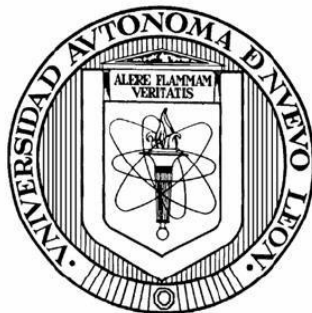


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EFFECTO DEL HONGO ENTOMOPATOGENO *Metarhizium* spp. EN EL  
CRECIMIENTO DE PLANTAS DE MAIZ (*Zea mays* L.)

POR

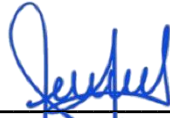
Q.B.P. ESTEBAN LÓPEZ TREVIÑO

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRIA EN  
CIENCIAS CON ORIENTACION EN MICROBIOLOGIA

2021

**EFFECTO DEL HONGO ENTOMOPATOGENO *Metarhizium* spp. EN EL  
CRECIMIENTO DE PLANTAS DE MAIZ (*Zea mayz* L.)**

**Comité de Tesis**



---

Dr. María Juliessa Ek Ramos  
Presidente



---

Dr. Ricardo Alberto Gómez Flores  
Secretario



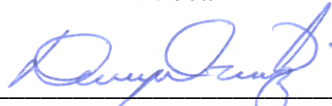
---

Dr. Patricia Tamez Guerra  
Vocal



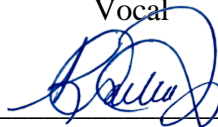
---

Dr. Efrén Ricardo Robledo Leal  
Vocal



---

Dra. Deyanira Quistán Martínez  
Vocal



---

Dra. Katiushka Arévalo Niño  
Subdirectora de posgrado



**EFFECTO DEL HONGO ENTOMOPATOGENO *Metarhizium* spp. EN EL  
CRECIMIENTO DE PLANTAS DE MAIZ (*Zea mayz* L.)**

**Dirección de tesis**



---

Dr. María Julissa Ek Ramos

Director



---

Dr. Horacio Mata Vázquez

Director externo

DERECHOS RESERVADOS©

PROHIBIDA SU REPRODUCCION TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco profundamente a CONACyT por el apoyo financiero brindado

A la Universidad Autónoma de Nuevo León, a la Facultad de Biológicas y a la Unidad de Formulación de Biológicos por las instalaciones y los recursos brindados,

A la Dra. Julissa Ek ramos por su apoyo, interés, consejos, preocupación y paciencia brindada a mi persona, también agradezco la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo.

A los miembros de mi comité por sus recomendaciones y consejos durante el trabajo, en especial a la Dra. Patricia Tamez Guerra por el espacio de trabajo en el laboratorio y el apoyo brindado

A mis compañeros del Laboratorio de Formulación de Biológicos, especialmente al Dr. Cesar Romo, el Dr. Alonso Orozco, Ricardo, Servando, Felizardo, Jesica y Angello.

A mis compañeros de generación de la maestría, tanto ellos como yo sabemos lo que es hacer un posgrado, el apoyo entre nosotros nos unió en momentos difíciles y nos sacó adelante, no solo conseguir compañeros, sino verdaderos amigos.

## **DEDICATORIAS**

A mis amigos, por sus palabras de aliento y apoyo incondicional, a los amigos que conocí en este trayecto y a los que siempre han estado ahí para apoyarme, que conozco desde niño, estoy orgulloso de ellos y sé que ellos estarán orgullosos de mí, los llevo en el corazón.

A mi familia, mis padres en especial, sin ustedes no hubiera podido sacar este trabajo adelante, así como muchas otras cosas en la vida, agradezco su apoyo incondicional y su amor, no tengo palabras para agradecerles todo lo que han hecho por mí. Los amo por siempre

A Mitzy, por apoyarme en todo momento, por siempre estar ahí conmigo en las buenas y en las malas, de igual forma, no tengo palabras para agradecer todo lo que has hecho por mí y siempre te lo agradeceré. Te amo.

## INDICE

|  |      |
|--|------|
| INDICE DE FIGURAS .....  | VI   |
| INDICE DE TABLAS.....  | VII  |
| LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS.....                                  | VIII |
| RESUMEN .....  | X    |
| SUMMARY .....  | XI   |
| INTRODUCCIÓN.....  | 1    |
| ANTECEDENTES .....   | 3    |
| Hongos endófitos.....  | 3    |
| El género <i>Metarhizium</i> .....                                     | 4    |
| <i>Metarhizium</i> como endófito .....                                 | 5    |
| Importancia y aplicación del género <i>Metarhizium</i> en México ..... | 7    |
| El maíz y su importancia en México .....                               | 8    |
| JUSTIFICACIÓN.....   | 9    |
| HIPÓTESIS.....   | 10   |
| OBJETIVO .....   | 11   |
| Objetivo general .....   | 11   |
| Objetivos específicos.....   | 11   |
| MATERIAL Y MÉTODOS .....   | 12   |

|  |           |
|--|-----------|
| Material biológico utilizado .....   | 12        |
| Crecimiento e identificación de <i>Metarhizium</i> spp.....  | 12        |
| Obtención de cultivos monospóricos.....  | 12        |
| Extracción del ADN genómico .....  | 12        |
| Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....   | 13        |
| Purificación de los productos de PCR .....   | 13        |
| Secuenciación y análisis de secuencias .....   | 14        |
| Crecimiento e inoculación de plantas de maíz .....   | 14        |
| Evaluación de los efectos de <i>Metarhizium</i> spp. en el crecimiento de plantas de maíz                            | 15        |
| Evaluación de los efectos de <i>Metarhizium</i> spp. en la tolerancia a la sequía en plantas de maíz .....           | 15        |
| Análisis estadístico .....   | 15        |
| <b>RESULTADOS</b> .....  | <b>16</b> |
| Identificación morfológica y molecular de cepas de <i>Metarhizium</i> spp.....                                       | 16        |
| Evaluación del efecto de la inoculación de <i>Metarhizium</i> spp. sobre el crecimiento de plantas de maíz. ....     | 19        |
| Evaluar el efecto de la inoculación de <i>Metarhizium</i> spp. en la tolerancia a la sequía en plantas de maíz. .... | 23        |
| <b>DISCUSIÓN</b> .....   | <b>24</b> |
| <b>CONCLUSIONES</b> .....  | <b>27</b> |
| <b>PERSPECTIVAS</b> .....  | <b>28</b> |
| <b>BIBLIOGRAFIA</b> .....  | <b>29</b> |



## INDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <i>M. anisopliae</i> (EH-473/4). .....   | 5  |
| Modelo de transferencia de nutrientes mediada por hongos .....                     | 6  |
| Crecimiento radial de las cepas de <i>Metarhizium</i> .....                        | 16 |
| Morfología microscópica de los conidios y conidióforos de <i>Metarhizium</i> ..... | 17 |
| Electroforesis en gel de agarosa 1%, amplificación de la región ITS 1-4. ....      | 18 |
| Árbol filogenético de la región ITS de la cepa MA01 y el aislado BM02. ....        | 19 |
| Efecto de los tratamientos en el peso fresco de plantas de maíz.....               | 21 |
| Efecto de los tratamientos en el peso seco de plantas de maíz. ....                | 22 |
| Porcentaje de recuperación del vigor en plantas de maíz. ....                      | 23 |

## INDICE DE TABLAS

Oligonucleótidos empleados en el trabajo..... 13

Efecto de los tratamientos en el porcentaje de germinación y altura de plantas de maíz 20

## LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

|                 |  |
|-----------------|--|
| °C              | Grados Celsius   |
| MAD2            | Proteína deficiente en detención mitótica 2                                  |
| MRT             | Transportador de rafinosa de <i>Metarhizium</i>                              |
| MrINV           | Invertasa extracelular de <i>M. robertsii</i>                                |
| ADN             | Ácido desoxirribonucleico  |
| EF-1 $\alpha$   | Factor de elongación 1 $\alpha$  |
| ITS             | Espaciador Transcrito Interno  |
| RPB1            | Subunidad mayor de la RNA-polimerasa   |
| RPB2            | Subunidad menor de la RNA-polimerasa   |
| <sup>13</sup> C | Carbono 13   |
| <sup>15</sup> N | Nitrógeno 15   |
| PDA             | Agar Papa Dextrosa   |
| NCBI            | Centro Nacional para la Información Biotecnológica                           |
| SENASICA        | Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria            |
| SAGARPA         | Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación |
| EDTA            | Ácido etilendiaminotetraacético  |
| MC              | Metilcelulosa  |
| NaCl            | Cloruro de sodio   |
| SDS             | Dodecilsulfato sodio   |
| HPLC            | Cromatografía líquida de alta eficacia                                       |
| PCR             | Reacción en cadena de la polimerasa  |
| CC              | Control negativo   |
| CMC             | Control con metilcelulosa  |
| MA01            | <i>M. anisopliae</i> cepa MA01   |
| MA01-MC         | <i>M. anisopliae</i> cepa MA01 con metilcelulosa                             |
| BM02            | <i>M. brunneum</i> cepa BM02   |

|         |  |
|---------|--|
| BM02-MC | <i>M. brunneum</i> cepa BM02 con metilcelulosa |
| PTG4    | <i>B. bassiana</i> cepa PTG4                   |
| PTG4-MC | <i>B. bassiana</i> cepa PTG4 con metilcelulosa |
| min     | minuto   |
| s       | segundo  |
| mL      | Mililitro                                      |
| M       | Masa molar                                     |
| μL      | Microlitro                                     |
| μm      | Micro molar                                    |
| V       | Volts  |
| pb      | Pares de bases                                 |
| %       | Porcentaje                                     |
| ±       | Más/menos                                      |

## RESUMEN

La importancia de la búsqueda de nuevos productos para ser aplicados a suelos y que actúen como potenciadores de crecimiento ha conducido al estudio de organismos tales como *Metarhizium* por su habilidad para colonizar raíces de plantas de interés comercial. Estudios recientes indican que también posee características de promotor de crecimiento vegetal, lo que ha orientado al estudio de los mecanismos de interacción planta-hongo, ensayos de inoculación y su efecto en distintos modelos vegetales. Las especies dentro de este género habitan el suelo como saprobios, como habitantes de la rizosfera, como endófitos y como patógenos de insectos.

En el presente trabajo se planteó evaluar el efecto de la inoculación de una cepa comercial y un aislado de *Metarhizium* spp. en semillas de maíz raza Chalqueño. Se evaluó el porcentaje de germinación, peso fresco y peso seco a los 10 días post inoculación por tratamiento de las semillas, utilizando metilcelulosa (MC) como agente adherente. También se evaluó la tolerancia a la sequía midiendo el porcentaje de recuperación del vigor 24 horas después de regar las plantas de maíz inoculadas que estuvieron previamente en sequía de 10 días. Los resultados obtenidos indican que no existe diferencia significativa en el crecimiento de las plantas de maíz entre los tratamientos con *Metarhizium* y los controles negativos, sin embargo, los resultados del ensayo de tolerancia a la sequía indican que el tratamiento con la cepa BM02 de *M. brunneum* y su tratamiento con MC confieren tolerancia a sequía (BM02 = 44.3 %, BM02-MC 54.9 %) en comparación con los controles negativos (CC = 8.1 %, CMC = 26.4 %). Este trabajo es el primero en evaluar el efecto de la inoculación de *Metarhizium* sobre la tolerancia a la sequía en semillas de maíz, por lo que se recomiendan estudios posteriores para elucidar los mecanismos fisiológicos y moleculares en la interacción *Metarhizium*-planta.

## SUMMARY

The importance of the search for new products to be applied to soils for use as growth enhancers has led to the study of organisms such as *Metarhizium* due to their characteristics of colonizing roots of plants of commercial interest. Recent studies indicate that it also has characteristics of a plant growth promoter, which has pointed to the study of plant-fungus interaction mechanisms, inoculation tests and its effect in different plant models. Species within this genus inhabit the soil as saprobes, as inhabitants of the rhizosphere, as endophytes, and as insect pathogens.

In the present work it's proposed to evaluate the effect of the inoculation of a commercial strain and an isolate of *Metarhizium* spp. in Chalqueño breed corn seeds. The germination percentage, fresh weight and dry weight were evaluated at 10 days post inoculation by seed treatments, using methylcellulose (MC) as an adherent agent, drought tolerance is also evaluated by measuring the percentage of recovery of vigor 24 hours after watering the corn plants. that were previously in a 10-day drought. The obtained results indicate that there is no significant difference in the growth of the maize plants between the treatments with *Metarhizium* and the negative controls, however, the results of the tolerance test against drought indicate that the treatment with the strain BM02 of *M. brunneum* and its treatment with MC confer tolerance to drought (BM02 = 44.3%, BM02-MC 54.9%) in comparison with negative controls (CC = 8.1%, CMC = 26.4%). This work is the first to evaluate the effect of *Metarhizium* inoculation on drought tolerance in corn seeds, for which further studies are recommended to elucidate the physiological and molecular mechanisms in the *Metarhizium*-plant interaction.

## INTRODUCCIÓN

Las plantas cotidianamente viven en sociedades con diversas comunidades microbianas, las cuales mantienen una relación estrecha donde los microorganismos desempeñan un papel importante en el crecimiento, desarrollo y protección de su hospedero (Hardoim *et al.* 2015). Los hongos considerados endófitos usualmente toman nutrientes y desempeñan un papel de protección a su hospedador, ya que pueden ser benéficos al inducir su crecimiento, aumentar la tolerancia al estrés y al producir metabolitos secundarios que confieren protección y resistencia contra agentes fitopatógenos (Sánchez *et al.* 2013).

Diversos estudios sobre hongos endófitos patógenos de insectos indican que viven dentro de los tejidos de las plantas sin causar algún síntoma adverso a su hospedero, asimismo parasitan y matan insectos considerados como plaga. Estas interacciones pueden ocurrir simultáneamente y conducir al control de plagas de importancia agrícola. Entre los hongos endófitos patógenos de insectos más estudiados se encuentran los géneros *Beauveria* y *Metarhizium* (Branine *et al.* 2019).

Para que se establezca una asociación simbiótica en plantas, como en insectos, es necesario la invasión y su posterior establecimiento en ambos organismos (Branine *et al.* 2019). El proceso de adhesión en plantas por parte de hongos del género *Metarhizium* depende de las adhesinas MAD2, posteriormente las proteasas degradan la pared celular vegetal para permitir el acceso a los tejidos, para promover una asociación mutualista con la planta proporcionando a esta Nitrógeno, que promueve crecimiento vegetal y protección ante plagas obteniendo a cambio fuentes de carbono usando un transportador de rafinosa MRT y una invertasa MrINV (Wang *et al.* 2007; Fang y St. Leger, 2010; Behie *et al.* 2012; Liao *et al.* 2013; Behie *et al.* 2014; Barelli *et al.* 2016; Moonjely *et al.* 2016).

El género *Metarhizium* habita naturalmente en suelo y algunas especies son colonizadoras de rizosfera (Brunner *et al.* 2018), estas características le han conferido un uso como agente de control biológico alrededor del mundo. Se ha reportado la exitosa aplicación de este hongo en Brasil desde la década de 1970 para control de plagas en caña de azúcar (Rangel *et al.* 2006) como son termitas, langostas, mosca pinta, gusano barrenador y para el control de los mosquitos vectores de la malaria, incluyendo sus estados larvales (Buti

*et al.* 1994). En México las especies de *Metarhizium* se han usado en cultivos de importancia agrícola como maíz, frijol, y caña de azúcar para el control del salivazo y langostas (Brunner *et al.* 2018).

Aunque el énfasis de este género es acorde como entomopatógeno, análisis filogenéticos de *Metarhizium* indican que este género es más cercanamente parecido a los géneros endosimbiontes de pastos *Claviceps* y *Ephicloë* que a patógenos de insectos, esto sugiere que *Metarhizium* pudo haber evolucionado de un linaje simbiote de plantas que posteriormente adquirió la capacidad de infectar y matar insectos como una adaptación a esta fuente de nitrógeno (Spatafora *et al.* 2007; Gao *et al.* 2011; Barelli *et al.* 2016). Estudios han demostrado la capacidad de *M. robertsii* de colonizar raíces de repollo por lo que se ha extendido el estudio a otros sistemas de plantas, otros estudios en campo usando insecticidas y *M. anisopliae* incrementó de 29% de rendimiento en comparación con un insecticida químico sin el hongo (Maniania *et al.* 2003; Kabaluk y Ericsson 2007).

El hecho de que *Metarhizium* actúe aumentando el crecimiento vegetal en presencia de insecticidas indica que no solo confiere una protección fitopatogena, por lo tanto, se ha impulsado su investigación para la búsqueda de alternativas a fertilizantes químicos que potencien el crecimiento vegetal, y que además tengan como valor agregado el ser entomopatógenos. Este tipo de productos tendrían múltiples ventajas incluyendo la disminución del impacto ambiental en comparación con los insecticidas químicos. Por lo tanto, se considera *Metarhizium* como un buen modelo a estudiar debido a la diversidad de cepas existentes en México. Para lograrlo en este trabajo se realizó una identificación morfológica y molecular de un aislado de *Metarhizium* de la región cañera de El Mante, Tamaulipas, y, de una cepa comercial. Se determinó la promoción de crecimiento vegetal del aislado y la cepa comercial, en un modelo de maíz (*Z. mays* L.) *in vitro*. Los resultados obtenidos podrían ayudar a comprender la posible interacción mutualista hongo-planta que puedan ser útiles en investigaciones básicas y aplicadas futuras.



## ANTECEDENTES

Los hongos en general son organismos de importancia a nivel mundial por su amplio uso en el sector salud, biotecnológico, económico, alimenticio, industrial, etc. En un ámbito agronómico ecológico, influyen en la disponibilidad de nutrientes ya sea como saprobios o colonizando raíces de plantas. Por lo que se ha tenido una especial atención en la búsqueda de hongos que puedan ser benéficos en su aplicación en cultivos o que no tengan un impacto negativo, como sus contrapartes químicas comerciales.

### **Hongos endófitos**

Comúnmente se confiere el término de endófitos a aquellos organismos que colonizan plantas y que no representan un impacto negativo en su hospedador, Anton de Bary fue el primero en adjudicar el término “epifito” a hongos que viven en la superficie de su hospedador y el término “endófito” a aquellos que habitan dentro de las plantas (De Bary 1866). Aunque posteriormente el término también se les adjudicó a bacterias y no específicamente a hongos.

La mayoría de las asociaciones fúngicas endófitas son atribuidas a la división Ascomycota. Los hongos endófitos se han clasificado como Clavicipitáceos y No Clavicipitáceos de acuerdo con diferencias de sus características taxonómicas, funciones ecológicas y relación evolutiva (Clay y Schardl 2002).

Existen hongos endófitos que tienen la capacidad de incrementar el crecimiento en plantas, a los cuales se les conoce como hongos potenciadores de crecimiento vegetal, poseyendo la capacidad de incrementar la disponibilidad de nutrientes ayudando indirectamente al rendimiento de los cultivos, por lo que un enfoque de los endófitos es promover el crecimiento vegetal y actuar como control biológico contra plagas. De igual manera, se han documentado múltiples mecanismos de potenciación de crecimiento, tales como crecimiento directo mediante la solubilización de nutrientes minerales inmovilizados, fijación de nitrógeno, producción de fitohormonas tales como auxinas, citoquinas y giberelinas, oxidación de sulfuro y producción de compuestos volátiles que estimulan el crecimiento como la acetona o 2,3-butanodiol (Grayston *et al.* 1990; Ryu *et al.* 2003).

De esta manera, se ha incrementado el interés en el uso de microorganismos que mejoren la productividad y salud de cultivos, de modo que se han implementado en una gran variedad de sistemas, como parte de gestión de productividad y manejo integral de plagas. Tal es el caso de *Metarhizium*, el cual ha sido objeto de estudio por su acción patógena ante insectos plagas en cultivos de importancia económica.

### **El género *Metarhizium***

*Metarhizium* es un género de hongos ascomicetos distribuido mundialmente encontrándose como saprófito en suelos y como endófito en la rizosfera. Fue descrito inicialmente como *Entomophthora anisopliae* hasta que en 1880 fue renombrado como *Isaria destructor*, posteriormente Sorokin propuso el nombre genérico *Metarhizium*. Inicialmente se clasificó de manera tradicional mediante características morfológicas, pero análisis fisiológicos, moleculares y filogenéticos permitieron la distinción de especies crípticas o diferentes variantes dentro del género (Brunner *et al.* 2018).

*Metarhizium* presenta conidióforos ramificados, aunque simples en algunas especies. Por lo general presenta dos o tres ramificaciones en cada septo. Los conidios presentan una variedad de coloraciones que van desde hialinos hasta marrones, verdes u oliva; en ocasiones llegan a formar cadenas. Las colonias en medio PDA forman micelio con borde blanco y grupos de conidióforos que se tornan a medida que el cultivo envejece, a una coloración verdosa con múltiples tonalidades, desde marrón oscuro hasta verde olivo y su revés es incoloro (Kepler *et al.* 2014).

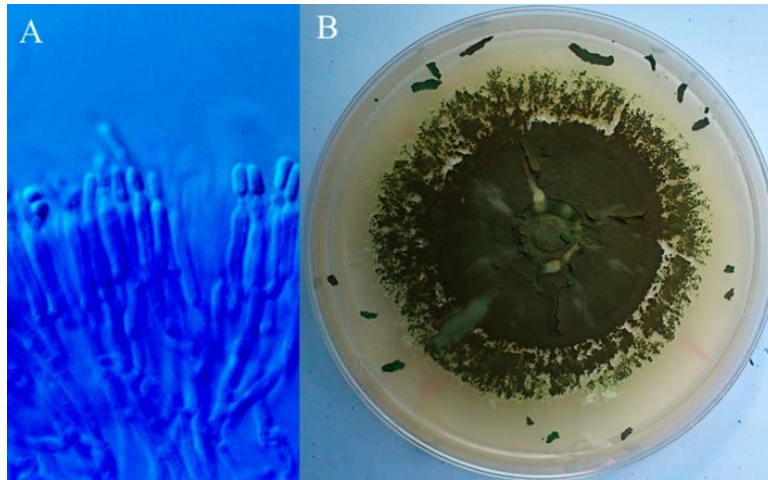


Figura 1: *M. anisopliae* (EH-473/4). A. Conidios, fotografía tomada de Brunner *et al.* (2018); B Colonia madura (9 días) en agar papa dextrosa a 28°C, fotografía tomada de Brunner *et al.* (2018).

### ***Metarhizium* como endófito**

El primer reporte demostrando la colonización de raíces por parte de *Metarhizium* fue el realizado por Hu y St. Leger (2002) utilizando una cepa que expresa la proteína verde fluorescente (GFP) como marcador molecular aplicada a un campo de repollo. A partir de ahí se han realizado trabajos para evaluar su efecto en el crecimiento de otras especies de plantas, por ejemplo, se ha demostrado que las raíces de plantas de uva inoculadas con este hongo fueron colonizadas y capaces de controlar plagas del gorgojo de la vid negra. (Hu y St. Leger 2002).

Otros estudios realizados usando *Metarhizium* como endófito fue el realizado por Jaber y Enkerli (2016) utilizando frijol como modelo indicando colonización por parte del hongo mostrando una relación en el tiempo de duración del inóculo con respecto al porcentaje de colonización en la planta, por su parte, García *et al.* (2011) reportaron un incremento en el crecimiento y el peso de plantas de tomate tratadas con *M. anisopliae*. Así mismo, Ahmed *et al.* (2020) indicaron resultados que muestran efectos positivos en el crecimiento de plantas de maíz.

Estudios enfocados al flujo de nutrientes a través de un sistema *Metarhizium*-planta han mostrado la transferencia de nitrógeno hacia las raíces rastreando  $^{15}\text{N}$  y  $^{13}\text{C}$  en *M. robertsii* desde insectos como sustrato y dentro de plantas, demostrando que el nitrógeno obtenido

de los insectos se transfiere a la planta solo cuando el hongo está presente y este obtiene fuentes de carbono fúngicas a cambio (Behie *et al.* 2012). Desde entonces, se han reportado especies como *M. guizhouense*, *M. brunneum*, *M. flavoviridae*, *M. acridum* con la misma capacidad de transferir nitrógeno proveniente de insectos muertos. y más recientemente *M. marquandii* (Behie y Bidochka 2014; Baron *et al.* 2020).

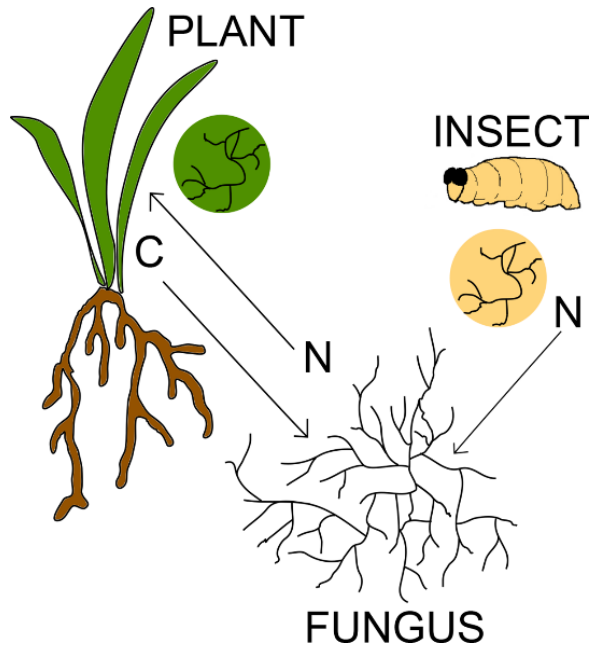


Figura 2: Modelo de transferencia de nutrientes mediada por hongos: interacciones tripartitas entre plantas, insectos y hongos endófitos patógenos de insectos. Imagen tomada de Branine *et al.* (2019).

Además del transporte de nitrógeno, se ha reportado que *Metarhizium* posee capacidad de solubilizar fósforo proveniente de fosfatos insolubles del suelo, así mismo, también se ha detectado la capacidad de producción de ácido indolacético (Baron *et al.* 2020; Liao *et al.* 2017).

Otros estudios realizados indican que *Metarhizium* actúa como antagonista contra patógenos de plantas, un estudio realizado por Sasan y Bidochka (2013) indica que plantas de frijol colonizadas por *M. robertsii* presentaron un crecimiento más saludable menos síntomas de enfermedad causado por una exposición posterior a *Fusarium solani*, además ensayos *in vitro* muestran resultados que indican este hongo como antagonista contra el

género *Fusarium*. Así mismo, Jaber (2018) reportó que semillas de trigo tratadas con *M. brunneum* mostraban una menor incidencia a síntomas de enfermedad causada por *F. culmorum*.

Estudios relevantes acerca de la interacción *Metarhizium*-planta han revelado mecanismos moleculares por los cuales se llevan a cabo este tipo de interacciones indicando el uso de adhesinas MAD2, transportadores de rafinosa MRT e invertasas MrINV (Liao *et al.* 2014), para complementar esto Liao *et al.* (2014) probaron mutantes  $\Delta mad2$  y  $\Delta mrt$  de *M. robertsii* en semillas de maíz encontrando que las cepas  $\Delta mad2$  no colonizaron las plantas de maíz debido a la incapacidad de adherirse a la planta. Esto resultó en una baja del crecimiento vegetal lo que sugiere que la colonización fue un requisito previo a la estimulación del crecimiento.

### **Importancia y aplicación del género *Metarhizium* en México**

*Metarhizium* ha sido aplicado principalmente en campañas de control de insectos plaga por parte del Servicio Nacional de Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) y la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER). En el 2017, se reportó que aproximadamente 41,689ha fueron tratadas con *M. acridum* para el control de especies de langosta y saltamontes en múltiples estados de México (SENASICA, 2017).

Existen diversos productos comerciales a base de *Metarhizium* (tales como Bio-blast para el control de termitas y cucarachas; Meta-Sin para el control de plagas caseras; Fitosan-M para el control de chapulines) y se han reportado aproximadamente 31 laboratorios en México que producen cepas de *Metarhizium* para su comercialización (Tamez *et al.* 2001; Brunner *et al.* 2018).

Considerando el carácter endófito de *Metarhizium* se han realizado estudios de diversidad y genética de poblaciones en suelos agrícolas de México, utilizando marcadores moleculares tales como el factor de elongación-1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ), regiones ITS, y  $\beta$ -tubulina, que permitan discriminar entre especies. Es de interés mencionar que se han realizado estudios sobre el aislamiento de *Metarhizium* con potencial endófito sobre plantas de maíz, tomate, frijol, caña de azúcar entre otras, en los estados de Colima, Guanajuato, Tamaulipas, San Luis Potosí, y Tabasco (Barrientos y Almaguer 2009).

## **El maíz y su importancia en México**

El maíz (*Z. mays*) es una planta monocotiledónea perteneciente a la familia de las gramíneas de importancia mundial puesto que está implicado en la alimentación humana, ganadera y es una materia básica importante en la industria. Las etapas de crecimiento del maíz se pueden dividir en las etapas vegetativa y reproductiva, a su vez, las etapas de crecimiento se pueden agrupar en cuatro periodos; crecimiento de plántulas, crecimiento vegetativo, floración y fecundación, y por último una etapa de llenado de grano y madurez, con duración de ciclo de 120 días aproximadamente en promedio, en regiones con temperaturas mínimas y máximas de entre 22°C a 33°C. (Tovar y Colonia 2013; Massieu y Lechuga 2002).

En México se registran 59 variedades criollas de maíz y principalmente se produce el maíz blanco y maíz amarillo, además, gran parte del territorio nacional es propicio para su producción. En 2017 se registró una producción de 27.8 millones de toneladas, ocupando el 8vo lugar en producción de maíz a nivel mundial. Los principales estados productores son Sinaloa (22%), Jalisco (14%), Estado de México (8%), Michoacán (7%) y Guanajuato (6%) (ASERCA, 2018). Además, se han realizado estudios genéticos para el mejoramiento del maíz en las razas Tuxpeño, Chalqueño, Cónico norteño y Celaya por parte del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Forestales y Pecuarias. Estos maíces modificados ocupan el 20% de la superficie total sembrada de maíz (Pinedo *et al.* 2009; SIAP 2011).

## JUSTIFICACIÓN

*Metarhizium* es un género perteneciente a la división Ascomycota que se caracteriza por ser un hongo entomopatógeno de importancia agrícola. Se encuentra comúnmente en suelos y rizosfera en asociación con plantas, y el hecho de que estudios recientes apuntan la orientación de este género como potenciador de crecimiento, junto con su capacidad entomopatógena, ha propiciado interés en su desarrollo como producto comercial por el bajo impacto ambiental y a la salud que este implica. Los productos comerciales a base de este hongo tendrían una amplia gama de efectos contra insectos, facilidad de inoculación y amplio rango de plantas hospederas.

Por otra parte, el maíz es un cultivo de gran importancia en ámbitos culturales, alimenticios y económicos en México, dicho cultivo representa aproximadamente el 50% de la superficie cultivada, y se estima un consumo anual de 192kg por persona.

Por lo tanto, se considera *Metarhizium* como un buen modelo a estudiar debido a la diversidad de cepas existentes en México que posiblemente estarían adaptadas a las condiciones ambientales y geográficas de los diversos cultivos y a su aplicación en el cultivo de maíz, que es de alta importancia alimenticia y económica en México.

## **HIPÓTESIS**

El género *Metarhizium* spp. provocará efectos positivos sobre el crecimiento vegetal de plantas de maíz (*Z. mays* L.) debido a sus propiedades como endófito y entomopatógeno, así como inducirá la tolerancia a la sequía en plantas inoculadas.



## OBJETIVO

### Objetivo general

- Evaluar el efecto de aislados de *Metarhizium* spp. como potenciador de crecimiento sobre plantas de maíz (*Z. mays* L.).

### Objetivos específicos

- Identificación morfológica y molecular de un aislado y una cepa comercial de *Metarhizium* spp.
- Evaluar el efecto de la inoculación de *Metarhizium* spp. sobre el crecimiento de plantas de maíz.
- Evaluar el efecto de la inoculación de *Metarhizium* spp. en la tolerancia a la sequía en plantas de maíz.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Material biológico utilizado

Para los modelos experimentales se usaron plantas de maíz raza Chalqueño (*Z. mays* L.), un aislado de *Metarhizium* spp. brindado por la Unidad Académica Multidisciplinaria Mante y una cepa comercial de *M. anisopliae* (Metabioss®).

El cultivo *in vivo* de las plantas de maíz y extracción de ADN genómico de *Metarhizium* spp. se realizaron en el Laboratorio de Formulación de Biológicos de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

### Crecimiento e identificación de *Metarhizium* spp.

Los hongos se sembraron en medio PDA (TM Media) e incubaron durante un periodo de 20 a 25 días a  $25\text{ °C} \pm 2.0\text{ °C}$  con luz natural hasta la observación morfológica típica del género (colonias color verde con consistencia terrosa, conidios ovals cilíndricos). Para la preparación del medio se pesaron 39 g de medio PDA y se diluyó en 1 L de agua destilada con ayuda de un agitador magnético, posteriormente se esterilizó en autoclave a  $121\text{ °C}$  durante 20 min a 20 psi.

### Obtención de cultivos monospóricos

Se tomó una muestra de conidios de la cepa aislada con un asa bacteriológica estéril y se colocó en tubos Eppendorf con 1 mL de Tween-80 al 0.1 %, posteriormente se realizó una cuenta de conidios en hemocitometro; se ajustó la concentración de conidios a 100 conidios/mL; por último, se tomaron 100  $\mu\text{L}$  de la solución y se sembró en medio PDA previamente esterilizado para su posterior inoculación e incubación a  $25\text{ °C} \pm 2.0\text{ °C}$  hasta la observación de colonias. Posteriormente se cortaron trozos de las colonias con un bisturí estéril y se depositó en tubos Eppendorf de 2 mL con 1 mL de glicerol al 40 % para su almacenamiento a  $-70\text{ °C}$ .

### Extracción del ADN genómico

Las cepas de *Metarhizium* se cultivaron en medio PDA durante 15 días a  $25\text{ °C}$ , posteriormente se tomó una fracción del micelio y se colocó en un tubo cónico de 1.5 mL de capacidad. Se lavó por duplicado con TE 1X. Después se añadió 250  $\mu\text{L}$  de buffer de

lisis (200 mM Tris pH8.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS) y se maceró con ayuda de un pistilo estéril. Se agregaron nuevamente 250  $\mu$ L de buffer de lisis y 500  $\mu$ L de fenol cloroformo isoamílico (25:24:1). Por último, el ADN se precipitó con acetato de sodio (3 M, pH 7) e isopropanol para después realizarse un lavado con etanol al 70% frío y resuspenderlo en buffer TE 1X.

### **Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Para la amplificación de las regiones ITS (580 pb aproximadamente) se usó la siguiente mezcla de reacción; 1 $\mu$ L de DNA genómico, 1  $\mu$ L del oligo forward ITS-1, 1  $\mu$ L del oligo reverse ITS-4, 15  $\mu$ L de DNA taq polimerasa (Sigma-Aldrich) y 13  $\mu$ L de agua grado HPLC para completar un volumen de 30  $\mu$ L. La mezcla se sometió a las siguientes condiciones en un termociclador modelo MaxyGene Thermal Cycler II (Axygene®): Desnaturalización a 95 °C por un minuto, durante 32 ciclos en el siguiente programa; 95 °C por 20 s, 1 min de alineamiento a 52 °C y una extensión durante 1 min a 72 °C, y finalmente extensión final a 72 °C durante 3 minutos.

Tabla 1: Oligonucleótidos empleados en el trabajo.

| Nombre | Descripción  | Secuencia            |
|--------|--|----------------------|
| ITS-1  | Primer forward para amplificar un fragmento de la región ITS de 580 pb aproximadamente | TCCGTAGGTGAACCTGCGG  |
| ITS-4  | Primer reverse para amplificar un fragmento de la región ITS de 580 pb aproximadamente | TCCTCCGCTTATTGATATGC |

### **Purificación de los productos de PCR**

Previo a la purificación, se comprobó la presencia y tamaño del producto de PCR mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1%, tomando una alícuota de los productos de PCR a 100V durante 45 min y observado en un transiluminador Safe Image (Invitrogen). Una vez observado los productos de PCR, se purificaron los productos de PCR usando el kit

comercial de purificación de ácidos nucleicos SureClean Plus (Bioline) siguiendo las instrucciones de fabricante.

### **Secuenciación y análisis de secuencias**

La secuenciación de los productos obtenidos se enviaron para su análisis a la empresa Laboratorios de Servicios Genómicos LABSERGEN.

El análisis de secuencias se realizó mediante la herramienta BLASTn del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI).

### **Crecimiento e inoculación de plantas de maíz**

Se utilizaron semillas de maíz raza Chalqueño plantadas en bandejas de germinación, como inóculo de siembra se usó un sustrato comercial (Happy flower) previamente esterilizado en autoclave a 121 °C a 15 psi durante 15 min.

Los aislados de *Metarhizium* se inocularon en cajas Petri con medio PDA previamente esterilizado e incubaron a temperatura ambiente durante 15 a 20 días hasta la producción de conidios. Se usó metilcelulosa para la adherencia de los conidios a las semillas a una concentración final de 2%. Para su preparación se disolvió metilcelulosa en agua destilada estéril (a 35-40 °C) para pre-gelatinizar y luego se colocó en refrigeración para la formación de un gel fluido y homogéneo. Posteriormente se mezcló la suspensión de conidios con el gel de metilcelulosa a temperatura ambiente hasta obtener una suspensión homogénea. La inoculación de las semillas se realizó antes de ser sembradas, sumergiendo las semillas en la suspensión de conidios con el adherente en frascos de vidrio de 125 mL estériles, posteriormente se agitaron durante 2 min, después se dejaron secar a temperatura ambiente en papel secante estéril para su posterior siembra. Como tratamientos se utilizó una suspensión de conidios a una concentración final de  $1 \times 10^6$  conidios/mL que se ajustó realizando un conteo de conidios en hemocitometro. Como control negativo se usó una solución de Tween-80 0.1% y como control positivo se utilizó *B. bassiana* PTG4. Todos los tratamientos se realizaron cada uno con y sin metilcelulosa.

### **Evaluación de los efectos de *Metarhizium* spp. en el crecimiento de plantas de maíz**

Se evaluó el porcentaje de germinación de las plantas a los 7 días post siembra. Posterior a esto, las plantas fueron retiradas de la bandeja de germinación y lavadas con agua corriente para eliminar el sustrato de las plantas, posteriormente se secaron con papel estéril y se procedió a la medición de la altura, determinación del peso fresco, peso seco. El peso seco se determinó colocando las plantas en un horno a 80 °C y tomando lectura del peso hasta obtener un valor constante.

### **Evaluación de los efectos de *Metarhizium* spp. en la tolerancia a la sequía en plantas de maíz**

Después de 10 días de germinación, las semillas se dejaron por otros 10 días sin agua, en el 11vo día, las plantas fueron regadas y colocadas en cámara de crecimiento a 25 °C ± 2.0 °C durante 24 horas para la observación de la recuperación del vigor.

### **Análisis estadístico**

Los datos obtenidos se analizaron en el programa SPSS Statistics v24 con el que se realizó una prueba de Kruskal-Wallis para la determinación de la distribución de los datos, y posteriormente un análisis Post Hoc mediante la prueba de Dunn ( $\alpha$  0.05). Para la prueba de tolerancia a la sequía se realizó un ANOVA de una vía, posteriormente un análisis Post Hoc mediante la prueba de Duncan ( $\alpha$  0.05).

## RESULTADOS

### Identificación morfológica y molecular de cepas de *Metarhizium* spp.

Para la caracterización morfológica del material biológico usado en el presente trabajo, se realizó una siembra de conidios de la cepa comercial de *M. anisopliae* (Metabioss®) a la cual se le designó el código MA01, por su parte, el aislado brindado amablemente por la Dra. Reyna Ivonne Torres Acosta de la Universidad Autónoma de Tamaulipas, identificado como *Metarhizium* spp., se le realizó una resiembra como se menciona en el apartado de Materiales y métodos, y se le designó el código BM02. Las muestras se dejaron en incubación a 25 °C durante por lo menos 15 días en medio PDA para la observación morfológica colonial. La figura 3 muestra las características morfológicas de las cepas utilizadas.

La cepa MA01 mostró características morfológicas típicas del género *Metarhizium*; crecimiento inicial micelar de color blanco, posteriormente una producción de conidios de coloración verde oscuro, de aspecto terroso, revés incoloro. Además, se observó una abundante producción de conidios. Por otro lado, la cepa BM02 inicia con un crecimiento micelar blanquecino que posteriormente se torna amarillento, la producción de conidios fue baja en comparación con la cepa MA01 y de igual forma, el revés de la colonia fue incoloro. Como observación, a mayor temperatura de incubación (30-33 °C) la coloración de las colonias de ambas cepas se tornó más amarilla.

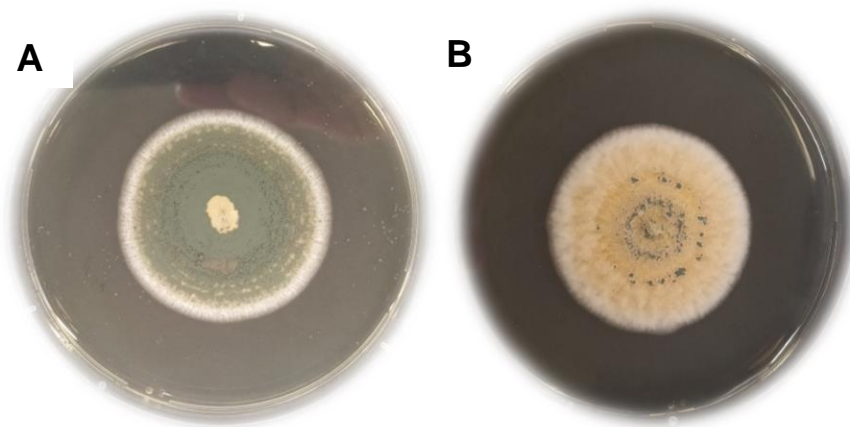


Figura 3: Crecimiento radial de las cepas de *Metarhizium*. A) *M. anisopliae* MA01, B) *Metarhizium* spp. BM02

La morfología microscópica de ambas cepas obtenidas a partir de un micro cultivo en medio PDA, son características del género *Metarhizium*. Se observaron conidios ovales o cilíndricos de coloración verdoso, a menudo formando cadenas, las hifas eran hialinas y sin septo. Los conidióforos eran irregulares y se presentaban con ramificaciones en 3 (Figura 4).

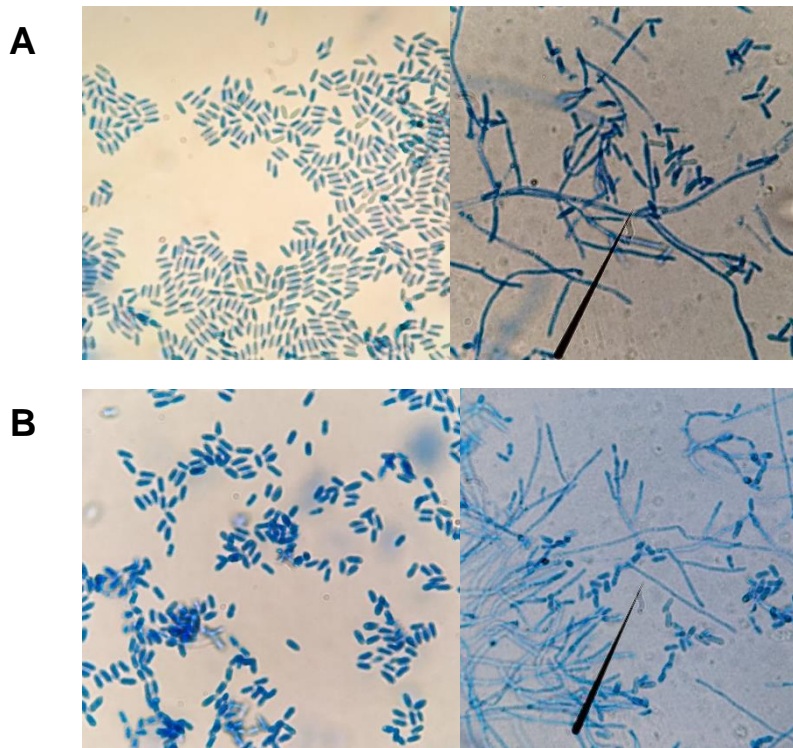


Figura 4: Morfología microscópica de los conidios y conidióforos de *Metarhizium*. A) *M. anisopliae* MA01, B) *Metarhizium* spp. BM02.

En el caso de existir diferencias morfológicas entre especies del género *Metarhizium*, se recomienda realizar análisis moleculares para la diferenciación y correcta identificación de las cepas utilizadas, por lo que se realizó un análisis molecular utilizando la región ITS 1-4 para la discriminación entre especies,

En la figura 5 se muestra un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio en donde se observan las muestras con los amplicones obtenidos como productos de PCR, teniendo un tamaño aproximado de 580 pb.

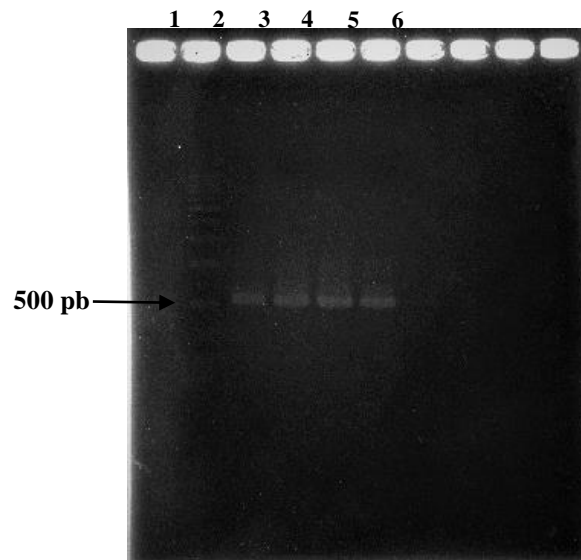


Figura 5: Electroforesis en gel de agarosa 1%, amplificación de la región ITS 1-4. 1) Control negativo, 2) Marcador de tamaño molecular, 3) y 4) MA01, 5) y 6) BM02.

Al analizar los resultados obtenidos de la secuenciación en la herramienta BLASTn del NCBI, el aislado BM02 obtuvo un 98.23% de identidad y una cobertura del 100% con la cepa C1 de *M. anisopliae* (ID de acceso KX809520.1), por el otro lado, la cepa comercial MA01 obtuvo un 98.03% y un 97.84% de identidad con la cepa CBS 316.51 de *M. brunneum* y la cepa ARSEF 2575 de *M. robertsii*. El análisis filogenético realizado indica que la cepa comercial MA01 y el aislado BM02 muestran un alto nivel de homología con *M. brunneum* por lo que se puede inferir que ambas cepas pertenecen a esta especie, el nivel de bootstrap utilizado fue de 2000 confirmando un soporte alto de confiabilidad al análisis realizado.



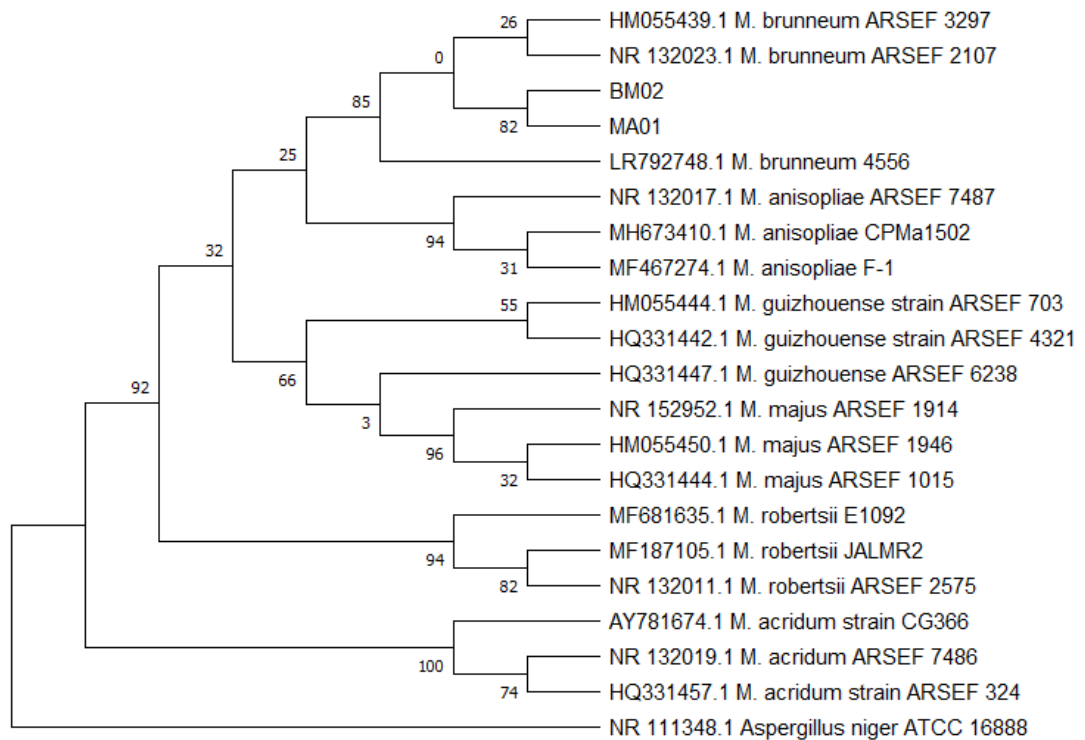


Figura 6: Árbol filogenético de la región ITS de la cepa MA01 y el aislado BM02. Los valores entre las diagonales representan el valor de porcentaje de Bootstrap de máxima verosimilitud.

### **Evaluación del efecto de la inoculación de *Metarhizium* spp. sobre el crecimiento de plantas de maíz**

Para evaluar el efecto de la interacción de *Metarhizium* spp. en plantas de maíz, se inocularon semillas de maíz con la cepa comercial *M. anisopliae* (Metabioss) M1, el aislado de *Metarhizium* spp. BM02, un control positivo utilizando *B. bassiana* PTG4 y un control negativo usando Tween 20 0.1 %. También se evalúa el uso de metilcelulosa como un medio de adhesión de los conidios por lo que cada tratamiento se realizó con, y sin el adherente.

Los efectos del tratamiento con las cepas de *Metarhizium* en el porcentaje de germinación no mostraron diferencia significativa con respecto al control negativo (Tabla 2), también se muestra una tendencia en que el uso de metilcelulosa tiene un efecto positivo sobre el porcentaje de germinación. De igual manera, con respecto a la altura, el análisis estadístico indica que tampoco existe diferencia significativa entre los tratamientos con *Metarhizium*

con respecto al control negativo, sin embargo, se observa una tendencia a una mayor altura en los tratamientos con *Metarhizium*. El mayor valor obtenido en cuanto a la altura entre los tratamientos con *Metarhizium*, se obtuvo utilizando la cepa BM02 (Tabla 2).

Tabla 2: Efecto de los tratamientos en el porcentaje de germinación y altura de plantas de maíz. Análisis Post Hoc fue realizado mediante la prueba de Dunn ( $\alpha$  0.05) posterior a la prueba de Kruskal-Wallis. Letras similares indican que no hay diferencia significativa.

| Tratamiento | Porcentaje de germinación | Altura (cm)   |
|-------------|---------------------------|---------------|
| CC          | 41%±0.49 a                | 18.48±5.84 a  |
| CC-MC       | 52%±0.52 a                | 19.20±6.05 a  |
| MA01        | 49%±0.50 a                | 21.24±6.8 ab  |
| MA01-MC     | 50%±0.50 a                | 20.36±5.8 a   |
| BM02        | 44%±0.49 a                | 22.13±5.23 ab |
| BM02-MC     | 55%±0.50 a                | 21.69±6.86 ab |
| PTG4        | 46%±0.50 a                | 24.8±5.11 c   |
| PTG4-MC     | 59%±0.49 a                | 24.59±6.63 c  |

En relación con los resultados obtenidos del peso fresco, el análisis estadístico indicó que, de igual manera, no existe diferencia significativa entre los tratamientos con *Metarhizium* y el control negativo, no así para el control positivo tanto para el peso fresco del tallo, como para el de la raíz. Los tratamientos BM02 y BM02-MC fueron los que mostraron un mayor peso fresco tanto en raíces como en tallo, a pesar de que estadísticamente no existieron diferencias significativas, también se observó una tendencia positiva al usar *Metarhizium* como tratamiento ya que la media de los tratamientos con *Metarhizium* fue mayor a la de los controles negativos. También se observó que la cepa MA01 tiende a un mejor rendimiento cuando se utiliza en conjunto con el adherente (Figura 6).

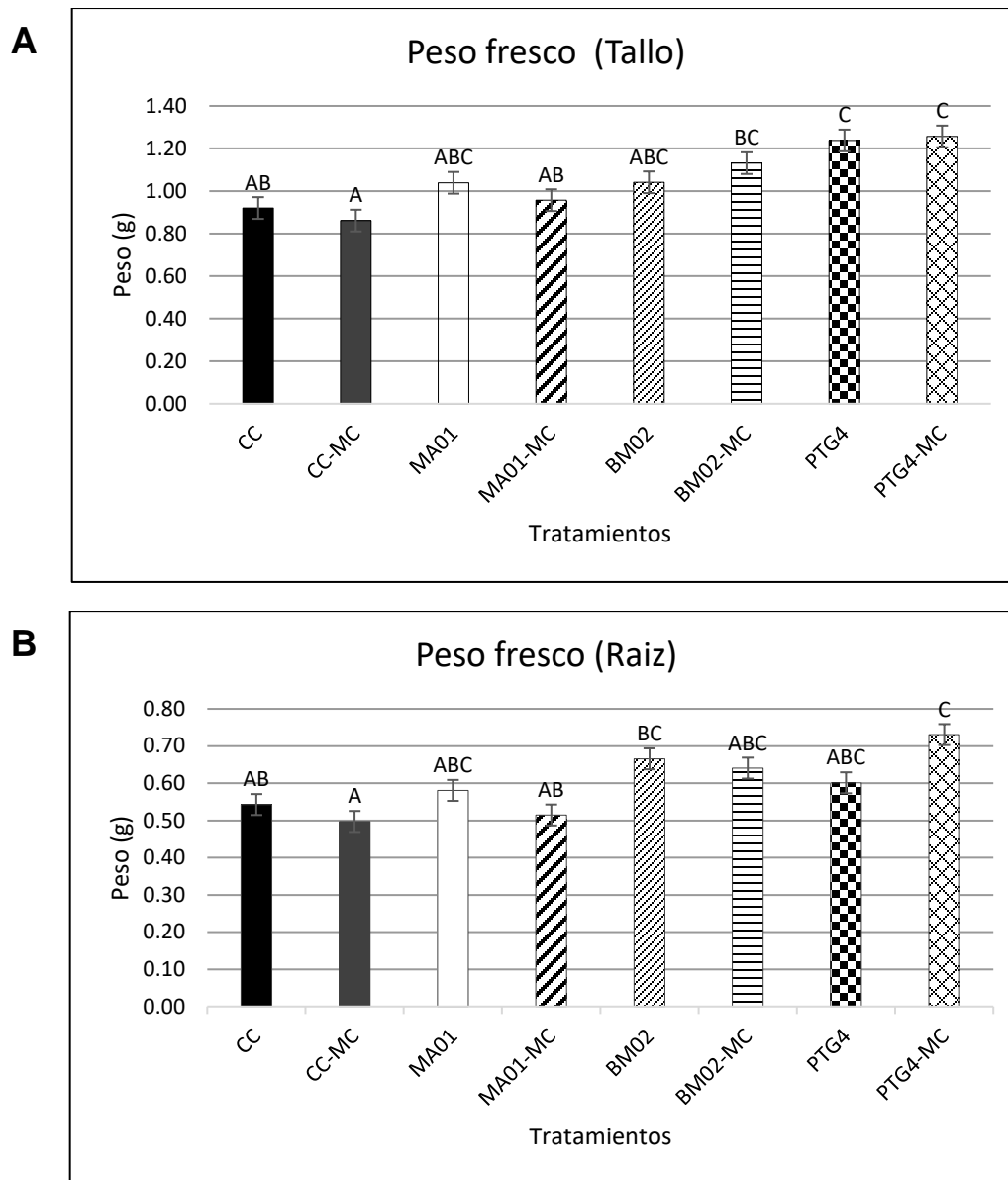


Figura 7: Efecto de los tratamientos en el peso fresco de plantas de maíz. A) Peso fresco del tallo, B) peso fresco de la raíz. Barras de error estándar mostradas en el gráfico. Análisis Post Hoc fue realizado mediante la prueba de Dunn ( $\alpha$  0.05) posterior a la prueba de Kruskal-Wallis. Barras gráficas con mismas letras muestran que no hay diferencia significativa.

En relación con el peso seco, este sirve como medida del incremento de la biomasa real de la planta al eliminar el contenido de agua presente en ella, por lo que se determinó este valor para evaluar si existía efecto directo en el crecimiento de las plantas. De igual forma, el análisis estadístico indicó que no existe diferencia significativa entre los tratamientos y

el control negativo. Si bien no existió diferencia ni tendencia con respecto al control, al no haber diferencia en el peso seco y al existir una mayor tendencia en el peso fresco, esto indica que, si bien los tratamientos con *Metarhizium* no tuvieron efecto sobre la biomasa de la planta, si existe un efecto en la absorción de agua, por lo que se procedió a realizar un ensayo de tolerancia a la sequía utilizando la cepa BM02, la cual obtuvo un mejor rendimiento en el peso fresco.

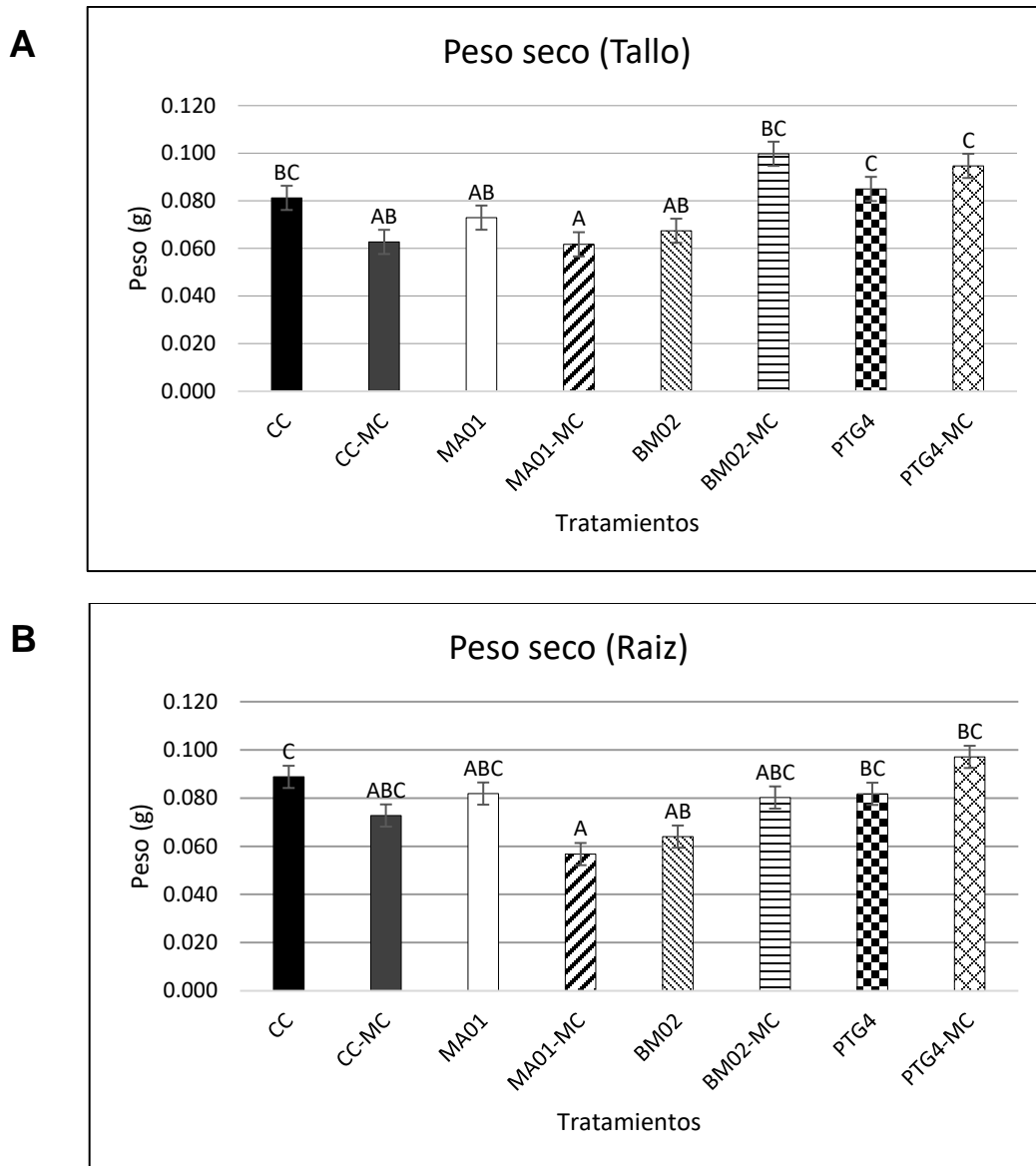


Figura 8: Efecto de los tratamientos en el peso seco de plantas de maíz. A) Peso seco del tallo, B) Peso seco de la raíz. Barras de error estándar mostradas en el gráfico. Análisis Post Hoc fue realizado mediante la prueba de Dunn ( $\alpha$  0.05) posterior a la prueba de Kruskal-Wallis. Barras gráficas con mismas letras muestran que no hay diferencia significativa.

## Evaluar el efecto de la inoculación de *Metarhizium* spp. en la tolerancia a la sequía en plantas de maíz

En adición a la evaluación del efecto de los tratamientos con *Metarhizium* en plantas de maíz, también se decidió realizar un ensayo de tolerancia a la sequía, por lo que se determinó el porcentaje de recuperación del vigor después de 10 días de sequía en plantas con 14 días de germinación. Los resultados indicaron diferencia significativa entre los tratamientos con *Metarhizium* BM02 (44.3 %) y BM02-MC (54.9 %) con respecto a los controles negativos que obtuvieron un 8.1 % (CC) y un 26.4 % (CC-MC). También se observó que el tratamiento BM02-MC obtuvo diferencia significativa con respecto a los controles positivos; PTG4 (35.4 %) y PTG4-MC (50 %). Como observación, es importante señalar que el estudio fue realizado a una temperatura de 25 °C, aunque variaciones en la temperatura llegaban a rangos de entre 29-32 °C. Estos resultados sugieren que el tratamiento BM02 y su correspondiente con metilcelulosa (BM02-MC) confieren una tolerancia significativa a la sequía.

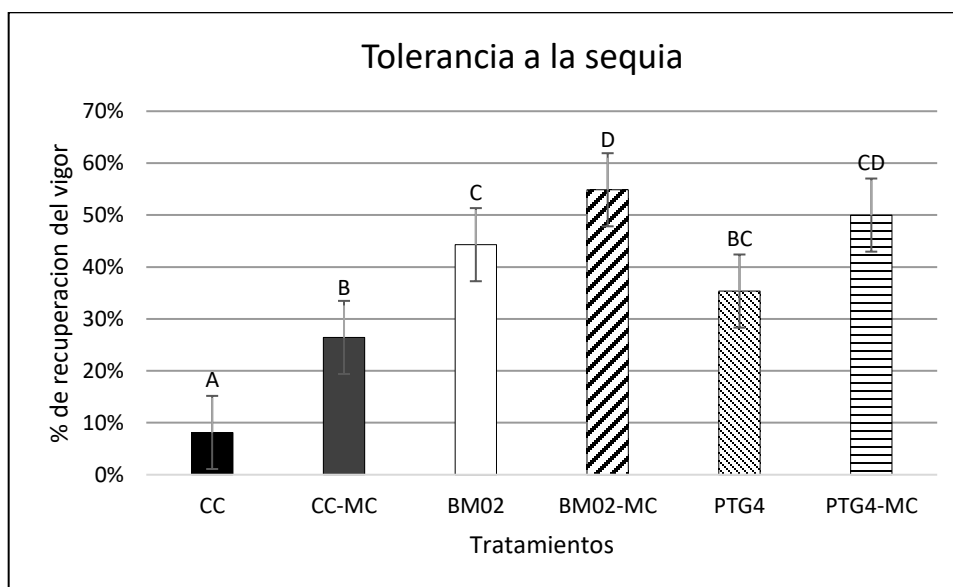


Figura 9: Porcentaje de recuperación del vigor en plantas de maíz. Barras de error estándar mostradas en el gráfico. Análisis Post Hoc fue realizado mediante la prueba de Duncan ( $\alpha$  0.05) posterior al análisis de varianza ANOVA de una vía. Barras gráficas con mismas letras muestran que no hay diferencia significativa.

## DISCUSIÓN

Los microorganismos endófitos han sido objeto de estudio en los últimos años debido a su gran impacto ambiental como alternativa al uso de fertilizantes químicos, teniendo un efecto potenciador en el crecimiento de plantas, promoviendo la resistencia vegetal ante patógenos o distintos tipos de estrés al afectar la expresión de genes de defensa o promoviendo cambios fisiológicos dentro de la planta, o al secretar metabolitos secundarios que puedan promover alguno de estos efectos ya mencionados (Khare *et al.* 2018). El estudio de hongos endófitos ha mostrado su capacidad de colonizar plantas como endófitos sin causar alguna patología aparente, entre algunas especies de importancia se encuentran *B. bassiana* y especies del género *Metarhizium* (Vidal S, y Jaber JR 2015).

El género *Metarhizium* está distribuido mundialmente como agente de control biológico y es uno de los hongos entomopatógenos de mayor importancia en México. La asociación de este hongo con las plantas y capacidad entomopatógena le confiere un rol ecológico por la interacción tripartita que este cumple mediante la transferencia de nutrientes (Branine *et al.* 2019; Behie *et al.* 2017; Behie *et al.* 2014).

Las especies dentro del género *Metarhizium* inicialmente se clasificaron en base a su morfología, microscópicamente de acuerdo con la forma en que los conidios pueden diferir entre especies y sus correspondientes variedades, los conidios de *M. anisopliae* var. *anisopliae* son rectos y pequeños en comparación con los conidios de *M. anisopliae* var. *majus* que pueden medir por encima de 18  $\mu\text{m}$ . Sin embargo, es importante la inclusión del análisis filogenético de las regiones ITS y más recientemente EF-1a, RPB1, RPB2 y  $\beta$ -tubulina para la correcta identificación de especies o incluso de distintas cepas entre especies (Brunner *et al.* 2019; Shrivastava *et al.* s.f.). Los resultados obtenidos del análisis filogenético de la región ITS de la cepa comercial MA01 y el aislado BM02 mostraron una alta homología con la especie *M. brunneum*, en contraste con estudios de diversidad de especies de *Metarhizium* realizados en México, estos indican la ausencia de aislamiento de *M. brunneum*, en contraparte encontrando en mayor abundancia, especies de *M. anisopliae*, *M. robertsii* y *M. pingshaense* (Brunner *et al.* 2019; Hernández *et al.* 2016; Carrillo *et al.* 2013; Muñiz *et al.* 2014), sin embargo, estudios recientes de aislamiento e

identificación de hongos entomopatógenos reportaron especies de *M. brunneum*, así como también especies de *M. robertsii*, *M. anisopliae* y *M. pingshaense*, indicando que la diversidad de especies y su distribución está influenciada por cultivo de donde se aisló (Cabrera *et al.* 2019).

Debido a la relación que establece el hongo con la planta del cultivo de donde fue aislado, el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto en el crecimiento en plantas de maíz, utilizando una cepa comercial en comparación con un aislado de campo. Los resultados obtenidos de este trabajo indican que no existe diferencia significativa con respecto al porcentaje de germinación, altura, peso fresco y peso seco. En concordancia con esto, Liao *et al.* (2014) analizaron 3 especies de *Metarhizium* para evaluar su efecto en plantas de maíz, encontrando que el porcentaje de germinación fue similar en todos los tratamientos, sin embargo, reportaron un incremento en el crecimiento foliar en presencia de *M. brunneum*, al igual que un aumento en la formación del collar de la hoja.

Si bien los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que no existen diferencias significativas de los tratamientos en el crecimiento de las plantas, se observó que las medias de los tratamientos con *Metarhizium* son mayores a la de los tratamientos control al evaluar la altura y peso fresco a los 7 días post siembra, lo cual concuerda con estudios similares al utilizar especies de *Metarhizium* como *M. anisopliae*, *M. brunneum*, *M. robertsii* y *M. marquandii* para evaluar su efecto en plantas de maíz (Baron *et al.* 2020; Liao *et al.* 2014; Ahmad *et al.* 2020). En relación con esto, hay diversos factores que pueden influir en la observación de resultados significativos, algunos estudios indican que un incremento en el desarrollo foliar y porcentaje de germinación después de los 14-30 días post siembra al usar *Metarhizium* o *Beauveria*. Esto pudiera explicarse debido a procesos de adaptación por parte del hongo y de la planta al estrés que este proceso de endofitismo conlleva, o la producción tardía de metabolitos por parte del hongo, puesto que también se ha reportado la producción de algunas fitohormonas como ácido indolacético en algunas especies de *Metarhizium*, o la composición del sustrato (Liao *et al.* 2014; Khuzuppilymyal *et al.* 2020; Krell *et al.* 2018; Behie y Bidochka 2014; Baron *et al.* 2020).

Debido a los resultados obtenidos del peso fresco, donde el aislado BM02 obtuvo un mejor rendimiento en comparación con la cepa MA01, se utilizó esta como tratamiento para un

ensayo de tolerancia a la sequía. Los resultados obtenidos muestran una diferencia significativa en comparación con los controles negativos, el tratamiento con la cepa BM02 y su correspondiente con metilcelulosa obtuvieron 44.3 % y 54.9 % respectivamente, estos resultados son equiparables a otros estudios realizados con hongos entomopatógenos, tal es el caso del estudio realizado por Khuzuppilymyal *et al.* (2020) donde obtuvo entre un 54-63% de porcentaje de recuperación del vigor en plantas de maíz al usar distintas cepas de *B. bassiana* en conjunto con metilcelulosa como adherente. Si bien al momento no hay estudios donde se evalúe la actividad promotora de tolerancia al estrés por sequía en plantas por parte de *Metarhizium*, existen estudios de su efecto endofítico bajo condiciones de estrés nutritivo, donde se observa un aumento en la biomasa contenido de nitrógeno y fósforo; estos efectos se pueden deber a cambios fisiológicos inducidos en la planta como el mantenimiento de la estabilidad de la membrana, reducción de daño oxidativo, acumulación de metabolitos de adaptación al estrés, como prolina o algunas fitohormonas, como el ácido indolacético o el ácido abscísico (Hosseini *et al.* 2018; Khuzuppilymyal *et al.* 2020; Krell *et al.* 2018; Llorens *et al.* 2019).

Estos resultados en conjunto indican la primera evidencia del efecto que tiene *Metarhizium* en la tolerancia a la sequía en plantas de maíz, destacando su importancia no solo como potenciador de crecimiento, sino como alternativas para su uso agrícola; sin embargo, son necesarios ensayos posteriores para elucidar los mecanismos por los cuales estos efectos se están llevando a cabo.



## CONCLUSIONES

- La cepa comercial MA01 y el aislado BM02 corresponden a la especie *M. brunneum*.
- Los tratamientos con la cepa MA01 y el aislado BM02 indican una tendencia positiva en la altura y peso fresco de plantas de maíz.
- El aislado BM02 (*M. brunneum*) indujo una tolerancia a la sequía en semillas de maíz con un 44.3% y un 54.9% en conjunto con metilcelulosa.

## PERSPECTIVAS

- Se recomienda la realización de estudios en campo para validación resultados en laboratorio.
- Ensayos con otras razas de maíz.
- Estudios de laboratorio con otras variables evaluando expresión génica y metabólica de las cepas de *Metarhizium*.
- Análisis de colonización endófitas.

## BIBLIOGRAFIA

- Ahmad I, del Mar JG, Luthe DS, Shakeel SN, Barbercheck ME. 2020. Endophytic *Metarhizium robertsii* promotes maize growth, suppresses insect growth, and alters plant defense gene expression. *Biological control* 144: 104167
- Barelli L, Moonjely S, Behie SW, Bidochka MJ. 2016. Fungi with multifunctional lifestyles: endophytic insect pathogenic fungi. *Plant Molecular Biology* 90: 657–664.
- Baron NC, de Souza AP, Rigobelo EC. 2020. *Purpureocillium lilacinum* and *Metarhizium marquandii* as plant growth-promoting fungi. *PeerJ* 8, e9005.
- Barrientos LL y Almaguer SP. 2009. Manejo sustentable de chapulines (Orthoptera: Acridoidea) en México. *Vedalia* 13(2): 51-56.
- Behie SW, Bidochka MJ. 2014. Ubiquity of insect-derived nitrogen transfer to plants by endophytic insect pathogenic fungi: Additional branch of the soil nitrogen cycle. *Appl. Environ. Microbiol.* 80: 1553–1560.
- Behie SW, Zelisko PM, Bidochka MJ. 2012. Endophytic insect-parasitic fungi translocate nitrogen directly from insects to plants. *Science* 336: 1576–1577.
- Behie SW, Moreira CC, Sementchoukova I, Barelli L, Zelisko PM, Bidochka MJ. (2017). Carbon translocation from a plant to an insect-pathogenic endophytic fungus. *Nature communications* 8(1), 1-5.
- Branine M, Bazzicalupo A, Branco S. 2019. Biology and applications of endophytic insect-pathogenic fungi. *PLoS Pathogens* 15(7): e1007831.
- Brunner MC, Reyes MM, Moonjely S, Bidochka MJ, Torielli C. 2019. A review on the genus *Metarhizium* as an entomopathogenic microbial biocontrol agent with emphasis on its use and utility in Mexico, *Biocontrol Science and Technology*. DOI: 10.1080/09583157.2018.1531111.
- Buti, T. M.; Ibrahim, L.; Ball, B. V. and Clark, S. J. 1994. Pathogenicity of the entomogenous fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against crucifer pests and the honeybee. *Bio. Sci. Technol.* 4(2): 207-214.

- Cabrera-Mora JA, Guzmán-Franco AW, Santillán-Galicia MT, Tamayo-Mejía F. (2019). Niche separation of species of entomopathogenic fungi within the genera *Metarhizium* and *Beauveria* in different cropping systems in Mexico. *Fungal ecology*, 39, 349-355.
- Carrillo BM, Guzmán FA, Alatorre RR, Enríquez VJ. 2013. Diversity and genetic population structure of fungal pathogens infecting white grub larvae in agricultural soils. *Microbial ecology* 65(2), 437-449.
- Clay K, Schardl CL. 2002. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *American Naturalist* 160: S99–S127.
- De Bary A. 1866. Morphology and physiology der pilze, flechten and myxomyceten, Holfmeister's Handbook of Physiological Botany. vol. 2.
- Garcia JE, Posadas JB, Peticari A, Lecuona RE. 2011. *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin promotes growth and has endophytic activity in tomato plants. *Advances in Biological Research* 5 (1): 22-27
- Gao Q, Jin K, Ying SH, Zhang Y, Xiao G, Shang Y, Duan Z, Hu X, Xie XQ, Zhou G, Peng G, Luo Z, Huang W, Wang B, Fang W, Wang S, Zhong Y, Ma LJ, Leger RJ, Zhao GP, Pei Y, Feng MG, Xia Y, Wang C. 2011. Genome sequencing and comparative transcriptomics of the model entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum*. *PLoS Genetics*. 7(1): e1001264.
- Grayston SJ, Stephens JH, Nelson LM. 1990. Field and green house studies on growth promoting of spring wheat inoculated with co-existent rhizobacteria. Second International Workshop on PGPR, Interlaken, Switzerland, 88-96.
- Hardoim PR, Van Overbeek LS, Berg G, Pirttilla AM, Compant S, Campisano A, Doring M, Sessitsch A. 2015. The hidden world within plants: Ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 79(3): 293–320.
- Hosseini F, Mosaddeghi MR, Dexter AR, Sepehri M. 2018. Maize water status and physiological traits as affected by root endophytic fungus *Piriformospora indica* under combined drought and mechanical stresses. *Planta* 247(5), 1229-1245.

- Fang W y St. Leger RJ. 2010. Mrt, a gene unique to fungi, encodes an oligosaccharide transporter and facilitates rhizosphere competency in *Metarhizium robertsii*. *Plant Physiol.* 154(3): 1549–1557.
- Hernandez DC, Guzmán FA, Carrillo BM, Alatorre RR, Rodríguez LE, Villanueva JJ, 2016. Specific diversity of *Metarhizium* isolates infecting *Aeneolamia* spp. (Hemiptera: Cercopidae) in sugarcane plantations. *Neotropical entomology* 45(1), 80-87.
- Hu G y St. Leger R. 2002. Field studies using a recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. *Appl. Environ. Microbiol* 68: 6383-6387.
- Jaber LR. 2018. Seed inoculation with endophytic fungal entomopathogens promotes plant growth and reduces crown and root rot (CRR) caused by *Fusarium culmorum* in wheat. *Planta* 248: 1525-1535.
- Jaber LB y Enkerli J. 2016. Effect of seed treatment duration on growth and colonization of *Vicia faba* by endophytic *Beauveria bassiana* and *Metarhizium brunneum*. *Elsevier* 103: 187-195.
- Kabaluk JT y Ericsson JD. 2007. Seed treatment increases yield of field corn when applied for wireworm control. *Agronomy Journal* 99(5): 1377-1381.
- Kepler RM, Humber RA, Bischoff JF, Rehner SA. 2014. Clarification of generic and species boundaries for *Metarhizium* and related fungi through multigene phylogenetics. *Mycologia* 106(4): 811–829.
- Khare E, Mishra J, Arora NK. 2018. Multifaceted interactions between endophytes and plant: Developments and prospects. *Frontiers in microbiology* 9, 2732
- Krell, V., Unger, S., Jakobs-Schoenwandt, D., & Patel, A. V. (2018). Endophytic *Metarhizium brunneum* mitigates nutrient deficits in potato and improves plant productivity and vitality. *Fungal Ecology*, 34, 43-49.
- Kuzhuppillymyal-Prabhakarankutty L, Tamez-Guerra P, Gomez-Flores,R, Rodriguez-Padilla, MC, Ek-Ramos MJ. 2020 Endophytic *Beauveria bassiana* promotes drought tolerance and early flowering in corn. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 36(3), 1-10

- Liao X, Fang W, Lin L, Lu H-L, St. Leger RJ. 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, St leger R. 2017. *Metarhizium robertsii* produces indole-3-acetic acid, which promotes root growth in *Arabidopsis* and enhances virulence to insects. Microbiology, 163(7), 980-991
- Liao X, O'Brien T, Fang W, St leger R. 2014. The plant beneficial effects of *Metarhizium* species correlate with their association with roots. Applied microbiology and biotechnology. 98. 10.1007/s00253-014-5788-2.
- Llorens E, Sharon O, Camañes G, García-Agustín P, Sharon A. 2019. Endophytes from wild cereals protect wheat plants from drought by alteration of physiological responses of the plants to water stress. Environmental microbiology 21(9), 3299-3312.
- Maniania NK, Sithanatham S, Ekesi S, Ampong-Nyarko K, Baumgärtner J, Löhr B, Matoka CM. 2003 A field trial of the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* for control of onion thrips. Thrips tabaci Crop Protection 22(3): 553-559.
- Massieu TY, Lechuga MJ. 2002. El maíz en México: biodiversidad y cambios en el consumo. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=41303610>
- Moonjely S, Barelli L, Bidochka MJ. 2016 Insect pathogenic fungi as endophytes. In: St Leger RJ, editor. Advances in Genetics. Academic Press; pp. 107–135.
- Muñiz RE, Guzmán FA, Sánchez EJ, Nieto AR. 2014. Occurrence of entomopathogenic fungi in tejocote (*Crataegus mexicana*) orchard soils and their pathogenicity against *Rhagoletis pomonella*. Journal of applied microbiology 117(5), 1450-1462.
- Pinedo R, Collado L, Arias L, Shagarodsky T. 2009. Importancia del maíz, frijol, pallar y chile en agroecosistemas tradicionales del trópico húmedo de Cuba, México y Perú. Cómo conservan los agricultores sus semillas en el trópico húmedo de Cuba, México y Perú, 31-45.
- Rangel ED, Anderson AJ, Roberts DW. 2006. Growth of *Metarhizium anisopliae* on non-preferred carbon sources yields conidia with increased UV-B tolerance. J. Invertebr. Pathol. 93(2): 127-134

- Ryu CM, Farag MA, Hu CH, Reddy MS, Wei HX, Pare PW, Kloepper JW. 2003. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. Proc. Natl. Acad. Sci 100(8): 4927-4932.
- Sánchez RF, Sánchez BO, Sandoval EY, Ulloa AB, Armendariz BG, García MM, Macías MR. 2013. Hongos endófitos: Fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas 16(2): 132-146.
- Sasan RK, Bidochka MJ. 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.
- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). 2017. Programas de trabajo. Tomado de <https://www.gob.mx/senasica/documentos/programas-de-trabajo-sanidad-vegetal>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2011. Cierre de producción agrícola por cultivo. Disponible en: [http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com\\_wrapper&view=wrapper&Itemid=215](http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=215)
- Shrivastava N, Mahajan S, Varma A. s.f. Symbiotic soil microorganisms: Biology and applications. Springer, pp. 289-300.
- Spatafora JW, Sung GH, Sung J-M, Hywel-Jones NL, White JF. 2007. Phylogenetic evidence for an animal pathogen origin of ergot and the grass endophytes. Molecular Ecology 16(8) 1701-1711.
- Tamez GP, Galan WL, Medrano RH, García GC, Rodríguez PC, Gómez FR, Tamez GR. 2001. Bioinsecticidas: su empleo, producción y comercialización en México. Ciencia UANL 4(2) 143-152.
- Tovar GC, Colonia OB. 2013. Producción y procesamiento del maíz en Colombia. Revista Guillermo de Ockham 11.1:97-110.
- Vidal S. Jaber LR. 2015. Entomopathogenic fungi as endophytes: plant–endophyte–herbivore interactions and prospects for use in biological control. Current science, 46-54.

Wang C. Leger RJ. 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*. 2007; 6: 808–816.