo de la vida de <i>M. anisopliae</i> en sus hospederos. | 2 |
| Figura 2 | Colonización de raíces por parte de <i>Metarhizium</i> (ARSEF2575) expresando GFP. | 3 |
| Figura 3 | Intercambio de nitrógeno derivado de insectos para la planta, y compuestos carbonados de la planta hacia <i>Metarhizium</i> . | 4 |
| Figura 4 | Biocontrol de <i>F. solani</i> por <i>M. robertsii</i> sobre raíz de frijol. | 6 |
| Figura 5 | Representación gráfica del área natural protegida “Las Siete Luminarias”. | 10 |
| Figura 6 | Proceso del aislamiento de cepas de <i>Metarhizium</i> . | 18 |
| Figura 7 | Delimitación de áreas en “Imagen Lab Software” de las placas. | 27 |
| Figura 8 | Placas Petri con el medio de selección después de 25 días de incubación mostrando los aislados de <i>Metarhizium</i> . | 32 |
| Figura 9 | Aislados del hongo <i>Metarhizium</i> . | 33 |
| Figura 10 | Aislados de <i>Metarhizium</i> en medio M-100 2N. | 34 |
| Figura 11 | Crecimiento radial de los aislados de <i>Metarhizium</i> , mostrando sus características morfológicas. | 36 |
| Figura 12 | Electroforesis en gel de agarosa (DNA cromosómico). | 39 |
| Figura 13 | Amplificación del Fragmento del Factor de elongación 1 α (EF-1 α) de \approx 800 pb. | 40 |
| Figura 14 | Comprobación de la ligación del fragmento de interés del EF-1 α en el vector pGEM-T Easy, mediante corte enzimático con <i>EcoRI</i> . | 41 |
| Figura 15 | Análisis filogenético de un fragmento del gen (EF-1 α) de los aislados obtenidos en este trabajo y las secuencias de las cepas reportadas por Bischoff y colaboradores en 2009. | 43 |
| Figura 16 | Porcentaje de identidad entre algunos de los aislados de <i>Metarhizium</i> . | 44 |
| Figura 17 | Distribución geográfica de los aislados de <i>Metarhizium</i> en la región natural protegida “Las Siete Luminarias”. | 45 |
| Figura 18 | Crecimiento de semillas de sorgo en una interacción de 10 días con algunos aislados de <i>Metarhizium</i> en condiciones <i>in vitro</i> (28°C bajo oscuridad constante). | 47 |
| Figura 19 | Gráfica de cajas y bigotes de peso fresco de plántulas de sorgo <i>in vitro</i> . | 48 |
| Figura 20 | Gráfica de cajas y bigotes de peso seco de plántulas de sorgo <i>in vitro</i> . | 49 |
| Figura 21 | Macetas donde se desarrolló la interacción de aislados de <i>Metarhizium</i> con <i>Sorghum bicolor</i> en condiciones semicontroladas por 30 días. | 50 |
| Figura 22 | Imagen de comparación de tamaño de las plántulas obtenidas de la interacción con los aislados de <i>Metarhizium</i> bajo condiciones semicontroladas. | 51 |
| Figura 23 | Gráfico de porcentaje de germinación de los aislados de <i>Metarhizium</i> . | 52 |
| Figura 24 | Gráfica de cajas y bigotes de longitud de raíz de plántulas de sorgo sembradas en ambiente semicontrolado. | 53 |
| Figura 25 | Gráficas de cajas y bigotes de longitud de la plántula de sorgo (A) y la longitud total de la planta (B), sembradas en ambiente semicontrolado. | 54 |
| Figura 26 | Gráficas de cajas y bigotes del peso seco de las plántulas de sorgo sembradas en ambiente semicontrolado. | 56 |





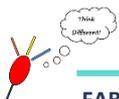
| | | |
|-----------|---|----|
| Figura 27 | Crecimiento de <i>Fusarium oxysporum</i> en condiciones de fotoperiodo y oscuridad total (16 días de incubación). | 57 |
| Figura 28 | Ensayos de cultivo dual en placa de algunos aislados de <i>Metarhizium</i> y <i>F. oxysporum</i> a los 16 días de interacción bajo condiciones de fotoperiodo. | 59 |
| Figura 29 | Promedio del área ocupada por la barrera de separación (halo) que se forma entre los aislados de <i>Metarhizium</i> y <i>F. oxysporum</i> en condiciones de fotoperiodo. | 60 |
| Figura 30 | Ensayos de cultivo dual en placa de algunos aislados de <i>Metarhizium</i> y <i>F. oxysporum</i> a los 16 días de interacción bajo condiciones de oscuridad total. | 61 |
| Figura 31 | Promedio del área ocupada por la barrera de separación (halo) que se forma entre los aislados de <i>Metarhizium</i> y <i>F. oxysporum</i> en condiciones de oscuridad total. | 62 |
| Figura 32 | Área ocupada por <i>F. oxysporum</i> en un enfrentamiento (cultivo dual en placa) con los diferentes aislados de <i>Metarhizium</i>. | 63 |
| Figura 33 | Área ocupada por <i>Metarhizium</i> en un enfrentamiento (cultivo dual en placa) con <i>F. oxysporum</i>. | 65 |
| Figura 34 | Efecto producido por los metabolitos solubles excretados al medio por <i>Metarhizium</i> sobre el fitopatógeno <i>F. oxysporum</i>. | 67 |
| Figura 35 | Área ocupada por <i>F. oxysporum</i> en los bioensayos con papel celofán. | 67 |
| Figura 36 | Interacción tripartita (<i>Sorghum bicolor</i> – <i>Metarhizium</i> – <i>Fusarium</i>). | 69 |
| Figura 37 | Imagen representativa de plantas de sorgo en una interacción tripartita bajo condiciones semicontroladas (invernadero). | 70 |
| Figura 38 | Gráfica de cajas y bigotes del peso seco total de las plantas de sorgo sembradas en un ambiente semicontrolado (interacción tripartita). | 71 |
| Figura 39 | Imagen representativa de plantas de tomate en una interacción tripartita bajo condiciones semicontroladas (invernadero). | 72 |
| Figura 40 | Gráficas de cajas y bigotes de los diferentes parámetros evaluados de la planta de tomate que se encontró en una interacción tripartita bajo condiciones de invernadero. | 74 |





ÍNDICE DE TABLAS

| | | Página |
|---------|---|--------|
| Tabla 1 | Oligonucleótidos utilizados en este estudio. | 17 |
| Tabla 2 | Mezcla de reacción para PCR. | 20 |
| Tabla 3 | Mezcla de reacción para ligación en pGEM®-T Easy. | 22 |
| Tabla 4 | Puntos de muestreo dentro del área natural protegida “Las Siete Luminarias”. | 30 |
| Tabla 5 | Total de muestras tomadas por sitio de muestreo en el área natural protegida “Las Siete Luminarias”. | 35 |
| Tabla 6 | Número total de aislados de <i>Metarhizium</i> spp. colectadas en “Las Siete Luminarias”. | 46 |
| Tabla 7 | Lista de aislados obtenidos en este trabajo (sección de anexos). | 93 |

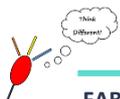




ABREVIATURAS

| Acrónimo o símbolo | Significado |
|--------------------|---|
| DNA (ADN) | Deoxyribonucleic Acid (Ácido desoxirribonucleico) * |
| RNA (ARN) | Ribonucleic acid (Ácido ribonucleico) * |
| Atm | Atmósfera |
| °C | Grados centígrados |
| g | Gramo |
| L | Litro |
| M | Molar |
| m | Metro |
| mM | Milimolar (milésima parte de un mol) |
| mm | Milimetro |
| mg | Miligramo |
| min | Minuto |
| mL | Mililitro |
| pb | Pares de bases |
| PCR | Polimerasa Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa) * |
| PDA | Potato Dextrose Agar (Agar de papa y dextrosa) * |
| pH | Potencial de hidrógeno |
| ® | Marca registrada |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| s | Segundos |
| SDS | Sodium Dodecyl Sulfate (Dodecil sulfato de sodio)* |
| spp. | Especies |
| TAE | Tris-Ácido Acético-EDTA |
| µg | Microgramos |
| µL | Microlitros |
| % | Por ciento |

* Por sus siglas en inglés





RESUMEN

El estado de Guanajuato cuenta con una gran biodiversidad, ya que en él existen 23 áreas naturales protegidas, en donde la actividad antropogénica es limitada, por lo que los ecosistemas ahí presentes se encuentran conservados; debido a esto la población de microorganismos aumenta en el suelo, como es el caso de *Metarhizium*, un hongo entomopatógeno que tiene gran importancia debido a su amplio uso como controlador de plagas de artrópodos.

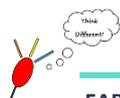
Recientemente se reportó que este hongo forma asociaciones simbióticas con las raíces de las plantas y actúa como un antagonista hacia ciertos hongos fitopatógenos.

En este trabajo se obtuvieron aislados nativos del hongo *Metarhizium* del área natural protegida “Las Siete Luminarias”, se realizó su caracterización morfológica y molecular, además de evaluar su capacidad para promover el crecimiento de plantas de sorgo, así como su posible capacidad antagónica hacia *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Las muestras se tomaron en 4 sitios localizados dentro del área natural; con diferentes características como la formación de variados microclimas y variación de vegetación. Se obtuvo un total de 44 aislados de *Metarhizium* de 133 muestras de suelo.

Para cada uno de los aislados obtenidos se realizó la caracterización morfológica de colonia; y con el análisis molecular de las secuencias de un fragmento del gen EF1- α se logró ubicar taxonómicamente a los aislados dentro de 4 clados pertenecientes a: *M. robertsii*, *M. brunneum*, *M. guizhouense* y *M. anisopliae*; así como posiblemente a una nueva especie de *Metarhizium*. Se evaluó en los 44 aislados la promoción del crecimiento vegetal y su capacidad de protección a fitopatógenos.

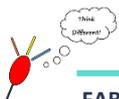
En relación a la promoción del crecimiento vegetal, se observó que existe una promoción de crecimiento en plantas de sorgo en 39 de los 44 aislados probados, siendo el mejor bajo condiciones semicontroladas (invernadero) el aislado HA-11-2 de *M. guizhouense*.

En los ensayos de confrontación de *Metarhizium* con *Fusarium* se observó que 39 aislados tuvieron un efecto antagónico hacia este fitopatógeno, tanto *in vitro* como *in planta* siendo el mejor el aislado HA-11-2.





**“CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS DEL
HONGO *Metarhizium* PROVENIENTES DEL
SUR DEL ESTADO DE GUANAJUATO CON
POTENCIAL DE PROMOVER EL
CRECIMIENTO VEGETAL”**





1. INTRODUCCIÓN

1.1. Relación Planta-Hongo

Los hongos del suelo forman interacciones simbióticas con más del 90% de todas las especies de plantas vasculares y dependen de estas interacciones para sobrevivir (Behie y Bidochka, 2013; Behie y Bidochka, 2014). Una simbiosis se define como una relación estrecha y persistente entre organismos de diferentes especies. Los organismos involucrados en dicha interacción biológica son denominados simbiositos; la interacción simbiótica se clasifica en base a el tipo de efecto que existe en los simbiositos: benéfico, perjudicial o no afectados por la asociación (Paracer y Ahmadjian, 2000). Estas interacciones son de enorme importancia ecológica, ya que algunas de ellas mejoran la adquisición de nutrientes por parte de las plantas a cambio de azúcares derivados de la planta, hacia el hongo (Behie *et al.*, 2017).

1.2. Generalidades del género *Metarhizium*

Las especies del género *Metarhizium* (Hypocreales: Clavicipitaceae) son hongos entomopatógenos, ampliamente reconocidos por su considerable potencial de control biológico, pudiendo infectar a más de 200 especies, incluyendo por lo menos siete órdenes de insectos (Kepler *et al.*, 2015; Keyser *et al.*, 2015). La enfermedad que provoca se conoce como muerte verde, llamada así ya que se observa la formación de conidios de color verde sobre el cadáver del insecto.

Este hongo se encuentra en una gran variedad de ecosistemas en todo el mundo, llegando a producir en el suelo hasta 10^6 propágulos por gramo de tierra (Behie *et al.*, 2012).

El mecanismo de patogenicidad usado por *Metarhizium* ha sido bien estudiado, se conocen las etapas principales del proceso infectivo (St Leger *et al.*, 1996). En general, el mecanismo de infección inicia con la adhesión de los conidios sobre la superficie del exoesqueleto, lo cual sugiere una interacción hidrofóbica entre éstos (Fang *et al.*, 2007). Posteriormente, germinan y forman el apresorio que los mantiene unidos para iniciar la formación de los tubos germinales y así





penetrar la cutícula del insecto (Charnley y St Leger, 1991; Shah y Pell, 2003) (Figura 1).

Al llegar a la hemolinfa se transforman en células individuales (blastoesporas), en esta etapa el hongo debe superar los mecanismos de defensa del insecto, mediante la síntesis de proteasas que degradan elementos del sistema inmune humoral de éste, así como de destruxinas y otras toxinas que causan parálisis al insecto, dificultando su capacidad para alimentarse y moverse (Pal *et al.*, 2007), completando el proceso de infección y ocasionando la muerte del insecto; posteriormente el hongo emerge en forma de hifa, esporula e inicia otro ciclo de infección (Lee *et al.*, 2005).

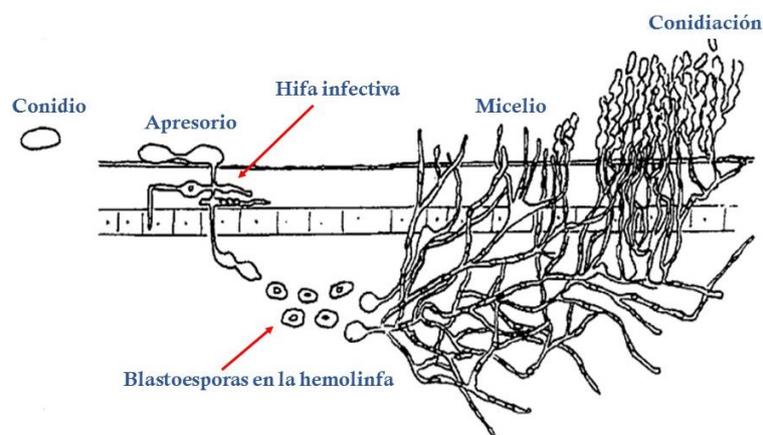


Figura 1. Representación esquemática del ciclo de la vida de *M. anisopliae* en sus hospederos. Etapas de penetración de *M. anisopliae* a través de la cutícula del insecto, proliferación dentro de la hemolinfa, seguida de la proliferación micelial y conidiación en la superficie del insecto. (Tomada y modificada de Small y Bidochka, 2005).

El interés en el estudio de este hongo entomopatógeno es debido en parte a su potencial uso para reducir los impactos perjudiciales para el ecosistema, asociados con los insecticidas químicos sintéticos; así como el uso médico de metabolitos secundarios secretados por *Metarhizium*, como las destruxinas y swainsoninas (Glare *et al.*, 2012; Roberts y St. Leger, 2004). La presencia de insectos resistentes a los productos químicos y la aparición de enfermedades en las plantas, ha producido enormes pérdidas agrícolas en México (García-Leaños *et al.*, 2007); por lo que la utilidad de hongos entomopatógenos para el control de plagas es una alternativa viable al uso de insecticidas químicos.





El hongo *Metarhizium* es de gran interés por su estilo de vida, no solo es patógeno de insectos, sino que también coloniza fácilmente la rizósfera de las plantas (Hu y St Leger, 2002); además se ha reportado que *Metarhizium robertsii* proporciona protección a las raíces de frijol de la infección del fitopatógeno *Fusarium solani* (Sasan y Bidochka, 2013).

1.3. Interacción de *Metarhizium* con plantas y su papel en la rizósfera

La rizósfera, es una zona de suelo influenciada directamente por las secreciones radiculares. Es un sitio de interacciones complejas entre plantas y microorganismos (Bais *et al.*, 2006). Dichas asociaciones son importantes para el ciclo de nutrientes y el funcionamiento del ecosistema.

Como se mencionó anteriormente, Hu y St Leger en 2002 demostraron la capacidad de *Metarhizium* para colonizar la rizósfera, mostrando una asociación preferencial con ésta, mediante una cepa de *Metarhizium* que expresa la proteína verde fluorescente (GFP) (Figura 2). Así se comprobó que *M. robertsii* se encuentra íntimamente asociado con las raíces de las plantas, que promueve la proliferación de los pelos radiculares del pasto varilla y que además reside como un colonizador endófito en raíces de frijol (Sasan y Bidochka, 2012).

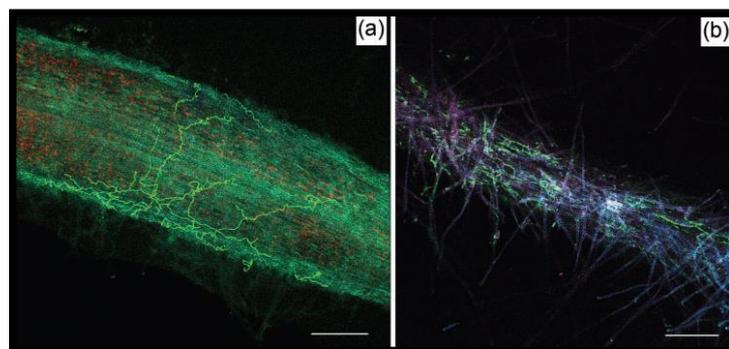
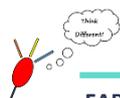


Figura 2. Colonización de raíces por parte de *Metarhizium* (ARSEF2575) expresando GFP. a) Asociación con la raíz de *Phaseolus vulgaris*, y b) *Panicum virgatum*. (Tomada de Wyrebek *et al.*, 2011).





Varias especies de *Metarhizium* y *Beauveria*, son capaces de infectar insectos y transferir nitrógeno derivado de ellos a la planta hospedera (Sasan y Bidochka, 2012; Behie, 2015). La capacidad endofítica y la patogenicidad hacia el insecto se acoplan de modo que el hongo actúa como conducto para proporcionar el nitrógeno derivado del insecto a la planta (Behie *et al.*, 2012).

En el 2012 Behie y colaboradores demostraron que *M. robertsii* es capaz de transferir nitrógeno derivado del insecto infectado a plantas como el frijol y pasto varilla, utilizando larvas de *Galleria mellonella* con ^{15}N (Figura 3). En estudios posteriores además evaluaron, la transferencia de nitrógeno con cuatro especies más de *Metarhizium* (*M. brunneum*, *M. guizhouense*, *M. acridum* y *M. flavoviride*), en donde se comprobó la capacidad de translocación de nitrógeno en frijol, soya, trigo y pasto varilla por parte del género *Metarhizium* (Behie *et al.*, 2014).

Recientemente se demostró que existe también un intercambio recíproco entre el hongo y la planta, mientras que *Metarhizium* le transfiere Nitrógeno derivado del insecto a la planta, éste a su vez recibe compuestos carbonados derivados de la planta (en esta interacción se utilizó $^{13}\text{CO}_2$) y por lo tanto juega un papel importante en el ciclo de nutrientes en el ecosistema (Behie *et al.*, 2017).

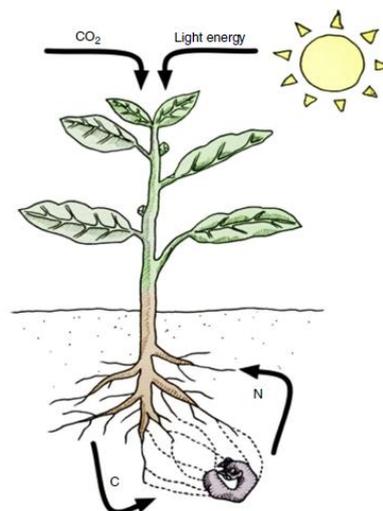


Figura 3. Intercambio de nitrógeno derivado de insectos para la planta, y compuestos carbonados de la planta hacia *Metarhizium*. Esquema representativo de la transferencia de nitrógeno mediante una asociación con *Metarhizium* y la transferencia de carbono de la planta hacia el hongo. (Tomada de Behie *et al.*, 2017).





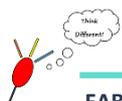
Esta asociación del género *Metarhizium* con las raíces de las plantas representa una aplicación importante de este hongo para el control de insectos y como promotor de crecimiento de plantas (Hu y St Leger, 2002; Behie *et al.*, 2012; Glare *et al.*, 2012).

Wang y St Leger en 2007, reportan que existen moléculas implicadas en la colonización hacia las raíces de las plantas y adhesión a la cutícula de insectos; mostraron que *M. robertsii* expresa diferencialmente dos genes que codifican para proteínas de adhesión (MAD1 y MAD2); la proteína MAD1 que participa en la adhesión a la cutícula del insecto y MAD2 es usada para la adhesión a la planta.

Además, también se demostró en estudios realizados por Liao y colaboradores en 2013 que *M. robertsii* produce una invertasa extracelular (MrINV), la cual juega un papel fundamental (hidroliza sacarosa a monosacáridos) en la capacidad de colonización de la raíz de las plantas. *M. robertsii* también puede tomar la sacarosa utilizando un transportador de oligosacáridos (MRT: Transportador de Rafinosa de *Metarhizium*), se comprobó que una disrupción del gen Mrt conduce a una competencia reducida en la rizósfera (Fang y St. Leger, 2010). También se conoce que en la interacción *Metarhizium*-Planta, el hongo secreta pectinasas para hidrolizar polisacáridos en la pared celular de la planta y de esta manera la hifa pueda penetrar en la superficie de las células (Liao *et al.*, 2013).

En este año se demostró que *M. robertsii* promueve el crecimiento de *Arabidopsis thaliana*, la ramificación de la raíz y desarrollo de pelo radicular debido a la producción de Ácido 3 Indol Acético (IAA) (Liao *et al.*, 2017).

Dentro de nuestro grupo de trabajo se han realizado interacciones de diferentes cepas del hongo *Metarhizium* y la planta de sorgo (*Sorghum vulgare*) (Herrera Gutiérrez, 2016); observando que *Metarhizium* se asocia a las raíces de la plántula de sorgo, resultando en una asociación beneficiosa al crecimiento de estas, ya que se observó un 92.2 % más de crecimiento y 300% más de germinación en una interacción *in vitro*; así como un 341% más de crecimiento





y 525% más de germinación, bajo condiciones semicontroladas en suelo agrícola.

Los aislados de *Metarhizium* producen un gran número de metabolitos, entre los descritos encontramos destruxinas, swainsoninas y citocalasinas. Estos compuestos tienen actividades de insecticida y fitotóxica; sin embargo, su efecto antagónico en patógenos de plantas no ha sido elucidado. (Roberts y St Leger, 2004; Krasnoff *et al.*, 2007).

Como ya se mencionó *Metarhizium* produce una gran cantidad de metabolitos, y a pesar de que el efecto de estos compuestos hacia patógenos de plantas no se conoce, se ha visto previamente que *Metarhizium* ha mostrado actividad antagónica contra *F. oxysporum*, *Botrytis cinerea* y *Alternaria solani* (Kang *et al.*, 1996; Yun *et al.*, 2017). Además, se demostró recientemente que *M. robertsii* brinda protección a las raíces de frijol de la infección del fitopatógeno *F. solani*, lo cual sugiere que tiene un papel antagónico hacia éste (Figura 4) (Sasan y Bidochka, 2013).

Existe también un reporte que demuestra que en una interacción de *M. brunneum* en conjunto con el micoparásito *Clonostachys rosea* en semillas de trigo, resultó en una reducción significativa en crecimiento del fitopatógeno *Fusarium culmorum* y que además en este tratamiento las raíces del trigo fueron un 70 % más largas respecto a las raíces control (Keyser *et al.*, 2015).

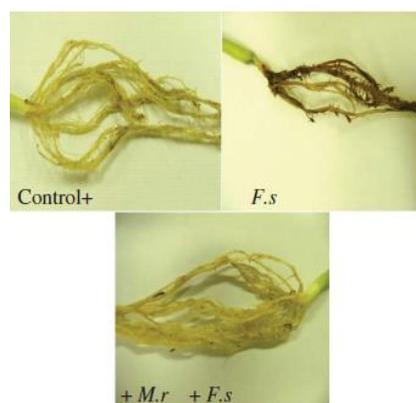
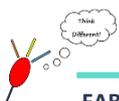


Figura 4. Biocontrol de *F. solani* por *M. robertsii* sobre raíz de frijol. Imágenes de la pudrición de la raíz del frijol causada por *F. solani* después de cuatro semanas. Se obtuvieron raíces de plantas control, tratamiento con *F. solani* y *M. robertsii* + *F. solani*. (Tomado de Sasan y Bidochka, 2013).





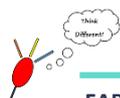
1.4. Aislamiento y caracterización de *Metarhizium*

El estudio de *Metarhizium* está basado en el aislamiento del hongo de cadáveres de insectos, utilizando el método del insecto cebo o proveniente de muestras de tierra mediante el uso de medios selectivos. Ambos métodos recientemente se han estado utilizando con éxito para el aislamiento de este hongo del suelo (Shin *et al.*, 2010; Steinwender *et al.*, 2015).

El método del insecto cebo es susceptible para aislar hongos entomopatógenos selectivamente hacia el insecto hospedero que se utiliza como cebo, por lo que es posible que con el uso de insectos se favorezca el aislamiento de cepas particulares, en función de la especificidad entre el tipo de insecto y el hongo; en contraste el uso de medios de cultivo selectivos para hongos entomopatógenos presenta ciertas ventajas para la colección en masa de hongos, además de que contiene químicos los cuales reducen el crecimiento de organismos contaminantes (Shin *et al.*, 2010).

Por lo que algunos medios selectivos para el aislamiento de hongos entomopatógenos de suelo han sido desarrollados; para esto varios fungicidas (Oxgall, Cloruro de cobre (II), Benomilo (1-(butilcarbamoil) benzimidazol-2-ilcarbamato de metilo)) y Dodine (monoacetato de N-dodecilguanidina)) y antibióticos (cloranfenicol, tetraciclina y estreptomicina) se han probado en conjunto y por separado para el aislamiento en medio selectivo de hongos entomopatógenos. Mediante la comparación de varios medios selectivos, se determinó que el Dodine es el fungicida más selectivo a una concentración de 50 µg/mL (Fernandes *et al.*, 2010). Los medios selectivos deben ser diseñados para tolerar la competencia entre los hongos blanco y la diversidad de microorganismos y metabolitos que se producen en el suelo.

Una vez que se obtienen las cepas aisladas ya sea por cualquiera de los dos métodos antes mencionados, es de gran importancia la clasificación de las mismas ya que esto nos permite ubicarlas en grupos taxonómicos y conocer sus relaciones filogenéticas, las relaciones que presenta con otras cepas, así como sus posibles aplicaciones. En un trabajo realizado por Driver y colaboradores en el 2000, realizaron análisis filogenéticos en base a los espaciadores transcritos





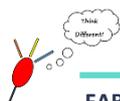
internos (ITS) ribosomales de especies de *Metarhizium*, reportando que los ITS son útiles para resolver nodos de filogenias del género *Metarhizium*, pero no son suficientes para el diagnóstico de muchas de las relaciones filogenéticas intragenéricas, ya que muchos linajes terminales no pudieron ser resueltos, describiendo algunos linajes terminales como nuevas variedades en lugar de nuevas especies.

En investigaciones posteriores se analizó la secuencia de DNA del factor de elongación uno alfa (EF-1 α), además de secuencias parciales de dos subunidades de la RNA polimerasa II (RPB1 y RPB2); esto resultó ser un enfoque multigenético eficiente y una manera robusta para la resolución de linajes de *Metarhizium* (Bischoff *et al.*, 2006). En 2009 Bischoff y colaboradores clarificaron la filogenia del complejo de *Metarhizium anisopliae* (*M. anisopliae*, *M. guizhouense*, *M. pingshaense* y *M. taii*) basándose en un enfoque multigenético. En este estudio se demostró que el EF-1 α , de manera individual, es suficiente para obtener una resolución total de las topologías de *Metarhizium*, y que es actualmente el locus más adecuado y preciso para el diagnóstico de grupos terminales, ya que también se utiliza para la identificación de especies en otros géneros de hongos, como es el caso de *Fusarium* (Geiser *et al.*, 2004) y *Trichoderma* (Chaverri *et al.*, 2015).

1.5. Características del estado de Guanajuato

El estado de Guanajuato se localiza en la parte centro del país; abarca 30,613 km² y está distribuido en 46 municipios; su rango altitudinal se encuentra entre los 640 msnm y los 3 320 msnm. Por su posición geográfica en el centro del país Guanajuato forma parte de las tres provincias fisiográficas y geológicas de México: en el norte y noreste la Mesa del Centro, en el extremo noreste una pequeña porción de la Sierra Madre Oriental y, ocupando la parte sur, el Eje Neo volcánico (Cruz *et al.*, 2012). La agrupación de estas tres regiones en el territorio del estado produce un paisaje diverso, en el que la presencia de sistemas montañosos se alterna con llanuras, valles, sierras y mesetas, lo cual resulta en una amplia gama de suelos, clima y vegetación.

El clima del estado se clasifica como seco y semiseco en la porción norte y noreste, templado subhúmedo en la parte centro y cálido subhúmedo en la parte





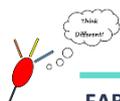
sur y oriente (Cruz *et al.*, 2012). Los cambios en el clima pueden afectar la biodiversidad, ya que éste conforma de manera esencial la estructura y funcionamiento de un ecosistema (Barradas, 1994). Además del clima, el suelo es uno de los factores que determina la riqueza y distribución de especies en una región, ya que alberga una gran diversidad de seres vivos como: bacterias, hongos y otros microorganismos (Chapin *et al.*, 2001). Los principales tipos de suelo en el estado son: vertisoles al sur del estado y los tipos feozem (háptico y lúvico) en el norte.

1.6. Áreas naturales protegidas del estado de Guanajuato

Guanajuato cuenta con 23 áreas naturales protegidas, mismas que se distribuyen en 28 municipios. Las áreas naturales protegidas son espacios delimitados por la sociedad, sujetas a regímenes especiales de protección, conservación, restauración y desarrollo, según categorías establecidas por la ley (<http://anps.guanajuato.gob.mx>).

Región volcánica Siete Luminarias

El área se localiza en el municipio de Valle de Santiago, tiene una superficie de 8,928.50 ha. Cuenta con bosque tropical caducifolio y los principales grupos vegetales están representados por las familias Acantaceae, Burseraceae, Cactaceae, Convolvulaceae, Fagaceae, Gramineae y Leguminosae. Esta área presenta características fisiográficas únicas en el estado, como la presencia de un grupo de cráteres volcánicos inactivos (Figura 5).



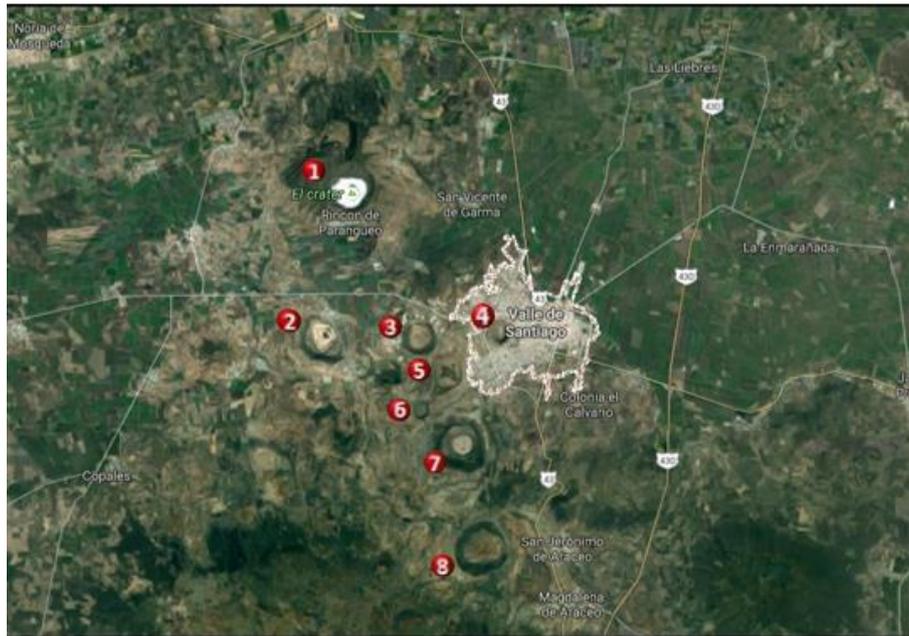
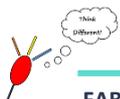


Figura 5. Representación gráfica del área natural protegida “Las Siete Luminarias”.1. Rincón de Parangueo; 2. Hoya de San Nicolas de Parangueo; 3. Hoya de Estrada; 4. La Alberca; 5. Hoya Blanca; 6. Hoya de Solís; 7. Hoya de Cíntora; 8. Hoya de Álvarez.





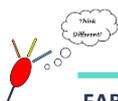
2. JUSTIFICACIÓN

Metarhizium es un género de hongos ascomicetos y es de gran importancia por el estilo de vida que presenta, ya que se clasifica como un hongo entomopatógeno y se encuentra asociado con la rizósfera de las plantas formando asociaciones simbióticas.

La implementación de nuevas estrategias de control biológico en la agricultura han tenido gran aceptación, ya que presentan un manejo eficiente en los campos de cultivo y resultan ser amigables con el medio ambiente.

El estado de Guanajuato presenta distintos tipos de clima, de suelo y de vegetación, además cuenta con 23 áreas naturales protegidas que representan una gran reserva de microbiota, en particular de hongos y entre estos los pertenecientes al género *Metarhizium*.

Por todo lo anterior y por las características geográficas y ecológicas del estado de Guanajuato, se considera que las cepas aisladas dentro del mismo estado podrían ser las mejores para ser utilizadas en la agricultura de la región, debido a que estarían mejor adaptadas a las condiciones ambientales y suelo de la misma. Por lo que es importante analizar la diversidad de cepas presentes en el estado e identificar aquellas que cuenten con potencial de uso en la agricultura.





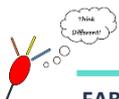
3. OBJETIVOS

Objetivo general

Caracterizar aislados del hongo *Metarhizium* provenientes del sur del estado de Guanajuato con el potencial para promover el crecimiento vegetal.

Objetivos específicos

1. Aislar cepas de *Metarhizium* spp. que se encuentren presentes en áreas naturales protegidas del sur del estado de Guanajuato.
2. Caracterizar a nivel morfológico y molecular los aislados obtenidos.
3. Determinar la capacidad de promoción de crecimiento en *Sorghum bicolor* de las cepas identificadas.
4. Determinar la capacidad antagónica de los aislados de *Metarhizium* con el hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.



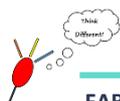


4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Cepas utilizadas

Se utilizaron algunas de las cepas pertenecientes a la colección de cepas del laboratorio de Genética Molecular de Hongos de la Universidad de Guanajuato; además de los aislados de *Metarhizium* obtenidos en este trabajo, los cuales se describen en la sección de resultados:

- ***Metarhizium acridum* ARSEF7486** (aislada del insecto *Ornithacris cavroisi*), de la Colección de Cultivos Fúngicos Entomopatógenos del Servicio de Investigación Agrícola perteneciente al Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA-ARSEF).
- ***Metarhizium robertsii* ARSEF2575** (aislada del insecto *Curculio caryae*), de la Colección de Cultivos Fúngicos Entomopatógenos del Servicio de Investigación Agrícola perteneciente al Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA-ARSEF).
- ***Metarhizium robertsii* CARO4** (aislada del insecto *Phyllophaga ravidia*), perteneciente a la Colección de Hongos Entomopatógenos del Laboratorio de Genética Molecular de Hongos, Universidad de Guanajuato, México.
- ***Metarhizium brunneum* CARO19** (aislada del insecto *Gerageus senilis*), perteneciente a la Colección de Hongos Entomopatógenos del Laboratorio de Genética Molecular de Hongos, Universidad de Guanajuato, México.
- ***Metarhizium pingshaense* SR19**. Cepa aislada de la sierra de Santa Rosa por Iván Horacio Piña Torres en su tesis de maestría (Piña Torres, 2017); perteneciente a la Colección de Hongos Entomopatógenos del Laboratorio de Genética Molecular de Hongos, Universidad de Guanajuato, México.
- ***Metarhizium palomense* LCP13**. Cepa aislada de Las Palomas (zona de educación ambiental) perteneciente a la Cuenca de la Esperanza, por





Iván Horacio Piña Torres en su tesis de maestría (Piña Torres, 2017); perteneciente a la Colección de Hongos Entomopatógenos del Laboratorio de Genética Molecular de Hongos, Universidad de Guanajuato, México.

- ***Metarhizium* sp. XR2-3.** Cepa aislada de la zona núcleo de Xichú por Ana Esmeralda Maya Ramírez para su tesis de maestría; perteneciente a la Colección de Hongos Entomopatógenos del Laboratorio de Genética Molecular de Hongos, Universidad de Guanajuato, México.
- ***Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FGSC 9935) cepa 4287 (raza 2)** (proporcionada por el Dr. J. Félix Gutiérrez Corona).
- **Células competentes DH5 α** (*Escherichia coli*).

4.2. Semillas utilizadas: (semillas de sorgo) *Sorghum bicolor*

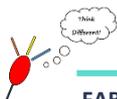
Las semillas que se utilizaron en este trabajo pertenecen a la variedad CB-112 de la empresa *Berentsen*® del lote 101865.

Las semillas de sorgo se esterilizaron superficialmente con una solución de alcohol al 80% durante 1 minuto, hipoclorito de sodio (NaClO) al 4% durante 2 minutos, y por último se realizaron 3 lavados de 1 minuto con agua destilada estéril.

Se utilizaron además plantas crecidas de tomate (*Solanum lycopersicum*).

4.3. Medios de cultivo

Los medios de cultivo se utilizaron para el aislamiento, crecimiento y mantenimiento de *Metarhizium*. Además de que se emplearon en las interacciones entre *Metarhizium-Fusarium* y *Metarhizium-planta* (sorgo). Los medios fueron esterilizados previamente en la autoclave (20 min, 121 °C a 2 atm de presión).





Medio selectivo para hongos entomopatógenos (*Metarhizium*)

Medio con Dodine: Contenido del medio por cada litro de agua destilada: 40 g de medio rico Papa Dextrosa Agar (PDA) Bioxon®, 1 g de extracto de levadura, 0.5 g de cloranfenicol, 0.25 g de cicloheximida y 0.15 g del fungicida comercial Dodine (monoacetato de duodecil guanidinio).

Medio con cristal violeta: Este medio contiene los mismos reactivos que el anterior y además de Dodine se adicionó 0.0025 g/L de cristal violeta.

Medio de resiembra: Cuando el medio se utilizó para resiembra de los aislados, el Dodine se agregó ahora en una concentración de 0.025 g/L y además, se le adicionaron cuatro antibióticos en las siguientes concentraciones (1 µL por cada mL de medio): kanamicina (100 µg/µL), ampicilina (150 µg/µL), carbenicilina (100 µg/µL), cefotaxima (100 µg/µL).

Solución de Elementos Traza M-100

Contenido del medio por cada litro de agua destilada: 60 mg de ácido bórico (H_3BO_3), 140 mg de cloruro de manganeso tetrahidratado ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$), 400 mg de cloruro de zinc ($ZnCl_2$), 40 mg de molibdato de sodio dihidratado ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$), 100 mg de cloruro de hierro III ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$), 400 mg de sulfato de cobre II pentahidratado ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$).

Solución de sales M-100

Contenido del medio por cada litro de agua destilada: 16 g de fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4), 4g de sulfato de sodio (Na_2SO_4), 8 g de cloruro de potasio (KCl), 2 g de sulfato de magnesio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), 1 g de cloruro de calcio ($CaCl_2$), 8 mL de solución de elementos traza M-100.

M-100 2N

Contenido del medio por cada litro de agua destilada: 10 g de dextrosa, 3 g de nitrato de potasio (KNO_3), 1.8 g de nitrato de amonio (NH_4NO_3), 60 mL de solución de sales M-100, 15 g de agar.





Medio Agar-Agua

Agar bacteriológico (BDBioxon®) 15 g en 1L de agua destilada.

Medio PDA

Medio de cultivo PDA deshidrato (BDBioxon®) 39 g en 1L de agua destilada.

Caldo de patata y dextrosa (PD)

Contenido del medio por cada litro de agua destilada: 200 g de papas cortadas en rodajas sin pelar (la infusión se preparó hirviendo durante 30 min), se filtró el caldo a través de una gasa; se añadieron 20 g de dextrosa.

Medio YPD-2

Contenido del medio por cada litro de agua destilada: 2 g de extracto de levadura, 10 g de peptona de caseína y 20 g de dextrosa.

Medio Luria-Bertani (LB)

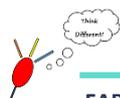
Contenido del medio por cada litro de agua destilada: 10 g de bacto-triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de cloruro de sodio (NaCl). Cuando se requirió medio sólido se agregaron 20 g de agar bacteriológico.

Medio LB-Xgal-IPTG

Este medio se utilizó en experimentos de transformación de *E. coli* (Sambrook y Russell, 2001) el medio LB, se suplementó con ampicilina a una concentración de 100 µg/mL y en cada caja se espatularon 40 µL de X-Gal (5-bromo-4-cloro-indolil-β-Dgalactopiranósido) al 2% p/v en N, N-dimetil-formamida y 4 µL de IPTG (isopropil- β-Dtiogalactopiranósido) 100 mM.

4.4. Plásmido empleado (Vector pGEM®-T Easy)

Para llevar a cabo la clonación de los productos de amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizó el vector pGEM®-T Easy de PROMEGA.





4.5. Oligonucleótidos empleados

Los oligonucleótidos utilizados en este estudio se describen en la Tabla 1.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en este estudio.

| Nombre | Descripción | Secuencia (5'-3') |
|-------------|--|-----------------------|
| EF1T | Directo, amplifica junto con EF2T un fragmento de aproximadamente 800 pb del gen del Factor de Elongación 1 α . | ATGGGTAAGGARGACAAGAC |
| EF2T | Reverso, amplifica junto con EF1T un fragmento de aproximadamente 800 pb del gen del Factor de Elongación 1 α . | GGAAGTACCAGTGATCATGTT |

4.6. Aislamiento de *Metarhizium*

4.6.1. Colecta y procesamiento de muestras de suelo

Las muestras de suelo se colectaron de áreas naturales protegidas del sur del estado de Guanajuato; en cuatro áreas localizadas dentro de la región volcánica Siete Luminarias (ver Figura 5).

Debido a que los sitios en donde se colectaron las muestras son regiones volcánicas (cráteres inactivos) no se pudo tomar la zona núcleo del área como un punto de partida, por lo que se tomaron muestras alrededor del sitio y en uno de los casos siguiendo la cuenca del río. Se tomaron muestras de 20 g de suelo, aproximadamente cada 50 m tomando en cuenta vegetación aparentemente sana, a una profundidad que no sobrepasara los 10 cm. Las muestras se colocaron en bolsas de plástico (Ziploc®) para su traslado al laboratorio (Figura 6).

Posteriormente se colocó un gramo de la muestra en tubos Falcon de 15 mL, al cual se le agregó una solución de Tritón X-100 al 0.01%, la muestra se homogenizó en agitador vórtex y se tomaron 100 μ l de la solución, enseguida se sembraron por duplicado en cajas Petri con medio selectivo (Fernandes *et al.*, 2010).





Figura 6. Proceso del aislamiento de cepas de *Metarhizium*.

4.6.2. Condiciones de incubación e identificación de *Metarhizium*

Las muestras se incubaron de 20 a 25 días a temperatura ambiente, hasta observar crecimiento de colonias en las placas con el medio selectivo.

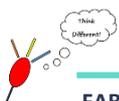
Las colonias de *Metarhizium* fueron identificadas en base a sus características morfológicas (color verde y consistencia terrosa). Además de que los conidios fueron observados al microscopio presentando una forma cilíndrico-ovalada.

4.6.3. Obtención de los cultivos puros de *Metarhizium*

Una vez que se identificaron colonias de *Metarhizium* en el medio selectivo, se procedió a pasarlas a un medio fresco de resiembra con la ayuda de palillos planos (estériles) mediante estriado; se incubaron a 26°C con fotoperiodo de 16 horas luz/ 8 horas oscuridad, hasta observar conidiación de los aislados. Posteriormente se tomaron conidios de la muestra con un palillo plano y se colocaron en tubos Eppendorf con 1 mL de Triton X-100 al 0.01% (Sigma®), se realizó conteo de conidios mediante un hematocitómetro (Hausser Scientific®) y se ajustó una concentración de 1000 conidios/mL, se tomaron 50 µL de la solución y fueron inoculados en medio de resiembra para la obtención de monoclonias. Se incubaron a 26 °C con fotoperiodo de 16 horas luz/ 8 horas oscuridad, hasta observar conidiación. Cuando se obtuvieron las monoclonias se sembraron por estriado en medio M-100 2N.

4.7. Obtención de conidios

Para la colecta de conidios se utilizó una solución de Tritón X-100 al 0.1% (Sigma®), se tomaron los conidios crecidos en medio M-100 2N con ayuda de una pipeta Pasteur (estéril), se filtró con malla de fibra sintética para descartar el micelio y se hicieron tres lavados con 30 mL de Tritón al 0.01% y finalmente se





determinó la concentración de conidios/mL con ayuda de un hematocitómetro (Hausser Scientific®).

4.8. Determinación de las características morfológicas de la colonia

Se prepararon soluciones con una concentración de 2×10^4 conidios/mL de cada uno de los aislados obtenidos. Se inoculó una gota de 50 μ L (1000 conidios) en el centro de una caja de Petri con medio PDA, la gota se dejó secar. Todas las placas se incubaron a 26°C durante 15 días. Posteriormente, se tomaron fotografías.

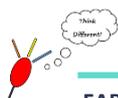
4.9. Métodos de Biología Molecular

4.9.1. Extracción de DNA genómico

Para llevar a cabo la extracción de DNA genómico se inocularon 1×10^6 conidios/mL de cada aislado, por separado en matraces Erlenmeyer conteniendo 20 mL de medio YPD-2, adicionado con 20 μ L de cloranfenicol (0.1 g/mL). Cada matraz fue incubado por 48 h a 28°C y agitación de 180 rpm. Posteriormente el micelio fue obtenido por filtración al vacío utilizando papel filtro Whatman 3 mm y un embudo Buchner, el micelio fue envuelto en papel aluminio y almacenado a -70 °C. Con el micelio congelado de cada uno de los aislados, se procedió a realizar la extracción de DNA siguiendo el protocolo propuesto por Sambrook y Russell (2001), con algunas modificaciones.

El procedimiento se describe a continuación:

1. Se tomó una fracción pequeña de micelio y se trituró en un mortero de porcelana (previamente lavado y esterilizado con calor seco, posteriormente enfriado a -70 °C) con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, el cual se colocó con una espátula estéril en un tubo Eppendorf que contenía 500 μ L de NTES (NaCl 0.1 M, Tris pH 8, EDTA 0.001M y SDS al 1% v/v). El tubo se agitó en vórtex hasta obtener una mezcla uniforme de color blanco y se colocó en hielo. Enseguida, se agregó a cada tubo 200 μ L de fenol y 200 μ L de cloroformo y la muestra se agitó en vortex.
2. El tubo fue centrifugado por 10 min a 20800 xg a 4°C en una centrifuga





- Eppendorf 5417R. Después se recuperaron 400 μ L del sobrenadante.
3. Enseguida se precipitó el DNA genómico adicionando 50 μ L de cloruro de sodio (NaCl) 5M y 900 μ L de etanol absoluto, se mezcló por inversión. Después las muestras se centrifugaron por 5 min a 2700 xg a 4°C y se eliminó el sobrenadante.
 4. Se adicionaron 1000 μ L de etanol absoluto al 100% y se mezcló por inversión. Nuevamente se centrifugó por 5 min a 2700 xg y se eliminó el sobrenadante (se realizaron 3 lavados con etanol absoluto).
 5. Por último, se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente y se resuspendió el DNA obtenido en 70 μ L de regulador TE con RNAsa.

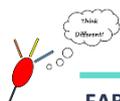
4.9.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la amplificación de un fragmento del gen del factor de elongación 1 α (EF-1 α).

Después de la extracción de DNA genómico de los aislados, se llevó a cabo la amplificación de un fragmento de aproximadamente 800 pb, del factor de elongación 1 α (EF-1 α). Las reacciones para la PCR se realizaron en tubos de 0.2 mL, con un volumen final de reacción de 30 μ L. Las cantidades de reactivos por reacción, se indican en la Tabla 2.

Tabla 2. Mezcla de reacción para PCR.

| Reactivos | PCR (μ L) |
|---|--------------------|
| DNA genómico | 1 |
| Oligonucleótido directo EF1T (ver tabla 1) | 0.5 (0.08 μ M) |
| Oligonucleótido reverso EF2T (ver tabla 1) | 0.5 (0.08 μ M) |
| JumpStar DNA taq Polymerase (Sigma-Aldrich) | 15 |
| Agua grado HPLC | 13 |

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador (ProFlex™ PCR System de Applied Biosystem™). Las condiciones fueron las siguientes: un ciclo de desnaturalización del DNA a 95°C por 5 min y 40 ciclos con el siguiente programa: desnaturalización a 95°C por 20 s, 1 min de alineamiento a 55°C, la elongación a 72 °C por 1:30 min y una extensión final a 72°C por 5 min.





Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con SYBR Safe (4 μ L de SYBR Safe DNA gel STAIN (10000X; Invitrogen) por cada 100 mL de agarosa) y se visualizaron bajo luz ultravioleta. El gel de agarosa, se preparó mezclando la agarosa con buffer TAE 1x (Tris-HCl, ácido acético, EDTA). La mezcla fue calentada en el microondas, para lograr la disolución de la agarosa y se dejó enfriar un poco, posteriormente se vació en la charola, en la cual se dejó solidificar con los peines inmersos, para formar los pozos en los cuales se cargaron las muestras. Se mezclaron 4 μ L de muestra con 3 μ L de buffer de carga y se depositaron dentro de cada pozo en el gel, después se realizó la electroforesis a 85 voltios durante 50 min, el DNA en el gel se visualizó y tomó fotografía en un fotodocumentador ChemiDoc™ MP de Bio-Rad. La presencia de una banda, con una amplificación de 800 pb fue interpretada como un resultado positivo.

4.9.3. Purificación de los productos de PCR

Antes de iniciar con la purificación, el DNA producto de la PCR se sometió a una separación mediante electroforesis en gel de agarosa (Sambrook y Russell, 2001). La preparación del gel fue como se describió anteriormente; modificando la concentración a 1.5 %.

Para la purificación de los productos de PCR se aplicó un voltaje de 60 durante 1:30 horas. Las bandas de DNA se visualizaron en un transiluminador Safe Image (Invitrogen) y se procedió al corte de la banda.

La purificación de los diferentes fragmentos de PCR se llevaron a cabo empleando el kit de extracción GenElute™ Gel Extraction de la marca Sigma de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

4.9.4. Clonación en el vector pGEM®-T Easy

Las cantidades de reactivos por reacción para llevar a cabo la ligación, se indican en la Tabla 3. La reacción se dejó incubando toda la noche a 4°C.

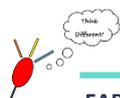




Tabla 3. Mezcla de reacción para ligación en pGEM®-T Easy.

| Reactivos | Ligación (μL) |
|----------------------------------|---------------------------------------|
| DNA (producto de PCR purificado) | 1 a 3 (4 ng/ μL) |
| 2X Rapid Ligation | 5 |
| vector pGEM®-T Easy | 0.25 |
| T4 DNA Ligase | 0.5 |
| Agua grado HPLC | Se completa el volumen final hasta 10 |

4.9.5. Transformación de *E. coli* DH5α por choque térmico

La transformación de *E. coli* DH5α se describe a continuación:

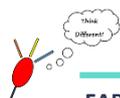
En un tubo Eppendorf estéril se añadieron 25 μL de células químicamente competentes de *E. coli* y 2 μL de DNA (DNA de la reacción de ligación), mezclando suavemente e incubando por 20 minutos en hielo. Después, se incubó por 45 s a 42°C, seguido de una incubación en hielo por 2 minutos. Se adicionó 1 mL de medio LB y se incubó por 1 h a 37°C.

Posteriormente se centrifugó por 1 min a 20800 *xg*, se descartaron 900 μL del sobrenadante y la pastilla se resuspendió en los 100 μL restantes, que posteriormente se sembraron por espatulado con asa de vidrio en una caja de Petri con medio LB-Amp. Se incubó toda la noche a 37°C (Sambrook y Russell, 2001).

4.9.6. Extracción de DNA plasmídico de *E. coli*

La extracción de DNA plasmídico de las células de *E. coli* se describe a continuación:

Se prepararon tubos de cultivo con 8 mL de medio de cultivo LB-ampicilina. Con un palillo estéril se picaron las colonias de color blanco, y se sembraron como una línea pequeña en una caja con medio LB-Amp sólido y el resto se inoculó en un tubo con medio líquido. Los tubos fueron puestos en agitación y se incubaron a 37°C durante toda la noche, al igual que la caja con medio sólido.





Después, cada cultivo fue colocado en un tubo Eppendorf de 2 mL y se centrifugó por 1 min a 20800 g en una centrífuga Eppendorf 5417C, desechando el sobrenadante y repitiendo el procedimiento hasta que se recuperaron por completo todas las células del cultivo. La extracción de DNA plasmídico se llevó a cabo empleando el kit GenElute™ HP Plasmid Miniprep de (Sigma), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

4.9.7. Tratamiento con endonucleasas de restricción

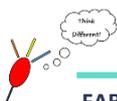
Para comprobar que el fragmento de interés se encontraba en el vector pGEM®-T Easy, se realizó un corte enzimático con *EcoRI* (New England Biolabs), siguiendo las condiciones recomendadas por el fabricante: La mezcla de reacción contenía 2 μ L de cada muestra, 0.5 μ L de la enzima de restricción *EcoRI*, 1.5 μ L del Buffer CutSmart® (50 mM Potassium Acetate, 20 mM Tris-acetate, 10 mM Magnesium Acetate, 100 μ g/ml BSA y pH 7.9 a 25°C) y 11 μ L de agua grado HPLC, para completar a un volumen de 15 μ L. La mezcla de reacción se dejó en incubación a 37°C por 3 h.

Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa y finalmente se visualizó el gel en un transiluminador Safe Image (Invitrogen) para la interpretación de resultados.

4.9.8. Secuenciación y análisis de las secuencias

La secuenciación de los plásmidos se llevó a cabo por la compañía Elim Biopharmaceuticals, Inc USA.

El análisis de las secuencias obtenidas se realizó empleando el software Lasergen® 14 de DNASTAR, usando los programas Seq-Man y Edit-Seq, posteriormente se realizó un alineamiento múltiple de secuencias con el algoritmo MAFFT (Multiple Alignment using Fast Fourier Transform) en <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft/> (Kepler *et al.*, 2014), posteriormente se realizó la inferencia filogenética por el método de máxima verosimilitud y máxima parsimonia en el software MEGA 7.0.26 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) utilizando el modelo GTR (General Time Reversible). Se realizó también la hipótesis filogenética por el método de inferencia bayesiana,





utilizando el programa Mr Bayes v3.2.6 empleando el modelo GTR con rango de distribución gamma invariable. Para cada inferencia filogenética se realizó un análisis de bootstrap con 1000 repeticiones.

4.10. Ensayo *in vitro* de la interacción *Metarhizium-Sorghum bicolor*

En cajas de Petri con medio agar-agua fueron colocadas 5 semillas de sorgo en línea recta y aproximadamente a 2 cm de distancia de la línea de semillas se inocularon 50 μ L en línea de una solución de conidios con 1×10^8 conidios/mL, de cada uno de los aislados, se incubaron a 28 °C en condiciones de oscuridad total durante 10 días. Se realizaron cinco repeticiones.

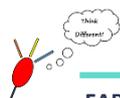
Posteriormente, se tomaron fotografías con cámara fotográfica (luz natural).

4.11. Ensayo en condiciones semicontroladas (invernadero)

Primeramente, se preparó una solución de conidios (de cada uno de los aislados de *Metarhizium* con los que se trabajó) con una concentración de 1×10^8 conidios/mL, esta solución se centrifugó para recuperar la pastilla celular, a la que se le adicionaron 250 μ L de una solución de carboximetilcelulosa al 0.5%; la suspensión resultante se agregó a un tubo que contenía 20 semillas de sorgo y se mezcló en vortex durante 1 minuto, para adherir 1×10^6 conidios en cada una de las semillas.

Posteriormente empleando Peat Moss como sustrato de la marca comercial Kekkilä Professional (el sustrato no fue esterilizado para la realización del experimento), se sembraron 16 semillas de sorgo (anteriormente tratadas con la solución de conidios y el adherente) en macetas de plástico de 15x8 cm; cada maceta se regó inicialmente con 100 mL de agua. Las macetas se incubaron en el Invernadero II (interacciones bióticas) por un periodo de tiempo de 30 días. Regando con 100 mL de agua destilada cada 48 horas.

Transcurridos los 30 días de incubación, las plantas se retiraron de las macetas y se lavaron con agua hasta la disgregación del suelo, enseguida las plántulas fueron sumergidas en agua varias veces para retirar el exceso de tierra y finalmente fueron medidas. Se analizaron plántulas de 3 macetas, cada maceta conteniendo 16 plántulas, para cada uno de los tratamientos; se utilizó la cepa





CARO19 de *M. brunneum* como control positivo y como un control negativo se incluyó un tratamiento únicamente con el adherente en la semilla, además de un tratamiento extra de la semilla sin el adherente.

Al terminar los experimentos, el sustrato utilizado fue esterilizado dos veces y se deshecho.

4.12. Determinación del desarrollo de las plántulas

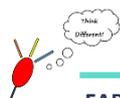
Para determinar el desarrollo de las plántulas crecidas bajo estas condiciones experimentales se evaluaron los siguientes parámetros: porcentaje de germinación, tamaño total, longitud de la raíz, y se determinó el peso seco de cada plántula.

4.13. Ensayos *in vitro* de la interacción de *Metarhizium* y *Fusarium oxysporum*

Para llevar a cabo los ensayos de interacción entre los aislados de *Metarhizium* y *Fusarium oxysporum* primeramente se obtuvieron conidios frescos de *F. oxysporum*; para esto se inocularon 1000 μL de una solución de conidios de *F. oxysporum* con una concentración de 1×10^6 conidios/mL en un matraz Erlenmeyer con 100 mL de medio líquido de patata y dextrosa (PD), cada matraz fue agitado a 180 rpm por 72 h. Posteriormente los conidios fueron obtenidos por filtración al vacío utilizando papel filtro Whatman 3 mm y un embudo Buchner.

Las pruebas de confrontación se realizaron por el método de cultivo dual en medio PDA reportado por diferentes autores (Bell *et al.*, 1982; Abdel-Fattah *et al.*, 2007; Popiel *et al.*, 2008; Schulz *et al.*, 2015).

Se prepararon soluciones con una concentración de 2.5×10^6 conidios/mL tomando como base lo reportado por González-Cárdenas en 2005, para cada uno de los aislados de *Metarhizium* empleados en este trabajo, además de la cepa de *F. oxysporum*. En cajas de Petri con medio PDA se inoculó una gota de 20 μL (aproximadamente 5×10^4 conidios) de cada uno de los aislados de *Metarhizium* a una distancia de 2 cm del borde de la placa Petri y en el lado opuesto se inoculó *F. oxysporum* (20 μL) quedando los inóculos a una distancia de 5 cm entre ellos, las gotas se dejaron secar. Las placas se incubaron por 16





días (tiempo que tarda en cubrir toda la placa *F. oxysporum* creciendo axénicamente) a 26°C. Se probaron dos condiciones de cultivo, con fotoperiodos 16 horas luz/ 8 horas oscuridad e incubación en oscuridad total. Se analizaron 6 placas para cada uno de los aislados tanto para condiciones de fotoperiodo como de oscuridad total con sus respectivos controles.

4.14. Determinación del antagonismo entre *Metarhizium* y *Fusarium oxysporum*

Una vez concurridos los 16 días, las placas se retiraron del periodo de incubación y se tomó fotografía en un fotodocumentador ChemiDoc™ MP de Bio-Rad a cada una de las placas (6 repeticiones), tanto de fotoperiodo como de oscuridad total. Se tomaron medidas del área ocupada por el aislado de *Metarhizium*, *F. oxysporum* y la barrera de separación que se formó en algunas de las placas; esto se realizó en el programa Imagen Lab Software 4.2 de Bio-Rad, en el cual se delimitó el total de la placa y posteriormente se delimitó el área en px ocupada por la barrera de inhibición y la colonia de *Metarhizium*, finalmente se delimitó el área ocupada por *F. oxysporum* (Figura 7). Los datos obtenidos en pixeles se convirtieron a cm² usando el siguiente factor de conversión:

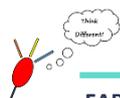
$$\text{Área} = \frac{(\text{No. de px})(50.26 \text{ cm}^2)}{614,385 \text{ px}}$$

Donde: No. de px equivale al número de pixeles correspondientes a B+C (colonia de *Metarhizium* y barrera de inhibición); 50.26 cm² es el área total de la placa en cm² y 614,385 px es el área total de la placa en pixeles.

De esta manera se determinó el área en cm² ocupada tanto por la colonia de *Metarhizium* y la barrera de inhibición (B+C), posteriormente a los 50.26 cm² se le restó el área ocupada por B+C para determinar el área ocupada por *F. oxysporum* (A). Finalmente a el área ocupada por B+C se le restó B (área ocupada por la colonia de *Metarhizium*) y de esta manera se determinó el área ocupada por la barrera de inhibición que se formó en algunas de las placas.

Posteriormente se obtuvo el error estándar del promedio del área ocupada por esta barrera de separación mediante el Software Prism versión 6.

También se determinó el error estándar del área ocupada por la colonia de *Fusarium oxysporum* cuando esta se encuentra en una confrontación con los aislados de *Metarhizium* que formaron esta barrera de separación.



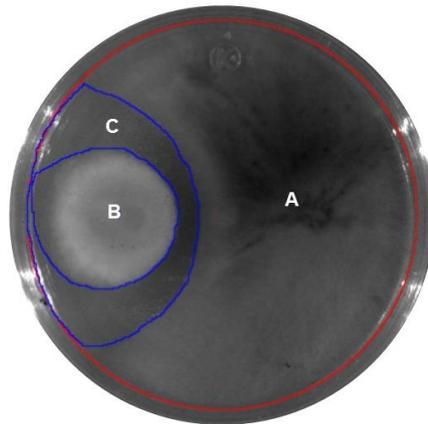


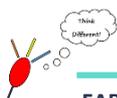
Figura 7. Delimitación de áreas en “Imagen Lab Software” de las placas. Simbología: **A+B+C=** área total de la placa; **B+C=** área de *Metarhizium* y halo de inhibición; **A=** área de *F. oxysporum*; **B=** área de *Metarhizium*; **C=** área del halo de inhibición.

4.15. Efecto de los metabolitos excretados por *Metarhizium* sobre *F. oxysporum*

Para evaluar el efecto producido por los metabolitos excretados al medio por parte de *Metarhizium*, se realizaron ensayos en placas con PDA, sobre las cuales fue colocado un disco de papel celofán previamente estéril (cubriendo la totalidad del medio), sobre este se colocó un disco de papel filtro estéril en el centro de la caja Petri.

Posterior a esto se inocularon 20 μL de una solución con una concentración de 2.5×10^6 conidios/mL, de cada uno de los aislados de *Metarhizium* con los que fue realizado este ensayo. Las placas se cubrieron totalmente con papel aluminio y se dejaron incubando un periodo de tiempo de 14 días a 26°C , trascurrido el tiempo de incubación el papel celofán (con el micelio) fue retirado cuidadosamente de las placas, de tal manera que permanecieran únicamente los metabolitos difusibles en la placa; así posteriormente se inocularon 20 μL de una solución con una concentración de 2.5×10^6 conidios/mL del fitopatógeno (*F. oxysporum*), dejando nuevamente incubando las placas con las condiciones antes mencionadas.

Cinco repeticiones fueron realizadas tanto para cada uno de los aislados de *Metarhizium* como el tratamiento control.





4.16. Efecto protector de *Metarhizium* hacia *F. oxysporum* *in vitro* e *in planta* (*Sorghum bicolor*)

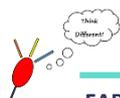
Con la finalidad de conocer si el hongo fitopatógeno (*F. oxysporum*) tenía algún efecto sobre la planta del sorgo, se procedió a realizar una interacción tripartita (sorgo –*Metarhizium* – *F. oxysporum*). Primeramente, se ajustó una solución con una concentración de 2.5×10^6 conidios/mL de ambos hongos (*M. guizhouense*: aislado HA-11-2, así como de *F. oxysporum*); posteriormente, semillas de sorgo previamente germinadas en medio agar-agua (6 días) se pasaron a una caja Petri dividida la cual contenía sustrato estéril (Peat Moss) en la mitad de la placa.

Enseguida se inocularon 100 μ L de las soluciones a la raíz de la planta de sorgo bajo los siguientes tratamientos:

1. ***F. oxysporum*** (100 μ L inoculados sobre la raíz de una solución de 2.5×10^6 conidios/mL).
2. ***F. oxysporum* – *Metarhizium*: HA-11-2** (100 μ L inoculados de cada uno sobre la raíz de una solución de 2.5×10^6 conidios/mL).
3. **Control** (100 μ L inoculados de Tritón X-100 al 0.01%).
4. ***Metarhizium*: aislado HA-11-2** (100 μ L inoculados sobre la raíz de una solución de 2.5×10^6 conidios/mL).

Se realizaron 4 repeticiones de cada uno de los tratamientos (cada placa con una planta). Las cajas se forraron con papel aluminio (solo de la mitad de la caja en donde se encontraba la raíz) y se incubaron por 21 días a 26 °C; todo esto se realizó bajo condiciones de esterilidad.

También se realizó una interacción tripartita bajo condiciones semicontroladas en invernadero con los mismos cuatro tratamientos mencionados anteriormente; esto se realizó en macetas de plástico de 15x8 cm utilizando Peat Moss como sustrato, en cada maceta se sembraron 16 semillas de sorgo, cada semilla fue colocada en el sustrato y posteriormente fue inoculada con 100 μ L de una solución de conidios con una concentración de 1×10^7 conidios/mL. Las macetas se incubaron en el Invernadero II (interacciones bióticas) por un periodo de tiempo de 30 días. Regando con 100 mL de agua destilada cada 48 horas.





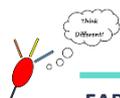
Transcurridos los 30 días de incubación, las plantas se retiraron de las macetas siguiendo el procedimiento mencionado en el apartado 4.11.

4.17. Efecto protector de *Metarhizium* hacia *F. oxysporum* in planta (*Solanum lycopersicum*)

Se realizó además una interacción tripartita entre tomate – *Metarhizium* – *Fusarium*. En esta interacción se trabajó con plántulas de tomate ya crecidas, las cuales fueron trasplantadas a macetas de 40x18 cm, se emplearon 15 plántulas por maceta y se manejó una maceta por tratamiento, los cuales fueron los siguientes:

1. ***F. oxysporum*** (1000 μ L inoculados sobre la raíz de una solución de 1×10^7 conidios/mL).
2. ***F. oxysporum* – *Metarhizium*: HA-11-2** (1000 μ L inoculados de cada uno sobre la raíz de una solución de 1×10^7 conidios/mL).
3. **Control** (1000 μ L inoculados de Tritón X-100 al 0.01%).
4. ***Metarhizium*: aislado HA-11-2** (1000 μ L inoculados sobre la raíz de una solución de 1×10^7 conidios/mL).

Una vez inoculados los conidios de ambos hongos sobre la raíz de las plantas de tomate, estas se dejaron incubando un periodo de tiempo de 50 días.





5. RESULTADOS

5.1. Aislamiento de *Metarhizium*

Los aislados del hongo *Metarhizium* se obtuvieron de muestras de tierra de la rizósfera de las plantas sanas en apariencia, como se mencionó en la sección de materiales y métodos. El muestreo se realizó dentro de cuatro regiones localizadas dentro del área natural protegida “Las Siete Luminarias” (cráteres inactivos) ubicada al sur del estado de Guanajuato (Tabla 4).

Tabla 4. Puntos de muestreo dentro del área natural protegida “Las Siete Luminarias”.

| Sitio de muestreo | Código del área | Coordenadas | Descripción del área |
|------------------------|-----------------|--|--|
| El Salto | ES | 20°18'46.17" N 101°12'10.41" O | Cuenca. Zona de Selva baja caducifolia y zonas con bosque de <i>Quercus</i> . Clima semicálido subhúmedo (A) C (W1) (el más húmedo), temperatura media anual >18 °C (Cruz <i>et al.</i> , 2012). Elevaciones: 1935 msnm hasta 1974 msnm |
| Hoya de Álvarez | HA, HAB | 20°19'32.17" N 101° 12'50.39" O | Cráter inactivo. Bosque con vegetación predominante: Palo blanco, palo dulce, huizache, cazahuate, pino, garambullo, ahuehuete, bromelia. Clima semicálido subhúmedo (A) C (W0) (humedad intermedia), temperatura media anual >18 °C (Cruz <i>et al.</i> , 2012). Elevaciones: 1860 msnm hasta 2088 |
| Hoya de Solís | HS | 20°21'50.10" N | Cráter inactivo. Vegetación predominante: Mezquite, huizache, palo blanco, palo dulce, cazahuate, |





Tabla 4 (Continuación).

| | | | | | |
|----------------------------|-----|-----------------|--|-----------|------------|
| | | 101°13'33.96" | garambullo, | pitayo, | pitahaya, |
| | | O | cactáceas. | Clima | semicálido |
| | | Elevaciones: | subhúmedo (A) C (W0) (humedad intermedia), temperatura media anual >18 °C (Cruz <i>et al.</i> , 2012). | | |
| | | 1826 msnm | | | |
| | | hasta 1840 msnm | | | |
| Rincón de Parangueo | RPV | 20°26'14.18" | Cráter | inactivo. | Vegetación |
| | | N | predominante: palo dorado, palo dulce, palo blanco, garambullo, | | |
| | | 101°14'51.41" | cactáceas, órganos, mezquite, | | |
| | | O | huizache. | Clima | semicálido |
| | | Elevaciones: | subhúmedo (A) C (W0) (humedad intermedia), temperatura media anual >18 °C (Cruz <i>et al.</i> , 2012). | | |
| | | 1720 msnm | | | |
| | | hasta 1070 msnm | | | |

Una vez tomadas las muestras, se trasladaron al laboratorio para su procesamiento. Se inocularon 100 µL de cada muestra en medios selectivos Dodine y Dodine-Cristal violeta para *Metarhizium*.

Las muestras se dejaron en un periodo de incubación de 20-25 días a temperatura ambiente, hasta observar el crecimiento de aquellas colonias que presentaron características típicas de *Metarhizium*: colonia color verde con aspecto terroso y al microscopio óptico la observación de conidios cilíndrico-ovalados.

La Figura 8 muestra los cultivos una vez finalizado el periodo de incubación, en donde se observan colonias de *Metarhizium* (flecha roja); en algunas muestras se lograron aislar más de dos colonias, con morfología colonial distinta como se observa en la figura 8-A (placa central, las diferentes colonias se indican por las flechas amarilla, roja y negra), éstas presentaron una tonalidad distinta de verde, al observar los conidios al microscopio, se confirmó la morfología típica de los conidios de *Metarhizium*. También se observó que en algunas muestras





crecieron casi exclusivamente colonias de *Metarhizium* ocupando casi la totalidad de la placa, como se observa en la figura 8-B (placa central). Una vez identificadas las colonias de *Metarhizium* se les asignó el nombre con el código correspondiente a cada sitio de muestreo seguido del número de muestra a la que correspondía; por ejemplo: ES-30 (ES: El Salto, muestra número 30), ES-35-1 y ES-35-2 (representan dos colonias aisladas de la muestra número 35).

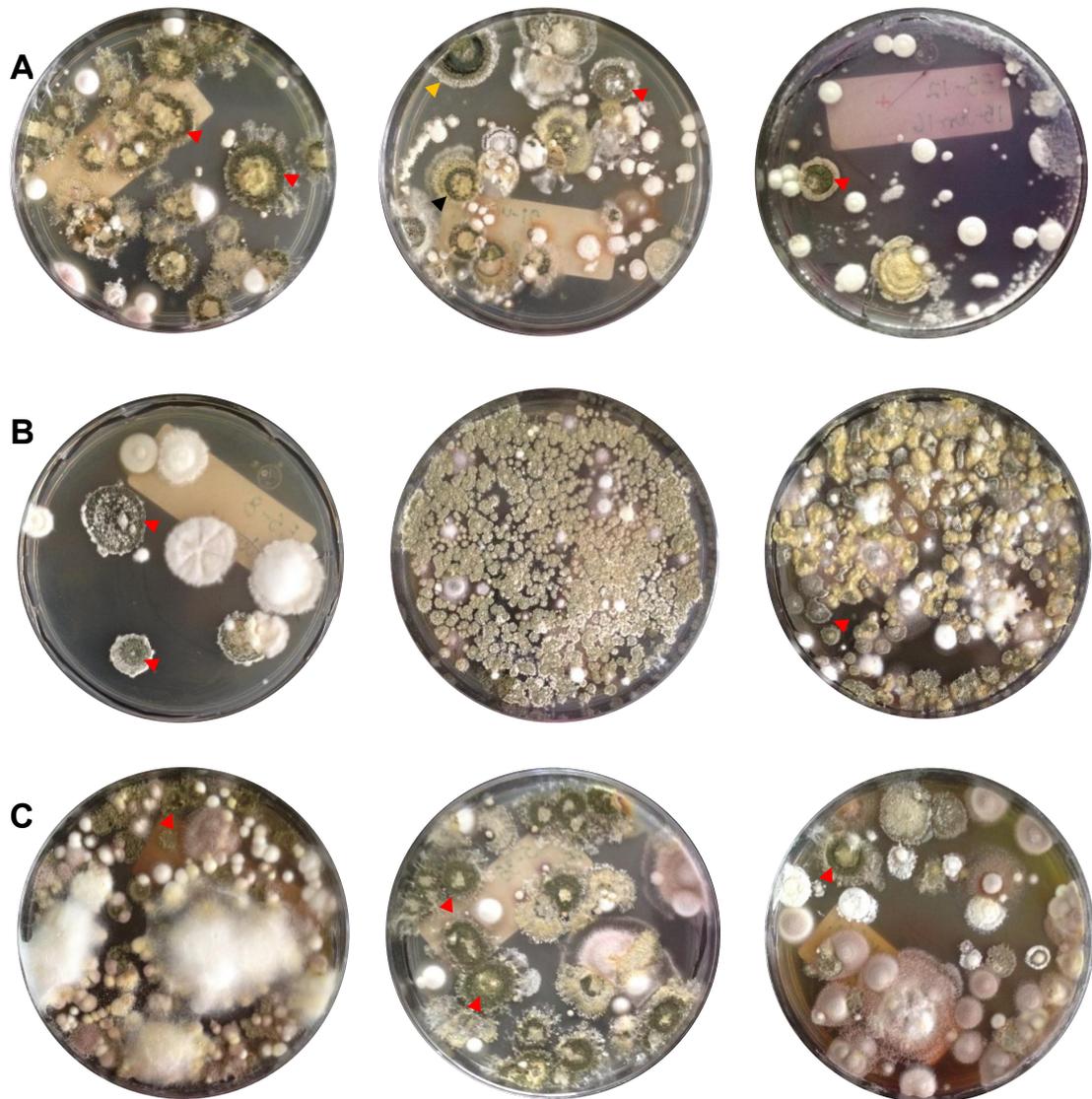
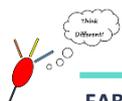


Figura 8. Placas Petri con el medio de selección después de 25 días de incubación mostrando los aislados de *Metarhizium*. (Indicados por la flecha roja).





Las colonias se sembraron en un nuevo medio (medio fresco de resiembra), se incubaron al menos durante 14 días o hasta observar su conidiación como se muestra en la figura 9-A. Posteriormente se colectaron los conidios de los aislados y se realizaron diluciones para la obtención de monoclonias (Figura 9-B).

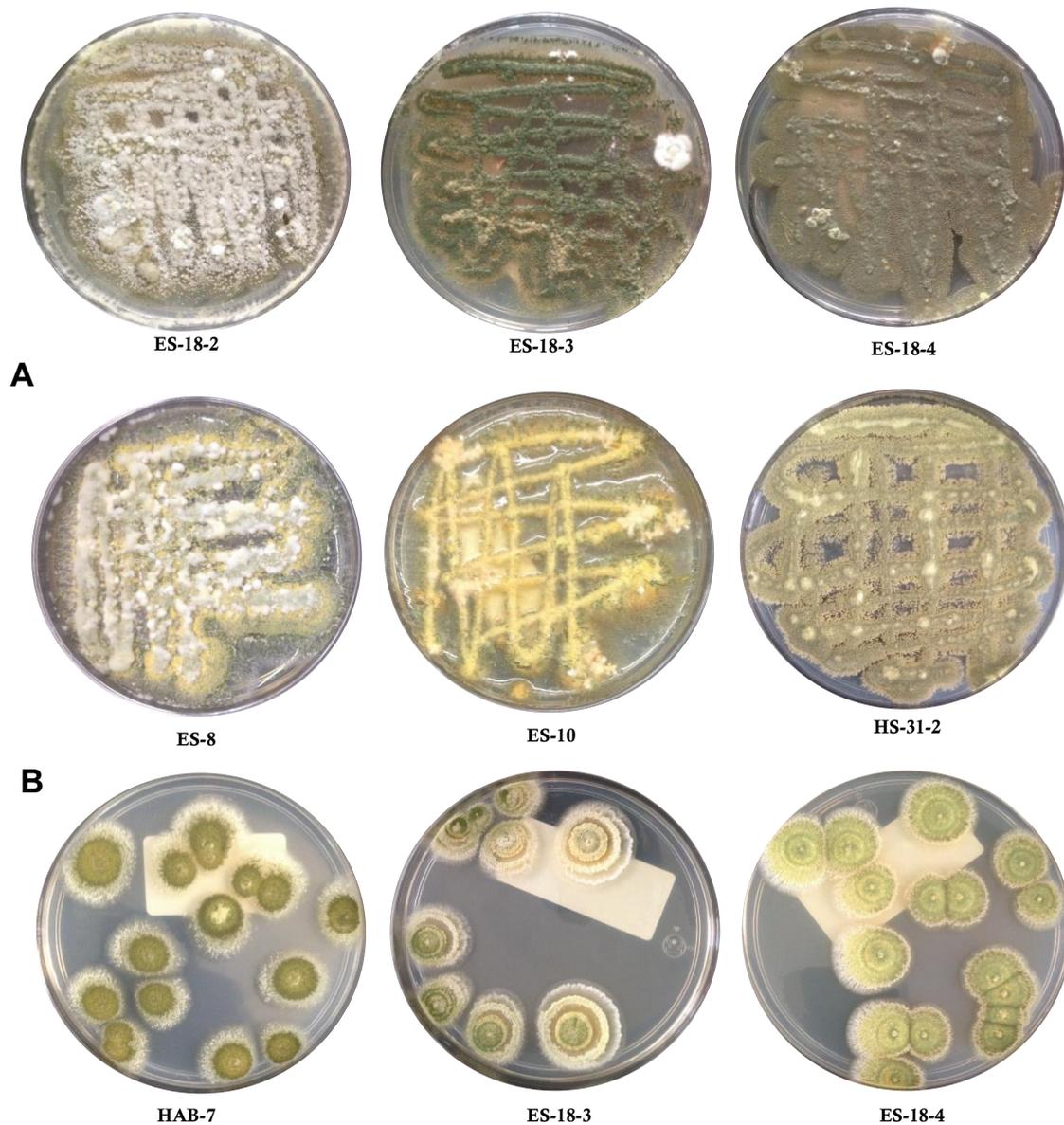
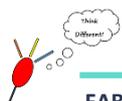


Figura 9. Aislados del hongo *Metarhizium*. A) Aislados de *Metarhizium* en medio fresco de resiembra. B) Obtención de monoclonias de algunos aislados de *Metarhizium*.





Esto se realizó con el fin de identificar si en cada aislado obtenido de *Metarhizium* se tenía solamente una morfología de colonia y así descartar contaminantes de otro hongo. Posteriormente los aislados se sembraron en un nuevo medio con dos fuentes de nitrógeno (M-100 2N) (Figura 10), tomando la muestra con un palillo plano a partir de una monoclonia.

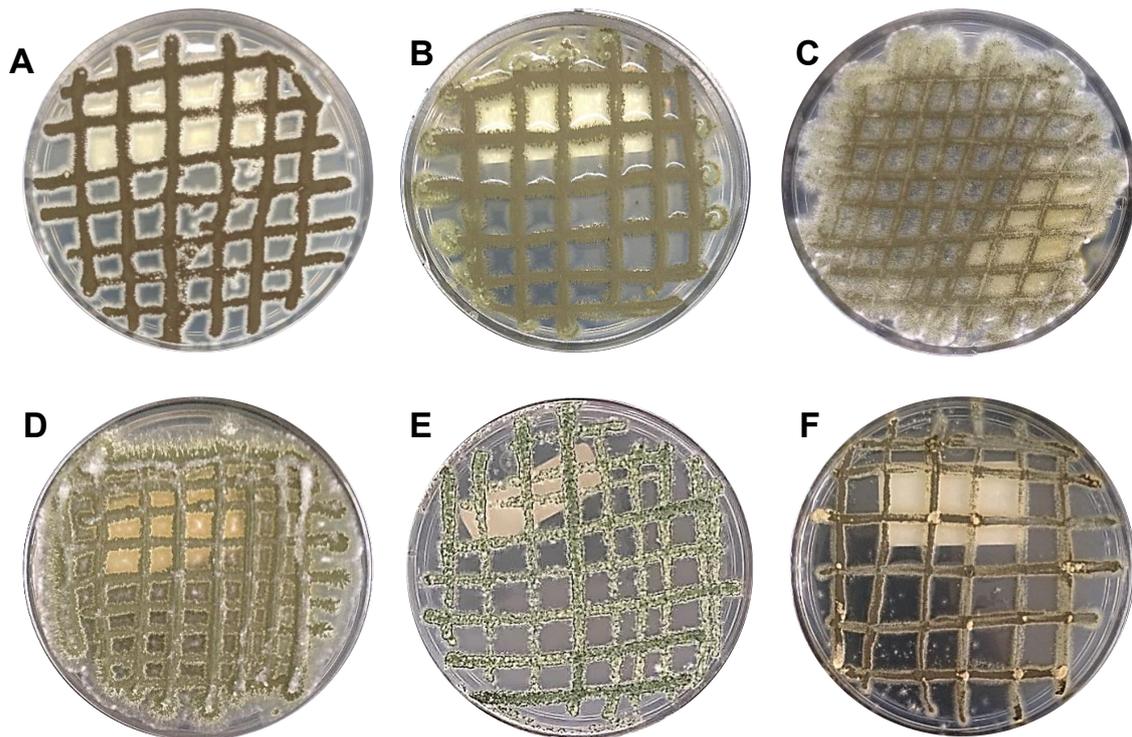


Figura 10. Aislados de *Metarhizium* en medio M-100 2N. A) ES-8, B) ES-18-3, C) ES-30, D) ES-35-2, E) ES-37, y F) HS-31-2.

En la Tabla 5 se observa el número total de muestras tomadas, así como el número de muestras positivas a la presencia de *Metarhizium* de cada sitio de muestreo. En los cuatro puntos de muestreo se encontró la presencia de aislados de *Metarhizium*. En “El Salto” fue donde se encontró la mayor cantidad de muestras positivas, posiblemente debido a la variación de microclimas en dicho sitio.

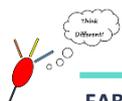




Tabla 5. Total de muestras tomadas por sitio de muestreo en el área natural protegida “Las Siete Luminarias”.

| Sitio de muestreo | Muestras tomadas | Aislados positivos |
|---------------------|------------------|--------------------|
| El Salto | 37 | 23 |
| Hoya de Álvarez | 26 | 8 |
| Hoya de Solís | 34 | 8 |
| Rincón de Parangueo | 36 | 5 |
| Total | 133 | 44 |

5.2. Caracterización morfológica de los aislados de *Metarhizium*

La caracterización morfológica es importante para la identificación de *Metarhizium*, ya que con ésta se puede distinguir rápidamente entre los diferentes aislados con base a sus diferencias morfológicas entre colonias (pigmentación de la colonia, formación de anillos de conidiación, crecimiento de micelio, velocidad de crecimiento). La luz es un factor importante para la conidiación ya que promueve un crecimiento mayor del hongo, así como una mayor producción de conidios (Onofre *et al.*, 2001).

Para llevar a cabo la caracterización morfológica de la colonia de cada aislado de *Metarhizium*, se colocó una gota de 50 µL (1000 conidios) en el centro de la caja de Petri con medio PDA, las placas se incubaron a 26°C durante 15 días a una exposición de 16 h luz/ 8 h oscuridad. En la Figura 11 se muestran las características morfológicas de cada uno de los aislados.

Los aislados que presentaron una mejor capacidad de conidiación fueron: ES-2, ES-6, ES-18-1, ES-18-4, ES-30, ES-37, HS-14, HS-22-4, HS-31-1, HS-31-2, RPV-3, RPV-10-1, RPV-10-2 y el aislado HA-11-2 en el cual se observan también sectores de micelio con poca conidiación. Los aislados que presentaron más micelio y poca conidiación fueron: ES-12-1, ES-18-2, ES-20-1 y HAB-9-1.



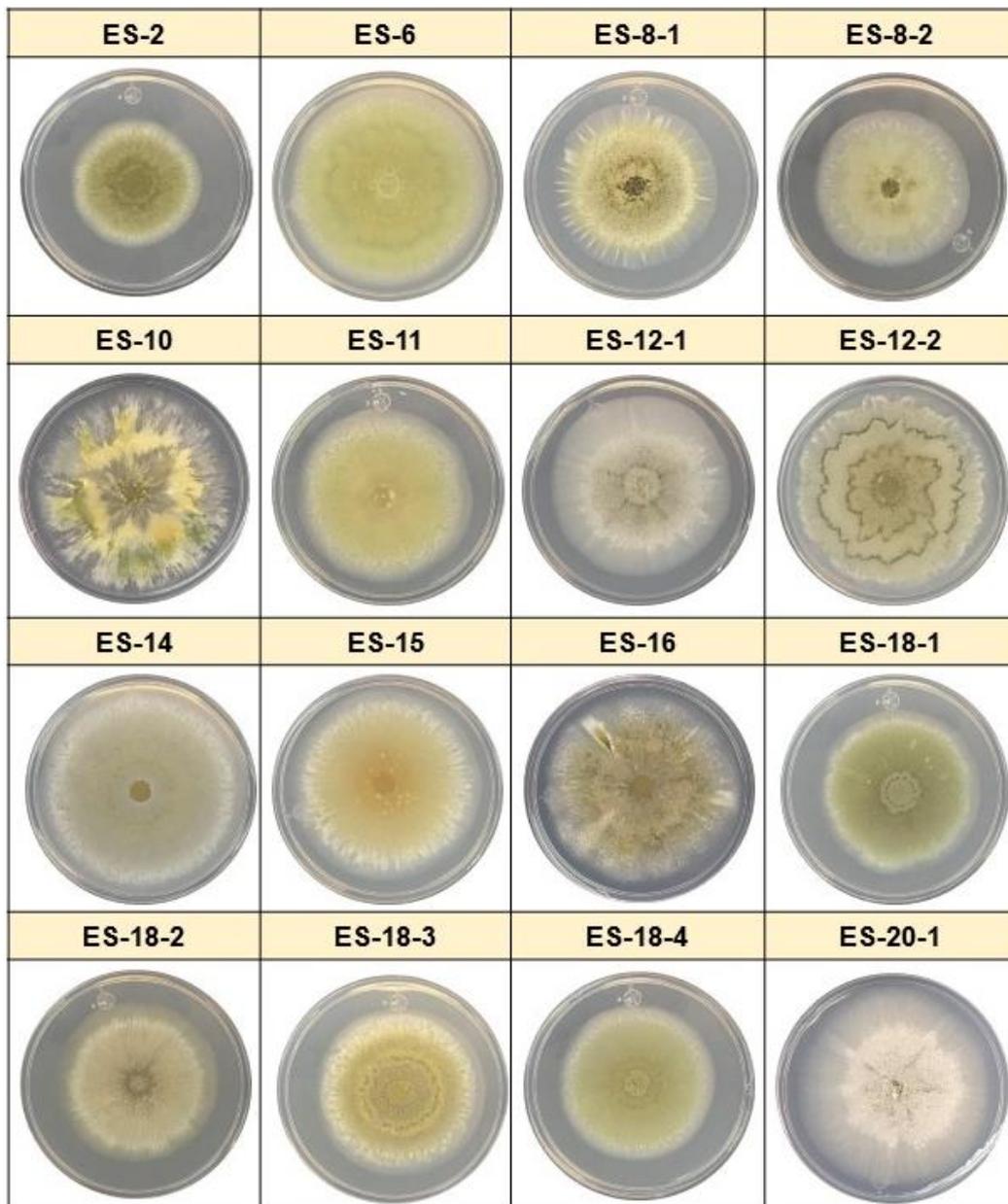
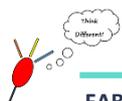


Figura 11. Crecimiento radial de los aislados de *Metarhizium*, mostrando sus características morfológicas.



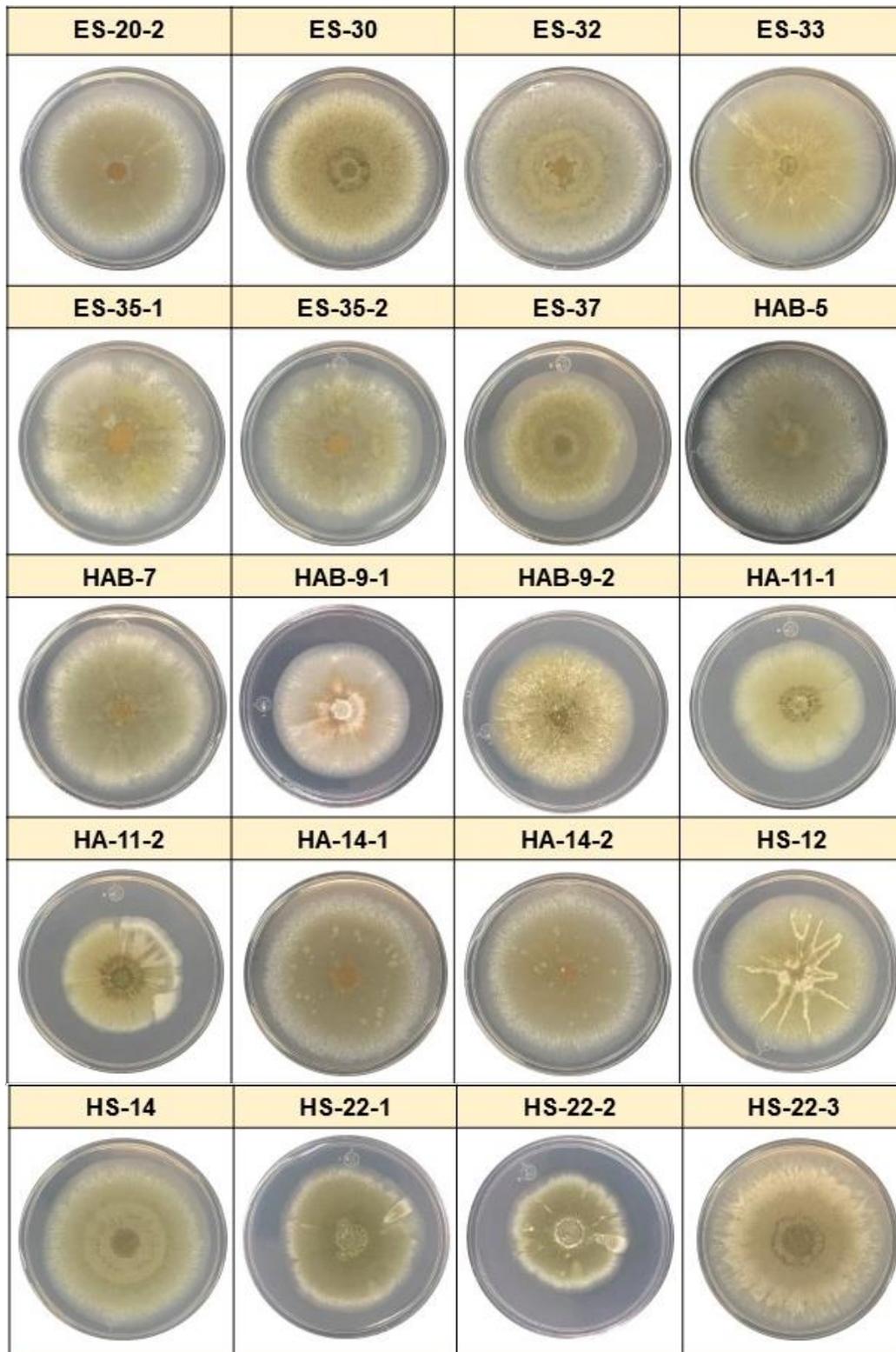
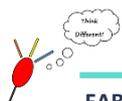


Figura 11 (continuación). Crecimiento radial de los aislados de *Metarhizium*, mostrando sus características morfológicas.



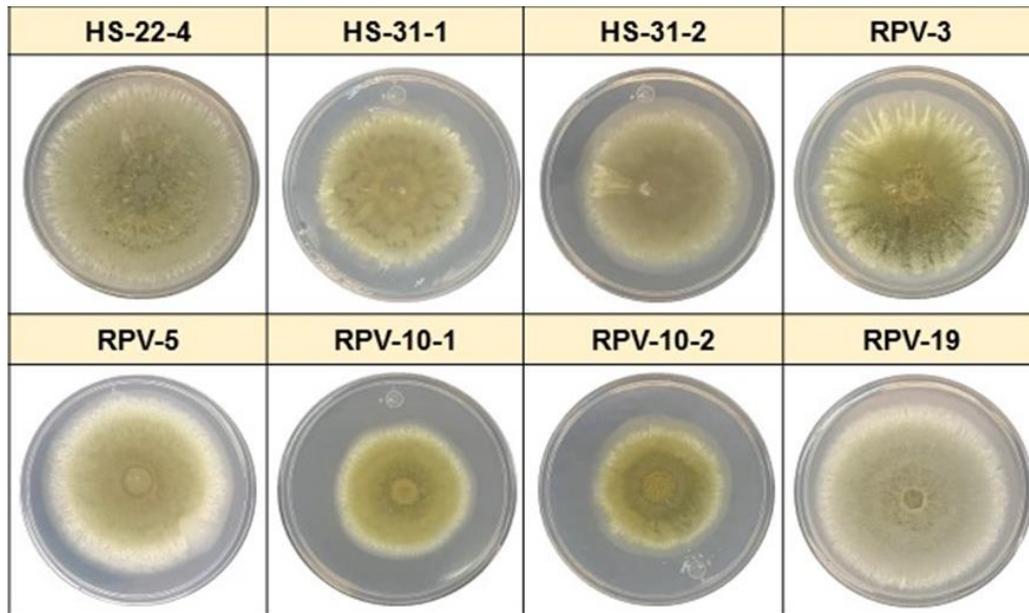
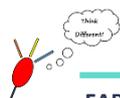


Figura 11 (continuación). Crecimiento radial de los aislados de *Metarhizium*, mostrando sus características morfológicas.

En la Figura 11 se observa que el aislado ES-12-2, a diferencia del ES-12-1 presentó mejor capacidad para conidiar, además se observa la formación evidente de anillos de conidiación; este aislado destaca de todos los demás en relación con la formación de anillos de conidiación, los cuales también se observan en los aislados ES-18-3, ES-32, HS-14 y HS-22-3 pero de manera menos pronunciada.

En relación a la velocidad de crecimiento: los aislados ES-6, ES-12-2, ES-14, ES-20-1, ES-20-2, ES-30, ES-32, ES-33, HAB-5, HA-14-1, HA-14-2, HS-22-3, HS-22-4, RPV-3 y RPV-19 en un periodo de incubación de 15 días cubrieron casi la totalidad de la caja Petri en comparación con el resto de los aislados, los cuales ocuparon un espacio menor en el mismo periodo de tiempo.

Todas estas características que presentan cada uno de los aislados, son importantes ya que de esta manera se puede distinguir más fácilmente entre cada uno de ellos.





5.3. Caracterización molecular de los aislados de *Metarhizium*

Para la caracterización molecular de cada uno de los aislados obtenidos, se realizó la extracción de DNA siguiendo el protocolo descrito por Sambrook y Russell (2001). Para verificar la calidad del DNA obtenido se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% (Figura 12).

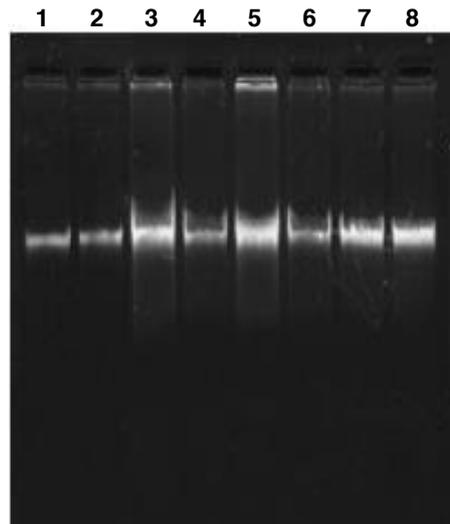


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa (DNA cromosómico). Carriles: 1) ES-2, 2) ES-6, 3) HAB-5, 4) HAB-7, 5) HS-12, 6) HS-14, 7) RPV-3, 8) RPV-5.

Una vez que se obtuvo el DNA cromosómico de cada uno de los aislados se realizó la amplificación de un fragmento del gen del Factor de Elongación 1 α (EF-1 α), utilizando los oligonucleótidos EF1T/ EF2T específicos para el género *Metarhizium* como se indica en materiales y método.

En la Figura 13 se muestra un gel representativo de agarosa al 1% teñido con SYBR Safe, en el que se observan los amplicones obtenidos en algunas de las muestras (aislados), mostrando una banda única del tamaño esperado para el EF-1 α de 800 pb aproximadamente.



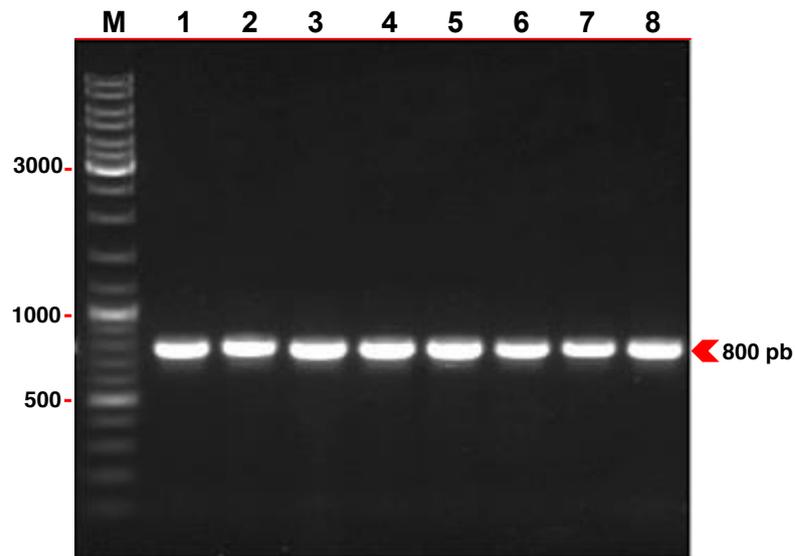
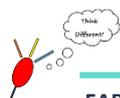


Figura 13. Amplificación del Fragmento del Factor de elongación 1 α (EF-1 α) de \approx 800 pb. M) Marcador de tamaño molecular; carriles: 1) ES-2, 2) ES-6, 3) HAB-5, 4) HAB-7, 5) HS-12, 6) HS-14, 7) RPV-3, 8) RPV-5.

Cuando se obtuvo el amplicón de cada uno de los aislados, se recuperaron los trozos de agarosa de los geles que contenían los amplicones y se procedió a purificarlos con el Kit Gen Elute™ Gel Extraction. Una vez purificados los fragmentos se ligaron en el vector de mantenimiento pGEM®-T Easy. Posterior a la ligación en pGEM®-T Easy, se realizó la transformación a través de choque térmico en células competentes DH5 α de *E. coli*, se rescataron las colonias blancas y se crecieron en medio selectivo para purificar los plásmidos recombinantes. La clonación de los fragmentos se comprobó por restricción con la enzima *EcoRI*, ya que el vector de mantenimiento pGEM®-T Easy tiene dos sitios de corte para *EcoRI*, los cuales flanquean el sitio de clonación, por lo que se esperaba que el tratamiento con enzimas libere el vector y el fragmento, de 3000 y 800 pb respectivamente.

En la Figura 14 se muestra un gel de agarosa donde se comprueba la liberación del fragmento de interés (800 pb) del EF-1 α y el vector linearizado (3000 pb).



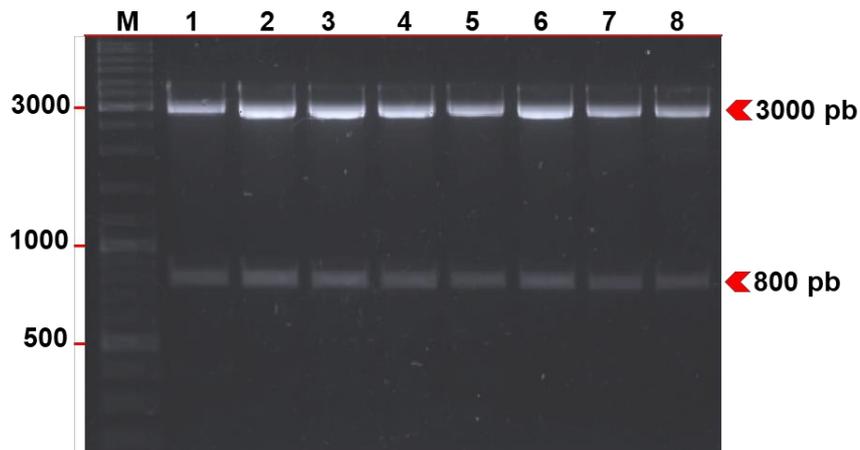


Figura 14. Comprobación de la ligación del fragmento de interés del EF-1 α en el vector pGEM-T Easy, mediante corte enzimático con *EcoRI*. M) Marcador de tamaño molecular; carriles: 1) ES-2, 2) ES-6, 3) HAB-5, 4) HAB-7, 5) HS-12, 6) HS-14, 7) RPV-3, 8) RPV-5.

La presencia de la banda de 800 pb indica que los plásmidos contienen el fragmento de interés del gen EF-1 α . Posteriormente los plásmidos se mandaron secuenciar por ambos extremos de las cadenas de DNA a la compañía Elim Biopharmaceuticals, Inc USA.

Una vez que se obtuvieron las secuencias, éstas se analizaron por medio del paquete bioinformático Lasergen 14.0 de DNASTAR y los programas MEGA7 y Mr Bayes; se realizó un alineamiento múltiple de secuencias con el algoritmo MAFFT y en base a esto se realizó la inferencia filogenética empleando el método de máxima verosimilitud.

Las secuencias obtenidas de los aislados se compararon con secuencias del gen EF-1 α de *Metarhizium* ya reportadas por Bischoff en 2009, de esta manera se generó la construcción filogenética que se muestra en la Figura 15 (máxima verosimilitud), además se muestran los valores de bootstrap de los tres métodos estadísticos en el siguiente orden: máxima verosimilitud/máxima parsimonia/inferencia Bayesiana.

Los resultados de la secuenciación y el análisis filogenético de las secuencias analizadas permitieron ubicar taxonómicamente 26 aislados dentro del clado de *M. robertsii*, 2 dentro del clado de *M. anisopliae*, 8 en el clado de *M. brunneum* y

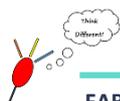




3 aislados dentro del clado de *M. guizhouense*. Para 3 de los aislados (ES-8-2, ES-12-1 y HAB-9-1) la información de la secuencia analizada no fue suficiente para poder emparentarlos con algunos de los clados ya reportados de *Metarhizium*; sin embargo, la rama terminal en la que se ubicaron estos 3 aislados muestra un soporte de rama (bootstrap) arriba de 98 % para los tres métodos, y se encuentra separada de las demás (indicada en la figura 15 con una flecha roja) por lo que se sugiere que podrían ser una nueva especie de *Metarhizium*.

En la Figura 16 se muestra el porcentaje de identidad que existe entre los aislados pertenecientes a cada uno de los clados filogenéticos (diferencia de porcentaje de identidad entre especies), comparando algunos de los aislados obtenidos en este trabajo (en la matriz de distancias se colocó un aislado de cada clado) y cepas ya reportadas por Bischoff y colaboradores en 2009.

A manera de ejemplo en la matriz de distancias de la figura se observa que en el análisis de la secuencia del aislado ES-8-2 (aislado que no logró ubicarse dentro de ningún grupo taxonómico ya reportado) existe un porcentaje de identidad de 98.7 % (de 10 a 11 pb de diferencia) con la cepa de ARSEF7929 *M. pingshaense* y un 98.5 % (12 pb de diferencia) con la cepa de ARSEF7462 *M. robertsii*. Los demás aislados que sí lograron clasificarse dentro de un clado taxonómico muestran una diferencia de 2-3 pb entre ellos, como por ejemplo el aislado ES-6 que se agrupó dentro del clado de *M. anisopliae* muestra un porcentaje de identidad de 99.7 % con la cepa ARSEF6347 *M. anisopliae*. Indicando que entre aislados que pertenecen al mismo clado existe una diferencia de entre 2 a 4 pb.



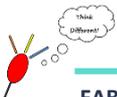
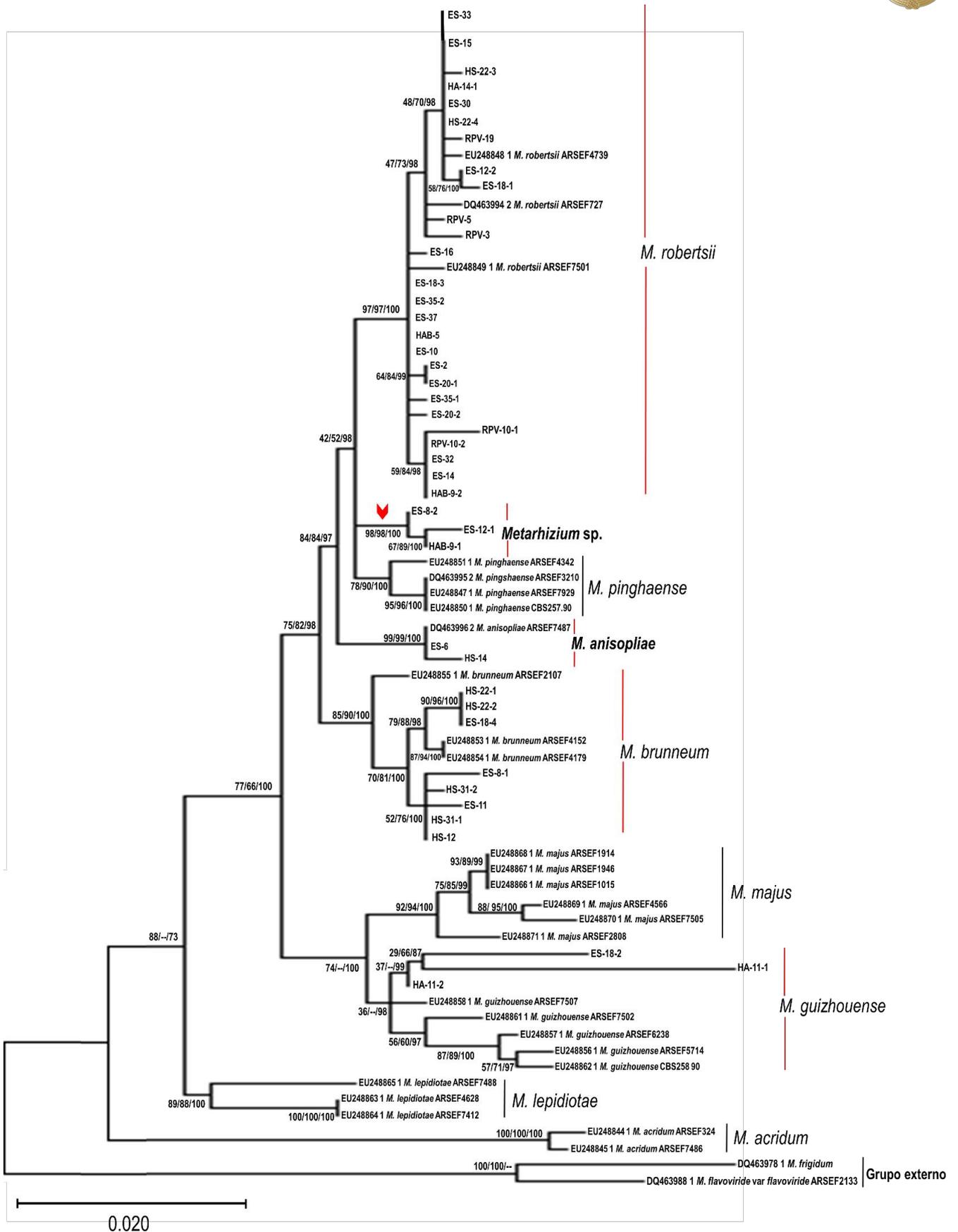




Figura 15. Análisis filogenético de un fragmento del gen (EF-1 α) de los aislados obtenidos en este trabajo y las secuencias de las cepas reportadas por Bischoff y colaboradores en 2009. La historia evolutiva que se muestra fue inferida mediante el uso del método de máxima verosimilitud; el soporte nodal para el análisis (bootstrap) se muestra por encima de las ramas del árbol en el orden siguiente máxima verosimilitud/máxima parsimonia/inferencia bayesiana.

| | | Porcentaje de identidad | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------|----|-------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|----|-----------------------------------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | | |
| Divergencia | 1 | ■ | 97.4 | 96.4 | 96.4 | 96.2 | 96.3 | 95.5 | 91.2 | 96.5 | 96.5 | 96.8 | 96.4 | 96.5 | 96.1 | 97.7 | 1 | ARSEF473maju |
| | 2 | 2.2 | ■ | 96.9 | 97.4 | 96.9 | 97.1 | 96.4 | 91.6 | 97.2 | 97.2 | 97.5 | 97.1 | 97.2 | 96.8 | 99.4 | 2 | ARSEF7420guizhouense |
| | 3 | 3.3 | 3.1 | ■ | 97.5 | 97.4 | 97.7 | 96.2 | 91.3 | 97.7 | 97.7 | 98.0 | 97.5 | 97.7 | 98.4 | 97.4 | 3 | ARSEF3826brunneum |
| | 4 | 3.3 | 2.7 | 2.5 | ■ | 98.5 | 98.2 | 96.2 | 91.6 | 98.4 | 98.8 | 98.7 | 98.3 | 98.4 | 97.4 | 97.8 | 4 | ARSEF7929pingshaense |
| | 5 | 3.5 | 3.1 | 2.7 | 1.5 | ■ | 97.9 | 96.1 | 91.3 | 98.0 | 99.4 | 98.5 | 98.1 | 98.3 | 97.2 | 97.4 | 5 | ARSEF6472robertsii |
| | 6 | 3.3 | 3.0 | 2.4 | 1.8 | 2.1 | ■ | 96.2 | 91.5 | 99.7 | 98.1 | 98.4 | 97.9 | 98.1 | 97.4 | 97.5 | 6 | ARSEF6347anisopliae |
| | 7 | 4.2 | 3.7 | 3.9 | 3.9 | 4.1 | 3.9 | ■ | 92.5 | 96.2 | 96.2 | 96.7 | 96.2 | 96.4 | 95.8 | 96.7 | 7 | ARSEF4154lepidiotae |
| | 8 | 9.0 | 9.0 | 9.3 | 9.0 | 9.4 | 9.1 | 7.9 | ■ | 91.6 | 91.6 | 91.9 | 91.5 | 91.6 | 91.3 | 91.9 | 8 | ARSEF5748acridum |
| | 9 | 3.1 | 2.8 | 2.4 | 1.6 | 2.1 | 0.3 | 3.9 | 9.0 | ■ | 98.4 | 98.7 | 98.3 | 98.3 | 97.5 | 95.6 | 9 | ES-6.seq <i>M. anisopliae</i> |
| | 10 | 3.1 | 2.8 | 2.4 | 1.2 | 0.6 | 1.9 | 3.9 | 9.0 | 1.6 | ■ | 99.0 | 98.6 | 98.6 | 97.5 | 95.5 | 10 | ES-14.seq <i>M. robertsii</i> |
| | 11 | 2.8 | 2.5 | 2.1 | 1.3 | 1.5 | 1.6 | 3.4 | 8.6 | 1.3 | 1.1 | ■ | 99.6 | 99.6 | 97.8 | 95.8 | 11 | ES-8-2.seq |
| | 12 | 3.3 | 3.0 | 2.5 | 1.8 | 1.9 | 2.1 | 3.9 | 9.1 | 1.7 | 1.5 | 0.4 | ■ | 99.5 | 97.4 | 95.4 | 12 | ES-12-1.seq |
| | 13 | 3.1 | 2.8 | 2.4 | 1.6 | 1.8 | 1.9 | 3.7 | 9.0 | 1.7 | 1.5 | 0.4 | 0.5 | ■ | 97.4 | 95.4 | 13 | HAB-9-1.seq |
| | 14 | 3.4 | 3.1 | 1.5 | 2.5 | 2.7 | 2.5 | 4.2 | 9.1 | 2.3 | 2.3 | 2.0 | 2.4 | 2.4 | ■ | 95.1 | 14 | ES-18-4.seq <i>M. brunneum</i> |
| | 15 | 1.9 | 0.6 | 2.7 | 2.2 | 2.7 | 2.5 | 3.4 | 8.6 | 4.6 | 4.6 | 4.3 | 4.7 | 4.7 | 4.9 | ■ | 15 | HA-11-2.seq <i>M. guizhouense</i> |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | | | |

Figura 16. Porcentaje de identidad entre algunos de los aislados de *Metarhizium*.

5.3.1. Distribución geográfica de los aislados obtenidos

Se obtuvo un total de 44 aislados de *Metarhizium* de muestras tomadas de la rizósfera, en cuatro sitios localizados dentro del área natural protegida “Las Siete Luminarias”. Un total de 23 aislados corresponden a El Salto, 8 a la Hoya de Álvarez, 8 a la Hoya de Solís y 5 de los aislados corresponden a Rincón de Parangueo.

La distribución geográfica de las especies de *Metarhizium* es importante para conocer su biodiversidad; por esto se realizó una aproximación de la distribución de las especies identificadas en este estudio (Figura 17).

En la tabla 6 se indica el número total de aislados de *Metarhizium* colectados en Las Siete Luminarias. En la zona de “El Salto” fue en donde se encontró el mayor número de aislados, además de mayor diversidad de especies de *Metarhizium* dentro de las cuales se encuentran *M. robertsii*, *M. anisopliae*, *M. brunneum*, *M. guizhouense* y dos aislados pertenecientes a una especie de *Metarhizium* (*Metarhizium* sp.), que no se agruparon con ninguna de las especies ya





reportadas (Figura 17, Tabla 6). En La Hoya de Álvarez se encontraron 6 aislados, 3 perteneciente a *M. robertsii*, 2 a *M. guizhouense* y un aislado de *Metarhizium* (*Metarhizium* sp.) así como 2 aislados los cuales su secuencia no fue analizada; en la Hoya de Solís se encontraron aislados pertenecientes a *M. anisopliae*, *M. brunneum* y *M. robertsii*; en cuanto a Rincón de Parangueo se aislaron únicamente especies de *M. robertsii*.

De manera general se encontró un mayor número de especies pertenecientes a *M. robertsii* (26 aislados) y *M. brunneum* (8 aislados).

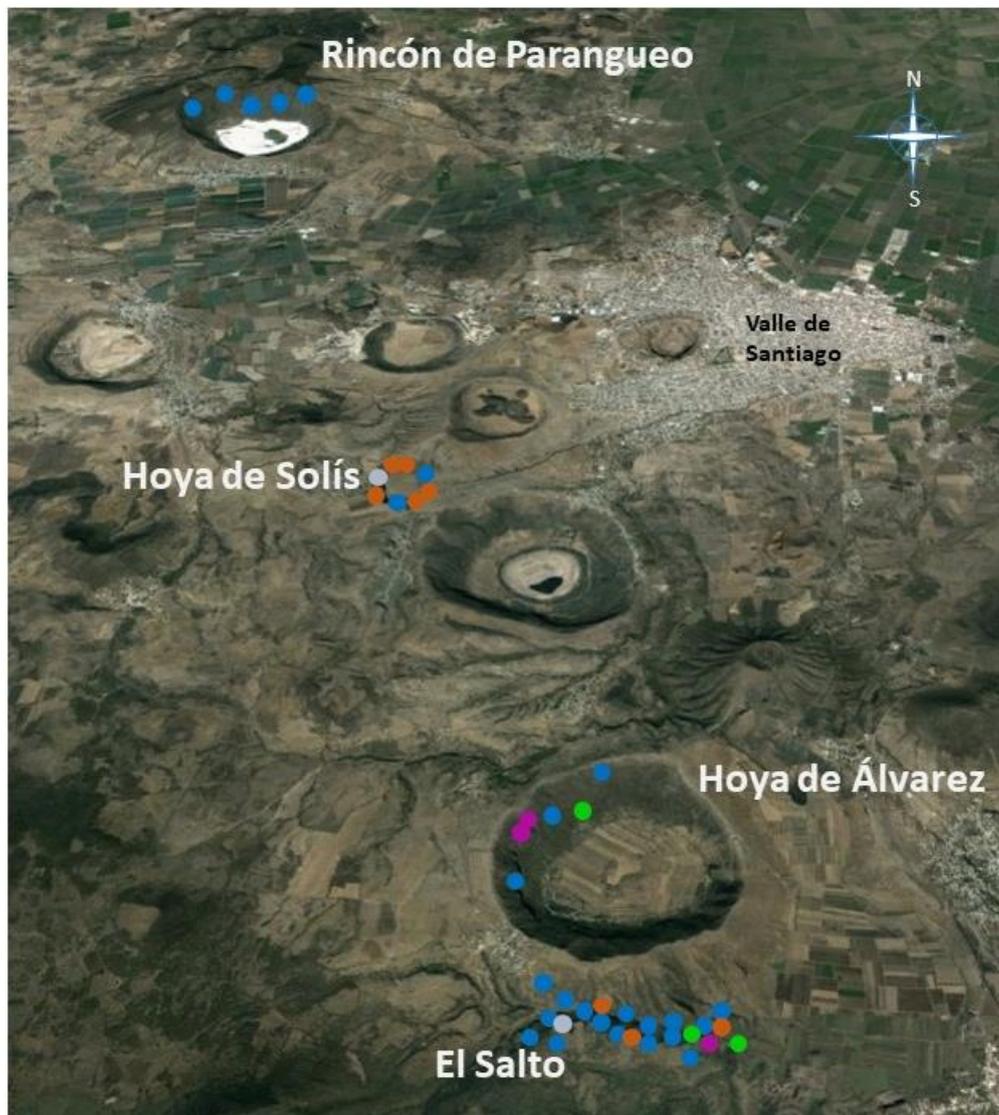


Figura 17. Distribución geográfica de los Aislados de *Metarhizium* en la región Natural Protegida "Las Siete Luminarias". Simbología: (●) *M. robertsii*, (●) *M. anisopliae*, (●) *M. brunneum*, (●) *M. guizhouense*, (●) *Metarhizium* sp.

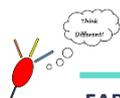




Tabla 6. Número total de aislados de *Metarhizium* spp. colectadas en “Las Siete Luminarias”.

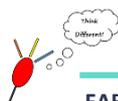
| Sitio de muestreo | <i>Metarhizium robertsii</i> | <i>Metarhizium anisopliae</i> | <i>Metarhizium brunneum</i> | <i>Metarhizium guizhouense</i> | <i>Metarhizium</i> sp. | Total |
|---------------------|------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|--------------------------------|------------------------|-----------|
| El Salto | 16 | 1 | 3 | 1 | 2 | 23 |
| Hoya de Álvarez | 3 | --- | --- | 2 | 1 | 6 |
| Hoya de Solís | 2 | 1 | 5 | --- | --- | 8 |
| Rincón de Parangueo | 5 | --- | --- | --- | --- | 5 |
| Total | 26 | 2 | 8 | 3 | 3 | 42 |

Para 2 de los aislados obtenidos (HAB-7, HA.14-2) su secuencia no fue analizada.

5.4. Interacción de los aislados de *Metarhizium* con semillas de sorgo (*in vitro*)

Con la finalidad de evaluar los efectos producidos por el hongo *Metarhizium* en una planta de interés agrícola (sorgo), se realizó la asociación del sorgo con los diferentes aislados de *Metarhizium* obtenidos en este trabajo (44) y con la cepa CARO19 (*M. brunneum*), la cual se utilizó como un control positivo dado los experimentos realizados por (Herrera Gutiérrez, 2016), además se utilizó un control negativo en donde únicamente se colocaron las semillas de sorgo; esta interacción se realizó bajo condiciones *in vitro* a 28°C en oscuridad total por un periodo de 10 días. Se colocaron 5 semillas de sorgo para cada ensayo individual de interacción en medio agar-agua y aproximadamente, a 2 cm de las semillas se inocularon los diferentes aislados de *Metarhizium* (se realizaron 5 repeticiones de cada ensayo).

Los efectos que se observaron en la germinación no fueron significativos (no se observó diferencia en la germinación de las semillas interaccionando con los aislados de *Metarhizium* respecto al control sin interacción con el hongo); por tal motivo el porcentaje de germinación no fue evaluado. En la Figura 18 se muestran algunos aislados de *Metarhizium* así como el tratamiento control, en donde se observa que de las 5 semillas que se colocaron en el medio, las cinco germinaron. Sin embargo se puede observar que aunque no existió diferencia en la germinación de las semillas, a pesar de las condiciones mínimas en nutrientes del medio, los efectos en la mayor producción de masa vegetal son apreciables; por lo que se obtuvieron datos del peso fresco de las plántulas y





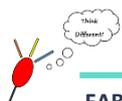
posteriormente fueron almacenadas a 50°C por 48 horas para determinar el peso seco (medida que expresa la cantidad de masa cuando no hay agua en la planta) por ensayo individual de cada uno de los tratamientos.

En relación a los resultados analizados del peso fresco por la prueba de Kruskal-Wallis mediante una comparación múltiple, arrojan que existe una diferencia significativa respecto al tratamiento control en 10 de los aislados de *Metarhizium* (Figura 19).



Figura 18. Crecimiento de semillas de sorgo en una interacción de 10 días con algunos aislados de *Metarhizium* en condiciones *in vitro* (28°C bajo oscuridad constante).

El aislado HS-22-2 fue el que mayor peso fresco presentó con una media de 0.39 g. Sin embargo, aunque el análisis estadístico indica que no existen diferencias significativas en peso fresco para algunos de los aislados, la media de estos se encuentra por arriba del tratamiento control.



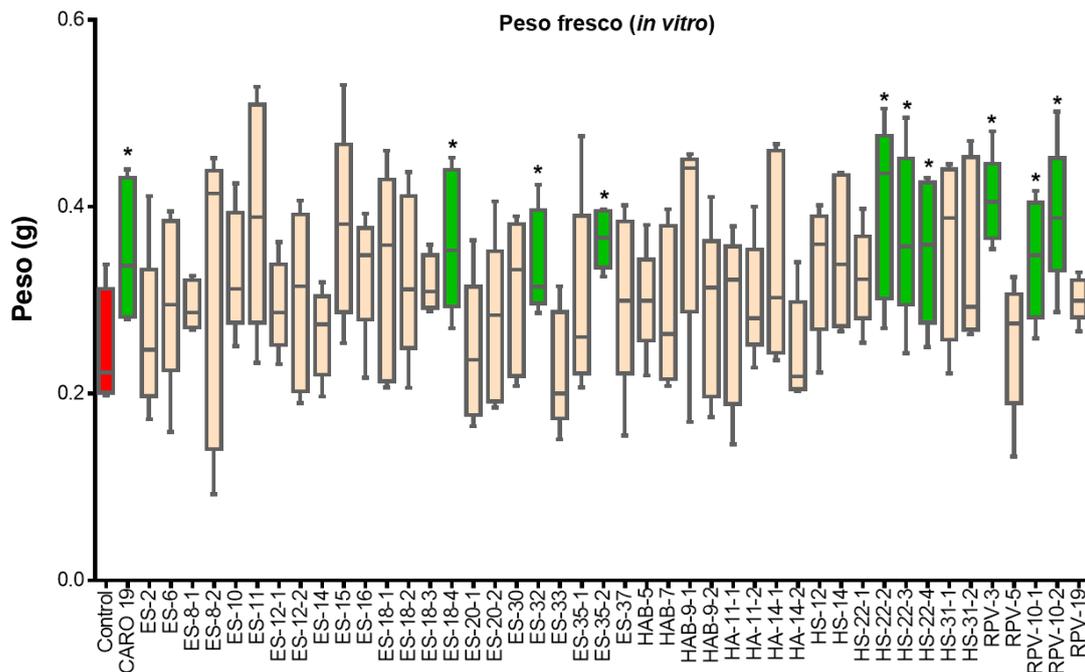


Figura 19. Gráfica de cajas y bigotes de peso fresco de plántulas de sorgo *in vitro*. Análisis estadístico con Prueba Kruskal-Wallis: $H(45, N=1150)=59.71, p<0.05$. $N=25$ por tratamiento. Los aislados con (*) presentan diferencias significativas respecto al control.

El peso seco indica la cantidad de biomasa de un cuerpo, para este caso el peso seco fue evaluado por cada tratamiento de plántulas individualmente. Entre mayor peso seco por tratamiento en las plántulas, hay mayor cantidad de carbohidratos, proteínas, minerales, vitaminas, entre otros. Por tal motivo se tomó en cuenta este parámetro para conocer si la planta se encuentra en mayor crecimiento de masa vegetal, cuando esta tiene una interacción con los diferentes aislados de *Metarhizium*.

Los resultados analizados del peso seco por tratamiento individual bajo la prueba de Kruskal-Wallis por comparación multiple, indican diferencias significativas respecto al control en 41 de los 45 aislados de *Metarhizium* evaluados.

En la Figura 20 se muestra la gráfica del peso seco del sorgo, las cajas de color verde representan los aislados de *Metarhizium* que resultaron significativos; los aislados ES-35-2 y HS-12 son los que muestran un mayor peso seco respecto al control con el doble de crecimiento en masa (200%). Sin embargo, aunque algunos otros aislados de *Metarhizium* no presenten un porcentaje de diferencia





tan alto como los dos antes mencionados, se encuentran arriba del control por ejemplo la cepa de CARO19 presenta un 68 % de peso mayor respecto al control.

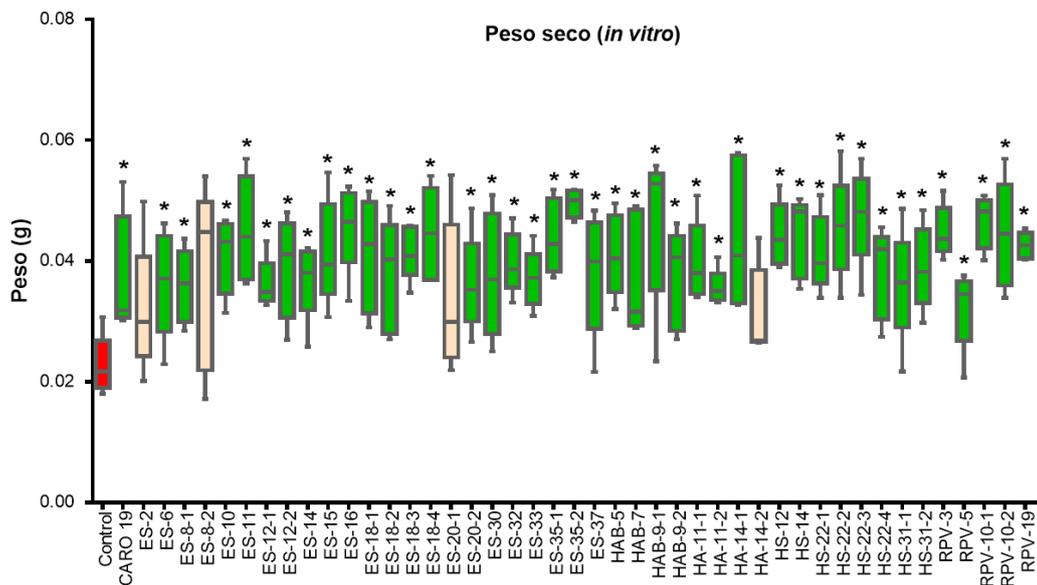
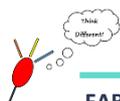


Figura 20. Gráfica de cajas y bigotes de peso seco de plántulas de sorgo *in vitro*. Análisis estadístico con Prueba Kruskal-Wallis: $H(45, N=1150)=70.14, p<0.05$. $N= 25$ por tratamiento. Los aislados con (*) presentan diferencias significativas respecto al control.

5.5. Interacción de los aislados de *Metarhizium* con la planta de sorgo en condiciones semicontroladas (invernadero)

Como ya se mencionó anteriormente *Metarhizium* es un hongo que persiste en los campos agrícolas y el sorgo presenta buena adaptabilidad y rendimientos para este ambiente, su utilización es fundamental para el consumo animal; se le ha clasificado como el quinto cereal de mayor importancia en el mundo aportando el 3% de la producción total (Dragún *et al.*, 2010). Por lo que la interacción del sorgo con organismos persistentes en el suelo es de interés al campo agrícola.

Los parámetros que se evaluaron en esta interacción, tienen el objetivo de observar los posibles efectos benéficos que puede proporcionar *Metarhizium* a la planta de sorgo en un ambiente similar a lo que se observa en campo (ambiente semicontrolado en invernadero).





El sorgo es un cereal de verano originario del continente africano y asiático, por lo que la siembra del grano se realizó durante verano (14 de julio-14 de agosto) en el invernadero II (interacciones bióticas) del Departamento de Biología de la División de Ciencias Naturales y Exactas; la temperatura dentro del invernadero osciló entre 26.8°C a 45.1°C (durante el tiempo de incubación de las plantas). El procedimiento que se siguió para este ensayo se describe en la sección de materiales y métodos.

Los aislados de *Metarhizium* que se utilizaron para estos ensayos fueron: 10 aislados obtenidos en este trabajo, la cepa de CARO19 y se utilizaron dos tratamientos (con adherente en la semilla: carboximetilcelulosa y la semillas solas). En la Figura 21 se muestran las macetas con las plántulas de sorgo una vez concluida la interacción (30 días de interacción). En la Figura 22 se muestran plántulas representativas de la interacción del sorgo con los diferentes aislados de *Metarhizium* probados bajo esta condición, se observa que la raíz de las plantas en una interacción con el hongo presenta una mayor longitud en comparación con los controles.

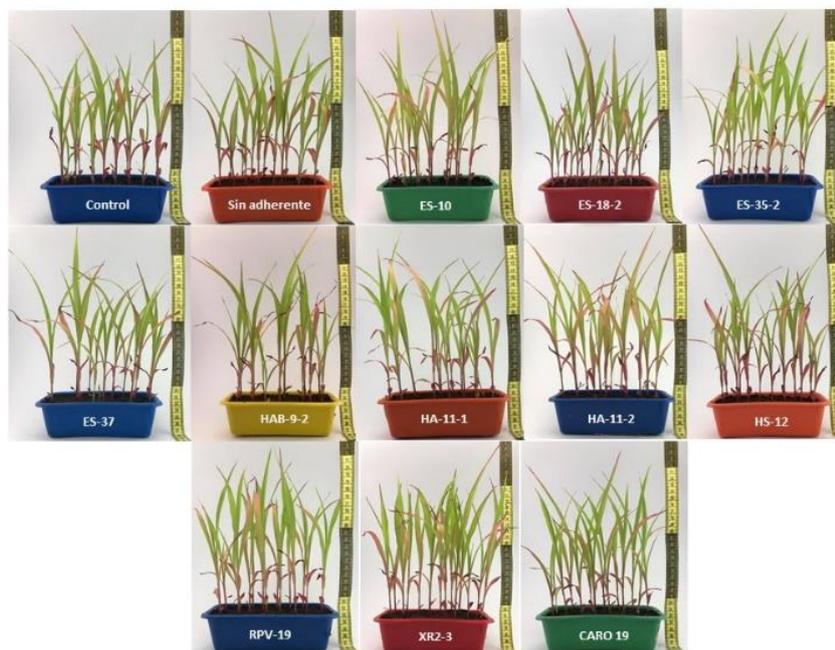
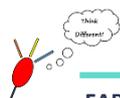


Figura 21. Macetas donde se desarrolló la interacción de aislados de *Metarhizium* con *Sorghum bicolor* en condiciones semicontroladas por 30 días.



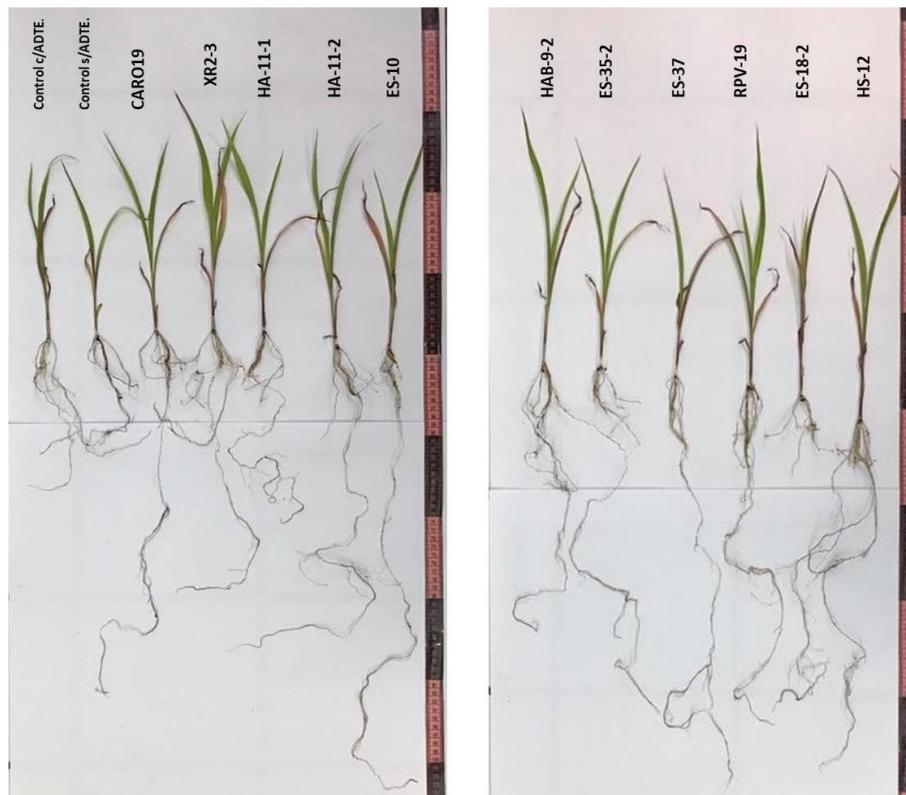
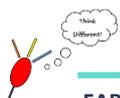


Figura 22. Imagen de comparación de tamaño de las plántulas obtenidas de la interacción con los aislados de *Metarhizium* bajo condiciones semicontroladas. (Imágenes representativas).

5.5.1. Efecto de los aislados de *Metarhizium* sobre la germinación de las semillas de sorgo en un ambiente semicontrolado

En relación a la germinación de la semilla de sorgo se observó que la cantidad de plántulas que crecieron en el tratamiento control (semillas germinadas) fue mayor que las que se encontraban en una interacción con algunos de los aislados de *Metarhizium* (Figura 23); sin embargo, los resultados analizados del porcentaje de germinación bajo la prueba de Kruskal-Wallis por comparación múltiple con el control, indican que no existe una diferencia significativa.



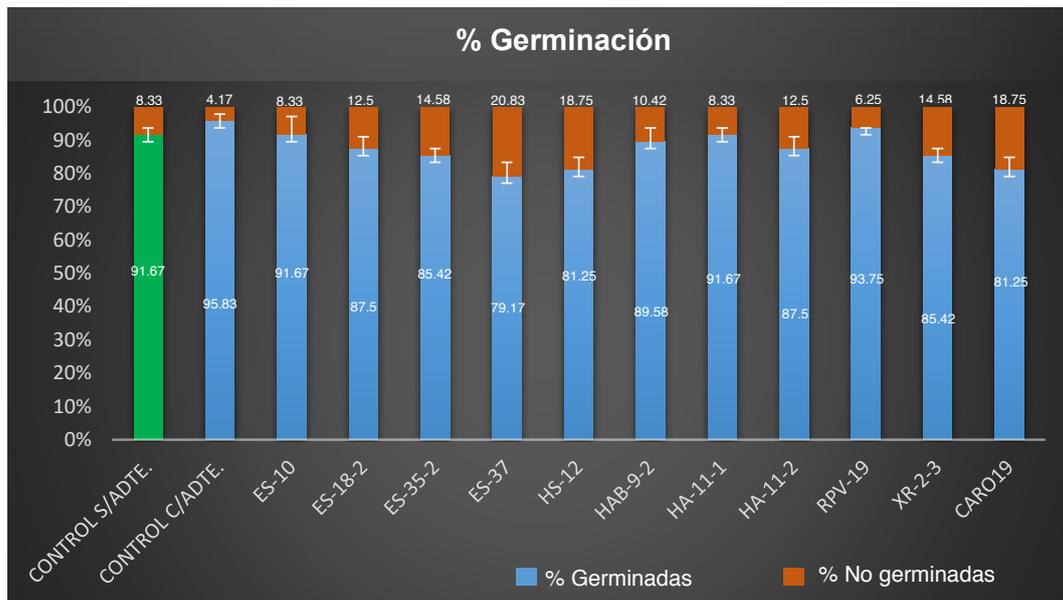
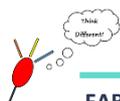


Figura 23. Gráfico de porcentaje de germinación de los aislados de *Metarhizium*. En verde se muestra el porcentaje de germinación del control con el que se hizo la comparación múltiple (semilla sin adherente). Análisis estadístico con prueba Kruskal-Wallis: $H(12, N=624)=20.75, p=0.0542; N=48$ por tratamiento.

5.5.2. Efecto de los aislados de *Metarhizium* sobre la longitud de la raíz de las plántulas de sorgo en un ambiente semicontrolado

Se analizó el efecto sobre la raíz de las plántulas de sorgo cuando estuvo en una interacción con los diferentes aislados de *Metarhizium*, ya que en este caso el sustrato (Peat Moss), es una condición totalmente diferente en comparación con el medio agar-agua bajo condiciones *in vitro*, el sustrato contiene diferentes nutrientes y brinda más espacio para el crecimiento.

Los datos en relación a la longitud de la raíz se muestran en la Figura 24. En la gráfica se observa que el resultado de las interacciones presentó poco aumento de la longitud de la raíz, en las plantas de sorgo que estuvieron en una interacción con los diferentes aislados de *Metarhizium*; los aislados HAB-9-2 y HA-11-1, presentaron una diferencia significativa hacia abajo respecto al tratamiento control (semillas con el adherente). La cepa de CARO19 de *M. brunneum* fue la que presentó mayor longitud de la raíz con un 111 % respecto al control, sin embargo este aumento no se afectó de manera significativa.





Sin embargo, es claro que existe un efecto en la longitud de la raíz de sorgo ejercido por el adherente (carboximetilcelulosa), ya que la longitud de las raíces del tratamiento de las semillas sin el adherente es un 40% menos que las del control (semilla con el adherente).

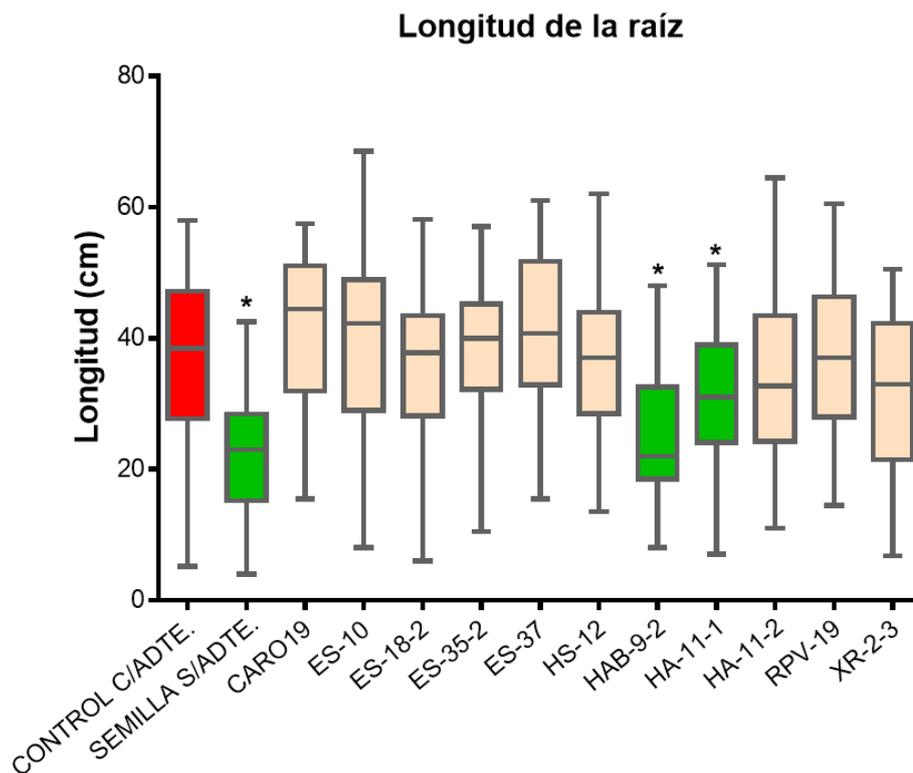
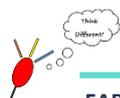


Figura 24. Gráfica de cajas y bigotes de longitud de raíz de plántulas de sorgo sembradas en ambiente semicontrolado. Análisis estadístico con prueba Kruskal-Wallis: $H(12, N=624)=107.8, p=0.0001$; $N=48$ por tratamiento. Los aislados con (*) presentan diferencias significativas respecto al control.

5.5.3. Efecto de los aislados de *Metarhizium* sobre la longitud total de la planta de sorgo en un ambiente semicontrolado

Un parámetro importante a considerar es la longitud total de la planta, especialmente el tejido aéreo, ya que es la parte que se observa en el cultivo y de la cual se obtiene el producto final. Los resultados obtenidos de la interacción se muestran en las gráficas (A) Longitud de la plántula y (B) Longitud total de la planta (plántula y raíz) de la Figura 25.



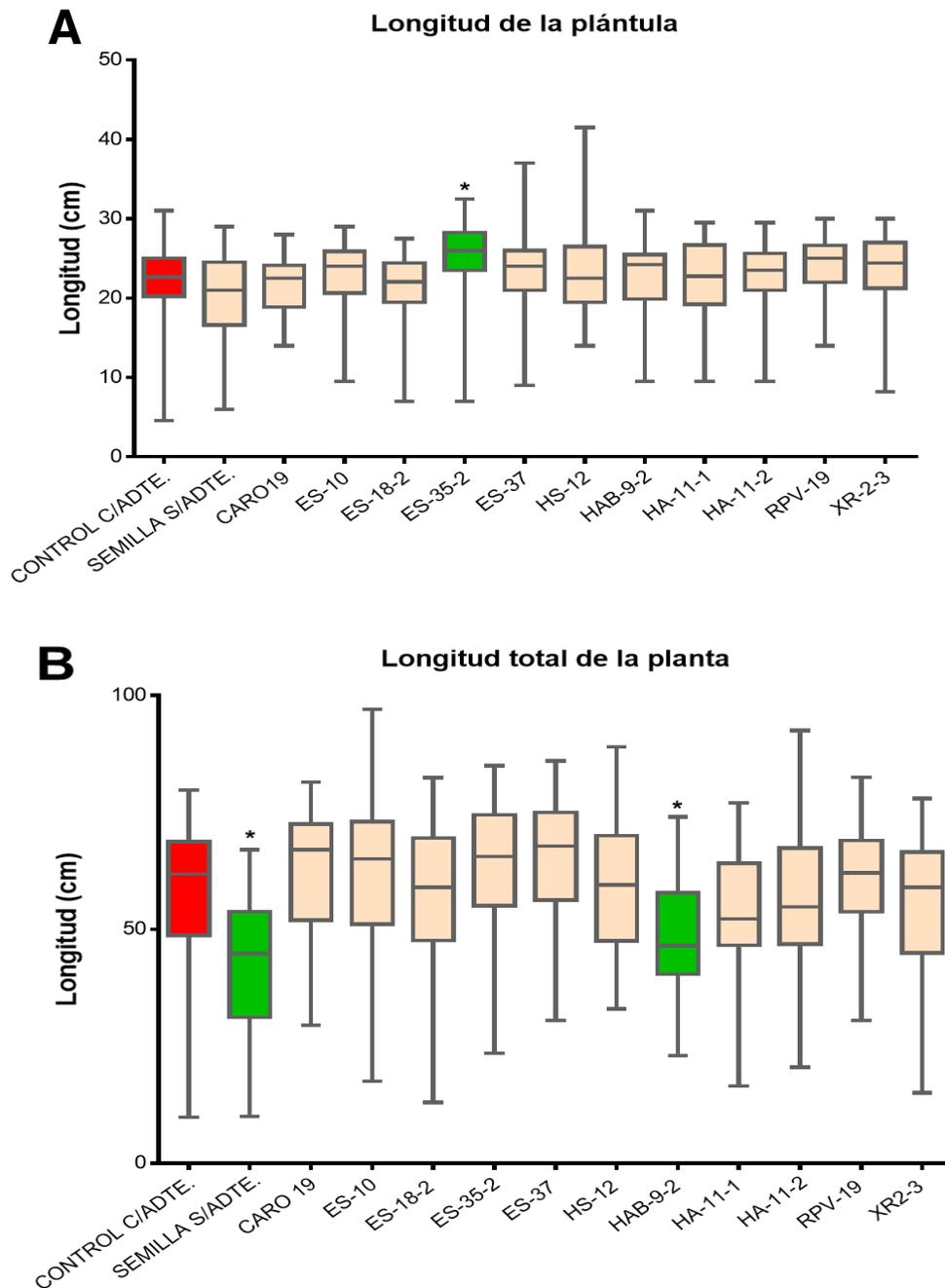
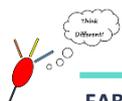


Figura 25. Gráficas de cajas y bigotes de longitud de la plántula de sorgo (A) y la longitud total de la planta (B), sembradas en ambiente semicontrolado. A) Análisis estadístico con Prueba Kruskal-Wallis H (12, N=624)=40.42, p=0.0001 y B) H (12, N=624)=89.76, P=0.0001. N=48 por tratamiento. Los aislados con (*) presentan diferencias significativas respecto al control.

Como crecimiento de la plántula, existe un aumento de longitud de 103 % a 113.44 % en plántulas que estuvieron en una interacción con los aislados de *Metarhizium* comparando estos datos respecto al control, existiendo diferencia





significativa únicamente en el aislado ES-35-2 que se muestra en la gráfica (A) de la Figura 25, aunque no existió diferencia significativa en el crecimiento de la longitud de la plántula con los demás aislados de *Metarhizium* probados, estos se encuentran parejo o por arriba del control.

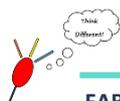
En la gráfica (B) de la Figura 25 se muestran los resultados obtenidos de la longitud total de la planta de sorgo (plántula y raíz), en el análisis estadístico que se realizó, se indica que existe una diferencia significativa hacía abajo en el aislado HAB-9-2 y en el tratamiento con las semillas sin el adherente.

Los resultados obtenidos del crecimiento de la longitud de las plantas de sorgo cuando se encuentran en interacción con los diferentes aislados de *Metarhizium*, nos indican que la longitud de la planta no se ve afectada de manera significativa; sin embargo, su longitud no se encuentra por debajo del tratamiento control (semilla con el adherente).

5.5.4. Efecto de los aislados de *Metarhizium* sobre el peso seco de la planta de sorgo en un ambiente semicontrolado

Un aspecto muy importante a evaluar es la cantidad de biomasa producida, debido que dependiendo de la cantidad de la misma se obtiene el alimento para el ganado (forraje).

En la gráfica de la Figura 26 se muestra que el aislado HA-11-2 de *M. guizhouense* fue el que mayor peso seco mostró, teniendo una diferencia significativa con un 166.57 % más de peso seco respecto al control. Los aislados HA-11-1, HS-12 y ES-35-2 presentaron también una diferencia significativa, la biomasa total producida por la planta de sorgo en una interacción con dichos aislados se encuentra entre 148.86% a 155.14% mayor que el control; aunque la cepa CARO19 no tuvo una diferencia significativa, esta presentó un 116.97 % de producción de biomasa más que el tratamiento control.



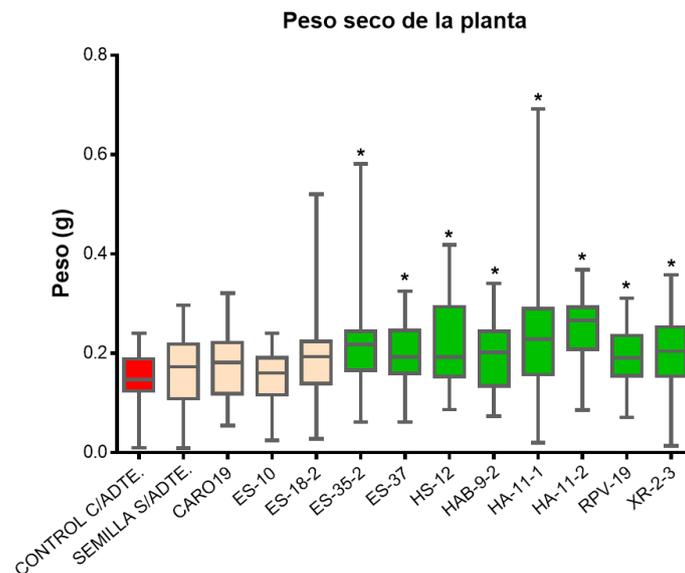


Figura 26. Gráficas de cajas y bigotes del peso seco de las plántulas de sorgo sembradas en ambiente semicontrolado. Análisis estadístico con Prueba Kruskal-Wallis: $H(12, N=624)=78.34, p=0.0001$; $N=48$ por tratamiento. Los aislados con (*) presentan diferencias significativas respecto al control.

Los resultados obtenidos del crecimiento de peso seco de las plantas de sorgo cuando se encuentran en interacción con los diferentes aislados de *Metarhizium*, nos indican que la planta se ve afectada de alguna manera positivamente por *Metarhizium*, y que este efecto varía entre los aislados probados, comparándolo con el tratamiento control.

5.6. Antagonismo de los aislados de *Metarhizium* a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en cultivo dual.

El uso de fungicidas ha sido la principal estrategia de control adoptada contra las enfermedades en las plantas. Sin embargo, esta estrategia no es completamente eficaz en la prevención de las enfermedades, ya que existen numerosos riesgos ambientales, resistencia a los mismos, costos de producción y problemas de toxicidad asociados con los agroquímicos. En este contexto el control biológico representa una alternativa eficaz para el manejo de enfermedades de plantas de importancia agrícola, que se basa en la capacidad de un organismo para inhibir el crecimiento de otro, en este caso un fitopatógeno (Whipps y Lumsden, 2001).





En el suelo existen diversos microorganismos con capacidad antagonista hacia fitopatógenos, uno de los más estudiado es el hongo *Trichoderma*; también existen reportes de especies de *Metarhizium* que han demostrado previamente actuar como antagonistas contra *Fusarium oxysporum* (Kang *et al.*, 1996) y *Fusarium solani* (Sasan y Bidochka, 2013). Por todo lo anterior en el presente trabajo se evaluó, bajo condiciones *in vitro*, la actividad antagonista de los 44 aislados obtenidos, así como de 7 aislados adicionales mencionados previamente en el apartado de material y métodos (SR19, XR2-3, LCP13, CARO4, CARO19, ARSEF7486 de *M. acridum* y ARSEF2575 de *M. robertsii*) sobre una cepa de *Fusarium oxysporum*.

En una interacción de ambos hongos durante 16 días (tiempo que tarda *F. oxysporum* en cubrir toda la placa (Figura 27)), bajo condiciones de fotoperiodo (16 horas luz/8 horas oscuridad) y oscuridad total, se realizaron ensayos con 51 aislados de *Metarhizium*, se realizaron 6 repeticiones del ensayo. Los resultados muestran que 12 de éstos afectan el crecimiento del fitopatógeno bajo condiciones de fotoperiodo, mismo que se observa mediante la formación de una barrera de separación (zona de inhibición) entre la colonia de *Metarhizium* y la de *F. oxysporum* (Figura 28).

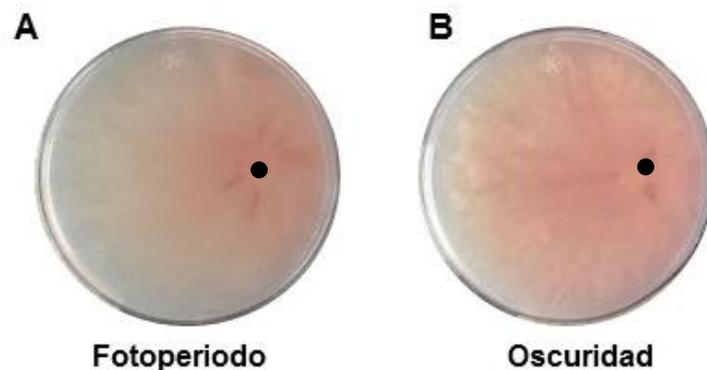


Figura 27. Crecimiento de *Fusarium oxysporum* en condiciones de fotoperiodo y oscuridad total (16 días de incubación). Área total de la placa= 50.26 cm²; el círculo negro indica donde fue inoculado el hongo.

La Figura 28 muestra las imágenes más representativas de algunos de los aislados de *Metarhizium* en confrontación con *F. oxysporum* bajo condiciones de



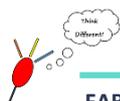


fotoperiodo, en donde se agrupan los 3 aislados que presentaron un mayor efecto antagónico hacia *F. oxysporum*: HAB-9-2, HA-11-1 y HA-11-2, así como 3 de los aislados que no mostraron el mismo efecto hacia este fitopatógeno.

Se observa que entre los aislados HAB-9-2, HA-11-1 y *F. oxysporum* en una interacción de 16 días se forma una zona de inhibición entre las colonias, en donde no existe una interacción de las hifas por parte de ninguno de los dos hongos; a diferencia de los aislados ES-8-2, ES-18-1 y la cepa de *M. acridum* (ARSEF-7486), en donde se observa claramente la interacción entre ambas colonias. El número de estrellas rojas en las figuras indican el mejor aislado (3), (2) y (1) bajo cada condición.

El aislado HA-11-2 bajo condiciones de fotoperiodo, en una confrontación con el fitopatógeno presentó poca interacción entre las hifas de ambos hongos; sin embargo, este aislado mostró ser uno de los tres mejores aislados bajo esta condición.

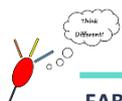
Se determinó el área promedio (de las 6 repeticiones) ocupada por la barrera de inhibición que se formó entre los aislados de *Metarhizium* y *F. oxysporum*. En la Figura 29 se indican los datos obtenidos del área promedio ocupada por esta zona de inhibición, bajo condiciones de fotoperiodo para los 12 aislados de *Metarhizium* que presentaron este efecto. Bajo estas condiciones el aislado HAB-9-2 fue el que presentó una barrera de separación mayor (casi 4 cm²) como se indica en la Figura 29 (barra verde).





| Aislado | Control (<i>Metarhizium</i>) | Confrontación | Acercamiento |
|--------------------------------|-----------------------------------|---------------|--------------|
| HAB-9-2 ★★★ | | | |
| HA-11-1 ★★ | | | |
| HA-11-2 ★ | | | |
| ES-8-2 | | | |
| ES-18-1 | | | |
| ARSEF7486 <i>M. acridum</i> | | | |

Figura 28. Ensayos de cultivo dual en placa de algunos aislados de *Metarhizium* y *F. oxysporum* a los 16 días de interacción bajo condiciones de fotoperiodo. (★★★), (★★), (★): Aislados que mostraron mayor efecto antagonico hacia *F. oxysporum*.



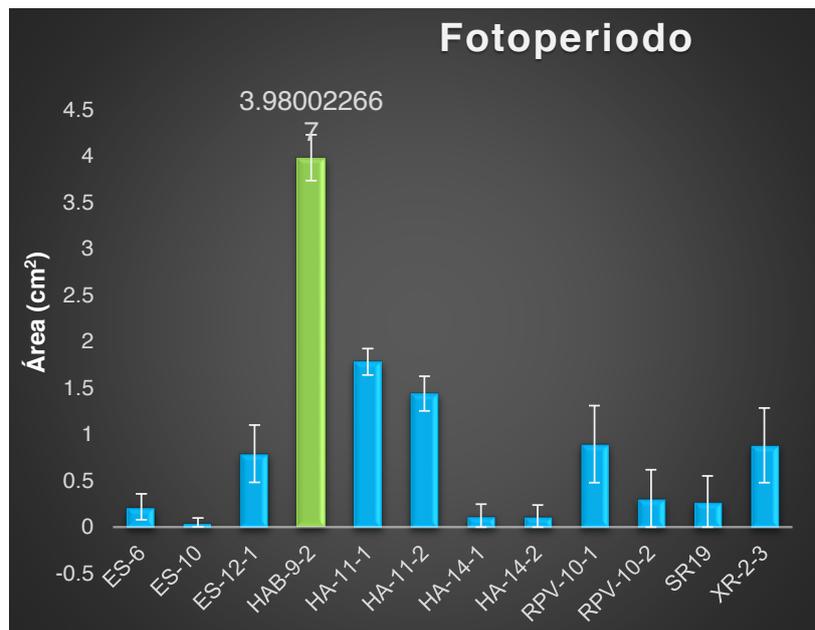


Figura 29. Promedio del área ocupada por la zona de inhibición (halo) que se forma entre los aislados de *Metarhizium* y *F. oxysporum* en condiciones de fotoperiodo.

Bajo condiciones de oscuridad total a diferencia de fotoperiodo, de los 51 aislados que se probaron contra *F. oxysporum*, en 39 de ellos se observó que se formó una zona de inhibición de crecimiento cuando se encontraban en interacción con el hongo fitopatógeno. En la Figura 30 se presentan los 3 aislados de *Metarhizium* resaltados con las estrellas rojas, los cuales son los mismos tres aislados que mejor efecto antagónico presentaron bajo condiciones de fotoperiodo, se observa claramente en la zona de acercamiento que no hubo contacto entre las hifas de ambos hongos en estos tres aislados.

Las zonas de inhibición que se formaron en la interacción bajo condiciones de oscuridad total ocuparon un área mucho mayor en la placa que las que se formaron en condiciones de fotoperiodo (Figura 31). Bajo condiciones de oscuridad constante el aislado HA-11-2 fue el que formó una barrera de separación mayor, ocupando un área promedio en la placa de 7.19 cm² (barra verde, Figura 31), seguido del aislado HA-11-1 (5.6 cm²), después el HAB-9-2 (4.3 cm²); los demás aislados mostraron un área ocupada por esta zona de inhibición menor a 4 cm².





| Aislado | Control (<i>Metarhizium</i>) | Confrontación | Acercamiento |
|------------------------------------|--------------------------------|---------------|--------------|
| HA-11-2 ★★★ | | | |
| HA-11-1 ★★ | | | |
| HAB-9-2 ★ | | | |
| ES-8-2 | | | |
| ES-18-1 | | | |
| ARSEF7486 (<i>M. acridum</i>) | | | |

Figura 30. Ensayos de cultivo dual en placa de algunos aislados de *Metarhizium* y *F. oxysporum* a los 16 días de interacción bajo condiciones de oscuridad total. (★★★), (★★), (★): Aislados que mostraron mayor efecto antagónico hacia *F. oxysporum*.

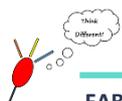




Figura 31. Promedio del área ocupada por la zona de inhibición (halo) que se forma entre los aislados de *Metarhizium* y *F. oxysporum* en condiciones de oscuridad total.

En condiciones de oscuridad total es más evidente y pronunciada la formación de una zona libre de crecimiento, lo cual es importante ya que la interacción de estos organismos se lleva a cabo en el suelo.

Las placas se mantuvieron por 30 días después de la interacción a una temperatura de 4°C y en ninguna de ellas se observó que el hongo fitopatógeno siguiera colonizando, por lo que se sugiere que *Metarhizium* (principalmente estos tres aislados HA-11-2, HA-11-1 y HAB-9-2) actúa como un antagonista de crecimiento de *F. oxysporum*.

Se determinó también el área ocupada por *F. oxysporum* y *Metarhizium* cuando estos se encontraban en una interacción uno con el otro, con la finalidad de determinar si existen diferencias significativas en la reducción del área del fitopatógeno cuando este se encuentra enfrentado con *Metarhizium* respecto a cuándo crece axénicamente, y viceversa cuando *Metarhizium* se encuentra enfrentado con *F. oxysporum*.

Los resultados del área ocupada por el fitopatógeno, cuando este se encuentra en confrontación con los diferentes aislados de *Metarhizium* se indican la Figura 32.



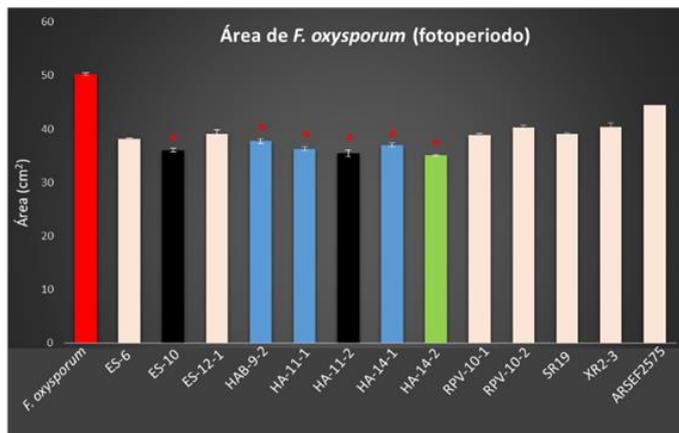
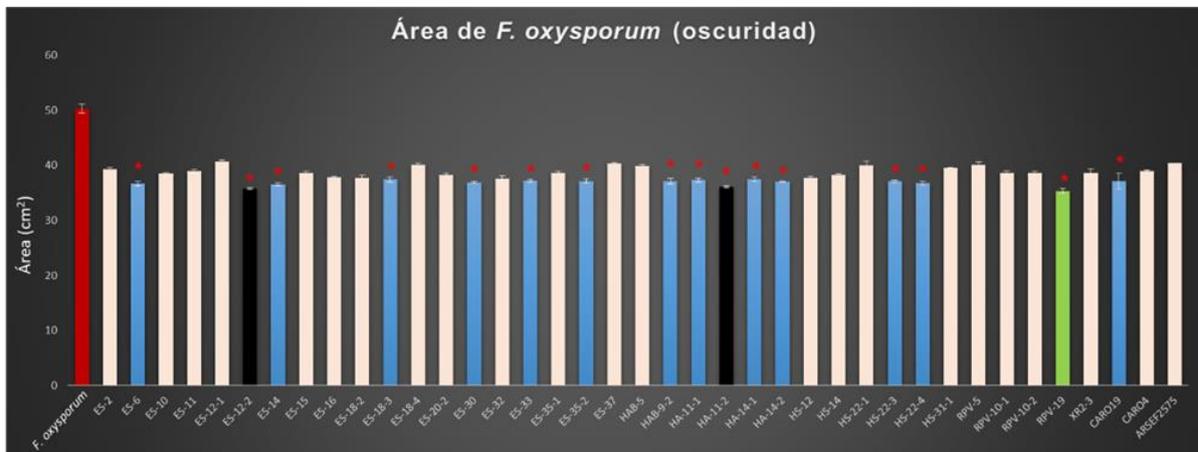
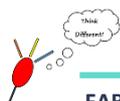
**A****B**

Figura 32. Área ocupada por *F. oxysporum* en un enfrentamiento (cultivo dual en placa) con los diferentes aislados de *Metarhizium*. A) Análisis estadístico con Prueba Kruskal-Wallis: $H(13, N=84)=64.15, p=0.0001$; B) prueba Kruskal-Wallis: $H(39, N=240)=168.4, p=0.0001$. $N=6$ repeticiones por tratamiento. Los aislados con (*) presentan diferencias significativas respecto al control.

En la gráfica A de la Figura 32 se presenta el área ocupada por *F. oxysporum* en un enfrentamiento con los aislados de *Metarhizium* bajo condiciones de fotoperiodo, se observa que en 6 de los aislados que formaron una zona de inhibición de crecimiento entre las colonias, también existe una reducción significativa del área ocupada por el fitopatógeno. Cuando el fitopatógeno se encontró creciendo con el aislado HA-14-2 (barra verde) fue en donde *F. oxysporum* ocupó un área menor (35 cm^2) con diferencia significativa respecto al control (barra roja), seguida de los aislados HA-11-2 y ES-10 con un área de 35.43 cm^2 y 36 cm^2 respectivamente (barras negras).





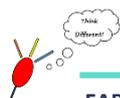
En relación a estos resultados bajo estas condiciones (fotoperiodo), si se correlacionan con el área ocupada por la zona de inhibición formada entre las colonias, los aislados HA-14-2 y ES-10 presentaron un área de esta zona mucho menor en comparación con el aislado HA-11-2 (ver Figura 29).

En la gráfica B de la Figura 32 se presenta el área ocupada por *F. oxysporum* en un enfrentamiento con *Metarhizium* bajo condiciones de oscuridad, en donde 16 de los aislados de *Metarhizium* lograron que el área del fitopatógeno se redujera significativamente en comparación con el tratamiento control (barra roja).

Bajo estas condiciones de oscuridad, cuando *F. oxysporum* se encontró creciendo junto con el aislado RPV-19 (barra verde) fue en donde ocupó un área menor con 35.32 cm² teniendo diferencia significativa respecto al control, siguiendo los aislados ES-12-2 y HA-11-2 con 35.79 cm² y 36 cm² respectivamente (barras negras). De igual manera si se compara el área ocupada por la zona de inhibición que se formó entre *F. oxysporum* y los aislados de *Metarhizium* RPV-19 y ES-12-2 en comparación con la que se formó con el aislado HA-11-2, esta es mucho menor que la que se forma con él HA-11-2 (ver Figura 31).

Estos resultados son importantes, ya que nos indican que los tres aislados de *Metarhizium* (HA-11-2, HA-11-1 y HAB-9-2) en los que se presentó la mayor formación de la zona de inhibición de crecimiento entre las colonias de estos y la del fitopatógeno, también muestran que existe además una reducción significativa en el área que abarca el fitopatógeno.

En relación al área que ocuparon los aislados de *Metarhizium*, cuando se encontraron en un enfrentamiento con *F. oxysporum*, se observó que existe una diferencia significativa en la reducción de su área cuando se encuentra creciendo con el fitopatógeno en comparación a cuando *Metarhizium* crece axénicamente (Figura 33). Esto aparentemente es debido a la velocidad de crecimiento de *F. oxysporum* que es mayor que la de *Metarhizium*; ya que ambos hongos se inocularon al mismo tiempo y con igual concentración de conidios.



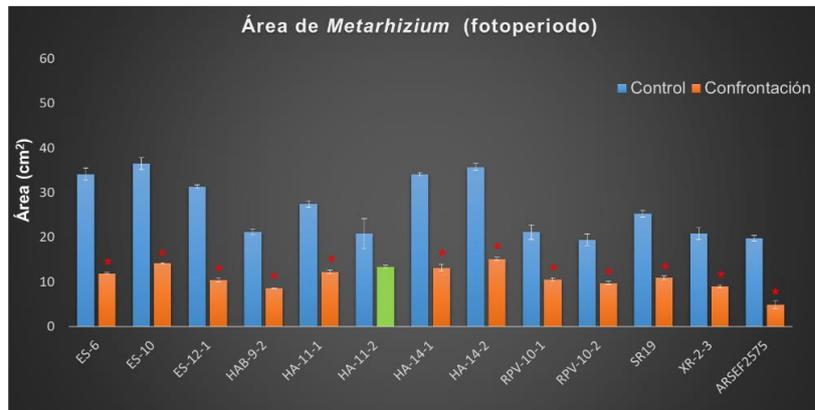
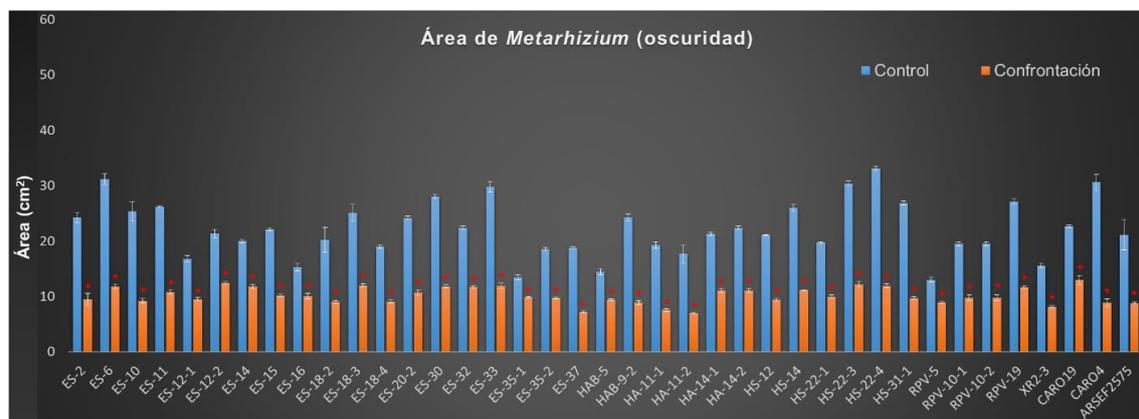
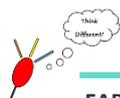
**A****B**

Figura 33. Área ocupada por *Metarhizium* en un enfrentamiento (cultivo dual en placa) con *F. oxysporum*. A) Análisis estadístico con Prueba Kruskal-Wallis: H (25, N=156), $p < 0.05$; B) prueba Kruskal-Wallis: H (77, N=468), $p < 0.05$. N= 6 repeticiones por tratamiento. Los aislados con (*) presentan diferencias significativas respecto al control.

Tanto bajo condiciones de fotoperiodo como de oscuridad total, todos los aislados de *Metarhizium* redujeron su área cuando se encontraron en una confrontación con el fitopatógeno; sin embargo, el aislado HA-11-2 de *M. guizhouense* no presentó una reducción significativa del tamaño de su colonia cuando se encontró creciendo con el fitopatógeno a cuando creció axénicamente (bajo condiciones de fotoperiodo) (Figura 33 A, barra verde).

Estos resultados, en conjunto indican que existe un antagonismo por parte de ambos hongos ya que el área de la colonia de ambos se ve afectada cuando estos crecen de manera dual.

En este trabajo, se seleccionaron y se tomaron en cuenta para experimentos posteriores, los aislados en los cuales se observó una zona libre de crecimiento





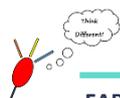
entre las colonias, como ya se ha reportado en otros estudios en donde se evalúa la capacidad antagónica y se observa la formación de dicha zona (Sasan y Bidochka, 2013; Yun *et al.*, 2017).

5.7. Efecto de los metabolitos excretados por *Metarhizium* sobre *F. oxysporum*

Con los ensayos de confrontación mediante la técnica de cultivo dual, se observó la formación de una zona de inhibición de crecimiento entre las colonias en algunos de los aislados, principalmente en condiciones de oscuridad constante; sin embargo, al encontrarse ambos hongos creciendo juntos los dos pueden activar mecanismos para defenderse uno del otro. Con el objetivo de evaluar más a detalle este efecto antagónico mostrado por parte de *Metarhizium*, se llevaron a cabo ensayos para probar el efecto de los metabolitos difusibles al medio por *Metarhizium*. El procedimiento seguido para llevar a cabo este ensayo se indica en la sección de materiales y métodos.

En la Figura 34 se muestran fotografías de las placas donde se cultivó *F. oxysporum* a los 14 días de ser expuesto a los metabolitos de cada uno de los aislados de *Metarhizium* (se realizó un quintuplicado por cada experimento individual). Se observó que el crecimiento del fitopatógeno fue reducido, cuando este se cultivó en el medio donde *Metarhizium* había sido crecido previamente, principalmente en los aislados HA-11-1 con un área de 2.1 cm² y HA-11-2 con 2.6 cm² (Figura 35), esto se comparó con el control (*F. oxysporum*), el cual después de retirado el papel celofán se inoculó nuevamente y presentó un área de crecimiento de 44.56 cm². Se observa que en las placas donde anteriormente crecieron los aislados ES-8-2 y ES-11, se obtuvo un mayor desarrollo del fitopatógeno en comparación con los 2 antes mencionados. Estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos en los ensayos de confrontación dual en placa; donde en los aislados que se observó una zona de inhibición mayor, mostraron una repercusión mayor en el desarrollo del fitopatógeno, en comparación con los aislados que no presentaron esta zona de inhibición de crecimiento en la placa.

Esto sugiere que los metabolitos excretados al medio por parte de *Metarhizium* inhiben el crecimiento de *F. oxysporum*, ya que existe una diferencia de





crecimiento en comparación con el tratamiento control (medio donde se creció *F. oxysporum*, se retiró el celofán y se inoculó nuevamente *F. oxysporum*).

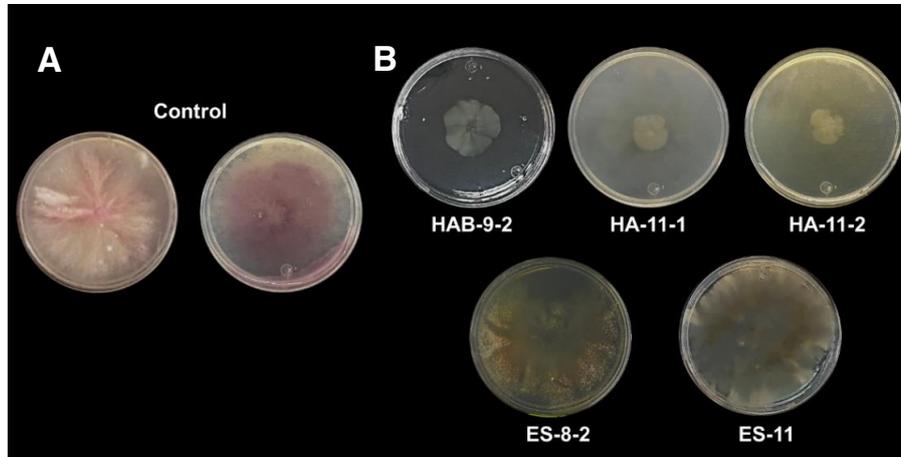


Figura 34. Efecto producido por los metabolitos solubles excretados al medio por *Metarhizium* sobre el fitopatógeno *F. oxysporum*. A) Control de *F. oxysporum*, a la izquierda se muestra el desarrollo del hongo a los 14 días (sobre el celofán); a la derecha se muestra el desarrollo del hongo 14 días después de retirado el celofán con el micelio. B) Desarrollo de *F. oxysporum* a los 14 días de ser expuesto a los metabolitos de cada uno de los aislados de *Metarhizium*.

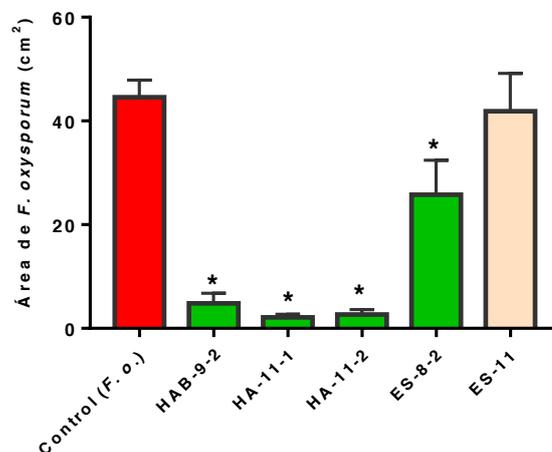
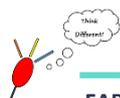


Figura 35. Área ocupada por *F. oxysporum* en los bioensayos con papel celofán. Eje de las Y (área en cm² ocupada por *F. oxysporum*), eje de las X (medios donde se inoculó el fitopatógeno, donde anteriormente se crecieron cada uno de los aislados de *Metarhizium*). Análisis estadístico con Prueba Kruskal-Wallis: $H(5, N=30)=25.91$. $N=5$ repeticiones por experimento. El * indica diferencia significativa respecto al control con un valor de $p=0.0001$ (HA-11-1 y HA-11-2) y $p=0.0079$ (HAB-9-2 y ES-8-2).





Este experimento también fue realizado a la inversa, es decir que primeramente se inoculó sobre el papel celofán *F. oxysporum* y a los 14 días se retiró el papel celofán con el micelio del fitopatógeno, para posteriormente cultivar los aislados de *Metarhizium* sobre estos medios; sin embargo, se observó que en la mayoría de las placas de donde se había retirado el celofán, *F. oxysporum* logró traspasar el celofán y se observó crecimiento en las placas de cultivo.

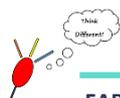
5.8. Efecto del antagonismo de *Metarhizium* hacia *F. oxysporum* in vitro e in planta (*Sorghum bicolor*)

Una vez que comprobamos que varios de los aislados de *Metarhizium* presentaban un efecto de inhibición de crecimiento hacia el fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en una interacción dual en placa, se planteó evaluar si este mismo efecto se presenta, pero ahora en una interacción con planta. Para esto se procedió a realizar una interacción tripartita entre la planta de sorgo - *Metarhizium* – *Fusarium oxysporum*.

El aislado de *Metarhizium* que se utilizó para llevar a cabo esta interacción fue el aislado HA-11-2 de *M. guizhouense*, ya que fue el que mostró un efecto antagónico mayor, donde la zona libre de crecimiento llegó a ocupar un área de 7.19 cm², en condiciones de oscuridad total. La metodología que se siguió para realizar este experimento y los tratamientos que se utilizaron se describe en la sección de materiales y métodos.

Transcurrido el tiempo de incubación de las placas (21 días) de cada uno de los tratamientos los resultados fueron los siguientes:

Se presentó el mismo efecto mostrado en los ensayos de confrontación dual por parte del aislado HA-11-2 (*M. guizhouense*), en la Figura 36 A se puede observar que en el tratamiento en donde únicamente fue inoculado *F. oxysporum* se muestra cómo este fitopatógeno logra colonizar la planta de sorgo (en 3 plantas de las cuatro que se evaluaron) a diferencia de lo que se observa en el tratamiento en el cual se inocularon ambos hongos (*F. oxysporum* – *Metarhizium guizhouense*: HA-11-2) (Figura 36 B) en donde no se observó que el fitopatógeno colonizara la planta como sucede en el tratamiento control (Figura 36 C). Con respecto al tratamiento en el cual únicamente se inoculó a la raíz de la planta





con *Metarhizium guizhouense* (HA-11-2) (Figura 36 D), se observó que se presentó mayor producción de raíces secundarias lo cual ya ha sido reportado en otros estudios (Herrera Gutiérrez, 2016). Estos resultados sugieren que *Metarhizium* actúa como un inhibidor de crecimiento de *F. oxysporum*.

Por lo anterior, se realizó también una interacción tripartita (sorgo- *F. oxysporum* – *Metarhizium guizhouense*: HA-11-2) con los mismos tratamientos mencionados anteriormente, pero esta se llevó a cabo en condiciones semicontroladas (invernadero), la interacción se dejó incubando un periodo de tiempo de 30 días y la metodología que se siguió se menciona en el apartado de material y métodos. Para este caso únicamente se tomaron datos de un solo parámetro (peso seco total de la planta), ya que una vez concluida la interacción no se presentaron diferencias a simple vista con respecto a la longitud de raíz y tamaño de la plántula, como se puede observar en la Figura 37; además de que fue el único parámetro que se alteró significativamente en los experimentos realizados previamente (interacción de los aislados de *Metarhizium* con la planta de sorgo).

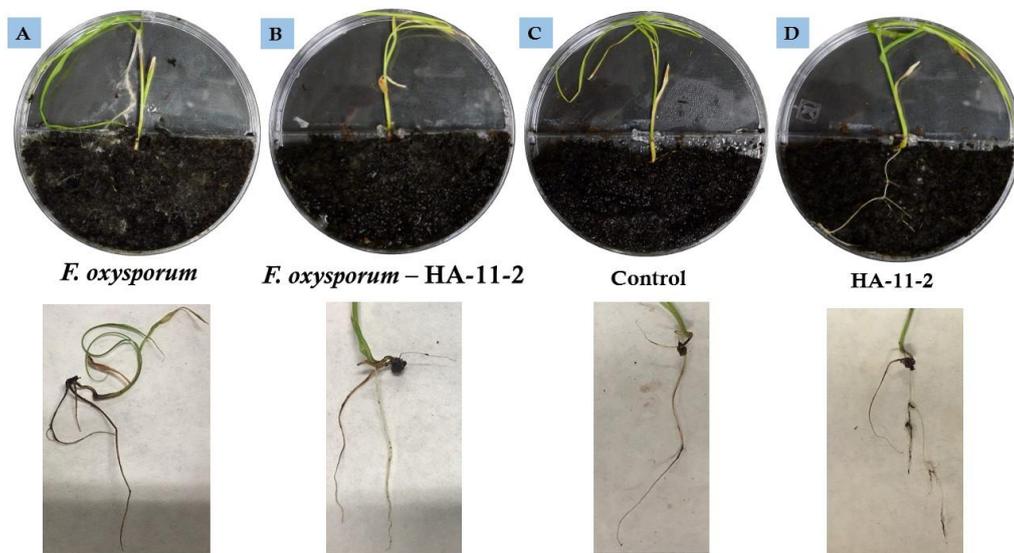


Figura 36. Interacción tripartita (*Sorghum bicolor* – *Metarhizium* – *Fusarium*). A) Tratamiento en donde se inoculó únicamente *F. oxysporum* a la raíz; B) Tratamiento en donde se inocularon ambos hongos a la raíz (*F. oxysporum* – *M. guizhouense*: HA-11-2); C) Tratamiento control; D) Tratamiento en donde se inoculó únicamente *M. guizhouense* (HA-11-2).

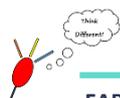
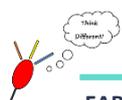




Figura 37. Imagen representativa de plantas de sorgo en una interacción tripartita bajo condiciones semicontroladas (invernadero).

Para este ensayo se sembraron 16 semillas por maceta (se utilizaron 3 macetas por tratamiento), no todas las semillas germinaron, pero no existió diferencia respecto al control en relación a la germinación, por lo que se analizaron los datos en promedio del peso seco. Se realizó una comparación múltiple mediante un ANOVA ordinario de una vía del peso seco total de la planta de los 3 tratamientos con el tratamiento control, y los resultados se indican en la gráfica de la Figura 38; el peso seco de las plantas que se encontraban en una interacción únicamente con el hongo fitopatógeno *F. oxysporum* presentó diferencia significativa respecto al tratamiento control, con un promedio de peso seco de 0.135 g.

Se observa también, que los tratamientos en donde se inoculó únicamente el aislado HA-11-2 y el tratamiento en donde se inocularon ambos hongos (HA-11-2 y *F. oxysporum*), no presentaron una diferencia significativa cuando estos se compararon con el tratamiento control. Lo que indica que *Metarhizium* está ejerciendo un efecto protector sobre la planta.



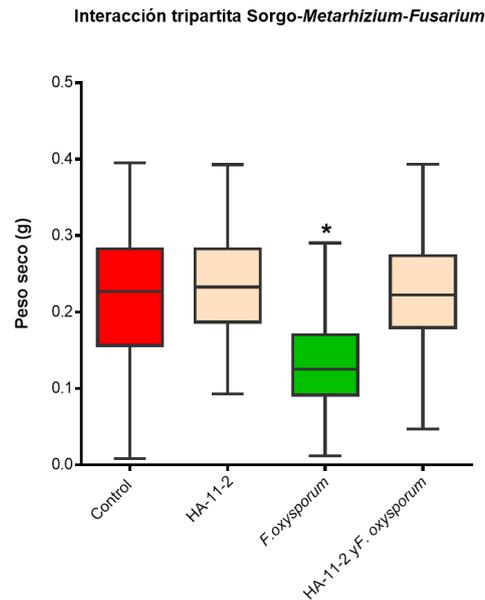
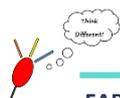


Figura 38. Gráfica de cajas y bigotes del peso seco total de las plantas de sorgo sembradas en un ambiente semicontrolado (interacción tripartita). Análisis estadístico con prueba (ANOVA de una vía) $p=0.0001$. $N= 48$ (por tratamiento). El (*) indica diferencia significativa respecto al control.

5.9. Efecto del antagonismo de *Metarhizium* hacia *F. oxysporum* in planta (*Solanum lycopersicum*)

Dado los resultados obtenidos en los experimentos anteriores, se decidió realizar una interacción tripartita empleando en este caso la planta de tomate (*Solanum lycopersicum*) y el aislado HA-11-2; con la finalidad de conocer los efectos producidos por la cepa de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* en dicha planta cuando se encuentra en interacción con *Metarhizium* y la planta, ya que esta reportado que este fitopatógeno causa una de las enfermedades (marchitez vascular) de mayor importancia para este cultivo (Marlatt *et al.*, 1996; Hernández *et al.*, 2014).

Los tratamientos con los que se trabajo fueron los siguientes: 1) control (unicamente las plantas de tomate), 2) HA-11-2 *M. guizhouense* (las raices de las plantas de tomate fueron inoculadas con 1000 μL de una solución de 1×10^7 conidios/mL), 3) HA-11-2 y *F. oxysporum* (las raices de las plantas de tomate fueron inoculadas con 1000 μL de una solución de 1×10^7 conidios/mL de ambos hongos) y 4) *F. oxysporum* (las raices de las plantas de tomate fueron inoculadas con 1000 μL de una solución de 1×10^7 conidios/mL). El procedimiento que se





siguió para realizar este ensayo durante un periodo de tiempo de 50 días, se describe en la sección de materiales y métodos.

Al concluir el periodo de incubación de esta interacción, las plantas de tomate no mostraron efectos aparentes por parte del fitopatógeno como son colonización a la planta o pudrición de raíz; lo que se observó fue que las plantas que se encontraron en interacción con *F. oxysporum* mostraron un leve marchitamiento en sus hojas (Figura 39 A); no en todas las plantas de este tratamiento se presentó este efecto. Se tomaron datos de la longitud tanto de raíz como de la plántula; además del peso seco, esto para cada uno de los tratamientos.

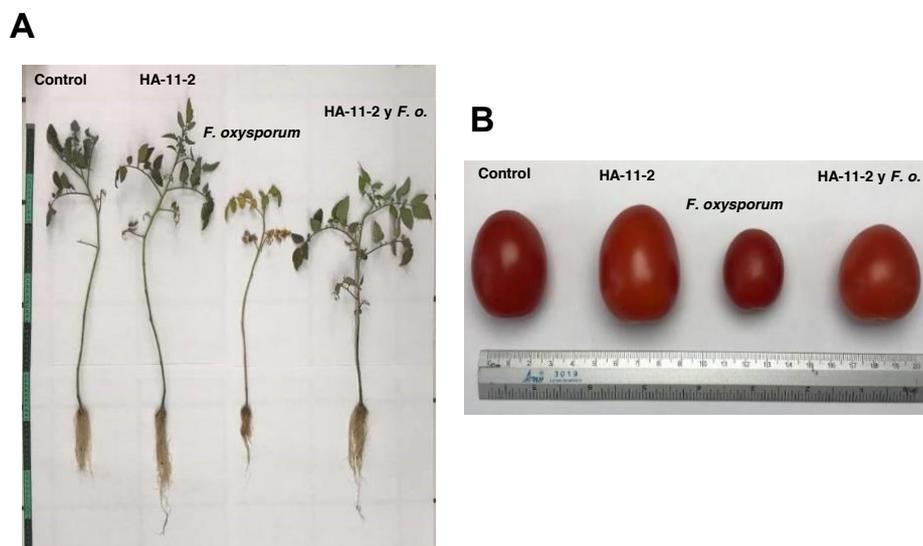
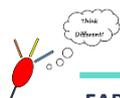


Figura 39. Imagen representativa de plantas de tomate en una interacción tripartita bajo condiciones semicontroladas (invernadero). A) Comparación de tamaño de las plántulas; **B)** Comparación de tamaño del fruto.

Los análisis estadístico (comparación múltiple mediante la prueba de Kruskal-Wallis) de los datos tomados con relación a estos parámetros arrojaron que no existió una diferencia significativa en longitud en ninguno de los tratamientos cuando estos se compararon con el tratamiento control (Figura 40).

Únicamente en la longitud de la raíz, las raíces de las plantas de tomate que se encontraban en interacción con el aislado de *Metarhizium* (HA-11-2) fueron las que presentaron mayor longitud, y según el análisis estadístico existe diferencia





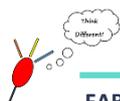
significativa con un valor de $p=0.0087$ (caja verde, Figura 40 B).

Sin embargo, aunque no se observó que el fitopatógeno afectara de manera negativa el crecimiento de la planta (longitud de la planta), se analizaron también los datos respecto al peso seco por separado: peso seco de la plántula, peso seco de la raíz, peso seco total de la planta y peso del tomate.

Los resultados del análisis de estos datos mediante la prueba de Kruskal-Wallis, indicaron que el peso seco de las plantas de tomate, las cuales fueron tratadas únicamente con *F. oxysporum* se vio significativamente reducido en comparación con el tratamiento control (Figura 40 D-F). La reducción del peso seco de la plántula fue significativo con un valor de $p=0.0097$, para la raíz con un valor de $p=0.0002$, para el peso seco total de la planta con un valor de $p=0.0042$. También se obtuvo un menor peso del fruto de tomate en las plantas tratadas con el fitopatógeno, existiendo una diferencia significativa con un valor de $p=0.0473$ (Figura 40 G).

El tamaño del fruto fue claramente apreciable (Figura 39 B), el tratamiento con mayor cantidad de frutos obtenidos en el periodo de tiempo antes mencionado fue el tratamiento control, donde de 15 plántulas de tomate se obtuvieron 10 frutos, siguiendo los tratamientos HA-11-2 y *F. oxysporum* – HA-11-2 con 8 y 7 frutos respectivamente, finalmente el tratamiento en el cual se inoculó únicamente el fitopatógeno con 5 frutos; los cuales presentaron un tamaño menor como se aprecia en la figura.

Estos resultados indican que *F. oxysporum* está afectando negativamente a la planta de tomate, y que al estar *Metarhizium* presente en la interacción del fitopatógeno con la planta este efecto negativo, en la reducción del peso seco de la planta es compensado; sugiriendo que el aislado de *Metarhizium* está ejerciendo un efecto protector hacia la planta.



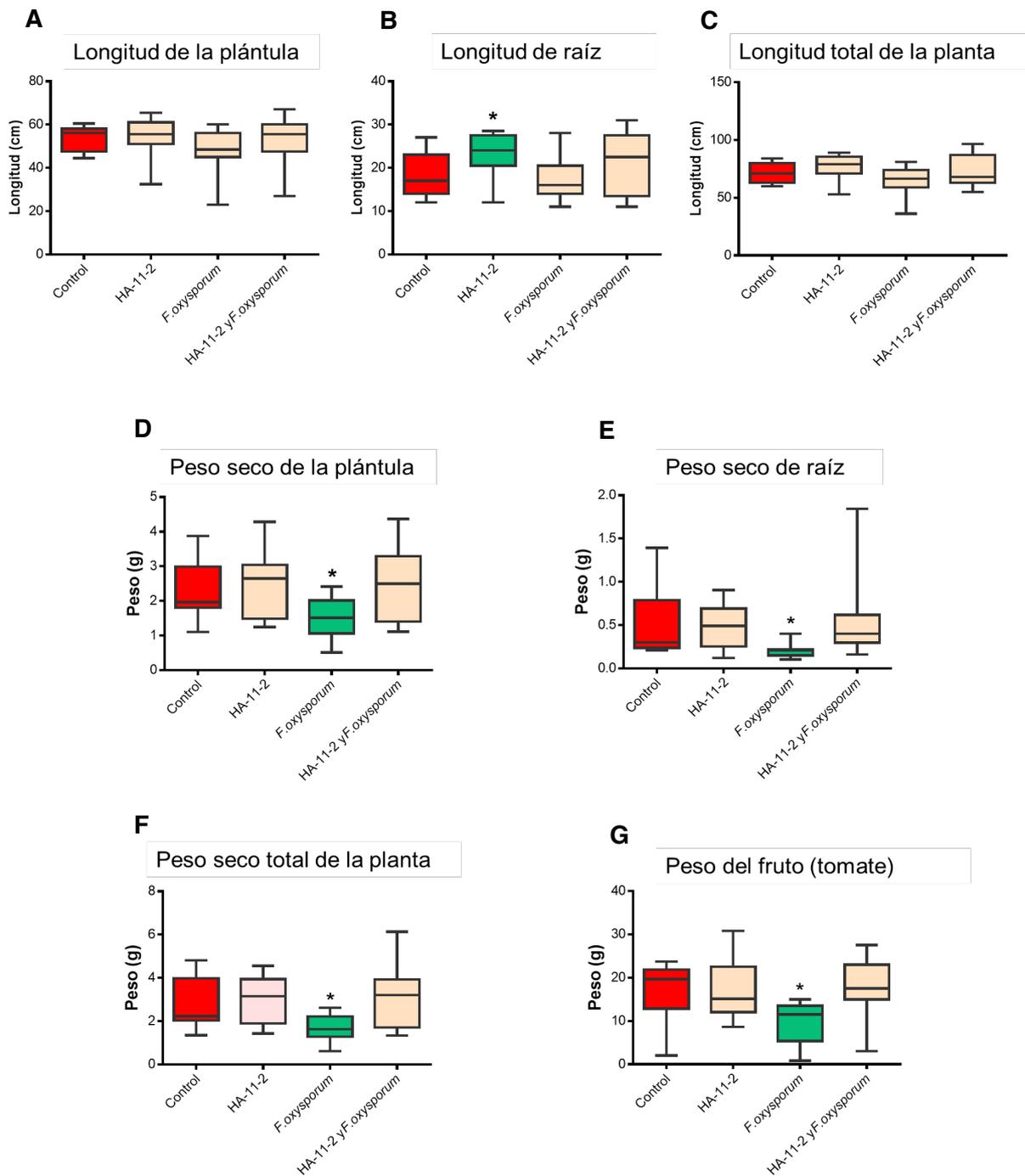
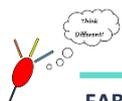


Figura 40. Gráficas de cajas y bigotes de los diferentes parámetros evaluados de la planta de tomate que se encontró en una interacción tripartita bajo condiciones de invernadero. Análisis estadístico con Prueba Kruskal-Wallis; N= 15 plántulas por tratamiento. El (*) indica diferencia significativa respecto al control, con un valor de $p < 0.05$.



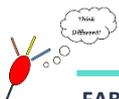


6. DISCUSIÓN

Las relaciones simbióticas entre los microorganismos que se encuentran en la rizósfera y las plantas tienen un enorme impacto en los ecosistemas terrestres (Pedraza *et al.*, 2010); entre estos microorganismos los hongos son cruciales para la salud de las plantas como antagonistas de patógenos y herbívoros; además de que facilitan la absorción de los nutrientes del suelo por las plantas (Fang y St. Leger 2010) y son un componente importante en la mayoría de los ecosistemas ya que desempeñan un papel clave en la regulación de las poblaciones de otros organismos como los insectos (principalmente los hongos entomopatógenos); entre estos, especies de *Beauveria* y *Metarhizium* son especialmente comunes como agentes de control biológico (Keller y Zimmerman, 1989).

La diversidad de microorganismos benéficos, presenta una alternativa para mitigar el impacto ambiental negativo causado por el uso excesivo de productos químicos en los cultivos agrícolas, mediante el aprovechamiento de microorganismos promotores del crecimiento vegetal que incluyen tanto bacterias como hongos, los cuales se asocian de forma simbiótica con las raíces de las plantas, además de mantener la calidad de los suelos (Richardson *et al.*, 2009; Pedraza *et al.*, 2010). La evaluación de esta diversidad genética de microorganismos rizosféricos y su caracterización en relación al aporte de nutrientes, producción de hormonas vegetales y capacidades antagónicas permiten la selección de los microorganismos eficientes para el sector productivo; además de que su aprovechamiento, mejora la calidad ambiental y producción sustentable de alimentos y biocombustibles, mediante un enfoque biológico e integrado principalmente basado en la importancia de esta diversidad (Giri *et al.*, 2005; Richardson *et al.*, 2009).

Uno de los hongos entomopatógenos más estudiados es *Metarhizium*, y el estudio de este género de hongos se enfocan principalmente en la capacidad de estos hongos para infectar insectos, lo cual ha promovido su uso como un agente de control biológico (Roberts y St. Leger, 2004); recientemente se reportó que este género de hongos es capaz de formar asociaciones con las raíces de las plantas (Hu y St. Leger, 2002; Garcia *et al.*, 2011; Sasan y Bidochka, 2012; Liao





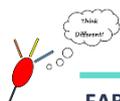
et al., 2014; Behie *et al.*, 2015; Herrera Gutiérrez, 2016) y persistir en el suelo en una parte significativa de su ciclo de vida una vez que emerge de su insecto hospedero (Keller y Zimmerman, 1989).

Metarhizium desempeña un papel ecológico importante en el ciclo de nutrientes del suelo, ya que se ha comprobado que transloca nitrógeno derivado del insecto que infecta hacia la planta, mientras que recíprocamente la planta le transfiere compuestos carbonados (Behie *et al.*, 2012; Behie *et al.*, 2017).

El rol ecológico que ejerce el hongo *Metarhizium* es claramente de gran importancia; en este trabajo, nosotros logramos obtener un total de 44 aislados pertenecientes al género *Metarhizium* (equivalentes a un 21.8% de las muestras tomadas), mediante un medio selectivo para hongos entomopatógenos. En contraste con la mayor parte de los trabajos donde se realiza el aislamiento de hongos entomopatógenos, mediante el método de insectos cebo o insectos carnada (Zimmermann, 1986; Chandler *et al.*, 1997; Bidochka *et al.*, 1998; Steinwender *et al.*, 2014); un ejemplo claro es un estudio realizado en el estado de Guanajuato por Pérez González y colaboradores en 2014; donde lograron obtener por el método de insecto cebo con (*G. mellonella*) 9 aislados de *Metarhizium* de 165 muestras, las cuales fueron tomadas de varias zonas agrícolas (sorgo y maíz). Además en España se realizó un trabajo similar en donde de 244 muestras tomadas de distintas zonas agrícolas, se obtuvieron 18 aislados de hongos entomopatógenos del género *Metarhizium* (7.3%) (Quesada Moraga *et al.*, 2007).

Los resultados obtenidos en este trabajo, resaltan la eficacia del método de aislamiento utilizado, resaltando además que la zona de muestreo mantiene diversidad de microorganismos, debido probablemente a la poca actividad antropogénica; como lo indican diversos estudios, en donde se demuestra que diferentes manejos agrícolas modifican la estructura de las comunidades microbiológicas del suelo (Kennedy y Smith, 1995; García de Salamone *et al.*, 2006)

En una investigación realizada en Dinamarca en el 2015 por Steinwender *et al.*, 2015, en la cual evaluaron la presencia de especies de *Metarhizium* en cultivos comunes del sitio, se demostró que este género de hongos se encuentra





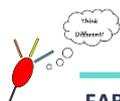
asociado a raíces de diferentes plantas ya que no se encontró ninguna asociación específica con un determinado cultivo. Dado este antecedente, en este trabajo no consideramos relacionar el tipo de plantas presentes en las zonas de colecta.

Los 44 aislados obtenidos fueron caracterizados morfológicamente y molecularmente, tomando en cuenta lo reportado por Bischoff *et al.*, 2009 y Luangsa-ard *et al.*, 2017. Se demostró que existe variabilidad de especies en los 4 sitios muestreados, principalmente en la zona de El Salto, donde se encontró la mayor biodiversidad de especies, con 4 especies encontradas (*M. robertsii*, *M. anisopliae*, *M. brunneum*, *M. guizhouense*). En la Hoya de Álvarez se obtuvieron aislados pertenecientes a *M. robertsii*, *M. guizhouense*; con respecto a Hoya de Solís se obtuvieron aislados pertenecientes a *M. anisopliae*, *M. robertsii* y *M. brunneum*. En Rincón de Parangueo únicamente se encontraron aislados pertenecientes a *M. robertsii*. De manera general se lograron obtener mayor cantidad de aislados pertenecientes a *M. robertsii*, lo que indica que esta especie pudiera estar mejor adaptada a las condiciones y características que presenta esta región en la parte sur de Guanajuato.

Tres de los aislados obtenidos se agruparon dentro de un clado, el cual se encuentra fuera de los ya reportados en la base de datos; lo cual podría indicar que se trate de una nueva especie de *Metarhizium* (ver Figura 15).

En este trabajo presentamos evidencia de que existe una gran biodiversidad en los aislados obtenidos, ya que ninguna de las secuencias analizadas del fragmento del gen (EF-1 α) de los aislados mostraron una identidad de 100%.

Como ya se mencionó anteriormente *Metarhizium* actúa como promotor del crecimiento vegetal (Sasan y Bidochka, 2012); por lo que realizamos una interacción entre diferentes aislados de *Metarhizium* con la planta de sorgo, con la finalidad de evaluar la promoción del crecimiento por parte de *Metarhizium*. Los parámetros medidos durante nuestros ensayos, nos permitieron determinar el desarrollo en la planta de sorgo cuando esta se encontró en una interacción con el hongo. Los datos obtenidos durante la interacción *Metarhizium*-sorgo en condiciones *in vitro* y condiciones semicontroladas en invernadero, arrojaron que no existe una diferencia significativa con respecto a la germinación en ninguno de los aislados probados a diferencia de lo reportado por Herrera Gutiérrez

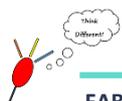




(2016) en relación a este parámetro; sin embargo, el periodo del año en el que se llevó a cabo el experimento, el método de esterilización de la semilla, el sustrato utilizado y el modo de aplicación del hongo en la planta para estos ensayos fue diferente al trabajo antes mencionado. Se ha demostrado además, que la composición, las condiciones y la estructura del suelo son factores importantes que influyen en el crecimiento de las plantas (Jin *et al.*, 2017).

Se demostró que los aislados de *Metarhizium* inducen un incremento en el peso seco de la planta, esto es importante ya que se resume en un incremento de la biomasa para la producción de sorgo; bajo condiciones *in vitro* los aislados ES-35-2 de *M. robertsii* y HS-12 de *M. brunneum* presentaron un 200% de crecimiento en masa en comparación con el tratamiento control. En condiciones semicontroladas en invernadero, de 11 aislados que se evaluaron el aislado HA-11-2 de *M. guizhouense* fue con el cual se obtuvo un mayor peso seco (166.57%), seguido de los aislados HA-11-1 de *M. guizhouense* y HS-12 de *M. brunneum* con un 155.14% y 148.86% respectivamente. Aunque en este trabajo no se presentaron diferencias significativas en relación a la longitud de raíz y tamaño total de la planta, la mayoría de los aislados mostraron estar por arriba del tratamiento control; en trabajos similares donde evalúan la promoción de crecimiento vegetal, se observan diferentes efectos en la planta de maíz por parte de distintas especies de *Metarhizium*; en donde se observó que en *M. brunneum* se presentan mejores resultados en promoción de crecimiento de la planta (Liao *et al.*, 2014), lo cual concuerda con los resultados de este trabajo en donde las especies de *M. guizhouense* y *M. brunneum* son las que mayor promoción de crecimiento presentaron. Por lo que las diferencias de crecimiento en las plantas con los diferentes aislados de *Metarhizium*, provoca respuestas distintas en la planta dependiendo del aislado con el que esta interactúe.

La producción de cultivos está constantemente bajo presión de varios organismos dañinos, incluyendo patógenos de plantas y plagas de artrópodos; la forma tradicional para el control de las enfermedades de fitopatógenos en los cultivos es la aplicación de productos químicos como los fungicidas (Campbell, 1989); sin embargo, en este contexto el control biológico puede ser una alternativa eficiente. Hasta el momento son pocos los reportes que describen el posible efecto antagónico por parte de *Metarhizium* hacia patógenos de plantas;





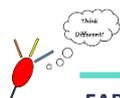
por lo que en este estudio, además de evaluar la capacidad para promoción de crecimiento por parte de *Metarhizium*, también se evaluó el potencial de los aislados de *Metarhizium* obtenidos en este trabajo como posibles antagonistas hacia el fitopatógeno *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Se observó que de los 51 aislados de *Metarhizium* probados contra *F. oxysporum* tanto en condiciones de fotoperiodo como en oscuridad total, bajo estas últimas *Metarhizium* presentó un mayor efecto antagónico hacia el fitopatógeno; en donde 39 de los aislados mostraron la delimitación del crecimiento entre ambos hongos, de los cuales destaca el aislado HA-11-2 de *M. guizhouense* ya que presentó una zona de inhibición de crecimiento muy marcada y con una área mayor al de los demás (ver Figuras 30 y 31).

No existen hasta el momento estudios en los que se haya evaluado el papel antagónico de *Metarhizium* bajo condiciones de oscuridad total; nuestros resultados sugieren que el mayor efecto antagónico observado por parte del aislado HA-11-2 de *M. guizhouense* en oscuridad, pudiera deberse a que las interacciones de manera natural se llevan a cabo en la rizósfera (oscuridad).

Se sugiere además, que el metabolismo del hongo cambia y que pudiera estar produciendo metabolitos diferentes o en mayores concentraciones bajo condiciones de oscuridad constante respecto a fotoperiodo (Dunlap, 2006).

En una investigación realizada por Sasan y Bidochka en 2013 se reportó que *M. robertsii* mostró tener un efecto antagónico hacia el patógeno de frijol *Fusarium solani*, brindando protección a las raíces del frijol; sin embargo, en nuestro trabajo un aislado perteneciente a *M. guizhouense* fue el que mostró un mayor efecto antagónico hacia *F. oxysporum*, esto indica que no existe una relación del potencial antagónico con respecto a las especies de *Metarhizium*, ya que también existen un reporte en donde *M. brunneum* en conjunto con el micoparásito *Clonostachys rosea* en semillas de trigo resultó en una reducción significativa de crecimiento del fitopatógeno *Fusarium culmorum* (Keyser *et al.*, 2015). Esto sugiere que en el sitio de donde fue aislada la cepa de *M. guizhouense*, ésta se pudiera haber encontrado de manera natural en contacto con organismos fitopatógenos por lo que desarrolló mecanismos de defensa hacia estos, lo cual se correlaciona con que los tres aislados que mostraron tener





un mayor efecto antagónico hacia *F. oxysporum*, fueron aislados dentro del mismo sitio.

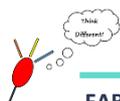
Con base en estos resultados obtenidos en una confrontación dual en placa de *Metarhizium* con *F. oxysporum*, se realizó un ensayo en el cual se evaluó el efecto de los metabolitos difusibles de *Metarhizium* sobre el desarrollo del fitopatógeno; en donde se determinó que los metabolitos excretados al medio por *Metarhizium* repercuten en el desarrollo de *F. oxysporum*. Se observó que, en el medio donde previamente se habían cultivado los 3 aislados que formaron una mayor barrera de separación en las confrontaciones en placa, fue en donde el desarrollo del fitopatógeno se vio mayormente afectado, en comparación con los aislados que no formaron una zona de inhibición entre las colonias de ambos hongos en los experimentos de confrontación, como ya se ha visto en otros estudios (Pérez López *et al.*, 2008).

Se estudió además el efecto protector de *Metarhizium* pero ahora en una interacción tripartita (en placa dividida), incluyendo plantas de sorgo. En este ensayo se observó que el aislado HA-11-2 de *M. guizhouense* logró inhibir la colonización del fitopatógeno *F. oxysporum* en la planta del sorgo. Este efecto protector se muestra en la Figura 36, en donde en el tratamiento que se inocularon ambos hongos en la raíz del sorgo se muestra que el fitopatógeno no colonizó la planta, a diferencia de lo observado en el tratamiento en donde se inoculó únicamente el fitopatógeno. Además también, se realizó una interacción tripartita en condiciones semicontroladas a nivel invernadero, esta asociación se hizo incluyendo plantas de sorgo y tomate.

En relación al sorgo, en su interacción con *F. oxysporum* se observó una disminución en el peso seco total de la planta (ver Figura 38); de igual manera con la planta de tomate existió una disminución tanto en el peso seco total de la planta como en el peso del fruto (ver Figura 40).

Generalmente la pudrición de raíz es uno de los síntomas causados por especies de *Fusarium*, en los resultados obtenidos en este trabajo no se observó pudrición de raíz de la planta; sin embargo, también se han reportado síntomas en el tallo, cotiledones y hojas (Herrera *et al.*, 2011; Avelar-Mejía *et al.*, 2011).

Existen reportes de una reducción significativa en el peso seco causados por *F. oxysporum* en cultivares de sorgo (65%), remolacha del azúcar (71%) y melón



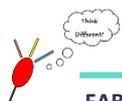


dulce “*cucumis*” (80%) (Caesar *et al.*, 1999); también en cártamo “*Carthamus tinctorius*” por *F. solani* con una reducción de peso seco de 72% en comparación al control, así como en 3 especies de pasto con porcentajes de arriba del 50% en reducción de peso seco más que el control (Caesar *et al.*, 1999). Además, también se tiene un estudio en el cual se determinó la agresividad de diferentes especies de *Fusarium* que causan la pudrición de raíz en soya, en donde se estimaron los efectos de infección de raíz en condiciones de invernadero; en este estudio se presentaron efectos perjudiciales en las características de desarrollo de la raíz, en donde se observaron principalmente reducciones significativas en el peso seco de la raíz, volumen total de raíz y superficie de la raíz, esto cuando las plantas fueron inoculadas con varias especies de *Fusarium*, entre estas *F. oxysporum* en comparación con las no inoculadas (Arias *et al.*, 2013).

Se conoce que el tomate es una de las hortalizas que mayormente se cultivan en México por la superficie explotada y la generación de empleos (Karkachi *et al.*, 2010); recientemente la superficie dedicada a este cultivo ha disminuido gradualmente, debido a diversos factores entre ellos la incidencia creciente de enfermedades radiculares (Carrillo *et al.*, 2003). Una de las enfermedades más importantes de tomate es el marchitamiento vascular, causado por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Karkachi *et al.*, 2010); ya que puede causar pérdidas económicas importantes, debido a la baja producción del cultivo. En un trabajo realizado en 2014, se reportó que *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* afectó significativamente el peso seco de las raíces, hojas, tallo y peso seco total de plantas de tomate variedad Saladette P-083-SVA (Vázquez, 2014).

Nuestros resultados indican que *F. oxysporum* afecta negativamente tanto a la planta de sorgo como de tomate, causando una disminución en el peso seco de las mismas y que, el aislado HA-11-2 de *M. guizhouense* protege a las plantas del daño en su desarrollo por el fitopatógeno *F. oxysporum*.

Actualmente no se conoce el mecanismo mediante el cual *Metarhizium* protege a las plantas de los fitopatógenos, existen estudios que sugieren que un metabolito soluble extracelular pudiera estar implicado (Sasan y Bidochka, 2013). La actividad de *Metarhizium* como antagonista de patógenos de plantas pudiera estar también relacionada con la producción de enzimas hidrolíticas,





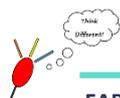
tales como quitinasas, glucanasas y proteasas; las cuales son consideradas importantes en la lisis de pared celular de hongos.

En general los antagonistas no tienen un único modo de acción y la multiplicidad de éstos es una característica importante para su selección como agentes de control biológico (Fernández, 2001).

En los resultados de la interacción de los distintos aislados de *Metarhizium*, con la planta de sorgo para evaluar la promoción de crecimiento, se obtuvo que el aislado HA-11-2 promueve el crecimiento de la planta de sorgo con un incremento de biomasa de la misma, existiendo una diferencia significativa en el peso seco con un 154 % más de peso en comparación con el tratamiento control (semilla sin el adherente) (ver Figura 26), este efecto no se observa en el experimento de la interacción tripartita con la planta de sorgo, ya que el tratamiento control y el tratamiento en donde únicamente fue inoculado el aislado HA-11-2 no presentan una diferencia de peso seco entre ellos (ver Figura 37).

Este resultado posiblemente se deba a que ambos experimentos fueron realizados en fechas diferentes con una diferencia de 15 días uno del otro. Las interacciones realizadas para evaluar la promoción de crecimiento en sorgo se llevaron a cabo del 14 de julio al 14 de agosto, con una temperatura dentro del invernadero oscilando de 26.8°C a 45.1°C y el experimento de las interacciones tripartitas en sorgo se realizó del 01 de agosto al 30 de agosto, dentro de este periodo el clima presentó variación bajando la temperatura oscilando entre 19.3°C a 32 °C; esta reportado que condiciones de temperatura baja (inferiores a 20°C) afectan negativamente la germinación y crecimiento de sorgo, reduciendo la producción de biomasa y su rendimiento (Franks *et al.*, 2006; Maulana y Tesso, 2013). Además, de que el método de inoculación del hongo en la planta se aplicó de manera distinta, para el primer experimento se utilizó un adherente y para el experimento de interacción tripartita se inoculó a la semilla directamente en la tierra.

Los resultados de este trabajo indican en un principio que la caracterización de los aislados de *Metarhizium* es muy importante, ya que nos proporciona la información sobre cuál es la especie con la que se está trabajando y de esta manera poder conjuntar estos datos con otras características de la especie como

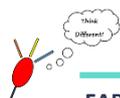




su velocidad de crecimiento, sus características morfológicas, su capacidad antagonica hacia fitopatógenos, para así poder seleccionar las cepas que cuenten con las características deseadas para poder ser utilizadas como biocontrolador o biofertilizantes.

Uno de los factores que permiten alcanzar una mayor competitividad en el campo agrícola es la reducción del uso de agroquímicos, la sustitución parcial o total de estos por microorganismos o la modificación de los componentes de la rizósfera mediante la ingeniería, son alternativas prometedoras para lograr una producción sostenible y mejorar la calidad del suelo y los cultivos (Pedraza *et al.*, 2010; Dessaux *et al.*, 2016).

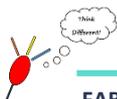
Este trabajo nos proporciona datos importantes sobre las características del género *Metarhizium* en su ecosistema, además de que se resalta la importancia de aplicar y aprovechar los microorganismos autóctonos para fines de su uso en la agricultura, como es el caso de la cepa HA-11-2 de *M. guizhouense*, la cual tiene la capacidad de promover el crecimiento en plantas y ser antagonista de hongos fitopatógenos.





7. CONCLUSIONES

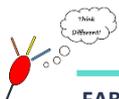
- El sur del estado de Guanajuato cuenta con una gran diversidad del hongo *Metarhizium*, ya que se obtuvieron un total de 44 aislados distintos; de los cuales 26 corresponden a *M. robertsii*, 8 a *M. brunneum*, 3 a *M. guizhouense* y 2 pertenecientes a *M. anisopliae*.
- Tres aislados se agruparon dentro de un mismo clado, este clado mostró estar fuera de los ya reportados en la base de datos; por lo que podría considerarse que estos tres aislados pertenecen a una nueva especie.
- Cuarenta de los aislados de *Metarhizium*, tienen la capacidad de promoción de crecimiento en la planta de sorgo; reflejándose principalmente en la biomasa total producida, siendo bajo condiciones *in vitro* las especies de *M. robertsii* y *M. brunneum* las que mostraron mejores resultados; y bajo condiciones semicontroladas en invernadero *M. guizhouense* y *M. brunneum*.
- La capacidad antagónica se vio mayormente reflejada bajo condiciones de oscuridad, donde 35 de los aislados de *Metarhizium* obtenidos en este trabajo, mostraron un efecto antagonista hacia *F. oxysporum*; siendo el aislado HA-11-2 el que mayor efecto presentó; sugiriendo que este aislado secreta metabolitos difusibles que repercuten en el desarrollo del fitopatógeno.





8. PERSPECTIVAS

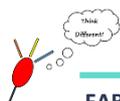
- Realizar ensayos bajo condiciones semicontroladas (invernadero) en diferentes plantas de interés agrícola con los aislados obtenidos en este trabajo, con la finalidad de probar el efecto que tengan en la promoción del crecimiento.
- Evaluar el efecto antagónico de los aislados contra otros organismos fitopatógenos de importancia en la región.
- Evaluar la compatibilidad de los aislados con los principales agroquímicos utilizados en campo con el fin de poder implementar estrategias de manejo integrado.
- Determinar si los aislados de *Metarhizium* obtenidos en este trabajo tienen la capacidad de producir alguna fitohormona.
- Probar la capacidad patogénica de los aislados hacia insectos plaga.





9. BIBLIOGRAFÍA

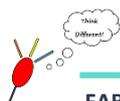
- Abdel-Fattah, G. M., Shabana, Y. M., Ismail, A. E., y Rashad, Y. M. (2007).** *Trichoderma harzianum*: a biocontrol agent against *Bipolaris oryzae*. *Mycopathologia*, 164(2), 81.
- Arias, M. M. D., Leandro, L. F., y Munkvold, G. P. (2013).** Aggressiveness of *Fusarium* species and impact of root infection on growth and yield of soybeans. *Phytopathology*, 103(8), 822-832.
- Avelar-Mejía, J. D. J., Galindo-Oliva, M., Lara-Herrera, A., Llamas-Llamas, J. J., Luna-Flores, M., Salas-Luevano, M. Á., y Cabral-Enciso, M. (2011).** Hongos asociados con la enfermedad "miada de perro" en el cultivo de chile. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 2(1), 155-160.
- Bais, H. P., Weir, T. L., Perry, L. G., Gilroy, S., y Vivanco, J. M. (2006).** The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57, 233-266.
- Barradas V. (1994).** Instrumentación Biometeorológica. México, Ediciones Científicas Universitarias, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)/Fondo de Cultura Económica (FCE).
- Behie, S. W., y Bidochka, M. J. (2013).** Insects as a nitrogen source for plants. *Insects*, 4(3), 413-424.
- Behie, S. W., y Bidochka, M. J. (2014).** Nutrient transfer in plant–fungal symbioses. *Trends in plant science*, 19(11), 734-740.
- Behie, S. W., y Bidochka, M. J. (2014).** Ubiquity of insect-derived nitrogen transfer to plants by endophytic insect-pathogenic fungi: an additional branch of the soil nitrogen cycle. *Applied and environmental microbiology*, 80(5), 1553-1560.
- Behie, S. W., Jones, S. J., y Bidochka, M. J. (2015).** Plant tissue localization of the endophytic insect pathogenic fungi *Metarhizium* and *Beauveria*. *Fungal Ecology*, 13, 112-119.
- Behie, S. W., Moreira, C. C., Sementchoukova, I., Barelli, L., Zelisko, P. M., y Bidochka, M. J. (2017).** Carbon translocation from a plant to an insect-pathogenic endophytic fungus. *Nature communications*, 8, 14245.
- Behie, S. W., Zelisko, P. M., y Bidochka, M. J. (2012).** Endophytic insect-parasitic fungi translocate nitrogen directly from insects to plants. *Science*, 336(6088), 1576-1577.
- Bell, D. K., Wells, H. D., y Markham, C. R. (1982).** *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*, 72(4), 379-382.
- Bidochka, M. J., Kasperski, J. E., y Wild, G. A. (1998).** Occurrence of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in soils from temperate and near-northern habitats. *Canadian Journal of Botany*, 76(7), 1198-1204.
- Bischoff, J. F., Rehner, S. A., y Humber, R. A. (2006).** *Metarhizium frigidum* sp. nov.: a cryptic species of *M. anisopliae* and a member of the *M. flavoviride* complex. *Mycologia*, 98(5), 737-745.
- Bischoff, J. F., Rehner, S. A., y Humber, R. A. (2009).** A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia*, 101(4), 512-530.
- Cabrera Rangel José Francisco. (2016).** Identificación de fitohormonas producidas por aislados Mexicanos del hongo *Metarhizium* spp. Tesis de Licenciatura, Universidad de





Guanajuato.

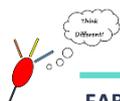
- Caesar, A. J., Campobasso, G., y Terragitti, G. (1999).** Effects of European and U.S. strains of *Fusarium* spp. pathogenic to leafy spurge on North American grasses and cultivated species. *Academic Press, Inc. Biological Control*; 15:130-136.
- Campbell, R. (1989).** Biological control of microbial plant pathogens. Cambridge University Press.
- Carrillo Fasio, J. A., Montoya Rodríguez, T. D. J., García Estrada, R. S., Cruz Ortega, J. E., Márquez Zequera, I., y Sañudo Barajas, A. J. (2003).** Razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Snyder y Hansen, en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en el Valle de Culiacán, Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(2).
- Chandler, D., Hay, D., y Reid, A. P. (1997).** Sampling and occurrence of entomopathogenic fungi and nematodes in UK soils. *Applied Soil Ecology*, 5(2), 133-141.
- Chapin, F.S., Sala, O.E., Huber- Sannwald, E. (2001).** Global biodiversity in a changing environment: scenarios for the 21st century/editors. Ecological Studies (152), Library of Congress, Springer.
- Charnley, A. K., y Leger, R. S. (1991).** The role of cuticle-degrading enzymes in fungal pathogenesis in insects. In *The fungal spore and disease initiation in plants and animals* (pp. 267-286). Springer US.
- Chaverri, P., Branco-Rocha, F., Jaklitsch, W., Gazis, R., Degenkolb, T., y Samuels, G. J. (2015).** Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. *Mycologia*, 107(3), 558-590.
- Cruz, A., Becerril, R., y Báez, O. (2012).** La Biodiversidad en Guanajuato: Estudio de Estado. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). Instituto de Ecología del Estado de Guanajuato. (IEE).
- Dessaux, Y., Grandclément, C., y Faure, D. (2016).** Engineering the rhizosphere. *Trends in plant science*, 21(3), 266-278.
- Dragún P., Moreno A., Picasso S., Lardizabal J., Gatti N., Telechea J. y Conti A. (2010).** Monitoreo y estudios de cadenas de valor ONCCA. Informe de Sorgo. XLI Congreso de la Asociación Argentina de Economía Agraria (AAEA), 1-18.
- Driver, F., Milner, R. J., y Trueman, J. W. (2000).** A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycological Research*, 104(2), 134-150.
- Dunlap J.C. y Loros JJ. (2006).** How fungi keep time: circadian system in *Neurospora* and other fungi. *Curr. Opin. Microbiol.* 9:579–87
- Fang, W., y Leger, R. J. S. (2010).** Mrt, a gene unique to fungi, encodes an oligosaccharide transporter and facilitates rhizosphere competency in *Metarhizium robertsii*. *Plant physiology*, 154(3), 1549-1557.
- Fang, W., Pei, Y., y Bidochka, M. J. (2007).** A regulator of a G protein signalling (RGS) gene, *cag8*, from the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* is involved in conidiation, virulence and hydrophobin synthesis. *Microbiology*, 153(4), 1017-1025.
- Fernandes, É. K., Keyser, C. A., Rangel, D. E., Foster, R. N., y Roberts, D. W. (2010).** CTC





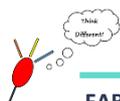
medium: a novel dodine-free selective medium for isolating entomopathogenic fungi, especially *Metarhizium acridum*, from soil. *Biological control*, 54(3), 197-205.

- Fernández-Larrea Vega, O. (2001).** Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Avances en el Fomento de Productos Fitosanitarios No-Sintéticos; Manejo Integrado de Plagas* (Costa Rica) No. 62 pág. 96 - 100.
- Franks C.D., Burow G.B. y Burke J.J. (2006).** A comparison of U.S. and Chinese sorghum germplasm for early season cold tolerance. *Crop Science* 46, 1371–1376.
- García Leños, M. D. L., Aguirre Gómez, J. A., Narro Sánchez, J., Cortés Baheza, E., y Rivera Reyes, J. G. (2007).** Silo hermético para el control de plagas de granos almacenados en Guanajuato, México. *Agricultura técnica en México*, 33(3), 231-239.
- García de Salamone I.E., Nelson L.M. (2006).** Inoculación de plantas de trigo con una cepa de *Pseudomonas fluorescens* con probada capacidad de producir citoquininas. En: XXVI Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. Sociedad Argentina de Fisiología Vegetal. Chascomús, Argentina.
- García, E., Posadas, B., Peticari, A., y Lecuona, R. (2011).** *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin promotes growth and has endophytic activity in tomato plants. *Advances in Biological Research* 2011; 5, 22-27.
- Geiser, D.M., del Mar Jiménez-Gasco, M., Kang, S., Makalowska, I., y Veeraraghavan, N. (2004).** *Fusarium-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying Fusarium.* In *Molecular Diversity and PCR-detection of Toxigenic Fusarium Species and Ochratoxigenic Fungi*; (pp. 473-479). Springer Netherlands.
- Glare, T., Caradus, J., Gelernter, W., Jackson, T., Keyhani, N., Köhl, J., y Stewart, A. (2012).** Have biopesticides come of age?. *Trends in biotechnology*, 30(5), 250-258.
- González Cárdenas, J.C., Maruri García, J.M., y González Acosta, A. (2005).** Evaluación de diferentes concentraciones de *Trichoderma* spp. contra *Fusarium oxysporum* agente causal de la pudrición de plántulas en papaya (*Carica papaya* L.) en Tuxpan, Veracruz, México. *UDO Agrícola*; 5 (1): 45-47.
- Grosch, R., Scherwinski, K., Lottmann, J., y Berg, G. (2006).** Fungal antagonists of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*: selection, control efficacy and influence on the indigenous microbial community. *Mycological Research*; 110(12), 1464-1474.
- Giri B, Pham HG, Kumari R, Prasad R y Varma A. (2005).** Microbial diversity in soils. En: Buscot F, Varma A (eds.). *Soil biology. Volume 3. Microorganisms in soils: roles in genesis and functions.* Springer-Verlag. Berlin.
- Hernández Martínez, R., López Benítez, A., Borrego Escalante, F., Espinoza Velázquez, J., Sánchez Aspeytia, D., Maldonado Mendoza, I. E., y López Ochoa, L. A. (2014).** Razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en predios tomateros en San Luis Potosí. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 5(7), 1169-1178.
- Herrera Gutiérrez Luz Janeth. (2016).** Evaluación de la interacción de cepas de *Metarhizium* con *Sorghum vulgare*. Tesis de Licenciatura, Universidad de Guanajuato.
- Herrera Parra, E., Bacab Pérez, I. M., Alejo, J. C., Tun Suárez, J. M., y Ruiz Sánchez, E. (2011).** Patogenicidad de *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. y *Alternaria alternata* (Fries) Keissler en *Thevetia peruviana* (Pers.) K. Schum. y su control in vitro. *Fitosanidad*, 15(4).



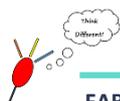


- Hu, G., y St Leger, R.J. (2002).** Field studies using a recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. *Applied and Environmental Microbiology*; 68(12), 6383-6387.
- Instituto de Ecología del Estado (SEMARNAT), (2003).** Áreas Naturales Protegidas (ANP). <http://anps.guanajuato.gob.mx>. 11 noviembre, 2017.
- Jin, K., White, P. J., Whalley, W. R., Shen, J., y Shi, L. (2017).** Shaping an Optimal Soil by Root–Soil Interaction. *Trends in Plant Science*.
- Kang, S.C., Bark, Y.G., Lee, D.G., y Kim, Y.H. (1996).** Antifungal activities of *Metarhizium anisopliae* against *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, and *Alternaria solani*. *The Korean Journal of Mycology*; 24(1), 49-55.
- Karkachi, N. E., Gharbi, S., y Henni, M. K. J. E. (2010).** Biological Control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Isolated from. *Research Journal of Agronomy*, 4(2), 31-34.
- Keller, S., y Zimmerman, G. (1989).** Mycopathogens of soil insects. In: Wilding N, Collins NM, Hammond PM, Webber JF (eds), *Insect– Fungus Interactions*. Academic Press, London; pp. 239–270.
- Kennedy A.C. y Smith K.L. (1995).** Soil microbial diversity and sustentability of agricultural soils. *Plant and Soil* 170:75-86.
- Kepler, R. M., Humber, R. A., Bischoff, J. F., y Rehner, S. A. (2014).** Clarification of generic and species boundaries for *Metarhizium* and related fungi through multigene phylogenetics. *Mycologia*; 106(4), 811-829.
- Kepler, R.M., Ugine, T.A., Maul, J.E., Cavigelli, M.A., y Rehner, S.A. (2015).** Community composition and population genetics of insect pathogenic fungi in the genus *Metarhizium* from soils of a long-term agricultural research system. *Environmental microbiology*; 17(8), 2791-2804.
- Keyser, C.A., Henrik, H., Steinwender, B.M., y Meyling, N.V. (2015).** Diversity within the entomopathogenic fungal species *Metarhizium flavoviride* associated with agricultural crops in Denmark. *BMC microbiology*; 15(1), 249.
- Keyser, C. A., Jensen, B., y Meyling, N. V. (2015).** Dual effects of *Metarhizium* spp. and *Clonostachys rosea* against an insect and a seed-borne pathogen in wheat. *Pest management science*, 72(3), 517-526.
- Krasnoff, S. B., Keresztes, I., Gillilan, R. E., Szebenyi, D. M., Donzelli, B. G., Churchill, A. C., y Gibson, D. M. (2007).** Serinocyclins A and B, cyclic heptapeptides from *Metarhizium anisopliae*. *Journal of natural products*, 70(12), 1919-1924.
- Lee, S.Y., Nakajima, I., Ihara, F., Kinoshita, H., y Nihira, T. (2005).** Cultivation of entomopathogenic fungi for the search of antibacterial compounds. *Mycopathologia*; 160(4), 321-325.
- Liao, X., Fang, W., Lin, L., Lu, H.L., St Leger, R.J. (2013).** *Metarhizium robertsii* produces an extracellular invertase (MrINV) that plays a pivotal role in rhizospheric interactions and root colonization. *PLoS one*; 8 (10), e78118.
- Liao, X., Lovett, B., Fang, W., y St Leger, R.J. (2017).** *Metarhizium robertsii* produces indole-3-acetic acid, which promotes root growth in *Arabidopsis* and enhances virulence to insects. *Microbiology (Reading, England)*, 163(7), 980.



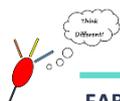


- Liao, X., O'Brien, T. R., Fang, W., y St Leger, R. J. (2014).** The plant beneficial effects of *Metarhizium* species correlate with their association with roots. *Applied microbiology and biotechnology*; 98(16), 7089-7096.
- Luangsa-ard, J. J., Mongkolsamrit, S., Thanakitpipattana, D., Khonsanit, A., Tasanathai, K., Noisripoom, W., y Humber, R. A. (2017).** Clavicipitaceous entomopathogens: new species in *Metarhizium* and a new genus *Nigelia*. *Mycological Progress*, 4(16), 369-391.
- Marlatt, M. L. J.; Correll, J. C.; Kaufman, P. y Cooper, P. E. (1996).** Two genetically distinct populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Ivcopersici* race 3 in the United States. *Plant Dis.* 80(12):1336-1342.
- Maulana F. y Tesso TT. (2013).** Cold temperature episode at seedling and flowering stages reduces growth and yield components in sorghum. *Crop Science* 53, 564–574.
- Onofre SB., Miniuk CM., Barros NM., Azevedo JL. (2001).** Growth and sporulation of *Metarhizium flavoviride* var. *Flavoviride* on culture media and lighting regimes. *Sci. agric*; 58(3): 613-616.
- Padilla-Melo, G. N., Bernal-Urbe, M. G., Vélez-Arango, P. E., y Montoya-Restrepo, E. C. (2000).** Caracterización patogénica y morfológica de aislamientos de *Metarhizium anisopliae* obtenidos de diferentes órdenes insectiles. *Cenicafé*, 51(1), 28-40.
- Pal, S., Leger, R. J. S., y Wu, L. P. (2007).** Fungal peptide Destruxin A plays a specific role in suppressing the innate immune response in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Biological Chemistry*, 282(12), 8969-8977.
- Paracer, S., Ahmadjian, V. (2000).** *Symbiosis: an introduction to biological associations*. 2nd edition. Oxford University Press.
- Pedraza, R. O., Teixeira, K. R., Fernández Scavino, A., García de Salamone, I., Baca, B. E., Azcón, R., y Bonilla, R. (2010).** Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos. Revisión. *Corpoica. Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 11(2).
- Pérez-González, V. H., Guzmán-Franco, A. W., Alatorre-Rosas, R., Hernández-López, J., Hernández-López, A., Carrillo-Benítez, M. G., y Baverstock, J. (2014).** Specific diversity of the entomopathogenic fungi *Beauveria* and *Metarhizium* in Mexican agricultural soils. *Journal of invertebrate pathology*, 119, 54-61.
- Pérez-López, A. N.; Lezama-Gutiérrez, R.; Rebolledo-Domínguez, O.; Molina-Ochoa, J.; Galindo-Velasco, E.; González-Ramírez, M. y Angel-Sahagún, C. A. (2008).** EFECTO DE *Trichoderma harzianum* (Moniliaceae) SOBRE EL CRECIMIENTO DE LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* Y *Paecilomyces fumosoroseus* (Hyphomycetes) EN LABORATORIO. *Revista entomológica Mexicana*; pág. 422-427.
- Piña Torres Iván Horacio. (2017).** Caracterización de aislados del hongo *Metarhizium* provenientes del norte del estado de Guanajuato con potencial de promover el crecimiento vegetal. Tesis de Maestría en Ciencias (Biología), Universidad de Guanajuato.
- Popiel, D., Kwasna, A., Chelkowski, J., Stepień, L., y Laskowska, M. (2008).** Impact of selected antagonistic fungi on *Fusarium* species-toxigenic cereal pathogens. *Acta Mycologica*; 43(1).





- Quesada-Moraga, E., Navas-Cortés, J. A., Maranhao, E. A., Ortiz-Urquiza, A., y Santiago-Álvarez, C. (2007).** Factors affecting the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in natural and cultivated soils. *Mycological research*, 111(8), 947-966.
- Roberts, D.W., y St. Leger, R.J. (2004).** *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect-pathogenic fungi: mycological aspects. *Advances in applied microbiology*, 54, 1-70.
- Rojo, F. G., Reynoso, M. M., Ferez, M., Chulze, S. N., y Torres, A. M. (2006).** Biological control by *Trichoderma* species of *Fusarium solani* causing peanut brown root rot under field conditions. *Crop protection*; 26(4), 549-555.
- Sambrook, J., y Russell, D.W. (2001).** Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring laboratory Press; New York*.
- Sasan, R.K., y Bidochka, M.J. (2012).** The insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* (Clavicipitaceae) is also an endophyte that stimulates plant root development. *American journal of botany*; 99(1), 101-107.
- Sasan, R.K., Bidochka, M.J. (2013).** Antagonism of the endophytic insect pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* against the bean plant pathogen *Fusarium solani* f. sp. phaseoli. *Canadian Journal of Plant Pathology*; 35(3), 288-293.
- Schulz, B., Haas, S., Junker, C., André, N., y Schobert, M. (2015).** Fungal endophytes are involved in multiple balanced antagonisms. *Curr Sci*; 109, 39-45.
- Shin, T.Y., Choi, J.B., Bae, S.M., Koo, H.N., Woo, S.D. (2010).** Study on selective media for isolation of entomopathogenic fungi. *International Journal of Industrial Entomology*; 20(1), 7-12.
- Shah, P.A., y Pell, J.K. (2003).** Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied microbiology and biotechnology*; 61(5), 413-423.
- Small, C.L.N., y Bidochka, M.J. (2005).** Up-regulation of Pr1, a subtilisin-like protease, during conidiation in the insect pathogen *Metarhizium anisopliae*. *Mycological Research*; 109(3), 307-313.
- St Leger, R.J., Joshi, L., Bidochka, M.J., Roberts, D.W. (1996).** Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 93(13):6349-54.
- St Leger, R. J., Nelson, J. O., y Screen, S. E. (1999).** The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* alters ambient pH, allowing extracellular protease production and activity. *Microbiology*; 145(10), 2691-2699.
- Steinwender, B. M., Enkerli, J., Widmer, F., Eilenberg, J., Thorup Kristensen, K., y Meyling, N. V. (2014).** Molecular diversity of the entomopathogenic fungal *Metarhizium* community within an agroecosystem. *Journal of invertebrate pathology*; 123, 6-12.
- Steinwender, B. M., Enkerli, J., Widmer, F., Eilenberg, J., Kristensen, H. L., Bidochka, M. J., y Meyling, N. V. (2015).** Root isolations of *Metarhizium* spp. from crops reflect diversity in the soil and indicate no plant specificity. *Journal of invertebrate pathology*, 132, 142-148.
- Ubaldo Vázquez, G. (2014).** Actividad antifúngica del extracto etanólico de *Flourensia cernua* DC para el control de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en el cultivo de tomate.





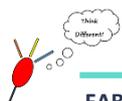
Wang, C., y St Leger, R.J. (2007). The MAD1 adhesin of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enables attachment to plants. *Eukaryotic cell*; 6(5), 808-816.

Whipps, J. M., y Lumsden, R. D. (2001). Commercial use of fungi as plant disease biological control agents: status and prospects. *Fungal biocontrol agents: progress, problems and Potential*; 9-22.

Wyrebek, M., Huber, C., Sasan, R.K., y Bidochka, M.J. (2011). Three sympatrically occurring species of *Metarhizium* show plant rhizosphere specificity. *Microbiology*; 157(10), 2904-2911.

Yun, H. G., Kim, D. J., Gwak, W. S., Shin, T. Y., y Woo, S. D. (2017). Entomopathogenic Fungi as Dual Control Agents against Both the Pest *Myzus persicae* and Phytopathogen *Botrytis cinerea*. *Mycobiology*, 45(3), 192-198.

Zimmermann, G. (1986). The Galleria bait method for detection of entomopathogenic fungi in soil. *Journal of applied Entomology*; 102(1-5), 213-215.

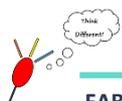




ANEXOS

Tabla 7. Lista de aislados obtenidos en este trabajo.

| | Aislado | Especie | Lugar donde se aisló | Promueve el crecimiento de sorgo (<i>in vitro</i>) | Formo zona de inhibición de crecimiento en una interacción con <i>F. oxysporum</i> | |
|----|---------|------------------------------|----------------------|---|--|-----------|
| | | | | | Fotoperiodo | Oscuridad |
| 1 | ES-2 | <i>M. robertsii</i> | El Salto | No | No | Si |
| 2 | ES-6 | <i>M. anisopliae</i> | El Salto | Si | Si | Si |
| 3 | ES-8-1 | <i>M. brunneum</i> | El Salto | Si | No | No |
| 4 | ES-8-2 | <i>Metarhizium</i> sp. | El Salto | No | No | No |
| 5 | ES-10 | <i>M. robertsii</i> | El Salto | Si ■ | Si | Si |
| 6 | ES-11 | <i>M. brunneum</i> | El Salto | Si | No | Si |
| 7 | ES-12-1 | <i>Metarhizium</i> sp. | El Salto | Si | Si | Si |
| 8 | ES-12-2 | <i>M. robertsii</i> | El Salto | Si | No | Si |
| 9 | ES-14 | <i>M. robertsii</i> | El Salto | Si | No | Si |
| 10 | ES-15 | <i>M. robertsii</i> | El Salto | Si | No | Si |
| 11 | ES-16 | <i>M. robertsii</i> | El Salto | Si | No | Si |
| 12 | ES-18-1 | <i>M. robertsii</i> | El Salto | Si | No | No |
| 13 | ES-18-2 | <i>M. guizhouense</i> | El Salto | Si ■ | No | Si |
| 14 | ES-18-3 | <i>M. robertsii</i> | El Salto | Si | No | Si |
| 15 | ES-18-4 | <i>M. brunneum</i> | El Salto | Si | No | Si |
| 16 | ES-20-1 | <i>M. robertsii</i> | El Salto | No | No | No |
| 17 | ES-20-2 | <i>M. robertsii</i> | El Salto | Si | No | Si |
| 18 | ES-30 | <i>M. robertsii</i> | El Salto | Si | No | Si |
| 19 | ES-32 | <i>M. robertsii</i> | El Salto | Si | No | Si |
| 20 | ES-33 | <i>M. robertsii</i> | El Salto | Si | No | Si |
| 21 | ES-35-1 | <i>M. robertsii</i> | El Salto | Si | No | Si |
| 22 | ES-35-2 | <i>M. robertsii</i> | El Salto | Si ■ → Si | No | Si |
| 23 | ES-37 | <i>M. robertsii</i> | El Salto | Si ■ → Si | No | Si |
| 24 | HAB-5 | <i>M. robertsii</i> | Hoya de Álvarez | Si | No | Si |
| 25 | HAB-7 | * No se analizó su secuencia | Hoya de Álvarez | Si | No | No |
| 26 | HAB-9-1 | <i>Metarhizium</i> sp. | Hoya de Álvarez | Si | No | No |
| 27 | HAB-9-2 | <i>M. robertsii</i> | Hoya de Álvarez | Si ■ → Si | Si * | Si * |





| | | | | | | |
|----|-----------|------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|------|------|
| 28 | HA-11-1 | <i>M. guizhouense</i> | Hoya de Álvarez | Si → Si | Si * | Si * |
| 29 | HA-11-2 | <i>M. guizhouense</i> | Hoya de Álvarez | Si → Si | Si * | Si * |
| 30 | HA-14-1 | <i>M. robertsii</i> | Hoya de Álvarez | Si | Si | Si |
| 31 | HA-14-2 | * No se analizó su secuencia | Hoya de Álvarez | No | Si | Si |
| 32 | HS-12 | <i>M. brunneum</i> | Hoya de Solís | Si → Si | No | Si |
| 33 | HS-14 | <i>M. anisopliae</i> | Hoya de Solís | Si | No | Si |
| 34 | HS-22-1 | <i>M. brunneum</i> | Hoya de Solís | Si | No | Si |
| 35 | HS-22-2 | <i>M. brunneum</i> | Hoya de Solís | Si | No | No |
| 36 | HS-22-3 | <i>M. robertsii</i> | Hoya de Solís | Si | No | Si |
| 37 | HS-22-4 | <i>M. robertsii</i> | Hoya de Solís | Si | No | Si |
| 38 | HS-31-1 | <i>M. brunneum</i> | Hoya de Solís | Si | No | Si |
| 39 | HS-31-2 | <i>M. brunneum</i> | Hoya de Solís | Si | No | No |
| 40 | RPV-3 | <i>M. robertsii</i> | Rincón de Parangueo | Si | No | No |
| 41 | RPV-5 | <i>M. robertsii</i> | Rincón de Parangueo | Si | No | Si |
| 42 | RPV-10-1 | <i>M. robertsii</i> | Rincón de Parangueo | Si | Si | Si |
| 43 | RPV-10-2 | <i>M. robertsii</i> | Rincón de Parangueo | Si | Si | Si |
| 44 | RPV-19 | <i>M. robertsii</i> | Rincón de Parangueo | Si → Si | No | Si |
| 45 | ARSEF7486 | <i>M. acridum</i> | Insecto <i>Ornithocris cavroisi</i> | No se evaluó | No | No |
| 46 | ARSEF2575 | <i>M. robertsii</i> | Insecto <i>Curculio caryae</i> | No se evaluó | No | Si |
| 47 | CARO4 | <i>M. robertsii</i> | Insecto <i>Phyllophaga ravidia</i> | No se evaluó | No | Si |
| 48 | CARO19 | <i>M. brunneum</i> | Insecto <i>Gerageus senilis</i> | Si | No | Si |
| 49 | SR19 | <i>M. pingshaense</i> | Santa Rosa | No se evaluó | Si | No |
| 50 | LCP13 | <i>M. palomense</i> | Las Palomas | No se evaluó | No | No |
| 51 | XR2-3 | <i>Metarhizium</i> sp. | Zona núcleo de Xichú | No se evaluó <i>in vitro</i> → Si | Si | Si |

Los datos sobre la promoción de crecimiento de sorgo *in vitro* (en esta tabla) se basan en relación al peso seco total de la planta. Los aislados en la tabla resaltados en color salmón son aislados pertenecientes a la colección del Laboratorio de Genética Molecular de Hongos de la Universidad de Guanajuato.

- Se probó también en condiciones semicontroladas en invernadero.
- * Aislados que mostraron una mayor barrera de separación en una interacción con *F. oxysporum*.

