UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DETECCIÓN ESPECÍFICA DE CEPAS DE *Beauveria bassiana "IN PLANTA"*, PRESENTE COMO ENDÓFITO EN CULTIVO DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris*)

POR

MC. TEODORA CAVAZOS VALLEJO

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORADO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

2022

.

DETECCIÓN ESPECÍFICA DE CEPAS DE *Beauveria bassiana* *"IN PLANTA"*, PRESENTE COMO ENDÓFITO EN CULTIVO DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris*)

Comité de Tesis

Dra. Patricia Tamez Guerra
Director de Tesis

Dr. Juan Manuel Alcocer González
Secretario

Dr. Ricardo Alberto Gómez Flores
Vocal

Dr. José Alberto Valadez Lira
Vocal

Dra. María Julissa Ek Ramos
Vocal

SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO

Dra. Katiushka Arévalo Niño
Subdirector de Posgrado

DETECCIÓN ESPECÍFICA DE CEPAS DE *Beauveria bassiana* *"IN PLANTA"*, PRESENTE COMO ENDÓFITO EN CULTIVO DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris*)

Dirección de Tesis

Dra. Patricia Tamez Guerra

Director

Dra. Deyanira Quistián Martínez

Director externo

DERECHOS RESERVADOS©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN 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.

Financiamiento

Este trabajo fue financiado por la Secretaría de Educación Pública, con el Programa de Desarrollo del Personal Docente SEP-DEGESU, Clave 183706

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento, primeramente a Dios porque me permitió terminar este proyecto junto a mis seres queridos, mi amado esposo Luis Jorge Díaz y mi querido hijo Iván J. Diaz, quienes me ha brindado su amor y apoyo incondicional todo este tiempo, a mis muy amados padres, Héctor Cavazos Duran y Pety Vallejo Alejo, de quienes aprendí excelentes valores, y a saber que todo en esta vida se obtiene mediante mucho trabajo y esfuerzo; me siento una mujer muy afortunada de pertenecer a una familia con muchos hermanos: Erika, Valeria, Héctor, Yalilee, Judith, Eloina con quienes jugué de niña infinidad de veces y con quienes he compartido muchísimos momentos de felicidad, gracias a todos por estar ahí y a los que ya no están: mis abuelitos Juan Cavazos, Francisco Vallejo, mis Tías Guille y Josefina Vallejo y seres queridos que sé que desde el Cielo me siguen apoyando.

Agradezco muy en especial a mi asesora de tesis la Dra. Patricia Tamez Guerra, quien me ha brindado en todo momento su apoyo para la realización de este proyecto, agradezco su amistad, su valiosa critica al proyecto, las facilidades de reactivos, equipos y por darme libertad de hacer algunos cambios, gracias por todo.

Agradezco a todas las personas que me apoyaron en su momento a la realización de este proyecto, en especial a la Dra. Julissa Ek Ramos y al Dr. Alberto Valadez Lira por sus valiosas críticas a este proyecto y por su valiosa amistad, al Dr. Alonso Orozco por su apoyo para la realización de este proyecto y sus interesantes platicas en el laboratorio de ciencia, al Dr. Ricardo A. Gómez, integrante del comité por la revisión de este documento, al Dr. Santiago Saavedra por su valiosa amistad y quien me apoyó en el diseño molecular de algunos oligos, a la Dra. Norma Zamora Avilés por todo su apoyo en la prueba de campo y su valiosa amistad. Además, quiero agradecer también a todos mis compañeros de laboratorio de formulación de biológicos, al QBP Angello Martínez y al M.C. Oziel Zúñiga Sánchez por su valioso apoyo todo este tiempo, a la Dra. Laiju Kuzhuppillymyal Prabhakarankutty , Dr. Juan Ballesteros, Dr. Cesar Iván Romo Sáenz , MC. Servando Cantú, a Norita, doña Rosy al MVZ Adán, por su valiosa amistad y con quienes compartí muy buenos momentos en mi estancia en el laboratorio.

Agradezco a toda la gente involucrada en este proyecto, al comité de tesis, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de mis estudios de Doctorado (CONACYT), a la Facultad de Ciencias Biológicas y Laboratorio de Inmunología y Virología Unidad de Formulación de Biológicos por permitirme utilizar sus instalaciones.

DEDICATORIA

A mi querido esposo Luis Jorge Díaz Santana Reyes y mi querido hijo Iván J. Diaz por su amor y constante apoyo incondicional para la realización de este proyecto, en especial a mi esposo por sus palabras de aliento en las interminables noches de desvelo.

A mis padres Héctor Cavazos Durán y Pety Vallejo Alejo por ser ejemplos de fortaleza y perseverancia, con gratitud, admiración y amor. A mis abuelos Juan Cavazos Garza, Teodora Duran Sauceda, Agustina Vallejo y Francisco Vallejo por ser siempre también un magnífico ejemplo de vida.

A mis hermanos Erika, Valeria, Héctor, Yalilee, Judith y Eloina por su valioso tiempo a mi lado desde pequeños y por su apoyo en todo momento, además dedico también este escrito a mis sobrinos Rebeca Estabillo Cavazos, Camila Estabillo Cavazos, Gabriel Lore, Raphael LoRe, a mi ahijado Francesco LoRe, Marie Ware, Catalina Caballero, Jesús Leonardo Caballero y la nena nueva Isabel Caballero, con quienes tendremos muchas experiencias para compartir cuando crezcan; con cariño y amor a toda mi familia.

ÍNDICE

RESUMEN…… 17
ABSTRACT…… 18
1. INTRODUCCIÓN……..... 19
2. ANTECEDENTES…… 21
2.1. Microorganismos endófitos……. 21
2.2. Endófitos fúngicos……... 22
2.3. Aplicaciones de endófitos fúngicos con importancia económica……... 24
2.4. *Beauveria bassiana* y su relación con plantas……. 24
2.4.1. *Beauveria bassiana* un entomopatógeno endófito…….. 24
2.4.2. Efecto de *Beauveria bassiana* en plantas…….. 26
2.4.3. Estudios con cepas de *Beauveria bassiana*…… 27
2.5. Métodos de aplicación artificial y su efecto en plantas……... 28
2.6. Métodos actuales para el estudio de Bb como endófito…….. 30
2.6.1. Tipos de métodos…… 30
2.6.1.1. Observación directa al microscopio…….. 30
2.6.1.2. Métodos dependientes de cultivo…….. 31
2.6.1.3. Métodos independientes de cultivo……. 31
2.6.2. Métodos moleculares para análisis de cepas…….. 33
2.6.3 Análisis de cepas por medio de intrones del grupo I……... 34
2.7. Otros aspectos de *Beauveria bassiana* inoculada……... 36
3. JUSTIFICACIÓN……. 38
4. HIPÓTESIS……... 39
5. OBJETIVO DEL TRABAJO…….. 40
5.1. Objetivo general…….. 40
5.2. Objetivos específicos……... 40
6. MATERIAL Y MÉTODOS……. 41
6.1. Generación de cultivos monospóricos para análisis de inserción de intrones……... 41
6.2. Crecimiento y extracción de ADN de *Beauveria bassiana*……. 42
6.3. Medición de concentración de ADN……... 43
6.4. Amplificación de sitios de inserción de intrones del grupo I….. 44
6.5. Amplificación de los sitos de inserción IDGI en frijol…….. 45
6.6. Análisis *in silico* de sitios de inserción de IDGI en plantas…… 46
6.7. Prueba de PCR directo simulando establecimiento de Bb en frijol…… 46
6.8. Diseño de oligonucleótidos para desarrollo de PCR anidado…. 47
6.8.1. Condiciones de primera y segunda reacción…….. 47
6.8.2. Límite de detección…… 48
6.9. Experimentos de inoculación a nivel laboratorio con cepa control…… 49
6.9.1. Crecimiento de plantas de frijol……. 49
6.9.2. Preparación de inoculo de *Beauveria bassiana*…….. 50

6.9.3. Aplicación de GHA en plantas de frijol……..... 52
6.9.4. Medición de variables y evaluación de establecimiento…. 53
6.9.5. Lavado y plaqueo de tejido……. 53
6.9.6. Análisis "*in planta*" para confirmar colonización de la cepa……... 54
6.10 Siembra de frijol para análisis cualitativo y molecular de las tres cepas……... 55
6.10.1. Filtrado molecular de muestras positivas para Bb……..... 55
6.10.2. PCR anidado "*in planta*" para diferenciar entre cepas…. 56
6.11. Siembra de frijol para inicio de prueba de campo……. 57
6.11.1. Preparación de inóculos…… 58
6.11.2. Aplicación de inóculos vía foliar y suelo……. 59
6.11.3. Muestreo de plantas…….. 59
6.11.4. Lavado y plaqueo de tejido……... 60
6.11.5. Muestreo del tejido para análisis molecular…… 61
6.11.6. Análisis "*in planta*" para confirmar colonización de cepas……. 61
6.10. Análisis estadístico…… 61
7. RESULTADOS…… 62
7.1. Obtención de cultivos monospóricos de cada cepa.…… 62
7.2. Secuenciación de amplicones obtenidos de los sitios de inserción IDGI en las tres cepas. …… 64
7.3. Amplificación de los sitos de inserción de IDGI en frijol……... 68
7.4. Análisis *in silico* de IDGI en ADN en plantas…… 69
7.5. Prueba de PCR directo simulando establecimiento de Bb en frijol……. 71
7.6. Diseño de oligonucleótidos para PCR anidado. ……. 73
7.7. Condiciones de primera y segunda reacción……... 73
7.8. Límite de detección……. 74
7.9. Plantas de frijol e inoculación de *B. bassiana* a nivel laboratorio…….. 76
7.9.1. Medición de variables……. 79
7.9.2. Prueba de PCR anidado en controles y muestras…… 82
7.10. Plantas de frijol con suelo de Marín Nuevo León e inoculación de *B. bassiana* a nivel laboratorio…… 85
7.11. Filtrado molecular de muestras positivas para *B. bassiana*….. 88
7.12. Determinación de establecimiento de las tres cepas en frijol por plaqueo de tejido y PCRs anidados…… 89
7.12.1. PCR anidado-Bb y PCR anidado-cepas experimento A... 92
7.12.2. PCR anidado-Bb y PCR anidado-cepas experimento A-1…… 95
7.12.3. PCR anidado-Bb y PCR anidado-cepas experimento B... 96
7.13. Prueba de campo en frijol con cepas de *B. bassiana*…… 100
8. DISCUSIÓN……. 108
9. CONCLUSIONES…..…… 118
10. PERSPECTIVAS…… 120
11. ANEXOS…….. 121

12. BIBLIOGRAFÍA…… 127

íNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1.	Secuencia de oligonucleótidos para amplificación de sitios de inserción IDGI I-IV……..	44
2.	Tamaño de las bandas amplificadas en pares de bases, según ausencia o presencia del intrón……	45
3.	Tratamientos en suelo estéril y no estéril (experimento no.1)……	53
4.	Tratamientos con suelo de Marín Nuevo León (experimento no. 2)……	53
5.	Tamaño aproximado de las amplificaciones de sitios de insercion I-IV del gen 28S en las cepas GHA, BBPTG4 y BB37……....	64
6.	Porcentajes de alineamiento *in silico* de los cuatro pares de oligos utilizados para amplificar los sitios I-IV de *B. bassiana* en los genomas de frijol, chile, sorgo y maiz…..	70
7.	Comparación de plaqueo de tejido, PCR anidado para detectar *B. bassiana* y PCR para diferenciar entre cepas...	90

ÍNDICE DE FIGURAS

No. Página

1. Micosis causada por *Beauveria bassiana* en un insecto adulto de la mosca de repollo *Delia radicum* (L.)……. 25
2. Distribución de secuencias ITS, 18S y 28S del ADNr en células eucariotas…….…….... 32
3. Estructura general de Intrones de tipo I. Elementos de secuencia conservados P, Q, R y S y hélices P1-P9……... 35
4. Representación de la región 3´OH de la subunidad 28S del ADNr de *B. bassiana* con sitios de inserción de IDGI IIV…..... 35
5. Producción de un cultivo monospórico a partir de conidios germinadas procedentes de un cultivo multiespórico……. 42
6. Campos en la cámara de Neubauer para contar conidios…… 51
7. Mapa de parcelas y tratamientos para la prueba de campo en Marín, Nuevo León……. 58
8. Monospóricos finales de la cepa GHA …….. 62
9. Monospórico final de la cepa PTG4……... 62
10. Monospórico final de la cepa BB37…… 63
11. Electroforesis en gel del patrón de amplificación de sitios de inserción IDGI I-IV del gen 28S en tres cepas de *B. bassiana*... 63
12. Secuencias de amplicones de sitios de inserción de IDGI I-IV para GHA…… 65
13. Secuencias de amplicones de sitios de inserción de IDGI I-IV para BBPTG4.…… 66
14. Secuencias de amplicones de sitios de inserción de IDGI I-IV para BB37……... 67
15. Electroforesis en gel de la amplificación de sitios de inserción de IDGI I-IV para el gen 28S de Bb, en dos genomas de frijol. 69
16. Electroforesis en gel de la amplificación de sitios de inserción de IDGI I-IV del gen 28S de Bb, en genoma de frijol de dos lotes. ……. 69
17. Electroforesis en gel de prueba de PCR directo de sitios de IDGI I-IV para detectar Bb BBPTG4 como endófito en raíz, tallo u hoja en frijol *in vitro*.…….. 72
18. Oligonucleótidos sintetizados para la amplificación de la región 3´OH del gen 28S de Bb…….. 73
19. Electroforesis en gel de las cinco reacciones propuestas para la primera reacción, amplificadas con Platinum Super Fi…..……. 73
20. Electroforesis en gel del patrón de amplificaciones de sitios de IDGI I-IV del gen 28S de Bb de la cepa BB37 para determinación del límite de detección. …….. 75
21. Crecimiento de frijol var. Pinto Saltillo a nivel laboratorio con tres semanas de crecimiento…… 76
22. Primera aplicación de *B. bassiana* GHA en plantas de frijol….. 76
23. Plantas de frijol al final del experimento…… 77
24. Plaqueo de tejido lavado en PDA con antibióticos……. 77
25. Porcentaje de establecimiento de Bb GHA en plantas de frijol con suelo estéril. …… 78

26. Porcentaje de establecimiento de Bb GHA en plantas de frijol con suelo no estéril. …… 78
27. Deformidades de primeras hojas de frijol en plantas inoculadas en semilla …… …….. 79
28. Deformidades de primeras hojas de frijol en plantas sin inoculación en semilla.…… 80
29. Grafica de medición de altura en controles y tratamientos, utilizando suelo estéril (SE) y suelo no estéril (SNE)……. 80
30. Grafica de medición de número de hojas en controles y tratamientos, utilizando suelo estéril (SE) y suelo no estéril (SNE)..…… 81
31. Grafica de medición de peso fresco en controles y tratamientos, utilizando suelo estéril (SE) y suelo no estéril (SNE).…… 81
32. Grafica de medición de largo de raíz en controles y tratamientos, utilizando suelo estéril (SE) y suelo no estéril (SNE).……. 82
33. Electroforesis en gel de PCR anidado-cepas para la búsqueda de perfil de GHA en muestra de frijol sin tratar y sin lavar…..... 83
34. Electroforesis en gel de PCR anidado-cepas para la búsqueda de perfil de GHA en muestra de frijol sin tratar y sin lavar…… 83
35. Electroforesis en gel de PCR anidado-cepas para la búsqueda de perfil de GHA en muestra de frijol tratada a nivel de semilla y sin tratar (ambas sin lavar)……... 84
36. Electroforesis en gel de comparativa de dos tipos de PCR anidado-cepas con diferentes enzimas y PCR directo con muestra positiva de frijol para GHA……... 85
37. Crecimiento de plantas de frijol con suelo de tipo vertisol de localidad de Marín, Nuevo León…….. 85
38. Placa de PDA de muestra T2 con tejido sustraído a causa de endófitos de crecimiento rápido…….. 86
39. Porcentaje de establecimiento de Bb en frijol utilizando conidios y suelo de una localidad de Marín Nuevo León……... 87
40. Porcentaje de establecimiento de Bb en frijol utilizando blastosporas y suelo de una localidad de Marín Nuevo León…. 87
41. Electroforesis en gel de PCR anidado-Bb (ITS/Bb) para la detección de muestras positivas para *B. bassiana* como endófito……... 88
42. Crecimiento de plantas para pruebas de inoculación con GHA, BBPTG4 y BB37 de experimento A antes de la plaga……... 89
43. Crecimiento de plantas para pruebas de inoculación con GHA, BBPTG4 y BB37 de experimento A con la plaga…… 89
44. Electroforesis en gel de PCR anidado-Bb para detectar muestras positivas para *B. bassiana* en experimento A……... 92
45. Electroforesis en gel de PCR anidado-cepas a muestra de hoja de frijol con endófito en experimento A……. 93
46. Electroforesis en gel de PCR anidado-cepas a muestra de hoja de frijol con endófito Bb BBPTG4-2 con ajustes en primera reacción……... 94
47. Electroforesis en gel de PCR anidado-cepas a muestra de hoja

de frijol con endófito BBPTG4 aplicado previamente y control de hongo positivo…… 94
48. Electroforesis en gel de PCR anidado-cepas a muestra de ADN de frijol con aplicación previa de la cepa BB37 (muestra BB37-2) …….. 95
49. Electroforesis en gel de PCR anidado-Bb (ITS/Bb) en muestras de ADN de hoja de frijol lavadas y tratadas previamente con GHA…… 95
50. Electroforesis en gel de PCR anidado-cepas (28S/I-IV) para muestras de hoja de frijol lavadas y tratadas con previamente GHA…… 96
51. Electroforesis en gel de PCR anidado-cepas de muestras de frijol previamente tratadas con GHA…….. 96
52. Electroforesis en gel de PCR anidado-Bb (ITS/Bb) de ADN de hoja de frijol lavadas y tratadas previamente con GHA, BBPTG4 o BB37 de experimento B……...… 97
53. Electroforesis en gel de PCR anidado-Bb (ITS/Bb) de muestras de ADN de hoja de frijol lavadas de repuesto de experimento B…… 97
54. Electroforesis en gel de PCR anidado-Bb (ITS/Bb) de muestras de ADN de hoja de frijol de experimento B sin lavar tratadas previamente con las tres cepas……... 98
55. Electroforesis en gel de PCR anidado-cepas de muestras de frijol tratadas con GHA de experimento B……. 99
56. Electroforesis en gel de PCR anidado-cepas de muestras de frijol tratadas con BBPTG4 de experimento B……... 99
57. Electroforesis en gel de PCR anidado-cepas de muestras de frijol tratadas con BB37 de experimento B……. 99
58. Delimitación de las plantas a tratar con rafia…….. 100
59. Aplicación de tratamientos en plantas de frijol Pinto Saltillo… 101
60. Electroforesis en gel del patrón de inserción de IDGI proveniente de cepas enviadas a prueba de campo……. 101
61. Cultivo de frijol quemado por helada en la zona…… 102
62. Electroforesis en gel de PCR anidado-Bb (ITS-Bb) en muestras de ADN de hojas provenientes de prueba de campo... 102
63. Variable de longitud de guía central de los nueve tratamientos en campo con y sin endófitos…….. 104
64. Variable número de vainas totales de los nueve tratamientos en campo con y sin endófitos……... 104
65. Variable número de vainas normales de los nueve tratamientos en campo con y sin endófitos…….. 105
66. Variable número de vainas vanas (sin frijoles) de los nueve tratamientos en campo con y sin endófitos……. 105
67. Variable de peso de semillas totales por planta de los nueve tratamientos en campo con y sin endófitos……. 106
68. Variable de peso de 100 semillas de los nueve tratamientos….. 107

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

%	Porcentaje
°C	Grados Celsius
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µm	Micro molar
3'OH	3' Hidroxilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNr	Ácido desoxirribonucleico ribosomal
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
Bb	*Beauveria bassiana*, *B. bassiana*
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
C	Clavicipetaceos
c/u	Cada uno
$CaCl_2$	Cloruro de calcio
ETS	External Transcribed Spacer
g	gramos
H_2O	Agua
IDT	Integrated ADN Technologies
IPTG	Isopropyl β- d-1-thiogalactopyranoside
ITS	Internal Transcribed Spacer
L	Litros
LB	Luria-Bertani
lb	libras
LSU	Large subunit
M	Molar
mg	Miligramos
min	Minutos
MIP	Manejo Integrado de Plagas
mL	Mililitros
mM	Milimolar
NC	No Clavicipetaceos
NCBI	National Center of Biotechnology Information
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
NPK	Nitrogen Phosphorus Potasium
NTS	None Transcribed Spacer
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDA	Papa Dextrosa Agar
PDB	Papa Dextrosa Broth
rpm	Revoluciones por minuto

S	Segundos
SCARS	Sequence Characterized Amplified Region
SSU	Small subunit
TA	Temperatura Ambiente
X-GAL	Indolyl β-D-galactopyranoside

RESUMEN

El uso indiscriminado de plaguicidas químicos ha traído impactos ecológicos negativos al suelo, aire y mantos acuíferos. El estudio de agentes microbiales para tratar o prevenir enfermedades agrícolas ha ido en aumento, debido a su efectividad y baja toxicidad. Un microorganismo de importancia económica es el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Bb) el cual puede establecerse como endófito con efectos benéficos para la planta como protección contra estrés hídrico, mayor crecimiento y tolerancia al ataque de insectos. Cepas diferentes de Bb tienen capacidades distintas para establecerse como endófitos y por lo tanto, su desempeño varía dentro de la planta. Es por esto por lo que es necesario contar con técnicas que ayuden a monitorear las cepas aplicadas, para asegurarse que los resultados obtenidos son debido a ellas y no por alguna otra cepa nativa. Estudios previos de aislamientos de Bb encontrados en Nuevo León, permitieron corroborar que las cepas BBPTG-4 y GHA, se pueden establecer como endófitos en maíz y reducir el daño por un lepidóptero. En el presente proyecto se estandarizó una metodología para diferenciar tres cepas de Bb: GHA, BBPTG4 y BB37, por medio de la detección de su perfil de inserción de intrones del grupo I, estando presentes como endófitos en cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Los resultados demostraron que la técnica molecular de PCR anidado *touchdown "in planta"* fue capaz detectar el perfil distintivo de cada cepa, si el endófito se establece al menos a una concentración de 1 pg/10 ng de ADN de planta.

ABSTRACT

The indiscriminate use of chemical pesticides has brought negative ecological impacts to the soil, air and aquifers. The study of microbial agents to treat or prevent agricultural diseases has been increasing, due to its effectiveness and low toxicity. A microorganism of economic importance is the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bb), which can be established as an endophyte with beneficial effects for the plant such as protection against water stress, increased growth and tolerance to insect attack. Different strains of Bb have different capacities to establish themselves as endophytes and therefore their performance varies within the plant. This is why it is necessary to have techniques that help monitor the strains applied, to ensure that the results obtained are due to them and not to some other native strain. Previous studies of Bb isolates found in Nuevo León confirmed that BBPTG-4 and GHA strains can be established as endophytes in maize and reduce damage by lepidoptera. In this project, a methodology was standardized to differentiate three Bb strains: GHA, BBPTG4 and BB37, by detecting their group I intron insertion profile, being present as endophytes in bean crops (*Phaseolus vulgaris* L.). The results showed that the "*in planta*" touch-down nested PCR molecular technique was able to detect the distinctive profile of each strain, if the endophyte is established at a concentration of at least 1 pg/10 ng of plant DNA

1. INTRODUCCIÓN

Los endófitos son microrganismos (bacterias, hongos o actinomicetos) que se encuentran en una forma asintomática en el tejido de todas las plantas. Dichos microorganismos pueden presentarse en todo o una parte de su ciclo de vida dentro del tejido vegetal, sin causar daño aparente. Los endófitos de tipo fúngico pueden potencialmente proteger a las plantas de una variedad de diferentes tipos de estrés y promover de esta manera el crecimiento.

Dentro de los hongos de importancia agrícola, destaca el uso de *Beauveria bassiana* (Bb) ya que tiene características de entomopatógeno, por lo que es ampliamente utilizado para control biológico de plagas en diversos cultivos. Como existen una gran gama de cepas de Bb, con capacidades distintas para establecerse como endófitos y con desempeños diferentes dentro de la planta, es importante contar con técnicas que ayuden a dar monitoreo de las cepas aplicadas artificialmente en campo para poder asegurar que el resultado obtenido sea por la cepa aplicada y no por alguna otra cepa nativa.

Actualmente, la metodología utilizada como estándar de oro para asegurar el establecimiento como endófitos de cepas aplicadas artificialmente, es el re-aislamiento de dichas cepas a partir de tejido lavado, donde se busca primero remover epifitos (microorganismos sobre la superficie) sin afectar la viabilidad de los endófitos, posteriormente dicho tejido lavado se coloca sobre PDA (o algún otro medio de cultivo), lo cual es denominado como plaqueo o plaqueado del tejido, esto para promover el crecimiento de los hongos que se encuentren en el interior del tejido, es decir que estén como endófitos. Sin embargo, el uso frecuente de NaClO y otras sustancias para los lavados afectan también la viabilidad de los endófitos del tejido tratado, por lo que es frecuente los casos de falsos negativos utilizando esta metodología, cuando se trata de re-asilar la cepa del endófito aplicado artificialmente. Así mismo como el lavado del tejido es muy importante para asegurar que lo que se aísle haya estado como endófito, existe todavía la

necesidad de contar con técnicas que nos ayuden a determinar el tipo de cepa aplicada, aunque el microrganismo ya no se encuentre viable.

Dentro las técnicas moleculares para la identificación de hongos en general, el más utilizado es la amplificación de sus secuencias ITS (por sus siglas en inglés "Internal Transcribed Spacer") del ADNr; dicha amplificación ayuda a determinar que especie de hongo se tiene en la muestra, pero requiere de secuenciación y solo determina el género y la especie, no el tipo de cepa. Por otro lado, amplificaciones de cuatro sitios conservados del gen de 28S del ADNr de Bb, donde se insertan intrones del grupo I, han ayudado a diferenciar algunas cepas de Bb por medio de patrones de inserción distintos, ya que dichos intrones son erráticos y se encuentran insertados en algunas cepas si y en otras no, lo cual ha sido útil para diferenciar cepas de Bb a nivel de cultivo axénico del hongo solamente.

Por lo anterior, en este proyecto, se desarrolló una técnica molecular que ayudó a detectar el perfil de inserción de intrones proveniente de Bb "*in planta*", es decir, directamente de la planta cuando el hongo se encuentra como endófito. Dicha detección se realizó de tres cepas aplicadas artificialmente en plantas de frijol a nivel laboratorio y campo. Las cepas utilizadas fueron GHA, la cual es una cepa comercial ampliamente utilizada en control biológico, BBPTG4 una cepa nativa del estado de Nuevo León, y BB37 una cepa nativa de la zona del bajío mexicano, las cuales se sabía previamente que mostraban un perfil inserción de intrones distinto entre ellas.

2. ANTECEDENTES

2.1 Microorganismos endófitos

Todas las plantas interactúan con una variedad de organismos en su medio ambiente, como bacterias, hongos, virus, herbívoros (OChippinti 2013). Estas interacciones pueden ser negativas, neutras o positivas (Newton *et al.* 2010; van Dam 2009). Pero además muchas de estas interacciones pueden considerarse mutualistas, en el cual ambos (planta y microorganismo) se benefician (Saikkonen *et al.* 1998; De Mandal *et al.* 2020). Algunas de estas relaciones incluyen interacciones entre plantas y una variedad de: micorrizas, bacterias rizobiales y endófitos (Saikkonen *et al.* 1998; Bonfante y Anca 2009).

El término endófito fue acuñado por el científico alemán Heinrich Anton De Bary (1866) y es usado para definir a un organismo que vive dentro de los tejidos de la planta sin causarle daño aparente; más de un siglo después, en 1986, Carroll definió endófitos como mutualistas que pueden colonizar partes aéreas de plantas vivas sin causar síntomas de enfermedad, por lo que micorrizas y patógenos quedaban excluidos del término. Posteriormente, Petrini en 1991, realizó una expansión de la definición de Carroll, en la cual incluía a todos los organismos que en algún tiempo de su ciclo de vida pueden colonizar tejido de la planta sin causar daño aparente. A la fecha existen más definiciones del término donde se hacen aclaraciones y exclusiones, pero la definición de Petrini ha sido la más utilizada (Sun y Guo 2012).

Dentro de los organismos endófitos podemos encontrar hongos, bacterias o actinomicetos, donde su asociación puede ser obligada o facultativa (Wilson 1995). Los endófitos son ubicuos y han sido aislados de todas las plantas examinadas hasta la fecha, siendo que su población se puede ver afectada en gran medida por las condiciones climáticas y la localización donde la planta esté creciendo (Nair y Padmavathy 2014). Estos microorganismos son componentes importantes del microbioma de las plantas y potencialmente pueden proteger a su planta hospedadora de una variedad de diferentes tipos de estrés, y de esta manera promover su

crecimiento (Porras-Alfaro y Bayman 2011). A su vez, las plantas limitan estrictamente el crecimiento de endófitos, quienes usan diversos mecanismos para gradualmente irse adaptando a vivir dentro de la planta. (Dudeja *et al*. 2012). Entre la variedad de compuestos producidos por endófitos se pueden encontrar: bioactivos con importancia médica, como antibióticos, compuestos medicinales y de alta relevancia en investigación para la industria alimenticia, como enzimas, además de aquellos con actividad de tipo: fitoestimulación, biocontrol, biorremediación y pigmentación, entre otros (Ek-Ramos *et al.* 2019; Nair y Padmavathy 2014).

2.2 Endófitos fúngicos

A diferencia de las micorrizas que colonizan las raíces de las plantas y crecen hacia el interior de la rizosfera, los endófitos fúngicos residen enteramente dentro del tejido vegetal y pueden crecer dentro de las raíces, tallos y hojas (Carroll 1988; Stone *et al*. 2004). En general, existen dos grupos mayores de endófitos fúngicos que han sido reconocidos previamente, reflejando diferencias en relevancia evolucionaria, taxonomía, planta hospedadora, y funciones ecológicas: uno de los grupos es el de los endófitos de la familia Clavicipitaceae (Clavicipitaceous) (C), los cuales infectan algunos tipos de hierbas y el otro tipo son los endófitos no Clavicipitaceous (NC), que pueden aislarse de tejido asintomático de plantas vasculares, helechos, coníferas y angiospermas (Rodríguez *et al*. 2008).

Por mucho los hongos endófitos más estudiados son los Clavicipitaceous: *Epichloë y Neotyphodium* (Clavicipitaceae, Ascomycota), los cuales forman una relación simbiótica obligada con su hospedero de pasto (hierba) y pueden ser transmitido verticalmente a través de las diferentes generaciones vía semilla (Clay y Schardl 2002; Saikkonen *et al.* 2002). En dicha simbiosis el hongo produce alcaloides, los cuales actúan como componentes para la defensa de la planta contra insectos y animales herbívoros, pero otros estudios demuestran también un sistema más complejo, en donde se observa que se requiere de una relación hongo-planta para producir dichos alcaloides (Schardl *et al.,* 2013), además de hormonas y otros metabolitos, los cuales interactivamente regulan la respuesta de factores de estrés de origen biótico y abiótico.(Clay 1988; Kaldau y Bacon 2008).

Por otro lado, los hongos NC son altamente diversos y representan una colección de diferentes filums, principalmente de hongos ascomicetos, los cuales tienen funciones ecológicas, a la fecha poco entendidas. Los hongos endófitos de tipo NC se han aislado de todos los tipos de plantas de ecosistemas terrestres, incluyendo los sistemas agro-económicos y de diferentes biomas, desde los trópicos hasta la tundra ártica (Arnold y Lutzoni 2007). La escala de su diversidad espacial y temporal, sus patrones de distribución, sus funciones ecológicas, su potencial de aplicación, su asociación con prácticas orgánicas o convencionales, su habilidad para cambiar entre los modos de vida libre y endófitos, están siendo más estudiadas debido al aprovechamiento que se puede obtener con el entendimiento de su relación con plantas (Porras-Alfaro y Bayman 2011; Ek-Ramos *et al*. 2013).

2.3 Aplicaciones de endófitos fúngicos con importancia económica

Sin duda una de las principales aplicaciones de algunos endófitos es el control biológico de insectos plaga. Los endófitos fúngicos con propiedades entomopatógenas más destacados son las especies *Beauveria, Metarhizium, Isaria, Hirsutella* y *Lecanicillium*, los cuales han ayudado a reducir la dependencia por plaguicidas químicos, habiendo alrededor de 170 productos basados en dichos microorganismos ya disponibles en el mercado (Bamisile *et al.* 2021).

Otra de las aplicaciones importantes de endófitos es el control de patógenos en cultivos. En general, se ha observado que cuando se inoculan plantas con endófitos fúngicos, se vuelven más resistentes al ataque por patógenos principalmente hongos y nemátodos (Poveda *et al.* 2020), incluso con la aplicación de filtrados cultivables del endófito también se muestra un grado de resistencia, sugiriendo que el endófito puede estar produciendo compuestos antifúngicos en las plantas (Zabalgogeazcoa 2008). Por otro lado, otro modo de acción de resistencia propone que el propio endófito utilizado para biocontrol pudiera estar estimulando los mecanismos de resistencia de la planta (*priming*) y de esta manera se tengan efectos que contrarresten a los patógenos (Zabalgogeazcoa 2008; Martínez-Arias *et al* 2021). De dicha asociación planta-endófito se ha concluido también en

múltiples investigaciones que los endófitos fúngicos pueden potenciar el crecimiento de su planta hospedadora (Baron y Rigobelo 2021). Además, algunos entomopatógenos han sido reportados como endófitos fúngicos naturales en diversas plantas y se ha demostrado que es posible inocular artificialmente cultivos con entomopatógeno fúngicos, logrando establecerlos como endófitos (Vega 2008 y 2018).

Por otro lado, además de conferir resistencia a insectos plaga, patógenos y a nemátodos, existen endófitos que puede conferir resistencia a la falta de agua. Estudios bien conocidos de endófitos tipo C, muestran que pueden potenciar la eco fisiología de la planta hospedera para contrarrestar el estrés abiótico causado por sequía (Arechavaleta *et al.* 1989) y el estrés causado por metales pesados (Malinowski y Belesky 2000). En general no todos los hongos de tipo endófito se han relacionado con la resistencia a sequía o mejora en la producción del cultivo (Schulz *et al*. 1998, 1999; Arnold y Engelbrecht 2007), por lo que son necesarios más estudios con cepas, en cultivos y hábitat específicos, para poder establecer bases para el buen uso de microorganismos endófitos en los cultivos seleccionados.

2.4 *Beauveria bassiana* y su relación con plantas

2.4.1 *Beauveria bassiana* un entomopatógeno endófito

Una clasificación del género *Beauveria* (con cepas de todos los continentes excepto de la antártica), caracterizando por medio de múltiples locus, los cuales incluyeron secuencias parciales de los genes RPB1, RPB2, TEF y la región intergénica nuclear (Bloc), muestran una bien fundamentada clasificación con doce clados terminales correspondientes a especies de: *B. amorpha*, *B. asiatica*, *B. australis*, *B. bassiana*, *B. brongniartii*, *B. caledonica*, *B. kipukae*, *B. malawiensis*, *B. pseudobassiana*, *B. sungii*, *B. vermiconia*, *y B. varroae* (Rehner *et al.* 2011), siendo de entre las anteriores la especie de *B. bassiana* la más empleada en productos como agente de control biológico de insectos plaga (de Faria y Wraight 2007).

Este microorganismo es un entomopatógeno ampliamente utilizado para el control de termitas (Rath 2000), áfidos (Kim *et al.* 2013), trips (Lee *et al.* 2017), escarabajos (Thurkathipana y Mikunthan 2008), mosca blanca (Sani *et al.* 2020), entre otros. En literatura se ha descrito ampliamente el

modo de infección directo de *B. bassiana* sobre insectos, el cual inicia con la deposición de conidios sobre su cutícula, seguido de la formación de un tubo germinal, el cual a través de reacciones enzimáticas y mecánicas perfora dicha cutícula para penetrar el insecto, así una vez en el hemocele, la hifa crece, causando daño del tejido y depleción de la nutrición lo que provoca con el tiempo la muerte del insecto (Hajek y St. Leger 1994). Posteriormente se puede observar el crecimiento del micelio y conidios sobre el cadáver del insecto, lo cual es denominado micosis (Fig. 1).

Figura 1. Micosis causada por *Beauveria bassiana* en insecto adulto de mosca de repollo *Delia radicum* (Linnaeus). Tomado de Goetel *et al*. (2005).

Por otro lado, hay evidencia que señala que las plantas podrían ser potencialmente parte del ciclo de vida de Bb (Gurulingappa *et al.* 2010). Diversos reportes ubican este entomopatógeno también como endófito natural en plantas como el *Pinus radiata* (Reay *et al.* 2008; Lefort *et al.* 2016), maíz (Sn *et al.* 2018; Wanger y Lewis 2000), caña de azúcar (Kasambala *et al* 2021), entre otros. Pero además, un sin número de investigaciones demuestran la factibilidad de establecer Bb como endófito por medio de inoculaciones artificiales (Vega *et al.* 2008), en diversos tipos de plantas como por ej. en alcachofa (Jouini *et al.* 2014), amapola de opio (Quesada-Moraga *et al.* 2006), café (Posada *et al.* 2007), tomate, algodón (Ownley *et al.* 2008; Castillo-López *et al.* 2014), chile (Allegrucci *et al.* 2020), cacao (Posada *et al.* 2010), calabacita (Jaber y Salem 2014), frijol (Parsa *et al.* 2013; Volkova *et al.* 2020), nuez (Ramakuwela *et al.* 2020), papa (Zhang 2021), plátano (Akello *et al.* 2008), sorgo (Tefera y Vidal 2009), pepino (Rajab *et al.* 2020), uva (Jaber 2015), trigo, calabaza

(Gurulingappa *et al.* 2010) entre otros. Siendo el principal interés, el de control biológico de insectos plaga y en fechas más recientes, el efecto benéfico que pudiera tener sobre la planta cuando Bb se encuentra como endófito (Bamisile *et al.* 2018).

2.4.2 Efecto de *Beauveria bassiana* en plantas

Uno de los principales efectos medidos cuando se han estudiado plantas con Bb establecida de manera natural o aplicada artificialmente como endófito, es mayor tolerancia a estrés biótico (Bamisile *et al.* 2018). En diversos estudios se ha observado una disminución en las poblaciones de insectos en plantas inoculadas o efectos adversos en su reproducción (Gurulingappa *et al.* 2010; Castillo-López *et al.* 2014; Dash *et al.* 2018; Sánchez-Rodriguez *et al.* 2017; Bamisile *et al.* 2019; Russo *et al.* 2019; Allegrucci *et al.* 2020; Shaalan *et al.* 2021;). También se ha observado mayor tolerancia a patógenos fúngicos (Owley *et al.* 2008; Jaber 2015, 2018) y además en un estudio inusual Jaber y Salem (2014) demostraron por primera vez que Bb tiene la capacidad de aminorar los efectos causados por virus en plantas, observando síntomas significativamente menos severos del virus del mosaico amarillo de la calabacita ZYMV (*zucchini yellow mosaic virus* por sus siglas en ingles) en plantas inoculadas.

Se han reportado cambios en el desarrollo de las plantas cuando Bb se encuentra como endófito, como por ej.: en frijol se ha demostrado potenciamiento o aceleramiento en el crecimiento (Dash *et al* 2018; Afandhi *et al.* 2019) y plantas más altas que los controles, cuando se utilizan varias cepas inoculadas (Volvoka *et al.* 2020); en vid se observa mejor crecimiento de raíz en plantas inoculadas (Mantzouskas *et al.* 2021) y aumento de calcio y magnesio en hojas, pero no existe diferencia en crecimiento comparado con controles (Moloinyane y Nchu, 2019); en trigo promueve el crecimiento y aumenta el peso de tallo y raíz (Jaber 2018), además ha aumentado la producción alrededor de un 40%, comparado con los controles (Sánchez-Rodríguez *et al.* 2017). En maíz incrementa su altura, el número de hojas, el porcentaje de germinación y el rendimiento (Russo *et al.* 2019), incluso promueve su floración temprana (Kuzhuppillymyal-Prabhakarankutty *et al.* 2020); potencia el crecimiento y aumenta la producción de compuestos

fenólicos en plantas de pepino (Shaalan *et al.* 2021), aumenta la altura y número de hojas en plantas de limón (Bamisile *et al.* 2020), aumenta la materia seca y número de flores en plantas de algodón (Castillo-López y Sword 2015). También se ha reportado algunos efectos adversos por las inoculaciones, como la baja en clorofila en plantas de yuca (Greenfield *et al*. 2016) y alternaciones en el potasio en cultivos de trigo y tomate (Sánchez-Rodríguez *et al*. 2015).

Otro de las características menos reportadas y/o estudiadas cuando se estudia Bb como endófito en plantas, es mayor tolerancia a estrés abiótico (Bamisile *et al.* 2018). En un estudio Ferus *et al.* (2019) demostró mayor tolerancia a sequía en plántulas de roble rojo (*Querus rubra* L.) inoculadas con Bb, relacionando dicha tolerancia al posible estimulo por parte del hongo hacia el crecimiento de la raíz. Por otro lado, Kuzhuppillymyal-Prabhakarankutty *et al.* (2020) demostraron que Bb promueve mayor tolerancia a sequía en maíz. En otro estudio se reportó alivio de síntomas de clorosis causado por deficiencia de hierro en trigo y tomate (Sánchez-Rodríguez *et al*. 2015).

2.4.3 Estudios con cepas de *Beauveria bassiana*

El estudio individual y/o comparativo de cepas en pruebas de establecimiento de Bb en plantas es muy importante, ya que se ha demostrado que diferentes cepas pueden tener efectos distintos en las plantas; aunque no todos los estudios concluyen la significancia de los tipos de cepa. Por ej. en un estudio realizado en la plantas de habas (*Vicia faba),* inoculadas con Bb a nivel de semilla mostraron un efecto de potenciación en el crecimiento de plantas en cuanto a las variables medidas de: altura, largo de raíz, largo y peso de tallo, número de hojas y número de habas con respecto al control sin inocular mostrando una mejora en las variables independientemente de las cepas utilizadas de dichos microrganismos (Jaber y Enkerli, 2016).

Sin embargo, hay estudios que indican que las cepas si tienen un efecto distintivo sobre la planta, como el estudio realizado en yuca (*Manihot*

esculenta Krantz), donde se mostró que hubo una diferencia significativa en el grado de colonización y potenciación en el crecimiento de la planta, dependiendo de las cepas utilizadas, tanto de Bb como de *Metarhizium* (Greenfield *et al., 2016*). Jaber (2015) señala también que hubo diferencia significativa en el grado de colonización con diferentes cepas en plantas de vid. En otro estudio realizado en frijol, se observó que en aplicaciones de once cepas de Bb y *Beauveria pseudobassiana* todas colonizaban en algún grado plantas, pero solo tres con el mayor grado de establecimiento, tuvieron efectos significativamente diferentes sobre la altura de las plantas (Volkova *et al.* 2020). En plántulas de castaña de la india se observó que de tres cepas probadas (dos Bb y una *B. pseudobassiana*), todas tuvieron menos efectos adversos causados por el gusano minador (*Cameraria ohridella* Deschka & Dimic) que las plantas sin inocular, sin embargo entre las cepas hubo diferencias significativas en cuanto a la cantidad de tuéneles en el follaje (Barta, 2018), En un estudio utilizando tres cepas de Bb, el autor destaca que solo una cepa tuvo un efecto significativo en el mejoramiento en la altura y número de hojas en plántulas de limón (Bamisile *et al.* 2020). En otro estudio las cepas RGM-557 y RGM-731 de Bb produjeron plantas más altas, pero solo la cepa RGM-731 logro una diferencia significativa en biomasa de plantas de tomate (Barra-Bucarei *et al.* 2020). Mas interesante aun, las respuestas de cepas individuales a nivel molecular han sido estudiadas también, ya que en un estudio que analizó microarreglos de las cepas BG11 y FRh2, mostro evidencia de reprogramación transcripcional de las vías de defensa de la planta, las cuales tuvieron cambios específicos de cepa en la expresión de genes relacionados con patogénesis, fitoalexinas, ácido jasmónico y salicílico, además de señalar que las inoculaciones a nivel de raíz en plantas de *Arabidopsis* mostraron que solo la cepa BG11 incrementó significativamente el crecimiento de la planta pero no la cepa FRh2 (Raad *et al.* 2019).

2.5 Métodos de aplicación artificial y su efecto en la planta

Uno de parámetros medidos en algunos experimentos con inoculaciones de Bb en plantas, es determinar si los métodos de aplicación (semilla, suelo o foliar) tienen un efecto significativo sobre el

establecimiento, potenciación del crecimiento y demás variables medidas en las plantas, el cual ha sido identificado como una limitante para la buena colonización en diversos estudios (Bamisile *et al.* 2018). Aplicaciones artificiales de Bb se han logrado por inoculación de conidios o blastosporas a nivel de suelo, sumergiendo raíz de plántulas, aplicaciones sobre semillas, aspersiones en tallos u hojas o inyección de tallos en plantas mono y dicotiledóneas (Posada *et al* 2007; Tefera y Vidal 2009; Gurulingappa *et al.* 2010; Bamisile *et al.* 2018). Hay estudios que confirman que la sustentabilidad de la producción de un cultivo y sus estrategias de protección basados en el uso de Bb, depende de la efectividad del método de inoculación y del tipo particular del cultivo (Sánchez-Rodriguez *et al.* 2017), pero existen resultados diversos. Por ejemplo, en el estudio de Tefera y Vidal (2009) concluyen que el crecimiento de plantas de sorgo (*Sorghum* spp.), fue afectado por el medio de crecimiento y no por los métodos de aplicación del endófito (semilla, suelo y foliar) donde Bb se había podido establecer con todos los métodos siendo el foliar el mejor. Por otro lado, Sánchez-Rodriguez *et al.* (2017); concluyeron que el método de inoculación si tiene un efecto significativo sobre el crecimiento de plantas de trigo, incluso un aumento del 40% en la producción con el método de aplicación en semilla, comparado con controles sin tratar. Confirmando otro estudio con inoculación en semilla en trigo, un aumento en algunos parámetros de crecimiento de plantas (Jaber 2018). En otro estudio hecho en frijol, se observó un aumento significativo en el desarrollo causado por mejor establecimiento después de la aplicación en suelo y al asperjado en hojas, pero no por el método de aplicación en semilla (Aphandi *et al.* 2019). Posada *et al.* (2007) concluye que, para inocular plántulas de café, el mejor método es la inyección de tallos, comparado con asperjado foliar y aplicaciones al suelo. En plantas de chile se demostró que fue mejor la técnica de asperjado foliar para el establecimiento de Bb, que aplicando a semillas o sumergido de raíces (Allegrucci *et al.* 2020). Aun con el mismo cultivo se reportan resultados variables. Por ejemplo, en tomate, se demostró que la colonización de Bb por medio de asperjado foliar disminuyó con el tiempo (Allegrucci *et al.* 2017), pero en otro estudio también con asperjado foliar (por el envés) demostró que con el tiempo la colonización de Bb en las plantas de tomate

aumentaba (Gurulingappa *et al.* 2010).

Resultados distintos en el mismo cultivo también se puede deber a la gran diversidad de variables contenidas en cada experimento, como: cepas del endófito, variedad de planta utilizada, tipo de tensoactivos usados para aplicar los endófitos, estado fenológico de la planta, tipo de suelo, si esta estéril o no, tipo de clima, como se mide la persistencia del hongo en la planta y en que tejidos se evalúa, entre otros.

2.6 Métodos actuales para estudios de *Beauveria bassiana* como endófito

2.6.1 Tipos de métodos

Las metodologías de análisis de hongos endófitos en general son: i) observación directa al microscopio, ii) métodos dependientes de cultivo del endófito y iii) métodos independientes de cultivo (Sun y Guo 2012).

2.6.1.1 Observación directa al microscopio

En el método directo de observación, se examinan estructuras de endófitos directamente al microscopio electrónico, en el cual se pueden observar toda la microbiota dentro del tejido de la planta, particularmente hongos que no pueden ser cultivables en el laboratorio, sin embargo la mayoría de los hongos endófitos dentro de las plantas, solo tienen estructuras de hifas y no pueden ser identificados de acuerdo por su morfología en ninguna categoría taxonómica debido a la falta de estructuras productoras de conidios sexual o asexual, por lo que esta metodología no es muy utilizada en estudios de diversidad (Sun y Guo 2012). Por este motivo los endófitos inoculados artificialmente como Bb y otros entomopatógenos endófitos generalmente necesitan primero ser cultivados en medios donde esporulen para poder observar sus estructuras reproductoras para su identificación. Pero aun así esta metodología de observación directa al microscopio es importante para observar el tipo de tejido en el cual se establece el organismo en el cultivo seleccionado. En un estudio, Landa *et al.* (2013) lograron detectar al Bb establecido en plantas de opio, modificando genéticamente al microorganismo con la proteína verde fluorescente (GFP por sus siglas en

ingles) para poder ser observado en microscopio de fluorescencia, siendo su principal desventaja el trabajo laborioso para la transformación del organismo. Existe además otra metodología basada en diacetato de fluoresceína, para observar la presencia de Bb estando como endófito directo al microscopio de fluorescencia, pero es solo para observar preparaciones frescas de tejido inoculado en el laboratorio (Wei y Liu 2021).

2.6.1.2 Métodos dependientes de cultivo de tejido

En contraste al método de observación directo, el método dependiente de cultivo se ha utilizado frecuentemente en estudios de diversidad, ya que es importante aislar el endófito para estudiarlo en: caracterización, diversidad de especies, estudio de endófitos inoculados artificialmente o para estudiar metabolitos secundarios de importancia biológica (Sun y Guo 2012). Este método es el estándar de oro utilizado para recobrar Bb cuando se inocula artificialmente como endófito y es ampliamente utilizado. Sin embargo, con este método, se tiene la incertidumbre si el lavado (para retirar los microorganismos de la superficie) afecte la viabilidad del endófito y se pueden dar casos de falsos negativos en tejidos donde se establezca el endófito en una cantidad baja.

Frecuentemente, los lavados utilizan sustancias bactericidas y/o fungicidas, como el NaClO, y algunos tensoactivos (Parsa *et al.* 2013; Greenfield *et al.* 2015), por lo que se deben ajustar los parámetros de tiempos para cada tipo de tejido, y aun así hay contaminaciones donde las muestras de tejido deben descartarse. Esta metodología es buena cuando se manejan cantidades pequeñas de plantas y se tiene un laboratorio disponible para procesarlas rápidamente, ya que una vez muestreado el material vegetal este se empieza a degradar y no se puede congelar con nitrógeno las muestras para conservarlas, ya que sería imposible hacer un lavado posteriormente, por lo que se deben procesar las muestras en pocos días. Otra desventajas que tiene esta metodología es, que no se tiene la certidumbre si el endófito obtenido es la cepa que se inoculó.

2.6.1.3 Métodos independientes de cultivo

Los métodos independientes de cultivo utilizan técnicas moleculares

para hacer PCR *in planta* (sin cultivo del tejido), estas muestras llevan una mezcla del ADN de la planta y del endófito, por lo que previo a la extracción del ADN se requiere también un lavado de la muestra para retirar los epifitos de la superficie (Sun y Guo 2012). Para esta metodología no importa que los endófitos no se encuentren viables ya que aun así podrían ser amplificados. Dentro de las secuencias mayormente utilizadas para la detección de endófitos fúngicos, está la amplificación de *Internal Transcribed Spacer* (ITS) 28S ó 18S del ADNr (Fig. 2), ya que son secuencias en tándem, repetidas miles de veces, por lo que son fáciles de amplificar aunque haya cantidades pequeñas de ADN blanco, siendo las secuencias ITS y su posterior secuenciación, las preferidas para la identificación de hongos, ya que muestran en general mayor resolución que las secuencias 18S y 28S para detectar género y especie (Schoch *et al.* 2012).

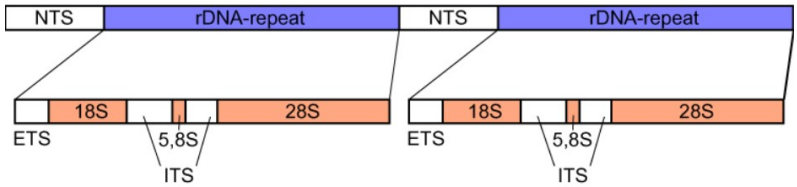


Figura 2. Distribución de secuencias ITS, 18S y 28S del ADNr en células eucariotas.

Para el caso especial de detección de Bb, existe una metodología basada en la amplificación de secuencias ITS por medio de un PCR anidado *in planta* (*Nested PCR* directo del genoma de la planta) con un buen desempeño, la cual no necesita secuenciación posterior, ya que en este estudio se diseñaron oligonucleótidos específicos para la detección de esta especie (Landa *et al.* 2013; Garrido-Jurado *et al.* 2016) lo cual ayuda a amplificar solamente Bb dentro de una gran variedad de hongos, siendo su única desventaja que no distingue entre cepas de Bb. Otras técnicas moleculares que se han utilizado para la detección de Bb es el PCR cuantitativo o qPCR (por sus siglas en ingles), donde se ha logrado detectar hasta 26 fg del ADN del Bb en plantas de opio por cada 10 ng de ADN de planta (Landa *et al.* 2013; Garrido-Jurado *et al.* 2016). Esta técnica tiene pocas desventajas sobre otras técnicas, solo que es más costosa que un PCR

convencional y en específico, esta técnica tampoco distingue entre cepas de Bb. Al final ambos métodos, dependiente e independiente de cultivo, tienen sus ventajas y desventajas, por lo que la mejor estrategia es una combinación de ambas técnicas (Porras-Alfaro y Bayman, 2011)

2.6.2 Métodos moleculares para análisis de cepas

El análisis de cepas específicas de Bb en campo no es fácil ya que existen especies nativas que se podrían establecer en el cultivo blanco. A la fecha existen diversas investigaciones para determinar por ejemplo la variedad de aislados de Bb provenientes de alguna muestra vegetal (Reay *et al.* 2010;Kambrekar y Aruna 2018), de algún insecto plaga (Urtz y Rice, 1997; Castrillo y Brooks 1998; Valderrama *et al.* 2000; Takatsura 2007; Mitina *et al.* 2011; Dhar *et al.* 2019; Furuie *et al.* 2022) o del suelo (Wang *et al.* 2005; Estrada *et al* 2007) incluso para el monitoreo de aislamientos de Bb en insectos (Neuvéglise y Brigoo 1997; Wang *et al.* 2004), pero en general existen pocas investigaciones con metodologías que sean utilizadas para dar monitoreo de una o varias cepas conocidas, cuando son aplicadas en plantas y establecidas como endófitos. Por ejemplo, un estudio utilizando la técnica de "Región Amplificada de Secuencia Caracterizada" (SCAR por sus siglas en inglés), en combinación con la técnica dependiente de cultivo para la búsqueda de la cepa GHA introducida en un campo, Castrillo *et al.* (2003) lograron buenos resultados con uno de los tres pares de oligonucleótidos diseñados, donde la técnica fue capaz de detectar hasta 100 pg de DNA genómico de la cepa en muestras de suelo; aunque esta técnica no estuvo diseñada para la búsqueda de GHA como endófito y no es muy sensible. En otro estudio utilizaron otro de esos tres pares de oligonucleótidos diseñados, observándose que fue útil para detectar la cepa Bb ITCC 4796 estando como endófito en plantas de yute (*Corchorus capsularis* L.), pero como no se comprobó en esa investigación que esos oligonucleótidos fueran exclusivos de esa cepa, se concluyó solamente que eran buenos para detectar Bb estando como endófito en tallo, hojas y cápsulas del cultivo antes mencionado (Biswas *et al.* 2012). En un estudio, Landa *et al.* (2013) lograron dar monitoreo a la cepa 04/01-tip para establecerse en plantas de opio, modificando genéticamente al microorganismo con la proteína verde

fluorescente GFP para poder ser observado en microscopio de fluorescencia. En otro estudio se logró la detección de tres cepas de Bb en plantas de maíz, por medio de la amplificación del gen del Factor de Elongación 1-alfa (*efl*α por sus siglas en inglés), con su posterior secuenciación (Mckinnon *et al.* 2018), lo que es poco práctico y costoso cuando se tiene un alto número de muestras. Otra técnica utilizada para la determinación de cepas de Bb es el análisis de microsatélites, la cual se basa en el grado de polimorfismos que pueda haber entre ellas, solamente que los hongos exhiben un grado menor de polimorfismos que otros organismos (Dutech 2007), pero aun así se ha utilizado con buenos resultados. En un estudio, Reineke *et al.* (2014) mostraron que tres marcadores de microsatélites (SSRs, por sus siglas en inglés) previamente diseñados para diferenciar entre cepas de Bb (Rehner y Buckley 2003) fueron efectivos para su diferenciación después de cultivarlas en diferentes sustratos y en muestras de hojas, pero no se probó *in vivo* como endófito. En general si existen metodologías para el análisis de cepas para su monitoreo, pero existen propuestas para mejorarlas.

2.6.3 Análisis de cepas por medio de intrones

Los intrones del grupo I (IDGI) son un tipo de enzimas de ARN llamadas también ribozimas, las cuales tiene la capacidad de catalizar su propio *splicing*, entre otras actividades (Saldahana *et al.* 1993). Están distribuidos en algunos bacteriófagos, bacterias, eucariotas inferiores (hongos y protozoarios) y plantas superiores; sin embargo, se sabe que su ocurrencia en bacterias es muy esporádica y aparentemente ausente en el reino animal (Dujon, 1989). Entre genes, que se encuentran interrumpidos por IDGI, están el ARNr, el ARNm y en ARNt de genomas de procariotas y en el genoma nuclear, mitocondrias y cloroplastos de eucariotas inferiores. Para el caso de plantas superiores, estos intrones están ampliamente distribuido en los genes *coxI* de mitocondrias de angiospermas (Cho *et al.* 1998) y en cloroplastos (Kuhsel *et al.* 1990; De Longevialle *et al.* 2010).

En hongos saprofitos y parasíticos, se han encontrado exclusivamente en el genoma nuclear, como complejos repetidos, usualmente localizados en los genes de ARNr de la subunidad pequeña (SSU por sus siglas en inglés) y

subunidad grande (LSU por sus siglas en inglés) (De Priest 1993; Perotto *et al*. 2000). Los intrones del grupo I se caracterizan por la presencia de elementos de secuencias conservados llamados P, Q, R y S (Fig. 3), los cuales están envueltos en la formación de las estructuras parcialmente apareadas (hélices), llamadas P1-P9, las cuales forman el centro de la estructura secundaria, esenciales para el *auto-splicing* (auto-corte) de los transcritos de ARN (Woodson 2005).

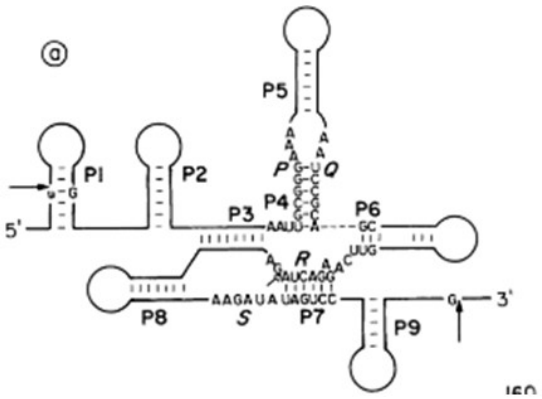


Figura 3. Estructura general de Intrones de tipo I. Elementos de secuencia conservados P, Q, R y S y hélices P1-P9.

Como su distribución es irregular, pueden estar presente en algunos aislados de la misma especie y en otros no (Dujon 1989). Un estudio realizado por Wang *et al.* (2003) identificaron cuatro sitios de inserción de IDGI de cepas axénicas de Bb en la subunidad mayor LSU del ADNr en las posiciones conservadas Ec2563, Ec2449, Ec2066 y EC1921 a los cuales denominaremos sitios de inserción I, II, III y IV respectivamente (Fig. 4)

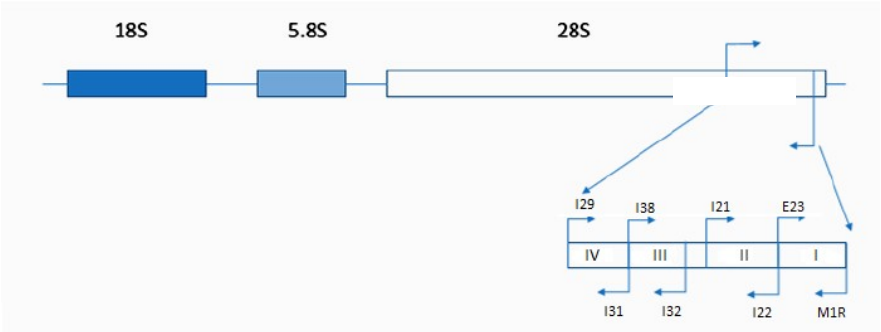


Figura 4. Representación de la región 3´OH de la subunidad 28S del ADNr de *B. bassiana* con sitios de inserción de IDGI I-IV. Oligonucleótidos con flechas para la amplificación de los sitios de inserción (Tomado de Wang et al. 2003).

Análisis de las secuencias de estos sitios verificaron que los intrones invariablemente se insertan en dichas secuencias específicas conservadas de la subunidad grande del ribosoma LSU, así como que el patrón de inserción era diferente entre múltiples aislamientos.

Por otro lado, Valadez-Lira *et al.* (2014) demostraron la factibilidad del uso de amplificación del sitio de inserción de IDGI de la LSU para la identificación diferenciada de cepas de Bb nativas del estado de Nuevo León (PTG 1, 2, 4 y 6), donde se logró diferenciar dichas cepas de una comercial (GHA) observando patrones distintos entre las nativas y la GHA. En general dicho estudio y el anterior se realizaron a nivel de cultivos axénicos (y no como endófito en algún cultivo).

A la fecha no existe una metodología basada en la búsqueda del perfil de IDGI para poder distinguir cepas de Bb como endófito, cuando son aplicadas a nivel laboratorio o para dar monitoreo cuando son aplicadas en campo.

2.7 Otros aspectos de *Beauveria bassiana* inoculada

Actualmente existe una necesidad en los métodos de análisis de endófitos por medio de secuencias ITS [secuencia seleccionada por el *Bar Coding of life* para la determinación de género y especie en hongos (Schoch *et al.* 2012)] o de casi cualquier otra metodología que involucren la búsqueda molecular de endófitos, que al hacer pruebas de inoculación artificial de cepas diferentes de la misma especie, por ejemplo en este caso, *B. bassiana* inoculada en algún cultivo y hacer su posterior detección, no hay certeza si la cepa inoculada en la prueba es la que se obtiene por medio de la amplificación. Si bien es cierto, si existen metodologías moleculares para el monitoreo de cepas (anteriormente descritas), estas son muy pocas y laboriosas. Además, todavía existe un área de oportunidad para mejorar las ya existentes, así como explorar el uso de métodos distintos que sean principalmente prácticos.

Por otro lado la principal importancia de contar con métodos que ayuden a dar mayor certeza de las cepas inoculadas, radica en que cepas diferentes tienen cualidades y capacidades distintas de establecerse en el

mismo cultivo bajo las mismas condiciones (Raad *et al*. 2019) y diversos estudios demuestran que sus efectos sobre las plantas son también distintos (Bamisile *et al.* 2020; Barra-Bucarei *et al.* 2020; Barta 2018; Greenfield *et al*. 2016; Jaber 2015; Raad *et al.* 2019; Volkova *et al*. 2020). En general, los estudios que ayuden a dar mayor certeza sobre el monitoreo de cepas inoculadas serán de gran ayuda para:

i) dar seguimiento del microrganismo inoculado en pruebas en campo,
ii) tener una mayor seguridad que el resultado obtenido en el cultivo sea por la cepa que se está inoculando y no por alguna otra cepa que se haya establecido en el cultivo de manera natural.
iii) hacer una correlación entre el tipo de cepa inoculada y los resultados obtenidos sobre la planta o el insecto plaga o ambos.

Por lo anterior el principal objetivo de este proyecto fue el desarrollo de una metodología para dar soporte al monitoreo de cepas cuando son aplicadas artificialmente en plantas. Dicha metodología se basó en la búsqueda *in planta* del perfil de inserción de IDGI de la subunidad mayor del gen de ARNr de tres cepas de Bb GHA, BBPTG4 y BB37 cuando están como endófitos en plantas de frijol; ya que es un método practico para diferenciar algunas cepas axénicas, no se tienen que diseñar oligonucleótidos específicos para cada cepa, no requiere secuenciación y que además no existe una metodología para su búsqueda cuando Bb se encuentra como endófito.

3. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad existe la necesidad de contar con metodologías más prácticas para el estudio de endófitos, ya que el método tradicional de plaqueado de tejido es laborioso, consume mucho tiempo y material, y está propenso a dar falsos negativos por el uso de sanitizantes para limpiar el tejido. Además, se requieren técnicas moleculares que sean más exactas y sencillas para el monitoreo de cepas cuando son aplicadas en campo, para asegurar que el resultado obtenido es por la cepa aplicada y no alguna nativa. Finalmente, no existe una metodología basada en la búsqueda del perfil de inserción de intrones del grupo I, para la detección e identificación a nivel de cepa cuando *Beauveria bassiana* está presente como endófito en frijol.

4. HIPÓTESIS

La detección del perfil de inserción de intrones del grupo I, por medio de PCR anidado "*in planta*", ayuda a diferenciar entre tres cepas de *Beauveria bassiana* (GHA, BBPTG4 y BB37), establecidas como endófitos en cultivos de frijol.

5. OBJETIVO DEL TRABAJO

5.1 Objetivo general

Estandarizar una metodología para la detección "*in planta*" de los cuatro sitios de inserción de intrones del grupo I de la región 3'OH de la subunidad mayor del ADNr de las cepas de *B. bassiana* GHA, BBPTG4 y BB37, establecidas como endófitos en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) y verificar su efectividad para discernir entre cepas.

5.2 Objetivos específicos

1. Obtener los patrones de inserción de intrones del grupo I del gen 28S de cultivos monospóricos de las cepas de *B. bassiana*. GHA, BBPTG4 y BB37.
2. Estandarizar técnica para la detección del perfil de inserción de intrones del grupo I del gen 28 S de *B. bassiana*, presentes como endófito en planta de frijol.
3. Seleccionar la mejor técnica de inoculación de *B. bassiana* en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) var. Pinto Saltillo.
4. Determinar la funcionalidad de la técnica estandarizada en el objetivo 2, para discernir entre las cepas GHA, BBPTG4 y BB37 inoculadas en frijol a nivel laboratorio.
5. Determinar el desempeño de la técnica con prueba de campo en frijol var. Pinto Saltillo, con las cepas GHA, BBPTG4 y BB37.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

Metodología para el Objetivo 1. Obtener los patrones de inserción de intrones del grupo I del gen 28S de cultivos monospóricos de las cepas GHA, BBPTG4 y BB37

6.1. Generación de cultivos monospóricos para análisis de intrones

Las cepas de Bb fueron provistas por la Unidad de Formulación de Biológicos de la UANL. Se generaron cultivos monospóricos de las cepas GHA, BBPTG4 y BB37 en PDA tomando una asada de cada cepa provenientes de placas con PDA, posteriormente se inoculó por separado un asada de cada cepa en matraces con 100 mL con caldo PDB y se puso a crecer con agitación de 120 rpm por seis días. Pasado el tiempo de crecimiento se sacó un mililitro de cada matraz y se realizaron diluciones de los conidios hasta 1×10^{-5} por separado para cada cepa. Para las diluciones se agregaron 900 μL de agua a seis tubos eppendorf de 1.5 mL y se etiquetaron según la dilución seriada desde 1×10^{-1} hasta 1×10^{-5}; primero se agregaron 100 μL de los conidios prevenientes de caldo en PDB de cada cepa al tubo con la etiqueta de 1×10^{-1} y se mezclaron perfectamente para hacer la primera dilución. Posteriormente se obtuvieron 100 μL de dicha dilución y se agregaron al siguiente tubo etiquetado con la dilución 1×10^{-2} y se mezclaron, se continuó consecutivamente con el resto de las diluciones, hasta obtener la última dilución de 1×10^{-5}. Una vez realizadas las diluciones, se plaquearon las etiquetadas con 1×10^{-4} y 1×10^{-5}, tomando una asada de cada tubo y estriándola en placas nuevas con PDA, las cuales se dejaron creciendo por 12 h a 25 °C en obscuridad.

Se buscaron conidios germinados que estuvieran aislados de otros conidios con la ayuda de un microscopio óptico y los objetivos 4x y 10x; para esto, se colocó directamente la caja Petri sin tapa en el microscopio, teniendo cuidado de tocarla por adentro para no contaminarla. Una vez que se encontró un conidio germinado y aislado, se procedió a hacer cortes finos en forma de un cuadro donde quedara en medio el conidio y con ayuda de un bisturí estéril se extrajo el cuadro de agar con el conidio o espora germinada,

y se traspasó a una placa nueva con PDA, colocando el cuadro con el conidio germinado en el centro de la placa, la cual se incubó una semana a 25 °C en obscuridad, hasta obtener un crecimiento radial en toda la caja, con esporulación, como se muestra en la fig. 5.

Figura 5. Producción de un cultivo monospórico a partir de conidios geminados procedentes de un cultivo multiespórico.

Solamente los monospóricos generados fueron utilizados en todos los experimentos que se describen más adelante. Además, se guardaron en aceite mineral a 4 °C para su conservación y cuando se necesitaban, se realizaban varios pases entre caldo y agar para su reactivación (Anexo A).

6.2. Crecimiento y extracción de ADN de *Beauveria bassiana*

Para la obtención del patrón de inserción de IDGI de cada cepa, se procedió a crecer los hongos obtenidos de los cultivos monospóricos en caldo PDB para realizar posteriormente la extracción de ADN genómico. Bajo el mechero se inoculó una asada de placas Petri con cada cepa en matraces de 100 mL con caldo PDB y se dejaron creciendo por cinco días en agitación 120 rpm a 25°C. Posteriormente se extrajo el ADN de cada cepa con el protocolo de extracción de ADN genómico del kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit A1125 de PROMEGA, utilizando el protocolo descrito para plantas, el cual previamente sé verifico su funcionalidad para extracción

de ADN de hongos con algunas modificaciones; el protocolo se describe a continuación: se agregó 1 mL del hongo crecido en caldo PDB a tubo eppendorf de 1.5 mL. Cada muestra se centrifugó a 5000 rpm por 5 min y se descartó sobrenadante, se volvió a agregar 1 mL del cultivo al mismo tubo, se centrifugó a 5000 rpm por 5 min y se descartó el sobrenadante. Posteriormente, se agregaron 600 µL de la solución *Nuclei Lysis Solution* mantenida en hielo, el pellet se maceró con un pistilo por 3 min y posteriormente se dio un vortex a alta velocidad por 10 segundos. Las muestras se incubaron a 65°C/15 min con agitación y a cada muestra se agregaron 3 µL de ARNasa, invirtiendo el tubo cinco veces. Los tubos se incubaron a 37 °C/15 min y pasado ese tiempo, se dejaron atemperar por 5 min. Adicionalmente, se agregaron 200 µL de la solución *Protein Precipitation Solution*, se le dio un vortex a alta velocidad por 30 segundos y el contenido del tubo se centrifugo a 14,000 rpm/3 min. Se tomó solamente el sobrenadante y se pasó a un tubo nuevo, se le agregaron 600 µL de isopropanol al 100% y se invirtió cada tubo 3 veces. El contenido se centrifugó a 14,000 rpm/5 min y se decantó el sobrenadante. Se lavó el pellet de ADN con 600 µL de etanol al 70%, se invirtió el tubo 5 veces, se centrifugó a 14,000 rpm/5 min y se descartó el sobrenadante. Los tubos se dejaron secando por una hora o el tiempo necesario para que evaporara el alcohol y, pasado ese tiempo, se disolvió el pellet en 100 µL de agua destilada inyectable estéril previamente filtrada con un filtro de 0.25 µm. Finalmente, las muestras se incubaron a 65 °C/15 min para homogenizar y se guardaron a -20 °C.

6.3. Medición de concentración de ADN

Una vez obtenido el ADN genómico, se procedió a su cuantificación por medio de un espectrofotómetro NanoDrop Lite de Thermo Fisher Scientific™. Para lograrlo, se colocó un microlitro de agua inyectable previamente filtrada con filtro de 0.25 µm, en el pedal del equipo para hacer el blanco y, una vez calibrado, se colocó la muestra a leer para obtener la concentración de ADN y para verificar la pureza de la muestra a un rango de absorbancia entre A_{280}/A_{260}.

6.4. Amplificación de sitios de inserción de intrones del grupo I

Una vez obtenido el ADN de las tres cepas se procedió a realizar la amplificación de los cuatro sitios de inserción de IDGI del gen 28S del ARNr de Bb. Para obtener el perfil de inserciones de cada cepa se realizaron cuatro amplificaciones diferentes en cada muestra, utilizando los oligonucleótidos descritos por Wang *et al.* (2003). Para amplificar cada uno de los cuatro sitios de inserción de intrones de las posiciones Ec2563 (I), Ec2449 (II), Ec2066 (III) y Ec1921 (IV) se utilizaron los oligonucleótidos: E23F y M1R para el sitio I, el 121F y 122R para el sitio II, el I38F y I32R para el sitio III y el 129F y 131R para el sitio IV de inserción (Tabla 1).

Tabla 1. Secuencia de oligonucleótidos para amplificación de sitios de inserción IDGI I-IV.

Sitio	Oligo	Secuencia
I	E23 F	5'-CCG AAG GAA TTC GGT AAG CG-3'
	M1 R	5′-GGT AAA ACT AAC CTG TCT CAC G-3′
II	121 F	5′-CGA TCC TTT AGT CCC TCG AC-3′
	122 R	5′-CGC TTA CCG AAT TCC TTC GG-3′
III	138 F	5′-ATG GGC TTG GCA GAA TCA GCG-3′
	132 R	5′-CAG CCA AAC TCC CCC CTG-3′
IV	129 F	5′-CTG CCC AGT GCT CTG AAT GTC-3′
	131 R	5′-CGC TGA TTC TGC CAA GCC CAT-3′

Cada amplificación se realizó de un volumen final de 20 µL, las cuales contenían: 0.5 µM de cada oligonucleótido, 1 µL de ADN del hongo (concentración 20-30 ng/µL) y 10 µL de GoTaq® Green Master Mix 2X (Promega Corp., Madison, WI. La amplificación se realizó en un equipo T100 Thermal Cycler (BioRad Laboratoires) con un programa de amplificación que se describe a continuación: 4 min a 95 °C como paso de desnaturalización inicial, seguido de 35 ciclos de: desnaturalización por 45 s a 94 °C, alineación por 45 s a 57°C y extensión de 45 s a 72 °C y un paso de extensión final de 4 min a 72 °C.

Para visualizar las bandas se corrió un gel de agarosa al 1% a 100 V durante 60 min con el marcador molecular de Promega de 100 pb. Los geles

se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron en un transiluminador Gel Doc XR+ Imagin System de la marca Biorad.

Para visualizar de manera rápida si cada uno de los cuatro sitios contenía un intrón insertado o no, las bandas con más de 500 pb aproximadamente indicaban una inserción de intrón. En la tabla 2 se muestran los tamaños moleculares para cada sitio cuando hay ausencia o presencia de intrones en pares de bases. Todos los fragmentos con y sin intrones se enviaron a secuenciar (Anexo B).

Tabla 2. Tamaños moleculares de las bandas amplificadas en pares de bases según ausencia o presencia del intrón**.**

Sitio	Ausencia	Presencia
Bb1	84 pb	501 pb
Bb2	157 pb	656 pb
Bb3	244 pb	606 pb
Bb4	207 pb	620 pb

Metodología para el Objetivo 2. Estandarizar técnica para la detección del perfil de inserción de intrones del grupo I del gen 28S de *B. bassiana*, presentes como endófito en planta de frijol.

6.5. Amplificación de los sitios de inserción IDGI en frijol.

Las variedades de frijol Pinto Americano y Pinto Saltillo fueron donados al laboratorio por la Facultad de Agronomía, departamento de Nutrición de la UANL. Primero para retirar los microorganismos epífitos, las semillas se lavaron con 20 mL de 0.5% de NaClO por 2 min, después con 20 mL de etanol al 70% por 2 min y finalmente se les dio tres enjuagues de 30 mL c/u con agua estéril. Posteriormente se realizó la extracción de ADN por medio del protocolo de Promega A1125 descrito en la sección 6.2, seguidamente se realizó la amplificación de los cuatro sitios de inserción de intrones I-IV para determinar si arrojaban algún resultado. Para esto se utilizaron los mismos oligonucleótidos y condiciones descritas en 6.4.

6.6. Análisis *in silico* de sitios de inserción de IDGI en ADN de plantas

Se realizó un análisis bioinformático en frijol (*Phaseolus* vulgaris) y también en otras plantas como chile (*Capsicum annuum*), sorgo (*Sorghum* spp.) y Maiz (*Zea mays*).para determinar la posible interacción de los oligonucleótidos que amplificaran los sitios I-IV con el genoma de dichas plantas. Se utilizó la "herramienta básica de búsqueda por alineación local" (*BLAST* por sus siglas en inglés).

6.7. Prueba de PCR directo simulando establecimiento de Bb en frijol.

Para determinar si un PCR directo fuera factible para detectar el perfil de IDGI del gen 28S de Bb en mezcla con el ADN de frijol, se realizó una prueba fabricando muestras con concentraciones conocidas de ADN de Bb en mezcla con ADN de frijol, para realizar un PCR de un paso. Para esta prueba primero se prepararon *stocks* de ADN de frijol a una concentración 10 ng/µL de raíz, tallo y hojas de manera separada. Además, se preparó también un *stock* de ADN de la cepa BBPTG4 a una concentración de 10 ng/µL para hacer diluciones seriadas, para las cuales, se agregaron a 4 tubos eppedorf de 0.6 mL 90 µL de agua destilada, seguidamente se agregaron 10 µL del tubo del stock de Bb de 10 ng/µL al primer tubo con la etiqueta 1×10^{-1}, se mezcló con pipeta y se tomaron 10 µL de ese tubo y se agregaron al tubo con la etiqueta 1×10^{-2}, así consecutivamente hasta tener la dilución hasta 1×10^{-4}, quedando las concentraciones de las diluciones seriadas en 1000, 100, 10 y 1 pg/µL de ADN de BBPTG4. Después se prepararon cuatro muestras con mezclas de ADN de frijol y Bb para probar el PCR de un paso, las cuales contenían 1 µL del stock de ADN de planta (10 ng) y 1 µL de los stocks de cada una de las diluciones. Además, se preparó un control positivo también con 1 µL del stock de ADN de planta (10 ng) y 1 µL de ADN de BBPTG4 de otra muestra que se encontraba a una concentración de 400 ng/µL. Posteriormente se realizó el PCR directo utilizando las muestras de las cuatro diluciones con ADN de Bb y frijol y el control positivo, utilizando los oligonucleótidos y condiciones descritas en el apartado 6.4.

6.8. Diseño de oligonucleótidos para desarrollo de PCR anidado

Se diseñaron oligonucleótidos para amplificar el gen 28S del ARNr del Bb que flanqueara toda la región que contuviera los cuatro sitios de inserción desde Bb1 hasta Bb4 y que no hibridaran con el genoma del frijol. Para diseñar dichos oligonucleótidos, se buscó la secuencia del gen en el Banco de Genes del Centro Nacional de información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés). La secuencia se descargó en formato FASTA y se cargó en el programa Amplifix versión 1.5.4 para el diseño de los oligonucleótidos. Una vez seleccionados algunos pares con la ayuda del programa, se realizó también una corrida de PCR *in vitro* con las secuencias de oligonucleótidos seleccionadas para verificar el tamaño del amplicón. Se verificó también que no tuviera buena hibridación y una posible amplificación en el genoma de frijol utilizando la herramienta *Blast* (mencionado en la sección 6.6). Una vez que se tuvieron las posibles secuencias, se enviaron a sintetizar con un proveedor extranjero que sintetiza oligonucleótidos (IDT del inglés *Integrated ADN Technologies*) por medio del intermediario local en México llamado Uniparts.

6.8.1. Condiciones de primera y segunda reacción

Para este objetivo, se estandarizo una amplificación de dos pasos (PCR anidado). En esta primera etapa, para determinar las condiciones de amplificación de la primera reacción (reacción de enriquecimiento), se utilizó solamente ADN de Bb (sin ADN de frijol). Primero se probaron condiciones utilizando los oligonucleótidos previamente diseñados los cuales amplificarían toda la región 3'OH del gen 28S del ARNr de Bb que contenía los cuatro sitios de inserción de intrones y en la segunda reacción (reacción intrones) se usaron los cuatro pares de oligonucleótidos de los sitios de inserción de intrones, descritos por Wang *et al.* (2003) con los cuales se obtiene el patrón distintivo de cada cepa.

Para estandarizar la primera reacción, se probaron cinco mezclas de pares de oligonucleótidos, dichas mezclas se realizaron entre los oligonucleótidos diseñados anteriormente (sección 6.8) y algunos de los diseñados por Wang *et al.* (2003) que delimitaran la zona de las inserciones. Debido a los tamaños teóricos mayores de los amplicones en las cepas

BBPTG4 y BB37 por tener más intrones insertados que GHA, se probaron dos tipos de enzimas, una Taq polimerasa (GoTaq®) Polymerase y una del tipo *Hot start* (Platinum™ Super Fi™ DNA polymerase de ThermoFisher Scientific). Las condiciones para las reacciones con la enzima Taq polimerasa fueron similares a las descritas en la sección 6.4, solo con la variación de la temperatura de alineamiento las cuales se determinaron utilizando la herramienta Tm Calculator (ThermoScientific) para cada juego de oligonucleótidos, seleccionando para el programa la menor temperatura de alineamiento para que todos los oligonucleótidos pudieran amplificar en la misma prueba.

Para la prueba con la enzima Platinum™ Super Fi™ se siguieron las recomendaciones del proveedor en cuanto a los tiempos y temperaturas de desnaturalización, hibridación y polimerización. Finalmente, para la primera reacción, la enzima seleccionada y las condiciones de amplificación se adaptaron a un programa de PCR *touchdown* para que fuera más eficiente el PCR anidado. Para la segunda reacción se utilizaron los oligonucleótidos y el programa descrito por Wang *et al.* (2003).

6.8.2. Límite de detección

Para determinar el límite de detección del anterior PCR anidado (PCR anidado-cepas), se fabricaron controles positivos con cantidades conocidas del ADN de Bb y de frijol. Para lograrlo, se tomaron semillas de frijol var. Pinto Saltillo, y se enjuagaron con NaClO al 3% por 10 s y etanol al 70% por 10 s y se enjuagaron con agua destilada estéril. Dicha semilla se colocó en un contender de plástico sanitizado con algodón y agua estéril y se dejó remojando hasta que germinara. Una vez emergida la plántula, a los tres días se tomó de 2 a 3 cm^2 del tejido de las primeras hojas y se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 mL, posteriormente se procedió a hacer la extracción de ADN utilizando el protocolo de extracción de ADN genómico para plantas del kit A1125 de PROMEGA anteriormente descrito en la sección 6.2. desde la adición del primer buffer.

Esta prueba se realizó solamente con la cepa BB37 (ya que es la que contenía el mayor número de intrones y más pesados que las otras dos cepas) en mezcla con ADN de frijol en concentraciones conocidas. Primero se

prepararon cuatro muestras con mezclas de ADN de frijol y Bb para probar el límite de detección del PCR anidado-cepas, las cuales contenían 1 µL del stock de ADN de planta (10 ng) y 1 µL de los stocks de diluciones de 1000, 100, 10 y 1 pg/µL de BB37 los cuales se prepararon como lo descrito en la sección 6.7. Posteriormente se les agregaron a las muestras los reactivos para la primera y segunda reacción del PCR anidado-cepas descrito anteriormente y se corrió el programa según lo estandarizado en la sección 6.8.1 Posteriormente se realizó el corrimiento y tenido del gel según lo descrito en la sección 6.4.

Metodología para el Objetivo 3. Seleccionar la mejor técnica de inoculación de *B. bassiana* en frijol (*Phaseolus vulgaris*) var. Pinto Saltillo

6.9. Experimentos de inoculación a nivel laboratorio con cepa control

Para determinar cuál técnica de inoculación era mejor, se realizaron pruebas de inoculación a nivel laboratorio. Las metodologías de inoculación que se probaron fueron: inmersión de las semillas en el inóculo, aplicación al suelo y asperjado foliar (haz o envés), utilizando conidios (experimento No. 1) y, además, se determinó también con los tres métodos si era más conveniente el uso de conidios o blastosporas (experimento No. 2).

Ambos experimentos se realizaron solo con la cepa control GHA. Para el crecimiento de plantas de frijol a nivel laboratorio, el Departamento de Cultivos básicos y Oleaginosas, de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León, donó semillas de frijol var. Pinto Saltillo, las cuales se mantuvieron en refrigeración a 4 °C, hasta su uso.

6.9.1 Crecimiento de plantas de frijol

Para esta prueba se prepararon macetas con suelo estéril y no estéril (experimento No. 1). Primero la tierra para maceta (comprada en un vivero de la localidad de San Nicolas de los Garza) se mezcló en una proporción de 2:1 con arena. Posteriormente la mitad de la mezcla se transfirió a 16 macetas de un litro y la otra mitad se esterilizó por autoclave a 121 lb de

presión/15 min. El suelo estéril se dejó enfriar y se depositó en otras 16 macetas de 1 litro previamente sanitizadas, para hacer un total de 32 macetas. Se realizó además otra prueba con suelo de la localidad de Marín Nuevo León (experimento No. 2), el suelo (tipo vertisol) se recoleto de una de las parcelas de prueba de la Facultad de Agronomía de la UANL, el cual se depositó en 36 macetas sin ningún tipo de tratamiento. Las semillas de frijol se lavaron con 20 mL de 0.5% de NaClO por 2 min, después con 20 mL de etanol al 70% por 2 min y finalmente se les dio tres lavados de 30 mL c/u con agua estéril. Para el experimento No. 1 se depositaron tres semillas por maceta y para las pruebas del experimento No. 2 se colocó solamente una semilla por maceta; ambas pruebas se acomodaron en bloques al azar, bajo una lampara fluorescente de 9,200 lúmenes con un fotoperiodo de 12 h de luz-oscuridad. Las plantas se regaban cada día con 100-200 mL de agua potable, si el suelo se observaba con falta de agua. Después de emergidas las plantas, se fertilizaron a los 10 días y 22 días con solución de NPK 15-15-15 (6 g/litro).

6.9.2 Preparación de inoculo de *Beauveria bassiana*

Preparación de conidios. Preparación de inoculo para sumergido de semillas, aplicación al suelo y asperjado foliar: Se activó la cepa GHA en medio líquido PDB por 6 días en agitación de 120 rpm a 25 °C y posteriormente se inoculó por estría en medio PDA 8-12 días a 25°C. Posteriormente se agregaron 10 mL de Inex A al 0.02% a las placas para levantar los conidios raspándolos con un asa de vidrio (solo para el caso del exp. No.1 se utilizó el tensoactivo Tritón X-100 al 0.02% en las inoculaciones de semilla, para el caso del experimento No. 2 se utilizó solamente agua solución salina al 0.9% sin tensoactivo). Después, se vertió el contenido de todas las placas se les agitó en vortex a alta velocidad para dispersar los conidios hacer el conteo.

Preparación de blastosporas. Se preparó inoculo de blastosporas medio de cultivo PDB, los cuales se inocularon con una asada de la cepa GHA proveniente de una placa con PDA y se dejaron en agitación por 8 días a 120 rpm. El caldo se filtró con una gasa para quitar el exceso de micelio y el filtrado se centrifugo a 3000 rpm/7 min a 4°C para sedimentar las

blastosporas. Posteriormente, se decantó el sobrenadante y se agregaron 30 mL de Inex A al 0.02%.

Conteo de conidios o blastosporas. Para la cuenta de conidios se realizaron diluciones seriadas desde 1×10^{-1} hasta 1×10^{-4}, como lo descrito en la sección 6.1. Para hacer el conteo de conidios , se utilizó la cámara de Neubauer, poniendo 10 µL de la dilución 1×10^{-4} y contando los 5 campos en color rojo indicados en la figura 6, para posteriormente sacar un promedio. Para obtener la cantidad de conidios se utilizó la siguiente formula:

$$\text{No. de conidios /mL} = \text{promedio} \times 250{,}000 \times \text{dilución}$$

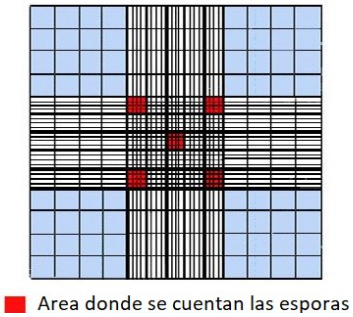


Figura 6. Campos en la cámara de Neubauer para contar conidios.

Una vez contados, los conidios se ajustaron a una concentración de 1×10^{8}/mL, agregando la cantidad de agua necesaria de afore, utilizando la siguiente formula:

$$\text{Volumen final de aforación} = \frac{\text{volumen del stock} \times \text{concentración del stock}}{1 \times 10^{8}}$$

Prueba de viabilidad. Cada vez que se hacían inoculaciones se realizaron pruebas de viabilidad de los conidios o blastosporas. Para esto se cortó bajo el mechero un cuadro de PDA de una placa de Petri y se depositó el cuadrito en un portaobjetos estéril contenido en otra caja Petri nueva estéril, posteriormente se le agregó al cuadro 10 µL de la dilución 1×10^{-4} y se cubrió con un cubreobjetos estéril, se colocó también un algodón húmedo dentro de la caja Petri a un costado del portaobjetos para que no se resecara el agar. Se dejó creciendo 14-22 h (para conidios) y 12 h (para blastosporas),

se visualizó al microscopio en objetivo de 40x para contar conidios germinadas o blastosporas alargadas en un total de 10 campos. Se consideraba un conidio germinado cuando el tubo de germinación se observaba visiblemente más largo que la mitad del diámetro del conidio y para el caso de las blastosporas cuando se observaran las hifas más largas que el observado previo a la incubación. Para considerar el inoculo viable para las pruebas de inoculación solo se utilizaron cultivos con más 90% de conidios/blastosporas germinadas.

6.9.3 Aplicación de GHA en plantas de frijol

Los inóculos de GHA se aplicaron como tratamiento de semilla, aplicación al suelo o asperjado foliar.

Tratamiento de semilla. Las semillas se lavaron (ver lavado de semilla en sección 6.5), posteriormente se sumergieron en un stock de conidios o blastosporas de GHA a una concentración de 1×10^8/mL dejándose incubar por 5 min, seguidamente se dejaron secar y se depositaron en una maceta presionándolas aproximadamente 2 cm de la superficie y se cubrieron con tierra de la maceta.

Aplicación al suelo. Se preparó otro inoculo de GHA a una concentración de 1×10^8/mL el cual se aplicó al suelo a los 21 y 32 días después de la germinación y para las inoculaciones al suelo agrícola a los 30 días solamente. Se aplicó en ambos experimentos la misma cantidad (10 mL) sobre la base del tallo dirigido al suelo.

Aplicación foliar. Se asperjaron 10 mL de la solución stock 1×10^8/mL en el haz de la 2^{da} hoja verdadera y en el envés de la 3^{era} hoja verdadera de la misma planta. Para las aplicaciones foliares en el experimento con suelo agrícola, se aplicaron en haz y envés de hojas de macetas diferentes.

Las tablas 3 y 4 muestran los tratamientos que se realizaron en los experimentos 1 y 2 (experimento con suelo agrícola). Una vez aplicados los tratamientos, se taparon las macetas con bolsas por 12 h.

Tabla 3. Tratamientos en suelo estéril y no estéril (Experimento No.1)

Tratamientos			
Suelo No estéril:		Suelo estéril	
Control:	T1-T4	Control:	T29-T32
Aplicación a semilla:	T5-T8	Aplicación a semilla:	T17-T20
Aplicación al suelo:	T9-T12	Aplicación al suelo:	T21-T24
Aplicación foliar: *	T13-T16	Aplicación foliar: *	T25-T28

*Tratamientos foliares en haz 2da hoja verdadera y envés en 3^{era} hoja verdadera

Tabla 4. Tratamientos en suelo agrícola no estéril* . (Experimento No. 2)

Tratamientos					
Controles		Conidios		Blastosporas	
Semilla:	T1,T4 ,T6	Semilla:	T7, T8, T10	Semilla:	T11 y T12**
Suelo:	T13, T15, T17	Suelo:	T19-T21	Suelo:	T22-T24
Foliar haz:	T26-T28	Foliar haz:	T31-T33	Foliar haz:	T34-T36
Foliar envés:	T29,T30,T25	Foliar envés:	T2 y T18 **	Foliar envés:	T5 y T16**

*Suelo agrícola proveniente de Marín Nuevo León.
**Tratamientos con dos repeticiones.

6.9.4 Medición de variables y evaluación de establecimiento.

Las plantas se sacaron de las macetas 10 días después a la última inoculación en el experimento no.1 y 13 días después de la inoculación en el experimento 2. Se sumergió raíz de la planta en agua para retirar el exceso de suelo, se lavó la raíz con abundante agua y se eliminó exceso de agua para proceder a la medida de variables: número de hojas, altura, peso fresco y largo de raíz.

6.9.5 Lavado y plaqueo de tejido

Para el muestreo de tejido, se cortó alrededor de 15 cm de raíz, 3 hojas por planta y alrededor de 15 cm de tallo, midiendo desde la base de la raíz hacia arriba. Todo el material muestreado se guardó etiquetado en bolsas de aluminio a 4 °C. El material se lavó y plaqueo al siguiente día después del muestreo siguiendo el método descrito por Parsa *et al.* (2015) con ligeras modificaciones, dándole primero a los tejidos un lavado en la tarja, para continuar en la campana de flujo laminar con el apoyo de un mechero con la siguiente secuencia: 20 mL de NaClO al 0.5 % por 60 s, después 20 mL de etanol al 70% por 2 min y tres lavados de 30 mL c/u con agua estéril;

posteriormente se dejó secando en papel previamente estilizado y seco, para absorber el exceso de humedad del lavado. Sucesivamente se cortó el tejido en ≤10 fragmentos de alrededor de 1 cm^2 procurando cortar primero los bordes del tejido, seguidamente se depositaron los fragmentos en placas con agar PDA con tetraciclina, penicilina, estreptomicina a 2 mg/L, las cuales se incubaron a 25°C en obscuridad por el tiempo en el que se observaran y se pudieran contar los endófitos de Bb, siendo 14 días el tiempo máximo de evaluación. Del último enjuague del lavado de cada tejido, se tomaron 100 µL para extenderlo con asa de vidrio en placas con PDA sin antibióticos, para confirmar que se hubieran retirado los epífitos de la superficie, dichas placas se incubaron a 25°C por 10 días. Para considerar un resultado dentro del conteo final de porcentaje de establecimiento de endófito en el tejido plaqueado, se determinaba primero si el agua plaqueada del último lavado estuviera libre de crecimiento de hongos, por lo que algún resultado con plaqueo de agua con crecimiento de hongos se descartaban del conteo. Se consideró como resultado positivo, cuando se observó la morfología típica de crecimiento de Bb alrededor del tejido plaqueado, la cual constituía un color blanco de forma algodonosa característico de la especie y para algunas ocasiones la confirmación con observación al microscopio de estructuras reproductoras.

6.9.6 Análisis molecular "*in planta*" para confirmar colonización de la cepa

Se seleccionaron algunas muestras de tejido de varios tratamientos para determinar cuál era el óptimo para el análisis molecular de la cepa endófito. Los tejidos de raíz, tallo y hoja lavados y sin lavar seleccionados (aproximadamente 1-2 cm^2) se les realizó extracción de ADN siguiendo el protocolo descrito anteriormente del kit de Promega A1125 con algunas modificaciones, (sección 6.2 desde la adición de *Nuclei Lysis Buffer*). Una vez extraído el ADN se contabilizó y se realizó el análisis molecular del perfil de la cepa GHA con la técnica de PCR anidado-cepas (sección 6.8.1). Una vez amplificadas las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 1 % con las condiciones mencionadas anteriormente (ver sección 6.4);

posteriormente se seleccionó solo un tipo de tejido para el resto de los análisis moleculares.

Metodología para el Objetivo 4. Determinar la funcionalidad de la técnica estandarizada en el objetivo 2 para discernir entre las cepas GHA, BBPTG4 y BB37 inoculadas en frijol a nivel laboratorio.

6.10 Siembra de frijol a nivel laboratorio para análisis cualitativo y molecular de las tres cepas

Se realizaron dos experimentos por separado (experimento A y B) de aplicación de las cepas GHA, BBPTG4, BB37 y control sin tratar, todos por triplicado en plantas de frijol a nivel laboratorio, para probar la técnica de PCR anidado-cepas. Para ambos experimentos se germinaron semillas de frijol en algodón húmedo y, una vez germinadas, se pasaron a macetas con suelo no estéril, con las condiciones de lavado de semilla y fotoperiodo descritos en la sección 6.9.1. Los inóculos de las tres cepas se prepararon a una concentración de 1 x 10^8/ mL (sección 6.9.2) y se aplicaron a los 21 y 25 días después de la germinación respectivamente para los experimentos 4 y 5 por el haz y envés de hojas (cubriendo las macetas con bolsas por 12 hr), posteriormente las plantas se sacaron a los 7 días después de la aplicación para el análisis de los endófitos por plaqueo de tejido y análisis moleculares.

6.10.1 Filtrado molecular de muestras positivas para Bb

Para el plaqueado del tejido se muestrearon solamente hojas, las cuales se lavaron y plaquearon según el método mencionado anteriormente (ver sección 6.9.5). Del material lavado se guardó la mitad a -80 °C para aislamiento de ADN (sección 6.2 desde la adicción del primer buffer). Una vez que se hizo la extracción del ADN, se procedió a hacer un filtrado de las muestras para confirmar cuales eran positivas para Bb antes de hacer la prueba del PCR anidado-cepas. Para dicho filtrado se utilizó otro PCR anidado que detecta la especie de Bb (Landa *et al.* 2013), el cual utiliza en la primera reacción los oligonucleótidos ITS1F 5’-CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A-3’ y ITS4 5’-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3’ y en la segunda reacción los oligonucleótidos específicos para *B. bassiana* Bb.fw 5'-

GAA CCT ACC TAT CGT TGC TTC-3' y Bb.rv 5'-ATT CGA GGT CAA CGT TCA G-3'), amplificando una banda de 464 pb aprox. para muestras positivas para dicha especie.

Las condiciones para dicho PCR anidado que detecta Bb (PCR anidado-Bb) fueron: en la primera reacción (volumen total 10 µL) se utilizó: 0.5 µM de cada oligo ITS1F/ITS4, 1 µL de ADN de la planta con el endófito (concentración 20-100 ng/µL) y 5 µL de GoTaq® Green Master Mix (Promega Corp., Madison, WI) con un programa de ciclos de 3 min a 95 °C como paso de desnaturalización inicial, seguido de 40 ciclos de: 1 min de desnaturalización a 94 °C, 1 min de alineamiento a 61 °C, y 1 min de extensión a 72 °C, con un paso de extensión final de 5 min a 72 °C. Los productos amplificados se utilizaron para la segunda reacción del PCR anidado-Bb de manera directa, con los oligonucleótidos específicos para *B. bassiana* la cual consistió (volumen final de 10 µL) de: 1 µL de la muestra del primer PCR del ITS1F/ITS4, 0.5 µM de cada oligo BB.fw/BB.rv (0.5µL de un stock de 10 µM de cada uno) y 5 µL de GoTaq® Green Master Mix (Promega Corp., Madison, WI) con un programa de ciclos de: 2 min a 95 °C como paso de desnaturalización inicial, seguido de 40 ciclos de 1 min de desnaturalización a 94 °C, 1 min alineamiento a 65 °C, 1 min de extensión a 72 °C y un paso de extensión final de 5 min a 72 °C. Los productos de amplificación se corrieron en un gel de agarosa al 1% el cual se tiño y visualizo en un foto documentador de luz UV como lo descrito previamente.

6.10.2 PCR anidado *in planta* para diferenciar entre las tres cepas

Una vez que se identificaron únicamente las muestras positivas para Bb, por medio del filtrado molecular anteriormente descrito, se procedió a correr la técnica del PCR anidado-cepas (estandarizada en sección 6.8.1) que correspondió a la primera reacción para amplificar toda la región 3'OH del gen 28S del ARNr de *B. bassiana* y la segunda reacción para amplificar los cuatro sitios de inserción de intrones.

Metodología para el Objetivo 5. Determinar el desempeño de la técnica con prueba de campo en frijol var. Pinto Saltillo, con las cepas GHA, BBPTG4 y BB37.

6.11. Siembra de frijol para inicio de prueba de campo

Para la prueba de campo, se sembró la variedad Pinto Saltillo, con un ciclo de 85 días (12 semanas), en uno de los campos de prueba de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en la localidad de Marín, bajo la dirección del Dr. José Elías Treviño Ramírez. El frijol se sembró en el ciclo tardío de agosto-diciembre del 2018.

La siembra inició el 3 de septiembre del 2018 y consistió en una superficie de 6.4 × 30 m, la cual tenía ocho surcos que corrían a lo largo de 30 m. La zona se dividió en cuatro bloques cada uno con doce parcelas de 2.5 x 1.6 m, conteniendo cada parcela dos carriles, donde en uno de los carriles se hizo la aplicación y en el otro carril se dejó sin aplicar. Tres parcelas se dejaron sin aplicar como protección entre los tratamientos (Fig. 7).

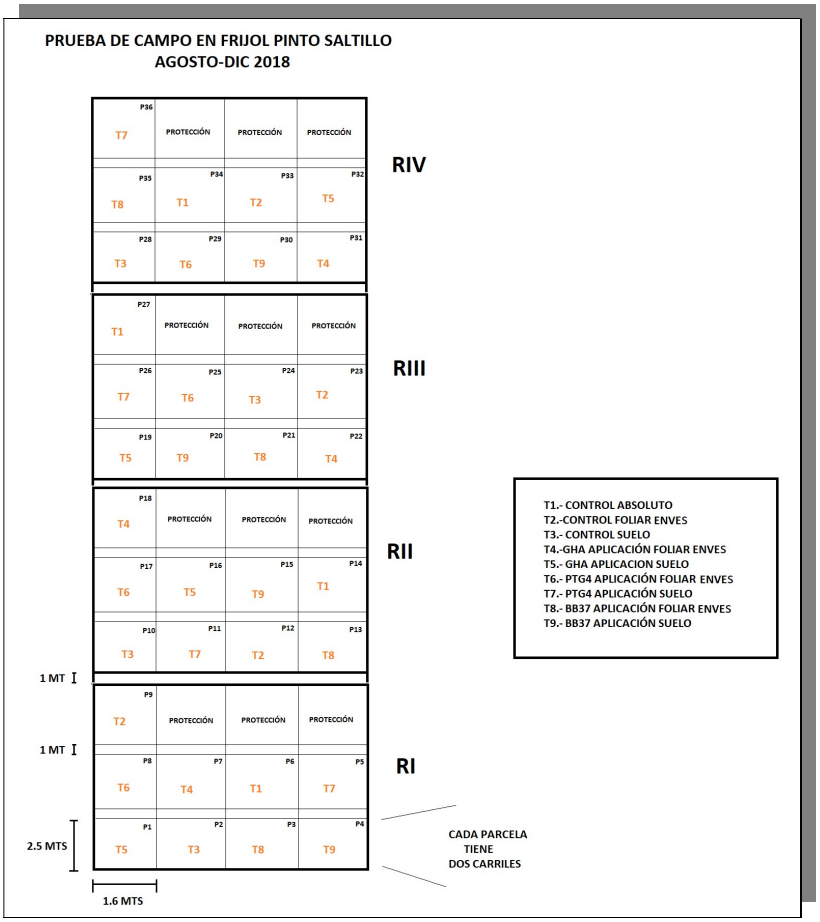


Figura 7. Mapa de parcelas y tratamientos para la prueba de campo en Marín, Nuevo León.

6.11.1. Preparación de inóculos

Los inóculos de Bb y la aplicación se realizaron seis semanas posteriores a la siembra. Para la preparación de los inóculos de las cepas GHA, PTG4 y BB37, se creció cada una de las cepas en matraces de 250 mL en caldo de PDB por seis días a 120 rpm/25 °C. Una vez que se observó crecimiento de las cepas en caldo, se procedió a tomar asadas de cada caldo para estriar en 20 placas con PDA por cepa, con un total de 60 placas. Las placas se incubaron por 10-12 días en obscuridad, colocando las placas volteadas, las cuales se abrían cada dos días bajo el mechero para proveerlas de aire fresco, ya que se observó que ayudaba al crecimiento del hongo.

Para la preparación de los inóculos, se abrieron todas las placas de la misma cepa al mismo tiempo bajo el mechero, y se les agregó a cada un 10 mL de Inex-A al 0.2%. Se raspó con mucho cuidado cada placa para levantar el micelio, el cual al ser removido del agar se iba vaciando el contenido de

cada placa a tubos de 50 mL estériles, los cuales se llenaban con cuatro placas. Una vez removidos todos los micelios de las placas y vaciados a los tubos de 50 mL, se les dio un vortex a cada tubo (vortex en el No. 8) /60 s, y se vacío todo el contenido de todos los tubos a un vaso de precipitado de 1 L previamente esterilizado para homogenizar el contenido de todas las placas. Posteriormente se agregó más Inex-A al 0.01%, hasta alcanzar la marca de 500 mL en el vaso de precipitado.

Para contar los conidios en la cámara de Neubauer se hicieron cuatro diluciones del stock final de 500 mL, a como se describe en la sección 6.9.2. Posteriormente se ajustó la concentración de los conidios a 1x 10^8/mL con la ayuda de Inex A al 0.01%.

6.11.2. Aplicación de inóculos vía foliar y al suelo

Pasada la sexta semana después de la siembra se hizo la aplicación de las tres cepas. Primero se aplicaron todos los controles (tratamientos 1-3 con todas sus repeticiones), los cuales consistieron en control absoluto (nada) y controles foliares y suelo, donde solo se aplicó Inex-A al 0.01% sin alguna cepa. Seguidamente se realizaron las aplicaciones a nivel de suelo, las cuales se hicieron rociando la suspensión con conidios en toda la hilera de las 10 plantas (500 mL para toda la hilera de 10 plantas) (tratamientos T5, T7 y T9 con todas sus repeticiones). Finalmente se hicieron las aplicaciones foliares a nivel de envés a la tercera y cuarta hoja verdadera, contando a partir de las primeras hojas cerca del suelo (se marcaron con plumón azul y rojo las hojas con la aplicación foliar de los tratamientos T4, T6 y T8).

6.11.3. Muestreo de plantas

Pasados los 85 días del ciclo se muestrearon entre cinco a siete plantas por tratamiento, es decir, cada tratamiento con sus respectivas repeticiones tubo al menos 20 plantas a las cuales se les midió diversas variables en el siguiente orden:

1) Longitud de guía central (de la base de la planta, antes de raíz, hasta la punta de la guía principal, esta medida se tomó antes de sacar la planta).

2) Número de hojas verdaderas (de cualquier tamaño) confirmando que sea solo de guía principal (esta variable se tomó directamente del campo antes de sacar las plantas).
3) Número de vainas totales por planta (se midió este parámetro antes de sacar las plantas).
4) Vainas normales y vainas de cada planta (se midió este parámetro antes de sacar las plantas. Para este paso se iban arrancando las vainas y se tuvo cuidado que no se revolvieran con las de otras plantas).
5) De las vainas totales de cada planta, se tomaron 10 vainas por planta y se desgranaron (a cada vaina por separado se le contaron el número de frijoles y se anotó por separado). Se trató de no mezclar las semillas de plantas diferentes del mismo tratamiento.
6) Se desgranaron todas las vainas de cada planta, para obtener el rendimiento en peso por planta, pesando todas las semillas de todas las vainas y reportando el peso de las semillas por planta, para no revolver las semillas de plantas diferentes del mismo tratamiento.
7) Peso de 100 semillas por tratamiento. Se obtuvo una muestra de las semillas representativas de 5 o 7 plantas muestreadas, obteniendo un promedio de 15-20 semillas por planta.
8) De las 100 semillas pesadas, se obtuvo el porcentaje de humedad solo en 20 semillas en una termobalanza.
9)Peso fresco y seco.

6.11.4. Lavado y plaque del tejido

De las plantas muestreadas a las que se les midió las variables descritas, se escogieron tres plantas en total por tratamiento para realizar lavado y plaqueo de hojas.

Para el muestreo de tejido se cortó una hoja por planta, todo el material muestreado se guardó etiquetado en bolsas de aluminio a 4 °C, por si se necesitaba tomar más para plaquear. El material se empezó a procesar al siguiente día después del muestreo, dándole primero un lavado en la tarja, para posteriormente continuar en la campana de flujo laminar con el apoyo de un mechero. El plaqueado del tejido de hojas y las aguas de lavado se realizó a como se describió anteriormente en la sección 6.9.5.

6.11.5. Muestreo del tejido para análisis molecular.

Para colectar las muestras, se escogieron algunas muestras al azar al momento de lavar el tejido de las hojas para su plaqueo, dichas muestras seleccionadas una vez lavadas, se separaban en tubos eppendorf de 1.5 mL, para realizar la extracción de ADN con el kit de Promega A1125 (sección 6.2 a partir de la adición de *Nuclei Lysis Buffer*), las cuales fueron guardadas a -80 grados antes de la extracción.

6.11.6 Análisis "*in planta*" para confirmar colonización de cepas

Una vez que se hizo la extracción del ADN de las plantas de las muestras previamente lavadas de hojas de frijol, se procedió a hacer una exploración de las muestras para confirmar cuales eran positivas antes de hacer la prueba del PCR anidado-cepas. Para dicha exploración se utilizó el PCR anidado-Bb de Landa *et al.* (2013) descrito en la sección 6.10.1.

Una vez que se identificaron las muestras positivas para *B. bassiana*, se procedió a correr la técnica del PCR anidado-cepas (sección 6.8.1), que correspondía a la primera reacción para amplificar toda la región 3'OH del gen 28S del RNAr de *B. bassiana*, y la segunda reacción para amplificar los cuatro sitios de inserción de intrones, el cual ayudaba a identificar la cepa.

6.12. Análisis estadístico

Para determinar si había diferencias significativas entre los tratamientos de endófitos (GHA, PTG4 y BB37) y controles se realizaron pruebas de ANOVA (para determinar si algún tratamiento era diferente). Si algún tratamiento resultaba diferente en la prueba de ANOVA se procedía a realizar la prueba de comparación de medias de Tukey o Tukey-Kramer (si el número de repeticiones era diferente entre los tratamientos). Las diferencias entre tratamientos se establecieron con base a una significancia de $P < 0.05$.

7. RESULTADOS

Resultados del Objetivo 1. Obtener los patrones de inserción de intrones del grupo I del gen 28S de cultivos monospóricos de las cepas de *Beauveria bassiana* GHA, BBPTG4 y BB37.

7.1 Obtención de monospóricos de cada cepa.

Se obtuvieron cultivos monospóricos de las cepas de *B bassiana* GHA (Fig.8), BBPTG4 (Fig. 9) y BB37 (Fig.10) los cuales se mantuvieron a 4°C y posteriormente se guardaron en tubos eppendorf con aceite mineral para su preservación a largo plazo también a 4 °C. Se observó que las cepas GHA y BB37 crecieron más rápido en el medio PDA que la cepa BBPTG4.

Figura 8. Monospórico final de la cepa GHA.

Figura 9. Monospórico final de la cepa BBPTG4.

Figura 10. Monospórico final de la cepa BB37.

Se obtuvieron también las amplificaciones de los cuatro sitios de inserción de IDGI del gen 28S del ADNr de cada una de las tres cepas de Bb utilizando los oligonucleótidos descritos en la tabla 1. Dichas cepas mostraron diferentes perfiles de inserción de los intrones Bb1, Bb2, Bb3 y/o Bb4 (Fig. 11). Cuando están presentes estos intrones, amplifican bandas igual o mayor de 500pb por lo que con la cepa GHA no se observan los intrones Bb1, Bb2, y Bb3, solamente el intrón Bb4. En la cepa BBPTG4 solo falta el intrón Bb2 pero el resto de los intrones están presentes. La cepa BB37 no amplificó el intrón Bb1 insertado pero sí el resto. En la tabla 5 se muestran los tamaños aproximados de las bandas.

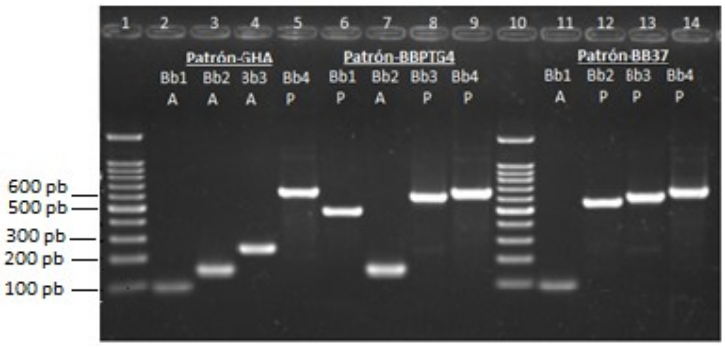


Figura 11. Electroforesis en gel del patrón de amplificación de sitios de inserción IDGI I-IV del gen 28S en tres cepas de *B. bassiana*. Carril 1 Marcador 100 pb Promega, carriles 2-5 patrón de la cepa GHA, carriles 6-9 patrón de la cepa BBPTG-4, carril 10 mismo marcador que carril 1 y carriles 11-14 patrón de la cepa BB37.

Tabla 5. Tamaño de las amplificaciones de los sitios de inserción I-IV del gen 28S en las cepas GHA, PTG4 y BB37

	I	II	III	IV
GHA	90 pb	157 pb	244 pb	620 pb
BBPTG4	501 pb	157 pb	606 pb	620 pb
BB37	207 pb	606 pb	606 pb	620 pb

7.2 Secuenciación de amplicones obtenidos de los sitios de inserción IDGI en las tres cepas.

Se clonaron los 12 amplicones obtenidos de las amplificaciones de los cuatro sitios de inserción IDGI del gel 28S para GHA, BBPTG4 y BB37, las cuales se enviaron secuenciar por el método secuenciación capilar por medio de un servicio externo (Laboratorio de Servicios Genómicos LANGEBIO del Cinvestav de Irapuato). Los resultados de la secuenciación fueron leídos con el software de SnapGen ver. 3.3.4 y comparados entre ellos y contra otras secuencias publicadas con la herramienta *Blast* del *NCBI*.

En las figuras 12-14 se muestran los resultados de las secuencias para GHA, BBPTG4 y BB37 de cada uno de los sitios de IDGI amplificados. En rojo se muestran los oligonucleótidos, en gris están secuencias que no pertenecen a secuencia de IDGI; en color amarillo están las secuencias pertenecientes a algún IDGI. Se ubicaron además las secuencias de inserción exactas publicadas por Wang *et al* en el 2003 de cada uno de los cuatro sitios: para: Bb1 CCAC**T** v **A**ATAGGGAA, Bb2 GGGA**T** v **A**ACTGGCCT, Bb3 GACCC**T** v **G**TTGAGCTTG, Bb4 TGAC**T** v **C**TCTTAAGG, las cuales se observan en cursiva y minúscula en las figuras. La única variación que se encontró con respecto a lo reportado por Wang y cols fue el cambio de C por T en el sitio de inserción Bb2 en el cual se detectó la secuencia Bb2 GGGAT v AACTGGC**T**T para las tres cepas en lugar de Bb2 GGGAT v AACTGGC**C**T.

GHA

- Sitio de inserción I sin intrón insertado (amplicón completo 90 pb).

CCGAAGGAATTCGGTAAGCGTTGGATTGTTCAC*ccac**ta**atagggaa*CGT
GAGCTGGGTTTAGACCGTCGTGAGACAGGTTAGTTTTACC

- Sitio de inserción II sin intrón insertado (amplicón completo 153 pb).

CGATCCTTTAGTCCCTCGACATTTGAGGCTAGAGGTGCCAGAAAA
GTTACCACA*ggga**ta**actggctt*GTGGCGGCCAAGCGTTCATAGCGACGT
CGCTTTTTGATCCTTCGATGTCGGCTCTTCCTATCATACCGAAGGA
ATTCGGTAAGCG

- Sitio de inserción III sin intrón insertado (amplicón completo 241 pb).

ATGGGCTTGGCAGAATCAGCGGGGAAAGAA*gaccc**tg**ttgagcttg*ACTCT
AGTTTGACATTGTGAAAAGACATAGGAGGTGTAGAATAGGTGGG
AGCTTCGGCGCCGGTGAAATACCACTACTCCTATTGTTTTTTTACT
TATTCAATGAAGCGGGGATGGATTTTGTCCAACTTCTGGTTTTAA
GGTCCTTCGCGGGCCGACCCGGGTTGAAGACATTGTCAGGGGGGG
AGTTTGGCTG

- Sitio de inserción IV con intrón Bb4 insertado de 445 pb en amarillo (amplicón 647 pb).

CTGCCCAGTGCTCTGAATGTCAAAGTGAAGTAATTCAACCAAGCG
CGGGTAAACGGCGGGAGTAACTA*tgact*CGAGAAATTGGCGGCTGC
CTTTTGGGGATGGACGGGCACCTGGTGCTGTAACGGCTGCTATGC
AGGCGCCTGGAAGTCCTCAACGTCAAGAGGGTCAAGCGGCATAA
AAGCTGTCCGCTAGTGGGCTGGGAATCACACTCTCAGCCCGCAAC
ACTGTCAAATTGCGGGAACATCCTAAAGCCAACACTACCAAGCGG
GCGCTGAAAGGCGTGCGTGGCCGGGGTAACGACCTAGGGTACGG
TAAAAACGTGTTGGATGATACAATGGACAATCCGCAGCCAAGCCC
TACGTTTGGTGCCATACGGGCGTGTGAGCCTGGCTGGCATCAGAT
ATGGGTGCAGTTCAACGACTAAATGGTGGTGGGTTCTGTAAGGGC
GCGTGCTGCCAACTCTTACAGGGCTTAAGATATAGTCTACTCCCA
CTCTGAAAGGATGGGTACTGAGTG*ctcttaagg*TAGCCAAATGCCTCG
TCATCTAATTAGTGACGCGCATGAATGGATTAACGAGATTCCCAC
TGTCCCTATCTACTATCTAGCGAAACCACAGCCAAGGGAATGGGC
TTGGCAGAATCAGCG

Figura 12. Secuencias de amplicones de sitios de inserción de IDGI I-IV para GHA.

BBPTG-4

- Sitio de inserción I con Intrón Bb1 insertado de 336 pb en amarillo (amplicón completo 473 pb).

CCGAAGGAATTCGGTAAGCGTTGGATTGTTCAC*ccact*AGAGTCGTAGACT
CAATTGATTTATTGTTTCTTGTTGGTGGGGATAGTCGGGTCCTGTTGGCA
GGATTACGCCGGCTAGTCGACATGACATGCACGCTGCAGGTGTCATGCG
GCGACATAACCTGGATCGGGGAAGGCTAATGGCCTGTAGGCCTACGCTA
ATCCCGAGTGCAGTCCTGGAGGGGTGACCTTCCGGGACGCATGTAGAGC
GCGGAAAGGTgTGACTCTTCTAGGGACGCCTAGAAGGTTGCTTAAGGGA
CGTGCCAGACCCACGGGAAACCGTGCCGGATGCGAAGGACCTGCAGTC
CGAATCGTCCGGGTGGCTTCGAGGCCGGGAGGAAATGCCCGGAAGAGC
CTGGTATACTATACCTACATGGTATTCG*aatagggaa*CGTGAGCTGGGTTTA
GACCGTCGTGAGACAGGTTAGTTTTACC

- Sitio de inserción No. II sin intrón insertado (amplicón completo 153 pb).

CGATCCTTTAGTCCCTCGACATTTGAGGCTAGAGGTGCCAGAAAAGTTA
CCACA*gggat**a**actggctt*GTGGCGGCCAAGCGTTCATAGCGACGTCGCTTTTTG
ATCCTTCGATGTCGGCTCTTCCTATCATACCGAAGGAATTCGGTAAGCG

- Sitio de inserción No. III con intrón Bb3 insertado de 358 pb en amarillo (Amplicon completo 600 pb).

ATGGGCTTGGCAGAATCAGCGGGGAAAGAA*gaccct*GAACAGAATCGCGG
TTCGTTCCAAACGATAAGCATCAACGGGGTCAATAGCGGTCTACGTGCC
GCTAGTCCAGCAGCCAGGTACGTTGTGGGTGGCTGCGGGCGAGACAACC
TGGTACGGGGAAGCCTACGGGGAGGACGCAGTCCTCTCTACGGTGATCC
CGTGGCGAGCCTCCAGGGGCCGTCGTAACGCGCGGAAAGGTGTCGGTTA
GCGGTCGTCATGGCCGCTGGCTTAAGGGACGTGCTAAACCCAGGCGAAA
GCCTGCCTGCCGACGGAGCGCCCACAGCGCAAAGTCGACGGGGGCCGT
ATCTACACAACGCCTGGGAGGAAATGCCCAGGCGGAGGCCGGTAGAAC
TCG***g***ttgagcttgACTCTAGTTTGACATTGTGAAAAGACATAGGAGGTGTAGA
ATAGGTGGGAGCCTCGGCGCCGGTGAAATACCACTACTCCTATTGTTTTT
TTACTTATTCAATGAAGCGGGGATGGATTTTTGTCCAACTTCTGGTTTTA
AGGTCCTTCGCGGGCCGACCCGGGTTGAAGACATTGTCAGGGGGGGAGT
TTGGCTG

- Sitio de inserción para IV con intrón BB4 insertado de 445 pb amarillo (amplicón completo 647 pb).

CTGCCCAGTGCTCTGAATGTCAAAGTGAAGTAATTCAACCAAGCGCGGG
TAAACGGCGGGAGTAACTA*tgact*CGAGAAATTGGCGGCTGCCTTTTGGGG
ATGGACGGGCACCTGGTGCTGTAACGGCTGCTATGCAGGCGCCTGGAAG
TCCTCAACGTCAAGAGGGTCAAGCGGCATAAAAGCTGTCCGCTAGTGGG
CTGGGAATCACACTCTCAGCCCGCAACACTGTCAAATTGCGGGAACATC
CTAAAGCCAACACTACCAAGCGGGCGCTGAAAGGCGTGCGTGGCCGGG
GTAACGACCTAGGGTACGGTAAAAACGTGTTGGATGATACAATGGACA
ATCCGCAGCCAAGCCCTACGTTTGGTGCCATACGGGCGTGTGAGCCTGG
CTGGCATCAGATATGGGTGCAGTTCAACGACTAAATGGTGGTGGGTTCT
GTAAGGGCGCGTGCTGCCAACTCTTACAGGGCTTAAGATATAGTCTACT
CCCACTCTGAAAGGATGGGTACTGAGTG***c***tcttaagg*TAGCCAAATGCCTCGT
CATCTAATTAGTGACGCGCATGAATGGATTAACGAGATTCCCACTGTCC
CTATCTACTATCTAGCGAAACCACAGCCAAGGGAATGGGCTTGGCAGAA
TCAGCG

Figura 13. Secuencias de amplicones de sitos de inserción de IDGI I-IV para BBPTG4.

BB37

- Sitio de inserción I sin Intrón insertado (amplicón completo 90 pb).

CCGAAGGAATTCGGTAAGCGTTGGATTGTTCAC*ccac**ta**atagggaa*CGTGAGC
TGGGTTTAGACCGTCGTGAGACAGGTTAGTTTTACC

- Sitio de inserción II con intrón Bb2 insertado de 398 pb en amarillo (amplicón completo de 551 pb).

CGATCCTTTAGTCCCTCGACATTTGAGGCTAGAGGTGCCAGAAAAGTTA
CCACA*gggat*AAACTGTTTTGTCCGAGGTGCAAGCCTATCACTTGCGCCTA
GTCGATCTACCGCTAAATGGCACTGGCGGTATACTGGCGACACGCCTGG
ATGCGGGGAACTCTCGTTAGGCACATGGTACCAAGCATTGGTTGTAACG
CTCCAATGTTCCGATGATAAGGGTACGGTAATAAACCATGTGATAGAGA
CAATCCGCAGCCGAGTTGGCTGCCTCGGAAGAGGATGCTGGCCGGTTCA
ACGCTCGCTAAGGTGTGGGTTATGACCAATTTTTGAACATATTTACGGTC
ATGGCTTAAGGTACGGGCTACGCCCACCCGAAAGGGTGATACTGTCTAC
CGGAAGTGCACTCTGAGAAGCAGTATGCGCGGGGAGTCCTCACTCCTCG
CAGGGTATCACGG***a****actggctt*GTGGCGGCCAAGCGTTCATAGCGACGTCGC
TTTTTGATCCTTCGATGTCGGCTCTTCCTATCATACCGAA**GG**AATTCGGT
AAGCG

- Sitio de inserción III con intrón Bb3 insertado de 358 pb en amarillo (amplicón completo 600 pb).

ATGGGCTTGGCAGAATCAGCGGGGAAAGAA*gaccct*GAACAGAATCGCGG
TTCGTTCCAAACGATAAGCATCAACGGGGTCAATAGCGGTCTACGTGCC
GCTAGTCCAGCAGCCAGGTACGTTGTGGGTGGCTGCGGGCGAGACAACC
TGGTACGGGGAAGCCTACGGGGAGGACGCAGTCCTCTCTACGGTGATCC
CGTGGCGAGCCTCCAGGGGCCGTCGTAACGCGCGGAAAGGTGTCGGTTA
GCGGTCGTCATGGCCGCTGGCTTAAGGGACGTGCTAAACCCAGGCGAAA
GCCTGCCTGCCGACGGAGCGCCCACAGCGCAAAGTCGACGGGGGCCGT
ATCTACACAACGCCTGGGAGGAAATGCCCAGGCGGAGGCCGGTAAAAC
TCG***g****ttgagcttg*ACTCTAGTTTGACATTGTGAAAAGACATAGGAGGTGTAGA
ATAGGTGGGAGCTTCGGCGCCGGTGAAATACCACTACTCCTATTGTTTTT
TTACTTATTCAATGAAGCGGGGATGGATTTTTGTCCAACTTCTGGTTTTA
AGGTCCTTCGCGGGCCGACCCGGGTTGAAGACATTGTCAGGGGGGGAGT
TTGGCTG

- Sitio de inserción IV con intrón Bb4 insertado de 445 pb en amarillo (amplicón completo de 647 pb).

CTGCCCAGTGCTCTGAATGTCAAAGTGAAGTAATTCAACCAAGCGCGGG
TAAACGGCGGGAGTAACTA*tgact*CGAGAAATTGGCGGCTGCCTTTTGGGG
ATGGACGGGCACCTGGTGCTGTAACGGCTGCTATGCAGGCGCCTGGAAG
TCCTCAACGTCAAGAGGGTCAAGCGGCATAAAAGCTGTCCGCTAGTGGG
CTGGGAATCACACTCTCAGCCCGCAACACTGTCAAATTGCGGGAACATC
CTAAAGCCAACACTACCAAGCGGGCGCTGAAAGGCGTGCGTGGCCGGG
GTAACGACCTAGGGTACGGTAAAAACGTGTTGGATGATACAATGGACA
ATCCGCAGCCAAGCCCTACGTTTGGTGCCATACGGGCGTGTGAGCCTGG
CTGGCATCAGATATGGGTGCAGTTCAACGACTAAATGGTGGTGGGTTCT
GTAAGGGCGCGTGCTGCCAACTCTTACAGGGCTTAAGATATAGTCTACT
CCCACTCTGAAAGGATGGGTACTGAGTG*ctcttaagg*TAGCCAAATGCCTCGT
CATCTAATTAGTGACGCGCATGAATGGATTAACGAGATTCCCACTGTCC
CTATCTACTATCTAGCGAAACCACAGCCAAGGGAATGGGCTTGGCAGAA
TCAGCG

Figura 14. Secuencias de amplicones de *sitios* de inserción de IDGI I-IV para BB37.

Se realizó comparación de las secuencias de los intrones insertados en las cepas, con secuencias ya reportas en el NCBI. Para el caso del intrón Bb1 insertado solamente en la cepa BBPTG4, se observó que la secuencia del intrón es similar al de otras cepas de Bb ya reportadas como ECB L16, INRS-IP, Bb151 (ID de secuencias: AF336302.1, EU334675.1, AH011185.2 respec.), así como también se ha encontrado en cepas de otras especies como *Cordyceps bassian*a (ID: EF115313.1), *C. militarus* (ID: CP023322.1) entre otras, pero ninguna fue 100% idéntica a la secuencia aquí reportada. Para el caso del intrón Bb2 insertado solamente en la cepa Bb37, este intrón tampoco tiene una secuencia publicada que sea idéntica al 100% y se reporta insertada en otras cepas de Bb como la Bb232, Bb1121, ARSEF654, DAOM210087 (ID: AH011184.2, AF391117.1, KJ701419.1, EU334678.1 respect.) así como también en especies de *C. bassiana* (EF115315.1) entre otras especies de hongos. Para el caso del intrón Bb3 insertado en las cepas BBPTG4 y BB37 este intrón es casi idéntico en ambas cepas, más sin embargo si tienen una diferencia solamente en una base. Por otro lado, la comparación de ambas secuencias reportadas de Bb como con otras cepas de Bb como ARSEF502, ARSEF654 y DAOM216540 (ID: KJ701420.1, KJ701419.1, EU334679.1 respect.) y con cepas de otras especies como *C. militaris* (ID: CP023322.1) y *Lecanicillium sp. (*ID: MH013330.1) mostraron también ligeras variaciones en algunas posiciones. Finalmente, los intrones Bb4 insertados en las tres cepas, fueron idénticos entre ellos, pero diferentes con los reportados en la base de datos y el cual se encuentra insertado en otras cepas de Bb como Bb2515, Bb148, Bb1962, INRS-CFL (ID: AF323943.1, AF430704.1, AF39116.1, EU334674.1 respec.), así como también en cepas también de *C. bassiana* (ID: EF115310.1, EF115307.1) entre otros.

Resultados del Objetivo 2. Estandarizar técnica para la detección del perfil de inserción de intrones del grupo I del gen 28 S de *B. bassiana*, presentes como endófito en planta de frijol.

7.3 Amplificación de los sitos de inserción de IDGI en frijol.

Se realizó un análisis de amplificación de los cuatro sitios de

inserción IDGI en el genoma de dos variedades de frijol Pinto Americano y Pinto Saltillo germinadas en el laboratorio, observándose que ambos genomas amplifican para los sitios II, III y IV, pero no para el I, en el cual no se observa la típica banda de 91 pb. (Fig. 15).

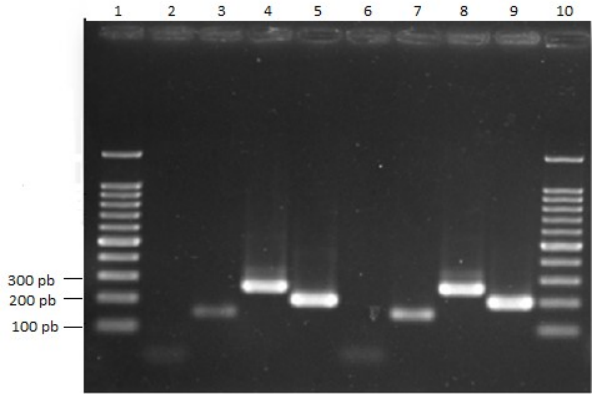


Figura 15. Electroforesis en gel de la amplificación de sitios de inserción de IDGI I-IV para el gen 28S de Bb, en dos genomas de frijol. Variedades Pinto Americano (carriles 2-5) y Pinto Saltillo (carriles 6-9). Carriles 1 y 10 marcador 100pb Promega.

Al realizar otra extracción de ADN de otra planta de frijol var. Pinto Satillo (de otro lote de semillas), se observó que el sitio de inserción para Bb1 si amplificaba (banda 91 pb) pero el sitio para Bb2 no amplificaba o amplificaba muy tenue (Fig. 16), por lo que podrían ser ambas bandas de endófitos y no del genoma de frijol *per se*.

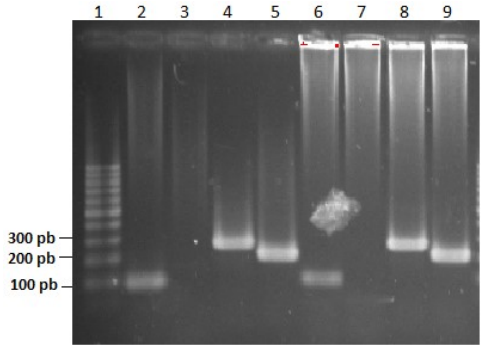


Figura 16. Electroforesis en gel de la amplificación de sitios de inserción de IDGI I-IV del gen 28S de Bb, en genoma de frijol de dos lotes. Variedad Pinto Saltillo, carriles: 1 marcador 100pb Promega, 2-5 de lote de semilla 1 y carriles 6-9 de lote de semilla 2.

7.4 Analisis *in silico* de sitios de inserción de IDGI en plantas

Como se obtuvieron amplificaciones en los cuatro sitios de insersion en plantas de frijol sin inocular con *B. bassiana* (Fig 15 y 16), se realizó

analisis *in silico* de los cuatro pares de oligonuclótidos que amplifican los sitios de inserción de IDGI I-IV para determinar si las amplificaciones eran endofitos internos o si pertenecian al genoma de la planta de frijol. Tambien se revisaron los genomas de otras plantas como chile, sorgo y maiz. Para esto, se utilizaron las secuencias de los oligobuleotidos y se revisó manualmente el porcentajes de alineamiento, utilizando la herramienta *Blast* del *NCBI* para cada genoma.

Los resultados de alineamiento de los cuatro pares de oligos en diferentes genomas se describen en la tabla no. 6. Para el caso del sitio I, se observó que aunque la hibridación del oligonuclótido *reverse* (R) está al 100 %, el porcentaje de hidridación del oligonuclótido forward (F) es baja (del 50 %), pero aun asi se podria dar en algun grado la amplifiacion en frijol por que no esta comprometida la hibridacion en 3'OH en ninguno de los dos oligos, que es lo que necesita la enzima para polimerizar; sin embargo por los resultados presentados en las figuras 15 y 16, donde se observó que en una muestra no amplifica y en otra si, por lo que hay una alta probabilidad que lo ampificado en el sitio I, sea algún otro endófito que se encuentre en el frijol al momento de la extracción. Se observó también que la hidridación de los oligos F y R en el sitio I fué smiliar para el resto de las plantas.

Tabla 6. Porcentajes de alineamiento *in silico* de los cuatro pares de oligos utilizados para amplificar los sitios de inserción I-IV de *B. bassiana* en los genomas de frijol, chile, sorgo y maíz respectivamente.

Plantas	Sitios de inserción			
	I	II	III	IV
Phaseolus vulgaris	F: 50%	F: 85%**	F: 95%	F: 91%
	R: 100%	R: 60%**	R: 95%	R: 91%
Capsicum annuum	F: 50%	F:80% **	F:91%	F:100%
	R: 100%	R: 60% **	R: 95%	R:95%
Sorghum sp.	F: 50%	F: 80%**	F: 81%	F:100%
	R: 100%	R: 60%**	R: 95%	R:81%
Zea Mays	F: 50%	F: 75%	F:91%	F:100%
	R: 100 %	R: 70% **	R: 95%	R:95%

** dos pares de bases que no hacen alineamiento en la región 3'OH

Los resultados de hibridación del sitio II mostraron que el oligonucleótido F permitía un buen porcentaje de alineamiento, pero las dos

últimas pares de bases de la region 3´OH no estaban hibridando, y el oligo R solo hibridaba al 60%. Tambien se comprometía la hibridación en 3´OH, por lo que en este caso se tendría una alta probabilidad de que lo amplificado en el genoma de frijol sin tratar con Bb, sea debido a un endófito al momento de la extracción, no por el genoma del frijol.

Con las pruebas de amplificación del sitio II si se observó amplificación (Fig. 15) pero con la otra muestra de otro lote de firjol no (Fig. 16), por lo que ambas pruebas aputan a que la amplificación no era del genoma del frijol. Resutados similares de hidridación se observaron con el resto de las plantas.

Para el caso de los sitios III y IV, la alta homologia de hibridación y los resultados de amplificación observadas con bandas intensas en las figuras 15 y 16, confirman que los oligonucleótidos utilizados amplifican muy bien dichos sitios en el genoma de frijol y en los genomas de las otras plantas revisadas, por lo que representan un problema al momento de hacer la detección de la amplificación de introns a partir de una muestra donde *B. bassiana* se ecuentre como endófito.

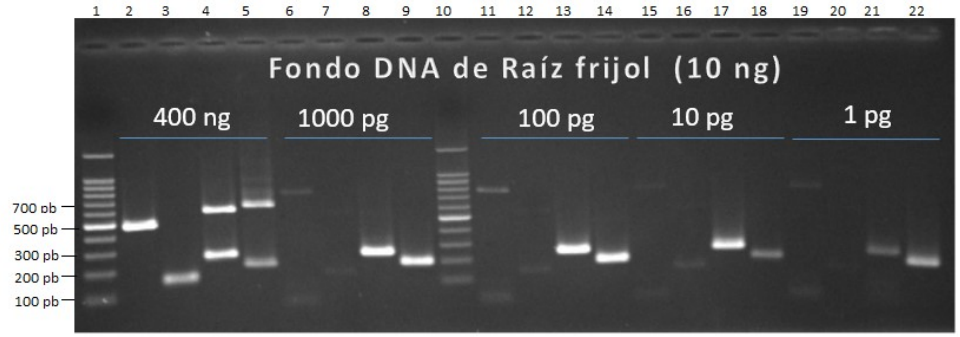
7.5 PCR directo simulando establecimiento de Bb en frijol

En este ensayo se prepararon muestras con concentraciones conocidas planta y hongo para simular el establecimiento de Bb como endófito en frijol y determinar si un PCR de un paso puede detectar cantidades bajas de ADN de Bb mezclado con el de frijol. En el resultado de esta prueba se puede observar que habiendo 400 ng ADN de *B. bassiana* por cada 10 ng de ADN de planta se podría observar el patrón distintivo de la cepa BBPTG4 en cada uno de los diferentes tejidos de raíz (A), tallo (B) u hojas (C), siendo dichas amplificaciones correspondientes a los controles positivos (Fig. 17).

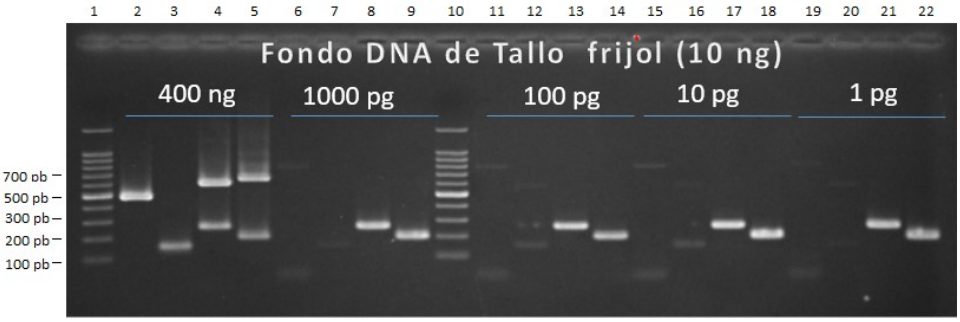
No se pudo observar el patrón de inserción de IDGI cuando había cantidades iguales o menores de 1000 pg de ADN del hongo por cada 10 ng de ADN de frijol utilizando la técnica de amplificación directa de los cuatro sitios de inserción de IDGI (Fig. 17). Se observó además que en las amplificaciones para los sitios III y IV, bandas de alrededor y menor de 200 pb corresponden al ADN de frijol ya que esto ya se había determinado en

pruebas anteriores (Figs. 15 y 16).

A)



B)



C)

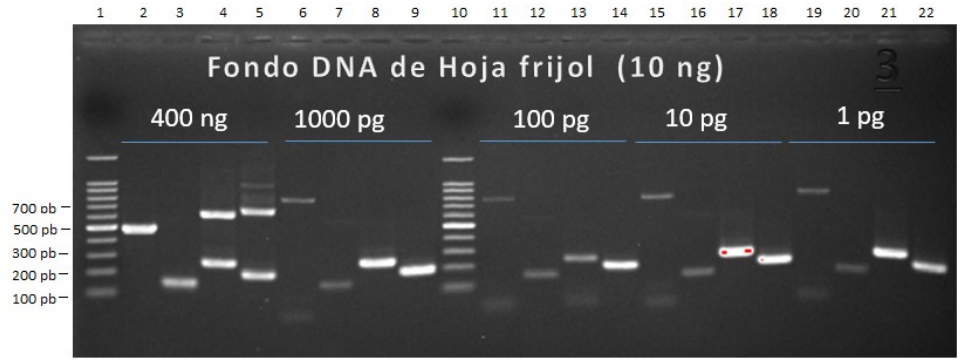


Figura 17. Electroforesis en gel de prueba de PCR directo de sitios de IDGI I-IV para detectar Bb BBPTG4 como endófito en raíz, tallo u hoja en frijol *in vitro.* Carriles 1 y 10 marcador 100 pb PROMEGA (Geles A, B y C). Carriles 2-5 patrón de amplificaciónes de sitios de inserción de IDGI I-IV del gen 28S de Bb en muestras con 400 ng de ADN de BBPTG4 y 10ng de ADN de frijol de raíz (A), tallo (B) u hojas (C), todas como control positivo. Carriles 6-9, 11-14, 15-18 y 19-22 correspondene a amplificaciones de sitios de inserción de IDGI I-IV del gen 28S de Bb en muestras con 1000, 100, 10 y 1 pg de ADN de BBPTG4 respec. y 10 ng de ADN de frijol de frijol de raíz (A), tallo (B) u hojas (C).

7.6 Diseño de oligonucleótidos para PCR anidado.

Se diseñaron oligonucleótidos a partir de una parte del genoma de *B.*

bassiana correspondiente a la región 3´OH del gen 28S (GenBank: JF429894.1), utilizando el programa Amplifix versión 1.5.4. Los oligonucleótidos diseñados para la primera reacción de PCR anidado-cepas, abarcaron toda la zona donde se encontraban los cuatro sitios de inserción de IDGI del gen antes mencionado (regiones I-IV). Las secuencias seleccionadas se describen en la figura 18.

28S-3´F 5´-AGCTAGGGTTTAATGGCCGGAAGA-3´
28S-3´R1 5´-TTACCATTGCGGTGAGGTCATC-3´
28S-3´R2 5´-TAGAGGCGTTCAGCCATTATCCAG-3´

Figura 18. Oligonucleótidos sintetizados para la amplificación de la región 3´OH del gen 28S de Bb.

7.7 Condiciones de primera y segunda reacción

Para la primera reacción se probaron dos enzimas (*Taq* polimerasa y Platinum Super FI) con cinco mezclas de oligonucleótidos [incluidos los oligonucleótidos diseñados anteriormente y los de los sitios de inserción I y IV diseñados por Wang *et al.* (2003) para amplificar toda la zona de las cuatro inserciones de IDGI].

La enzima *Taq* polimerasa se descartó ya que solo amplificaba dicha región en la cepa GHA (por ser un amplicón más corto porque tiene menos intrones insertados) pero no amplificaba en las cepas BBPTG4 y BB37. Por otro lado, con la enzima Platinum Super FI, si se logró amplificar en las tres cepas las cinco mezclas de oligonucleótidos probados (Fig. 19).

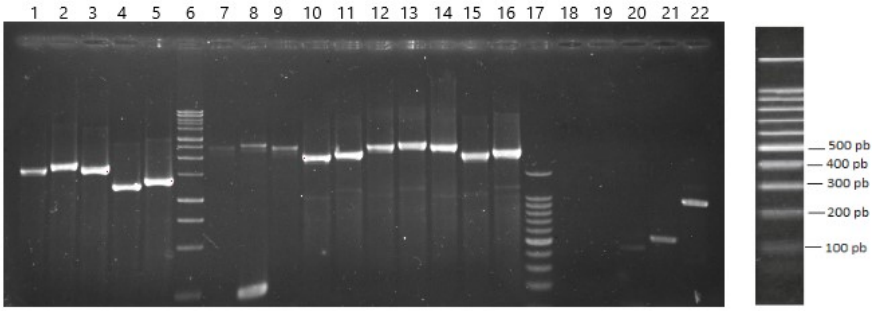


Fig. 19. Electroforesis en gel de las cinco reacciones propuestas para la primera reacción amplificadas con Platinum Super Fi. Carril 1-5 reaccion 1: oligonucleótidos 28S-3´F y 28S-3´R1, reacción 2: 28S-3´F y 28S-3´R2, reacción 3: 28S-3´F y 28S-M1R, reacción 4: 129F-28S-3´R1 y reacción 5: 129F-28S-3´R2 en genoma de GHA, carriles 6 y 17 marcador 100

pb Promega, carriles 7-11 mismas cinco reacciones con genoma de BBPTG4, carriles 12-16 mismas cinco reacciones con genoma de BB37 y carriles 18-22 mismas cinco reacciones en genoma frijol. Figura derecha marcador de 100 pb Promega ampliado.

Finalmente, para la primera reacción del PCR anidado-cepas se seleccionaron los oligonucleótidos previamente diseñados de 28SF (5'-AGCTAGGGTTTAATGGCCGGAAGA-3') y 28SR2 (5'-TAGAGGCGTTCAGCCATTATCCAG-3') ya que se observó que no amplificaban para el genoma vegetal y se tenía mayor resolución en las tres cepas (Fig. 19). La reacción final consistió (volumen final de 10 µl) de 5 µl de 2x Platinum™ SuperFi™ PCR Master mix (Invitrogen, ThermoFisher Scientific), 0.5µl de un stock de 10 µM de cada oligonucleótido 28S-3´F/28S-3´R2 (0.5 µm cada uno), 2.0 µl de 5x SuperFi™ GC enhancer y 1 µl de ADN de planta con endófito (concentración de 10-100 ng/µl). Para la amplificación se seleccionó un estilo de programa tipo touchdown el cual es especial para cuando hay concentraciones bajas del ADN blanco en la muestra, el cual consistió de: 30 s a 98 °C como temperatura inicial de desnaturalización, seguido de 14 ciclos de: 10 s de desnaturalización a 98°C, 30 s de alineamiento a 67°C con una reducción de 0.7°C por cada ciclo y 2 min extensión a 72°C, seguido de 30 ciclos de: 10 s de desnaturalización a 98°C, 30 s de alineamiento a 56°C y 2 min de extensión a 72°C con una extensión final de 10 min a 72 °C. El producto amplificado con ambos oligonucleótidos se utilizó como templado para la segunda reacción del PCR anidado-cepas, la cual consistió en las cuatro amplificaciones de los sitios de inserción del I-IV utilizando 1 µl para cada reacción por separado. Para dichas reacciones se utilizaron las condiciones y el programa para PCR descrito por Wang y cols (2003), descrito en la sección 6.4.

.

7.8 Límite de detección

Para la determinación del imite de detección se seleccionó la cepa BB37 ya que tiene insertados tres intrones y son más largos en conjunto que los de BBPTG4 por lo que se generaría un fragmento de la primera reacción más largo y más difícil de amplificar de las tres cepas. En el resultado se puede observar el patrón distintivo de BB37 a una concentración de 10 pg de

ADN con 10 ng de ADN frijol en los carriles 2-5, en los carriles 6-9 se puede observar también el patrón de Bb37 donde se encontraba a una concentración de 1 pg por cada 10 ng de ADN de frijol, pero en los carriles 10-13 donde se encontraba Bb37 a una concentración de 0.1 pg por cada 10 ng de ADN de frijol, ya no se observa el patrón de BB37 (Fig. 20). Por lo que el límite de detección de la técnica es hasta 1 ng/ por cada 10 ng de planta de frijol.

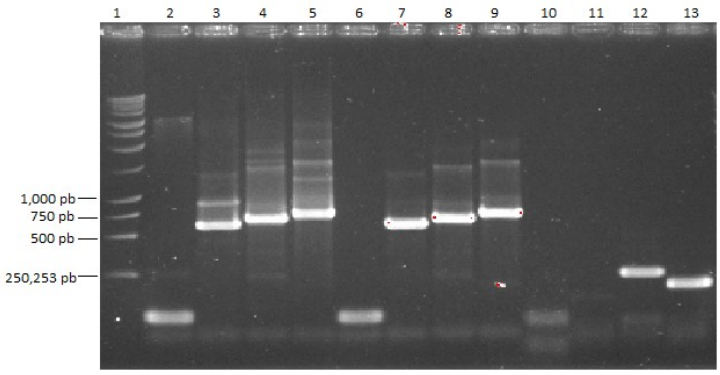


Figura 20. Electroforesis en gel del patrón de amplificaciones de sitios de IDGI I-IV del gen 28S de Bb de la cepa BB37 para determinación del límite de detección. Carril 1: marcador de 1kb (Promega), carriles 2-5, 6-9 y 10 a 13 perfil de amplificación de sitios de inserción de IDGI I-IV a una concentración de 10pg, 1 ó 0.1pg de BB37 teniendo como fondo cada amplificación 10 ng de ADN de frijo respectivamentel.

Resultados del Objetivo 3. Seleccionar la mejor técnica de inoculación de *B. bassiana* en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) var. Pinto Saltillo

7.9 Inoculación de *B. bassiana* en frijol a nivel laboratorio.

Se aplicó la cepa GHA en frijol para determinar de entre los métodos de aplicación en semilla, al suelo o foliar (has o envés) en cual se lograba un mayor porcentaje de establecimiento. Se observó un buen desarrollo de las plantas a lo largo del experimento (Fig. 21-23) con las condiciones utilizadas para su crecimiento (tipo de lámparas, tiempos de luz, tipo de suelo y riego).

Figura 19. Crecimiento de frijol var. Pinto Saltillo a nivel laboratorio con tres semanas de crecimiento.

Figura 20. Primera aplicación de B. bassiana GHA en plantas de frijol.

Figura 21. Plantas de frijol al final del experimento.

Se observó también en algunas placas del tejido lavado y plaqueado, crecimiento de Bb como endófito (Fig. 24).

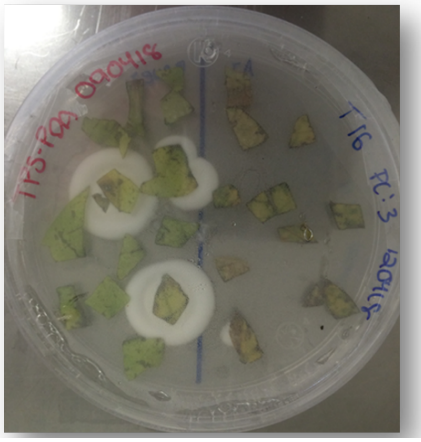


Figura 22. Plaqueo de tejido lavado en PDA con antibióticos. Der. aplicación en haz, izq. aplicación en envés de hoja positivo para *B. bassiana*.

Los resultados del plaqueo del tejido en PDA donde se utilizó suelo estéril y no estéril, mostraron que el mejor establecimiento se dio en las hojas cuando fue aplicado a nivel foliar con un 25 y 20 % de establecimiento del endófito respectivamente (Fig.25 y 26); de dicha aplicación foliar se observó un mejor establecimiento cuando era aplicado por el envés de las hojas en suelo estéril y no estéril (16 y 15%), que cuando era aplicado por el haz (9 y 5%).

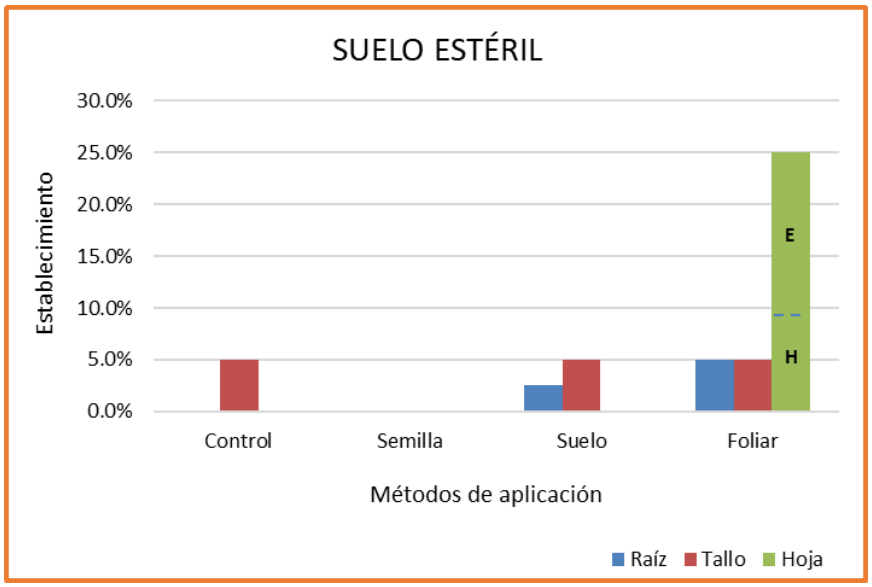


Figura 23. Porcentaje de establecimiento de Bb GHA en plantas de frijol con suelo estéril. E= envés, H= haz.

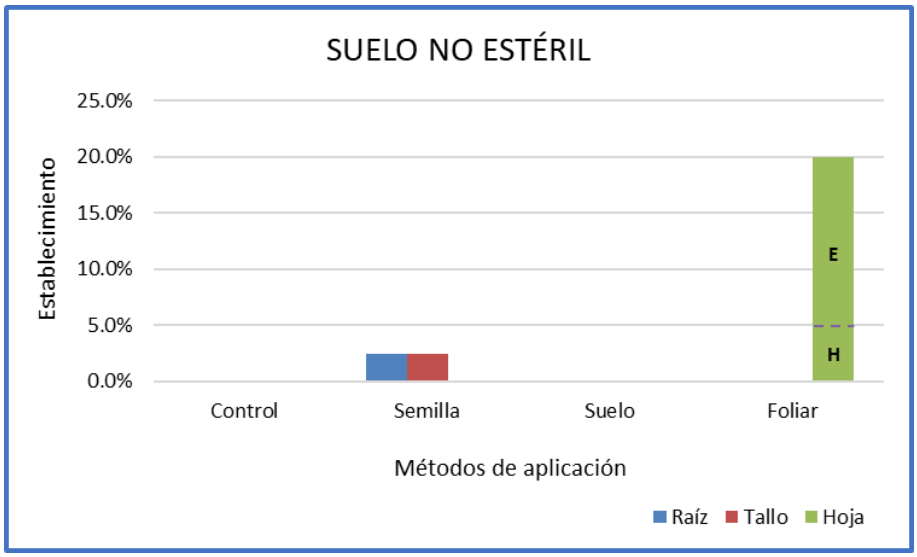


Figura 24. Porcentaje de establecimiento de Bb GHA en plantas de frijol con suelo no estéril. E= envés, H= haz.

En aplicaciones a nivel de semilla y al suelo, se observaron variaciones entre el suelo estéril y no estéril, ya que en suelo estéril no se logró observar el establecimiento del endófito en ningún tipo de tejido en las aplicaciones a nivel de semilla, pero si se detectó en raíz (2.5%) y tallo (5.0%) cuando era aplicado nivel del suelo. Donde se utilizó suelo no estéril fue al revés, ya que si se detectó establecimiento del endófito cuando este era aplicado a nivel de semilla en los tejidos de raíz (2.5%) y tallo (2.5%) pero

no se detectó en ningún tejido cuando fue aplicado a nivel de suelo (Figs. 25 y 26).

7.9.1 Medición de variables

Se observó un efecto adverso en las aplicaciones a nivel de semillas al inicio del experimento, que se considera pudiera ser un efecto del tensoactivo Tritón x100 al 0.02 % utilizado para aplicar el endófito sobre las semillas, más que por el endófito (por pruebas preliminares). Dicho efecto muestra una mayor frecuencia de plantas con las primeras hojas con deformidades, plantas no emergidas o muy pequeñas en ambos tipos de suelo, pero se observó esta frecuencia más marcada en suelo estéril. Dichas deformidades se observaban también en plantas sin aplicación a nivel de semilla, pero menos frecuentes (Figs. 27 y 28).

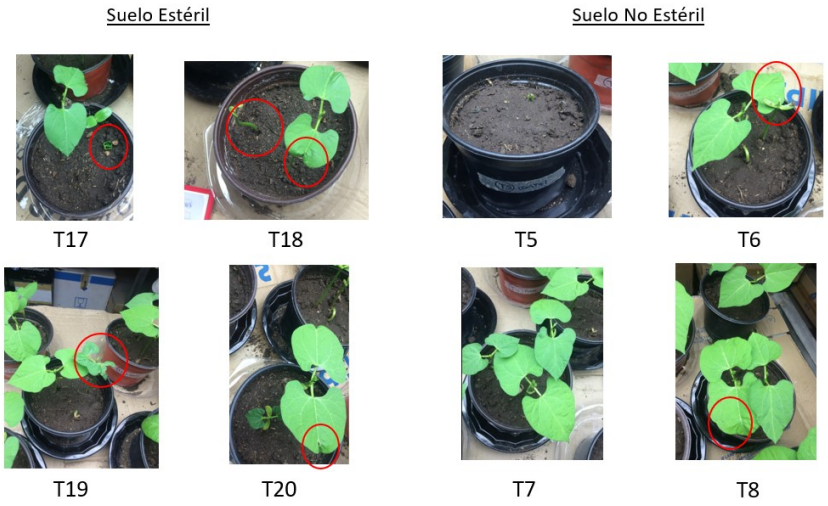


Figura 25. Deformidades de primeras hojas de frijol en plantas inoculadas en semilla. Para la inoculación se utilizó el tensoactivo Tritón X100 al 0.02 %.

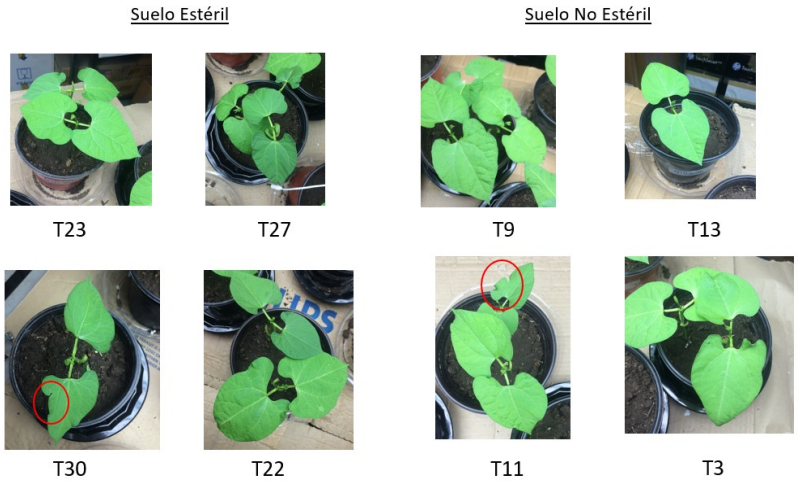


Figura 26. Deformidades de primeras hojas de frijol en plantas sin inoculación en semilla.

Al final del experimento se realizó la medición de algunas variables de crecimiento en las plantas. No se observaron diferencias significativas entre controles sin el endófito y los tratamientos con GHA en las variables de altura de la planta (Fig. 29), número de hojas (Fig. 30) y peso fresco (Fig. 31).

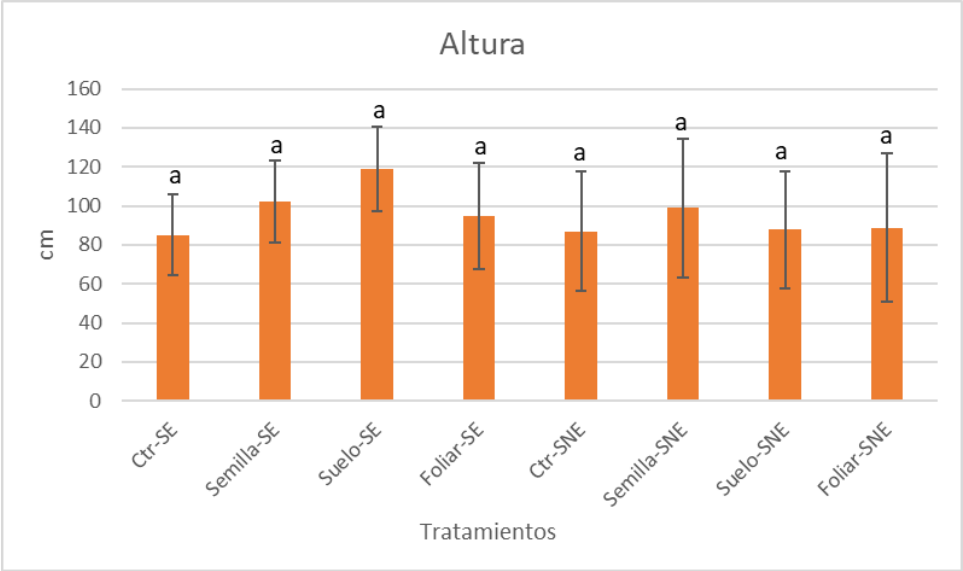


Figura 27. Medias (±DE) de la altura en plantas controles y tratamientos, utilizando suelo estéril (SE) y suelo no estéril (SNE). Control sin tratar con GHA (CTR), aplicación en semillas (Semilla), aplicaciones al suelo (Suelo), aplicaciones foliares (Foliar) de la cepa GHA.

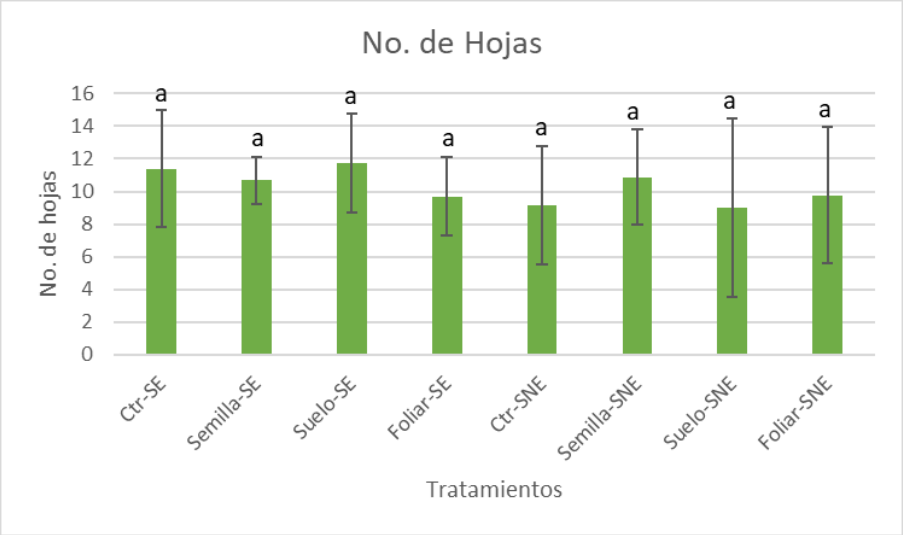


Figura 28. Medias (±DE) de número de hojas en controles y tratamientos, utilizando suelo estéril (SE) y suelo no estéril (SNE). Control sin tratar con GHA (CTR), aplicación en semillas (Semilla), aplicaciones al suelo (Suelo), aplicaciones foliares (Foliar) de la cepa GHA.

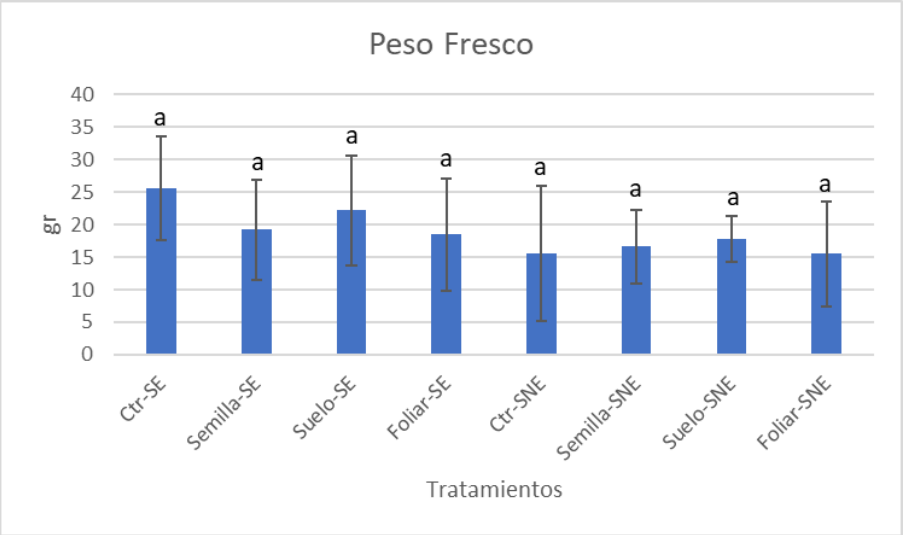


Figura 29. Medias (±DE) de peso fresco en controles y tratamientos, utilizando suelo estéril (SE) y suelo no estéril (SNE). Control sin tratar con GHA (CTR), aplicación en semillas (Semilla), aplicaciones al suelo (Suelo), aplicaciones foliares (Foliar) de la cepa GHA.

Por otro lado, solamente la variable de largo de raíz (Fig. 32) en los tratamientos de aplicación de GHA al suelo (en suelo estéril) mostró diferencias significativas en comparación al resto de las pruebas. Sin embargo se acentúa que este parámetro es muy subjetivo ya que al sacar las plantas de las macetas, en diversas ocasiones las raíces se rompían.

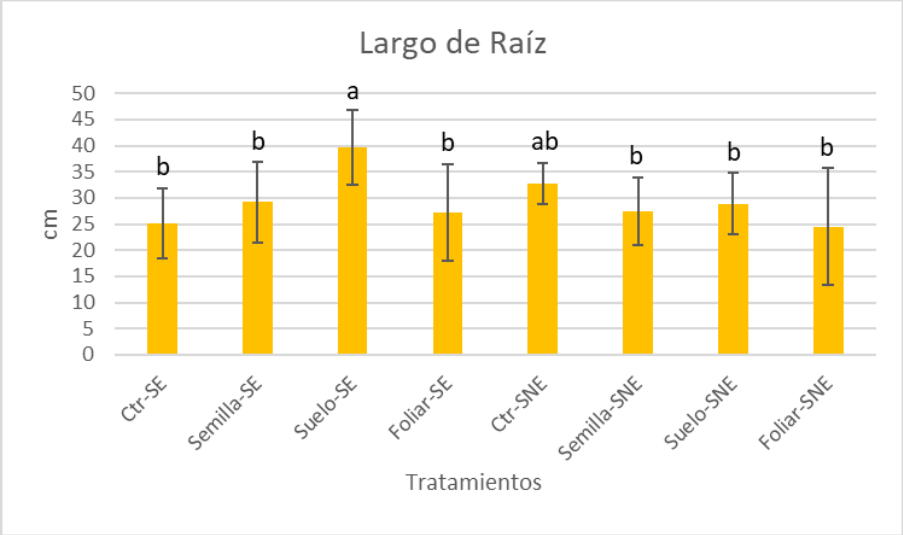


Figura 30. Medias (±DE) del largo de raíz en controles y tratamientos, utilizando suelo estéril (SE) y suelo no estéril (SNE). Control sin tratar con GHA (CTR), aplicación en semillas (Semilla), aplicaciones al suelo (Suelo), aplicaciones foliares (Foliar) de la cepa GHA ($P \leq 0.05$)

7.9.2 Prueba de PCR anidado en controles y muestras

Para probar la técnica de plantas controles e inoculadas, se tomaron algunos de los tejidos sin lavar y lavados y se les realizo extracción de ADN para la prueba molecular. Se realizó primero la prueba del PCR anidado-cepas con 28S y los sitios de inserción para los intrones Bb1-Bb4 en tejido de raíz, tallo y hoja de una muestra control sin inocular. En la figura 33 se observa el perfil de inserción de intrones Bb1-Bb4 en raíz (carriles 1-4) negativo para GHA o poco definido para confirmar que sea GHA; en tallo (carriles 6-9) y hoja (carriles10-13) se observa un patrón más contundente negativo para GHA, finalmente se observan las amplificaciones de los sitios I-IV de ADN de otro hongo que es distintivo morfológicamente a *B. bassiana* (hongo de color verde), mostrando todas las muestras un perfil negativo para GHA (Fig. 33).

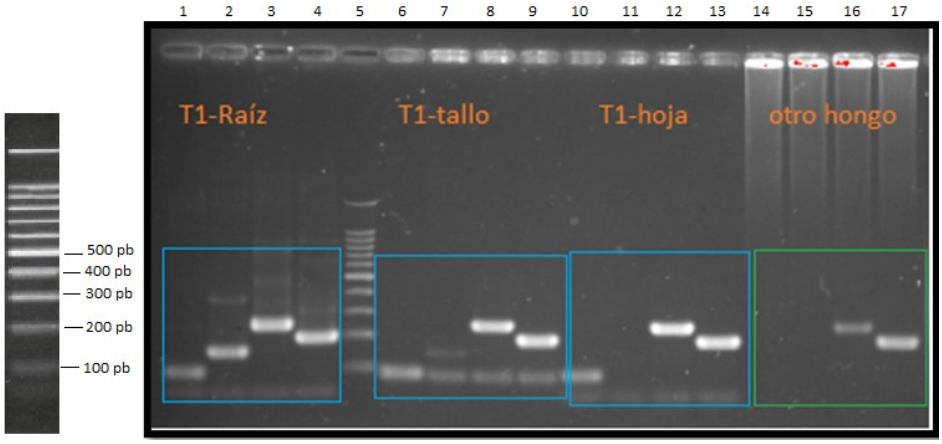


Figura 31. Electroforesis en gel de PCR anidado-cepas para la búsqueda de perfil de GHA en muestra de frijol sin tratar y sin lavar. Carriles 1-4,6-9, 10-13 y 14-17 amplificaciones en ADN de raíz, tallo, hoja y ADN de hongo color verde (endófito en frijol) de los sitios I, II, III y IV respectivamente. Carril 5 marcador de 100 pb de (Promega).

En otra muestra también control negativo sin inocular (T32) se realizó el análisis de inserción de IDGI I-IV de raíz, tallo y hoja sin lavar observándose un perfil negativo para GHA en raíz (carriles 1-4), pero positivo para GHA en tallo y hojas (carriles 5-8 y 10-13 respec.), ya que se observa el perfil distintivo de GHA dichas muestras (Fig. 34).

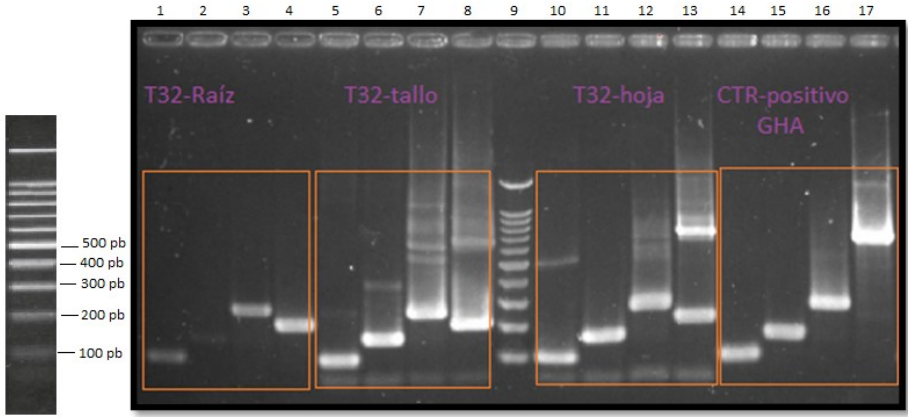


Figura 32. Electroforesis en gel de PCR anidado-cepas para la búsqueda de perfil de GHA en muestra de frijol sin tratar y sin lavar. Carriles 1-4,5-8, 10-13 y 14-17 amplificaciones raíz, tallo, hoja y ADN de hongo Bb (control positivo) de los sitios I, II, III y IV respectivamente. Carril 10 marcador de 100 pb (Promega).

También se analizaron dos muestras una que si se inoculo a nivel de semilla (muestra T8) y otro control sin tratar (T29) (Fig. 35) ambas muestras sin lavar, observándose que la muestra analizada en tejido de raíz tratada con

el endófito GHA, en un principio se observa dudoso el resultado positivo (por que no se ve amplificado el sitio II).

Sin embargo, se pudo observar el intrón Bb4 (carril 4), lo cual es típico en el perfil de GHA y los sitios I y III (carriles 1 y 3) muestran la amplificación típica de ausencia de intrones como lo observado en el control positivo para GHA (carriles 9-12). Se observa también un perfil positivo para GHA en los carriles 5-8 correspondientes a un control sin tratar el cual muestra una contaminación con la cepa.

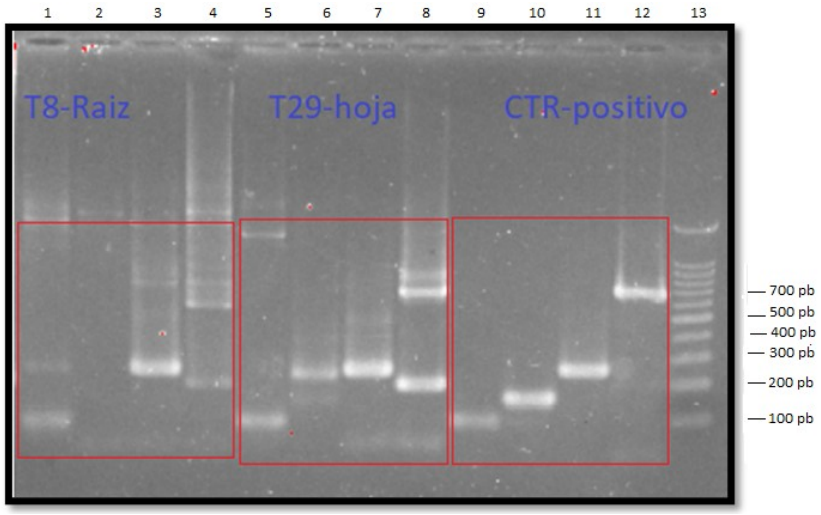


Figura 33. Electroforesis en gel de PCR anidado-cepas para la búsqueda de perfil de GHA en muestra de frijol tratada a nivel de semilla y sin tratar (ambas sin lavar). Carriles 1-4,5-8 y 9-12 muestran amplificaciones de los sitios I, II, III y IV, respectivamente en muestras de tratamiento de aplicación de semilla, analizado en tejido de raíz (T8), control negativo analizado en tejido de hoja (T29) y ADN de hongo Bb (control positivo), respectivamente. Carril 10 marcador de 100 pb (Promega).

Se verificó también en una muestra positiva, si era necesario el uso de la enzima de tipo *hot start* (Super Fi) para la primera reacción (para detectar GHA) en lugar de una enzima *Taq* polimerasa (Gotaq, ya que es más económica), observándose que si era necesaria ya que utilizando las enzimas Hot Start/*Taq* polimerasa para la primera y segunda reacción respectivamente, se logró la amplificación deseada para observar GHA (carriles 1-4), pero utilizando *Taq* polimerasa para ambas reacciones (carriles 6-9), no se logró ver el perfil de GHA (Fig. 36). Adicionalmente, los carriles 10-13 muestran la amplificación directa de los sitios para los intrones Bb-1 a

Bb-4 (solo segunda reacción) de la muestra positiva, observándose que tampoco se logró observar el perfil de GHA.

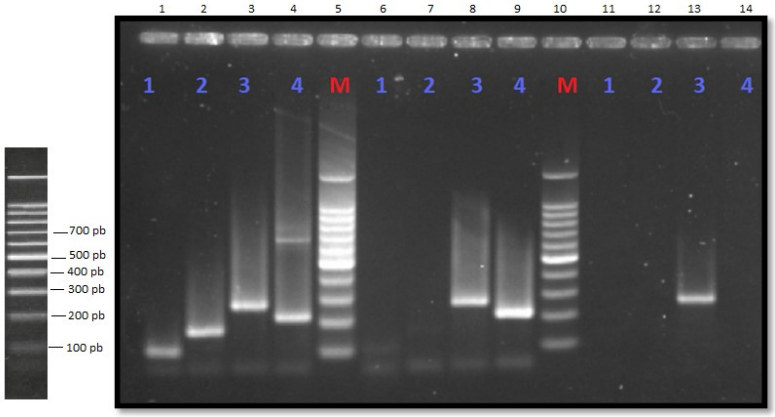


Figura 34. Electroforesis en gel de comparativa de dos tipos de PCR anidado-cepas con diferentes enzimas y PCR directo con muestra positiva de frijol para GHA. Carriles 1-4 amplificación de los sitios I, II, III y IV respectivamente por método de PCR anidado-cepas con enzimas Hot Start/*Taq* pol. para primera y segunda reacción, carriles 6-9 con enzimas Taq pol/Taq pol para primera y segunda reacción respectivamente y carriles 11-14 amplificación de intrones directa. Carriles 5 y 10 marcador de 100 pb (Promega).

7.10 Plantas de frijol con suelo de Marín Nuevo León e inoculación de *B. bassiana* a nivel laboratorio

Se realizó una segunda prueba a nivel laboratorio para confirmar el mejor método de aplicación (semilla, al suelo o foliar en haz o envés) para el establecimiento de Bb, con la cepa GHA, pero utilizando suelo de la localidad de Marín Nuevo León (Fig.37).

Figura 36. Crecimiento de plantas de frijol con suelo de tipo vertisol de localidad de Marín Nuevo León.

Para esta prueba no se utilizó tensoactivo para las aplicaciones a nivel de semilla ya que por pruebas anteriores se observó cierto grado de toxicidad con el tensoactivo Tritón X100 a nivel de semilla (Figs. 27 y 28), por lo que se utilizó para esta prueba solución salina en dichas aplicaciones. Por otro lado, al realizar el plaqueo de tejido en algunas ocasiones se procedía a cortar las muestras con otros hongos que ya se conocía que pudieran tener un crecimiento rápido sobre toda la placa e impedir la observación del establecimiento de Bb (Fig. 38), pero las cuales eran consideradas en el conteo final para la obtención del porcentaje de establecimiento.

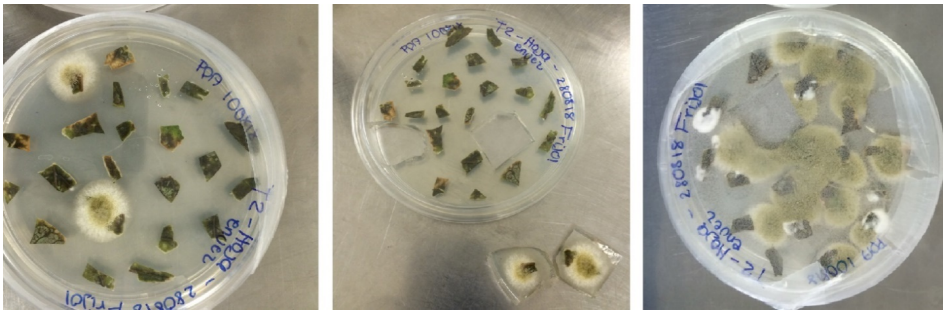


Figura 37. Placa de PDA de muestra T2 con tejido sustraído a causa de endófitos de crecimiento rápido. A) plaqueo de hoja muestra T2 (aplicación foliar envés) con 3 días de crecimiento y aparición de endófito de crecimiento rápido que no es Bb. B) Tejido de endófito de crecimiento rápido sustraído y C) placa con resultado final 8 días después con tejido positivo para Bb.

Los resultados finales del plaqueo de tejido en PDA para determinar los porcentajes de establecimiento de Bb GHA como endófito en el tejido lavado de raíz, tallo y hojas utilizando suelo de la localidad de Marín N.L, mostraron que el mejor establecimiento se dio de nuevo en las hojas por medio de aplicaciones foliares de conidios (33.2%) o blastosporas (20.5%), siendo mejor el establecimiento para ambos casos mejor por el envés (28 y 16% respectivamente) que por el haz de la hoja (5.0 y 4.5% respectivamente) (Figs. 39 y 40).

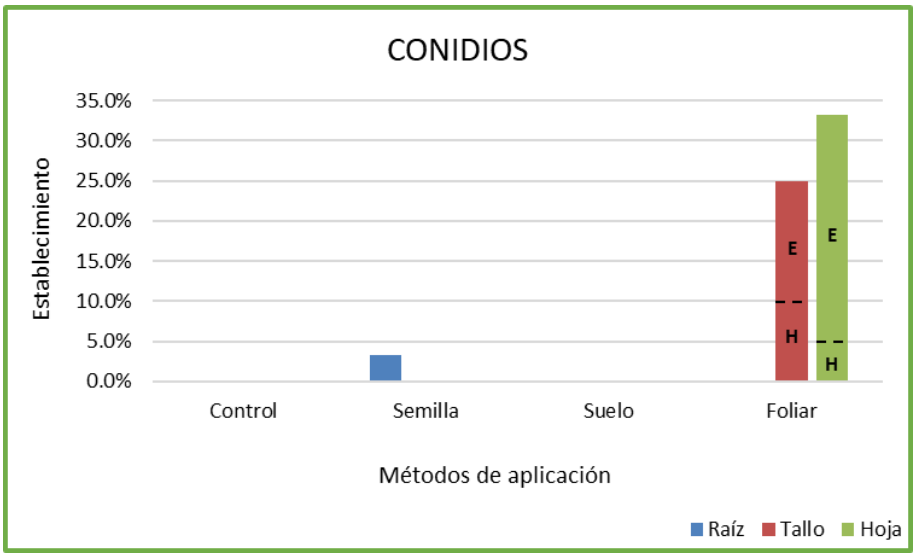


Figura 38. Porcentaje de establecimiento de Bb en frijol utilizando conidios y suelo de una localidad de Marín Nuevo León. E= envés, H= Haz.

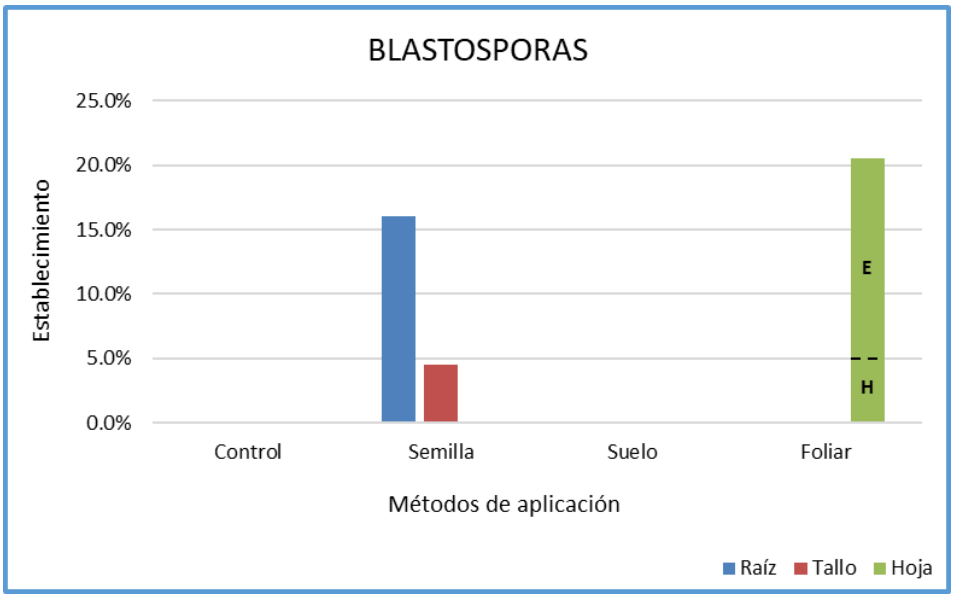


Figura 39. Porcentaje de establecimiento de Bb en frijol utilizando blastosporas y suelo de una localidad de Marín Nuevo León. E= envés, H= Haz.

Las aplicaciones foliares con conidios mostraron además un buen establecimiento en tallo (25%), observándose de nuevo que la aplicación foliar por el envés obtuvo mejor establecimiento en tallo que la aplicación por el haz (15 y 10%), pero dicho efecto no se observó utilizando blastosporas (Fig. 39 y 40). Por otro lado, las aplicaciones en semillas utilizando blastosporas mostraron mejores resultados de establecimiento en

raíz que las aplicaciones con conidios (16 y 3.3%), observándose además un grado de establecimiento en tallo (4.5%). Además, en este experimento no se observó establecimiento en ningún tipo de tejido cuando los conidios o blastosporas fueron aplicados al suelo.

Resultados del Objetivo 4. Determinar la funcionalidad de la técnica estandarizada en el objetivo 2, para discernir entre las cepas GHA, BBPTG4 y BB37 en frijol a nivel laboratorio.

7.11 Filtrado molecular de muestras positivas para *Beauveria bassiana*

Se adaptó el PCR anidado descrito por Landa y cols (Landa *et al*, 2013), el cual sirve para detectar muestras positivas para la especie de Bb (PCR anidado-Bb). Esto se realizó, para hacer un filtrado molecular de muestras que fueran positivas para Bb antes de hacer el PCR anidado para discernir entre cepas (PCR anidado-cepas). Al realizar el PCR anidado-Bb, con los tres genomas de Bb: GHA, BBPTG4, BB37 y de otro hongo *Asperguillus versicolor,* se observaron amplificaciones alrededor de 500 pb para las tres muestras de Bb y la no amplificación para la muestra de *Aspergillus versicolor* (Fig. 41).

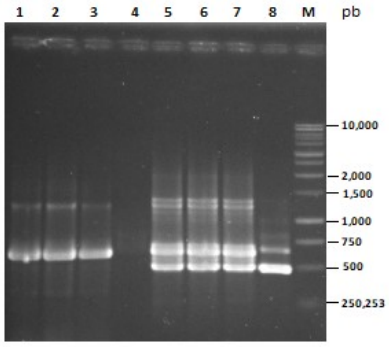


Figura 40. Electroforesis en gel de PCR anidado-Bb (ITS/Bb) para la detección de muestras positivas para *B. bassiana* como endófito. Carriles 1-4 segunda reacción de PCR anidado de muestras de hongos GHA, BBPTG4, BB37 y *Aspergilus versicolors.* Carriles 5-8 primera reacción de PCR anidado de la región ITS amplificando GHA, BBPTG4, BB37 y *Aspergillus versicolors.,* carril M marcador 1kb (Promega).

7.12 Determinación del establecimiento de las tres cepas en frijol por plaqueo de tejido y PCRs anidados.

Se realizaron dos experimentos aplicando las tres cepas en plantas de frijol en macetas, uno en campo y el otro a nivel laboratorio respectivamente (A y B), siendo todas las aplicaciones foliares por el envés. Se hace la observación que se tuvo un problema con una plaga en las hojas antes de las aplicaciones en el experimento A (Figs. 42 y 43), por lo que se realizó además el experimento A-1 solo con la cepa control GHA, el cual también fue al aire libre y no se reportó problema de plagas.

Figura 41. Crecimiento de plantas para pruebas de inoculación con GHA, BBPTG4 y BB37 de experimento A antes de la plaga.

Figura 42. Crecimiento de plantas para pruebas de inoculación con GHA, BBPTG4 y BB37 de experimento A con la plaga.

Al terminar el periodo de crecimiento en los tres experimentos, el tejido fue lavado y una parte se utilizó para la técnica de plaqueado de tejido y el resto se guardó a -80 °C para su posterior extracción de ADN para

realizar los dos PCRs anidados (PCR anidado-Bb y PCR anidado-cepas).

Los resultados del tejido lavado y plaqueado en PDA del experimento A aplicando cada una de las tres cepas mostraron un bajo establecimiento con solo 3 de 9 (3/9) muestras con tejido positivo con las características de *B. bassiana*: dos de plantas marcadas con la cepa BBPTG4 y una con BB37 (Tabla 7, A), las cuales demuestran un grado o porcentaje de establecimiento menor de 33% en las muestras que fueron positivas.

Tabla 7. Comparación de plaqueo de tejido, PCR anidado para detectar *B. bassiana* y PCR para diferenciar entre cepas.

A)

Muestras	Plaqueo de tejido	PCR anidado-Bb	PCR anidado-cepas
Control 1	NEGATIVO	NEGATIVO	NR
Control 2	NEGATIVO	NEGATIVO	NR
GHA-1	NEGATIVO	NEGATIVO	NR
GHA-2	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
GHA-3	NEGATIVO	NEGATIVO	NR
BBPTG4-1	POSITIVO (33%)	POSITIVO	NEGATIVO
BBPTG4-2	POSITIVO (28.5%)	POSITIVO	POSITIVO
BBPTG4-3	NEGATIVO	NEGATIVO	NR
BB37-1	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
BB37-2	POSITIVO (11%)	POSITIVO	POSITIVO
BB37-3	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO

A-1)

Muestras	Plaqueo de tejido	PCR anidado-Bb	PCR anidado-cepas
Control 1	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
Control 2	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
Control 3	NEGATIVO	NEGATIVO	NR
Control 4	NEGATIVO	NEGATIVO	NR
GHA-1	NEGATIVO	NEGATIVO	NR
GHA-2	NEGATIVO	NEGATIVO	NR
GHA-3	NEGATIVO	NEGATIVO	NR
GHA-4	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
GHA-5	NEGATIVO	NEGATIVO	NR
GHA-6	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO

GHA-7	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
GHA-8	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
GHA-9	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
GHA-10	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO

B)

Muestras	Plaqueo de tejido	PCR anidado-Bb*	PCR anidado-cepas*
Control-1-1	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
Control-1-2	NEGATIVO	NR	NR
Control-2-1	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
Control-2-2	NEGATIVO	NR	NR
Control-3-1	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
Control-3-2	NEGATIVO	NR	NR
GHA-1-1	POSITIVO (40%)	POSITIVO	NEGATIVO
GHA-1-2	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
GHA-2-1	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
GHA-2-2	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
GHA-3-1	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
GHA-3-2	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
BBPTG4-1-1	POSITIVO (100%)	POSITIVO	NEGATIVO
BBPTG4 -1-2	POSITIVO (50%)	POSITIVO	NEGATIVO
BBPTG4 -2-1	POSITIVO (20%)	POSITIVO	NEGATIVO
BBPTG4 -2-2	POSITIVO (16.6%)	POSITIVO	NEGATIVO
BBPTG4 -3-1	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
BBPTG4 -3-2	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
BB37 -1-1	POSITIVO (20%)	NEGATIVO	NR
BB37 -1-2	POSITIVO (40%)	POSITIVO	NR
BB37 -2-1	POSITIVO (60%)	NEGATIVO	NR
BB37 -2-2	NEGATIVO	POSITIVO	NR
BB37 -3-1	NEGATIVO	POSITIVO	NR
BB37 -3-2	POSITIVO (80%)	NEGATIVO	NR

NR= No realizado, * muestras sin lavar

Como no se obtuvieron muestras positivas para GHA por el método de plaqueo de tejido lavado en el experimento A, se realizó el experimento A-1 donde se aplicó solamente GHA, además de los controles sin inocular (Tabla 7, A-1), observándose de nuevo que, no se obtuvieron muestras positivas de GHA por el método de plaqueo de tejido en PDA. Posteriormente, para el experimento B (Tabla 7, B) se obtuvieron un total de 9/16 muestras positivas con características de Bb, siendo: 1/6 muestras positivas para GHA, 4/6 muestras positivas para BBPTG4 y 4/6 muestras

para BB37, observándose diversos porcentajes de establecimiento (desde un 16 hasta un 100%) en las muestras positivas de cada cepa.

Se considera que la cepa GHA no estaba en buenas condiciones durante estas pruebas, ya que en estos tres experimentos (A, A-1 y B) tuvo un bajo establecimiento con el método de placa. Es probable que el almacenamiento de dicha cepa en aceite mineral puedo haber afectado su desempeño ya que en pruebas anteriores donde se había utilizado lotes del monospórico de GHA sin haber estado guardado en aceite mineral (para determinación del mejor método de aplicación), se observó un buen desempeño de la cepa con mejores porcentajes de establecimiento (Fig.25,26,39 y 40).

7.12.1 PCR anidado-Bb y PCR anidado-cepas de experimento A

Al realizar el tamizaje molecular para determinar el número de muestras positivas para Bb con el PCR anidado-Bb (Tabla 7, A), las muestras que dieron positivo en el plaqueo de tejido, vuelven a dar positivo con el PCR anidado-Bb y además otras tres muestras, una proveniente de una planta inoculada con la cepa GHA y dos BB37), siendo un total de 6/9 muestras positivas. En la fig. 44 se muestran algunas de las muestras positivas por medio del PCR anidado-Bb para el experimento A.

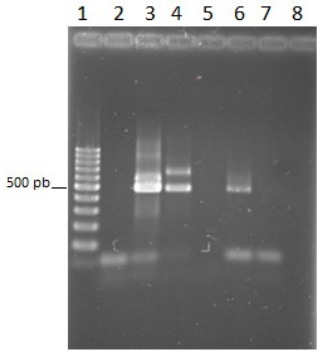


Figura 43. Electroforesis en gel de PCR anidado-Bb para detectar muestras positivas *para B. bassianana* en experimento A. Carril 1 marcador 100 pb (Promega), carriles 2-7: GHA-1,GHA-2 BB37-1, GHA-3, PTG4-1 y control negativo respectivamente. Banda de señal positiva esperada 464 pb aproximadamente.

Al realizar la prueba de PCR anidado-cepas a las muestras que dieron

positivas con el PCR anidado-Bb, se observó que aunque inicialmente la mayoría de las muestras se observaban aparentemente negativas, es decir sin mostrar el patrón distintivo de inserción de intrones de cada cepa (Fig. 45), se observó en dicho gel que en los patrones obtenidos de GHA 1 y 2 BBPTG4 y control negativo, el sitio para el intrón 2 amplifica muy bien, (lo cual es distintivo de la presencia de GHA o BBPTG4), ya que cuando se amplifican los cuatro sitios para la planta solamente sin inocular, el sitio para el intrón 2, sale muy tenue o no sale (Fig. 15 y 16), por lo que dicho gel podría indicar que por la falta de ADN de Bb no se pueda observar bien el patrón distintivo de cada esas cepas.

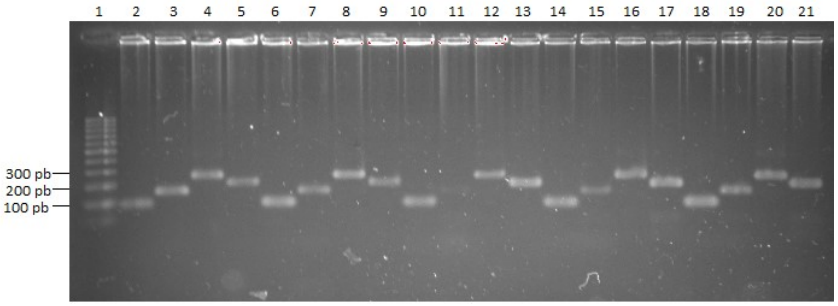


Figura 44. Electroforesis en gel de PCR anidado-cepas a muestra de hoja de frijol con endófito en experimento A. Carril 1 marcador 100 pb (Promega), carriles 2-21 PCR anidado-cepas (28S/I-IV) con una reacción de 28S y posterior amplificación para los sitios de inserción I-IV del gen 28S de Bb para las muestras de hojas con endófitos: GHA-1 y 2, BB37-2, BBPTG4-2 y control sin inocular, respectivamente.

Por la incertidumbre anterior, a todas las muestras pasadas que dieron positivo para Bb se les realizó la primera reacción de PCR anidado-cepas dos veces, para concentrar más dicho amplicón (tomando un microlitro de la primera reacción como muestra para la repetición de la primera amplificación) y posteriormente la segunda reacción que detecta el perfil de inserción de IDGI, ya que se observaba que de esta manera algunas muestras que arrojaban un resultado inicialmente negativo (o no correspondiente a la cepa que se había aplicado), con una segunda amplificación de la primera reacción y su posterior amplificación de perfil de inserción de IDGI arrojaban un resultado positivo distintivo de la cepa que se le había aplicado a dicha planta (Fig. 46).

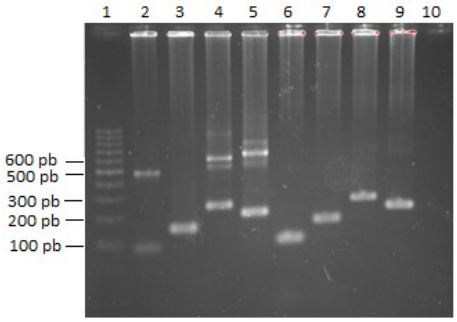


Figura 45. Electroforesis en gel de PCR anidado-cepas a muestra de hoja de frijol con endófito Bb BBPTG4-2 con ajustes en primera reacción. Carril 1 marcador 100 pb (Promega), carriles 2-5 PCR anidado-cepas (28S/I-IV) en hoja de frijol con BBPTG4 (BBPTG4-2) con doble amplificación del gen 28S y posterior amplificación de sitios de I-IV. Carriles 6-9 PCR anidado-cepas en hoja de frijol (BBPTG4-2), con una amplificación del gen 28S y posterior amplificación de sitios de I-IV del gen 28S.

De esta manera, se obtuvieron dos muestras positivas con su distintivo perfil de inserción de IDGI correspondiente a la planta que se les habían aplicado, una para BBPTG4 (Fig. 46 y 47) y otra para BB37 (Fig. 48); siendo que en general la técnica de PCR anidado-cepas pudo detectar 2/6 muestras positivas para Bb (Tabla 7, A).

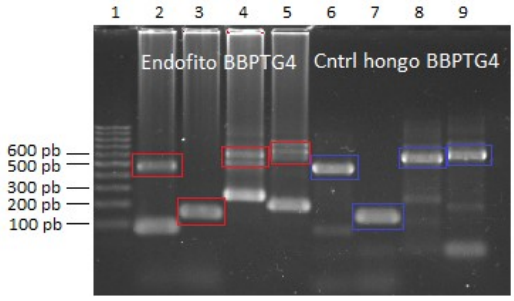


Figura 46. Electroforesis en gel de PCR anidado-cepas a muestra de hoja de frijol con endófito BBPTG4 aplicado previamente y control de hongo positivo. Carril 1 marcador 100 pb (Promega), carriles 2-5 PCR anidado-cepas (28S/I-IV) con doble reacción de 28S y posterior amplificación de sitios de inserción I-IV. carriles 6-9, PCR directo de muestra de hongo BBPTG4 de sitios I-IV.

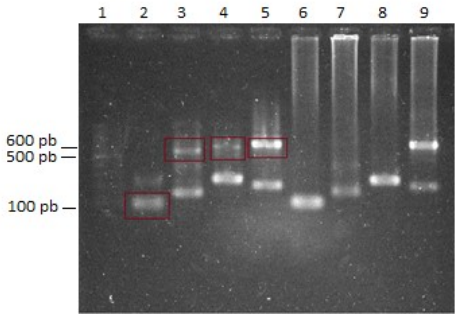


Figura 47. Electroforesis en gel de PCR anidado-cepas a muestra de ADN de frijol con aplicación previa de la cepa BB37 (muestra BB37-2). Carril 1: marcador 100 pb (Promega), carriles 2-5 PCR anidado-cepas (28S/I-IV) con doble reacción de 28S y posterior amplificación de sitios de inserción I-IV. Carriles 6-9 con reacción sencilla de 28S y posterior amplificación de sitios de inserción I-IV del gen 28S.

7.12.2 PCR anidado-Bb y PCR anidado-cepas experimento A-1

Para el experimento A-1, al realizar el tamizaje molecular para determinar el número de muestras positivas para Bb con el PCR anidado-Bb se observaron un total de 6/10 muestras positivas (Fig. 49) y además 2/4 controles sin inocular, también positivos (Tabla 7, A-1)

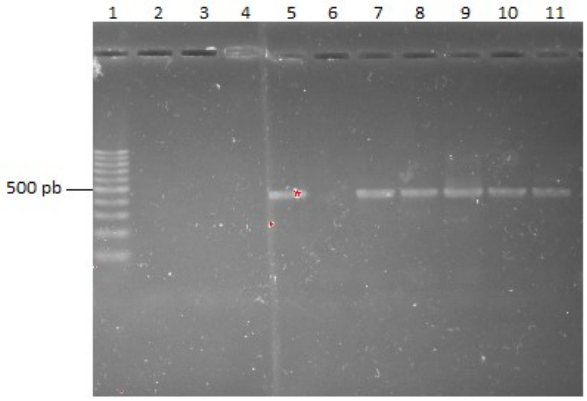


Figura 48. Electroforesis en gel de PCR anidado-Bb (ITS/Bb) en muestras de ADN de hoja de frijol lavadas y tratadas previamente con GHA.

Con base en resultados anteriores, donde se observó una mejor amplificación haciendo la primera reacción doble, se tomaron las muestras positivas GHA-4 y GHA-6 y se les realizó la primera reacción doble para posteriormente hacer la segunda reacción, obteniendo un resultado más nítido del perfil de inserción de GHA (Fig. 50), que haciendo solamente la

primera reacción una sola vez (Fig. 51). Para este último caso se consideraron las muestras GHA-9 y GHA-10 positivas por que muestran insertado el intrón Bb4, el cual es distintivo de dicha cepa (aunque no se haya visto el resto del perfil por falta de muestra).

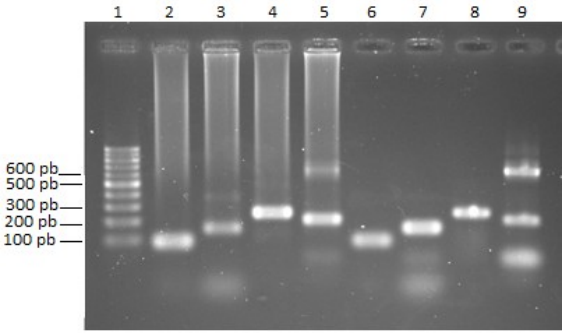


Figura 49. Electroforesis en gel de PCR anidado-cepas (28S/I-IV) para muestras de hoja de frijol lavadas y tratadas previamente con GHA. Carril 1: marcador 100 pb (Promega), carriles 2-5 y 6-9 muestras de ADN de frijol tratadas: muestras de frijol GHA-4 y 6 respectivamente con PCR anidado-cepas con la primera reacción doble y la segunda reacción para los sitios de inserción I-IV del gen 28S.

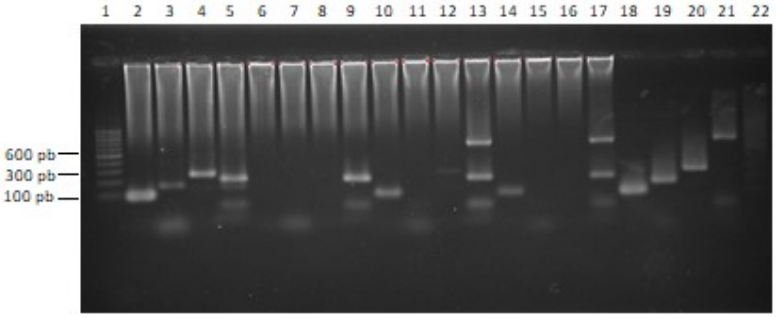


Figura 50. Electroforesis en gel de PCR anidado-cepas de muestras de frijol previamente tratadas con GHA. Carril 1 marcador 100 pb (Promega), carriles 2 -5, 6-9, 10-13, 14-17 con GHA-7,8,9 y GHA-10 respectivamente con PCR anidado-cepas (28S/I-IV) con la primera reacción sencilla y la segunda reacción para los sitios de inserción I-IV.

7.12.3 PCR anidado-Bb y PCR anidado-cepas de experimento B

Para el caso del tamizaje molecular para determinar el número de muestras positivas para Bb en el experimento B con el PCR anidado-Bb (Tabla 7, B), se tuvo un problema con el procesado de las muestras lavadas al hacer la extracción de ADN, ya que se observó que en el PCR anidado-Bb (Landa *et al.* 2013) solo dos muestras dieron positivo, observándose poca amplificación (Fig. 52 del derecho carriles 1 y 3), por lo que se piensa que en la extracción del ADN pudieron haber problemas de degradación de las

muestras ya que dichas extracciones salieron con cantidades bajas de ADN y radios absorbancia que indican la calidad de extracción (260/280) también bajos (datos no mostrados).

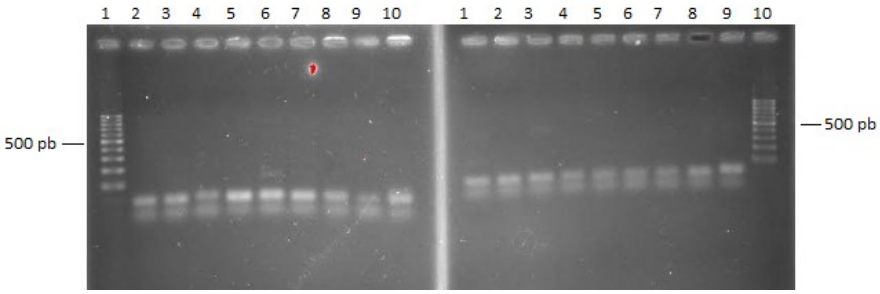


Figura 51. Electroforesis en gel de PCR anidado-Bb (ITS/Bb) de muestras de ADN de hoja de frijol lavadas y tratadas previamente con GHA, BBPTG4 o BB37 de experimento B. Carriles 1 (gel izq.) y 10 (gel der.) marcador 100 pb (Promega), carriles 2 -7 muestras con GHA, carriles 8-10 (gel izq) y del 1-3 (gel der.) muestras con BBPTG4 y 4-9 muestras con BB37.

Para algunas de las muestras anteriores se tenían muestras de repuesto congeladas a -80 °C sin procesar, pero solo se tenían 9 de las 24 (dos controles, tres muestras para GHA y una para BBPTG4 y dos para BB37), por lo que se procedió a hacer de nuevo la extracción de ADN con mejores resultados en la calidad del ADN y mayor cantidad de extracción (datos no mostrados), por lo que se realizó el PCR anidado-Bb a estas muestras de repuestos y se observaron cuatro muestras positivas, siendo una para GHA, una para BBPTG4 y dos para BB37 (Fig. 53).

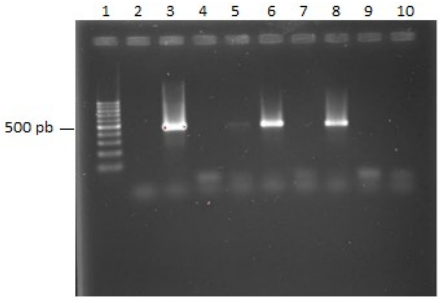


Figura 52. Electroforesis en gel de PCR anidado-Bb (ITS/Bb) de muestras de ADN de hoja de frijol lavadas de repuesto de experimento B. Carril 1: marcador 100 pb (Promega), carriles 2-9: GHA2-2, GHA1-2, GHA3-1, BB37-2-1, BB37-3-1, BB37-3-2, BBPTG4-3-2, Control 1-1 y Control 2-1 respectivamente.

En el experimento B, se conservaron muestras congeladas también

del tejido sin lavar, para determinar la factibilidad de determinar el perfil de inserción de IDGI de dichas muestras. Para esto primero se realizó el tamizaje molecular para detectar las muestras positivas para Bb, observándose que de las seis muestras por cepa y tres controles negativos (21 muestras en total), 18 fueron positivas (Fig. 54), siendo solo una muestra de GHA, tres de BB37 salieron negativas y uno de los tres controles negativos sin tratar.

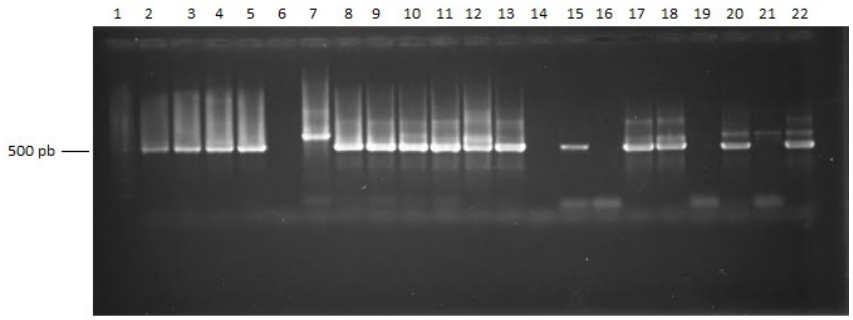


Figura 53. Electroforesis en gel de PCR anidado-Bb (ITS/Bb) de muestras de ADN de hoja de frijol de experimento B sin lavar tratadas previamente con las tres cepas. Carril 1: marcador 100 pb (Promega), carriles 2-7 GHA: 1-1, 1-2, 2-1, 2-2, 3-1, 3-2, carriles 8-13 PTG4: 1-1, 1-2, 2-1, 2-2, 3-1, 3-2, carriles 14-19 BB37:1-1, 1-2, 2-1, 2-2, 3-1, 3-2, carriles 20-22 controles negativos 1-1, 2-1 y 3-1.

Al realizar la técnica de PCR anidado-cepas para las cuatro muestras lavadas (Fig. 53) y todas las muestras sin lavar (Fig. 54) que habían salido positivas por la técnica de PCR anidado-Bb, se observó que se tuvo un problema de exceso de degradamiento en las muestras de los PCR anido-cepas, posiblemente por la contaminación de la enzima Super FI, por lo que no fue posible completar este experimento (Fig. 55-57).

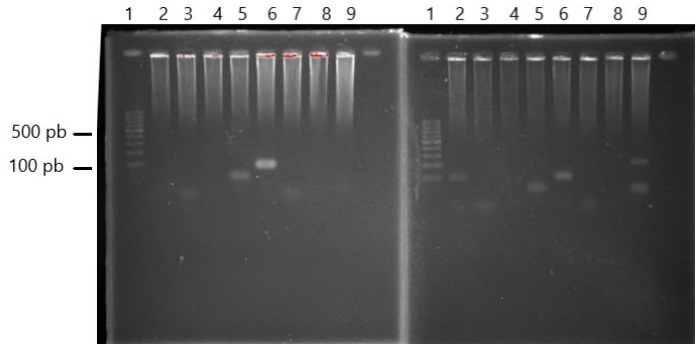
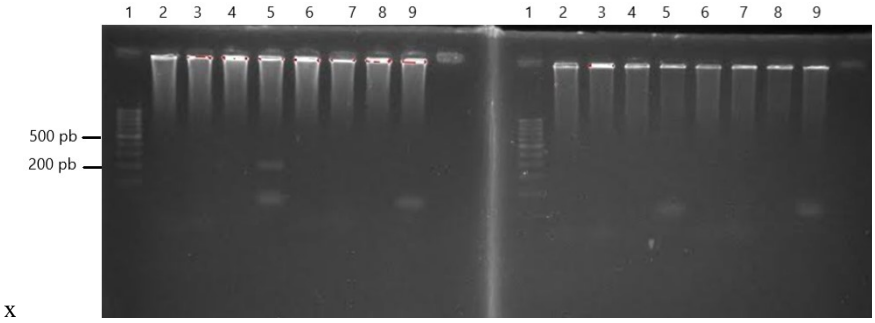


Figura 54 Electroforesis en gel de PCR anidado-cepas de muestras de frijol tratadas con GHA de experimento B. Carril 1:marcador 100 pb (Promega) en geles izq. y der. Carriles 2-5 y 6-9 de muestras GHA1-1 y 1-2 (gel izq) y muestras GHA 2-1 y 2-2 (gel der.) sin lavar. Todas las muestras son PCR anidado-cepas (28S/I-IV) con la primera reacción doble y la segunda reacción para los sitios de inserción I-IV.



x

Figura 55. Electroforesis en gel de PCR anidado-cepas de muestras de frijol tratadas con BBPTG4 de experimento B. Carril 1: marcador 100 pb (Promega) en geles izq. y der. Carriles 2-5 y 6-9 de muestras BBPTG4 1-1 y 1-2 (gel izq) y muestras BBPTG4 2-1 y 2-2 (gel der.) sin lavar. Todas las muestras son PCR anidado-cepas (28S/I-IV) con la primera reacción doble y la segunda reacción para los sitios de inserción I-IV.

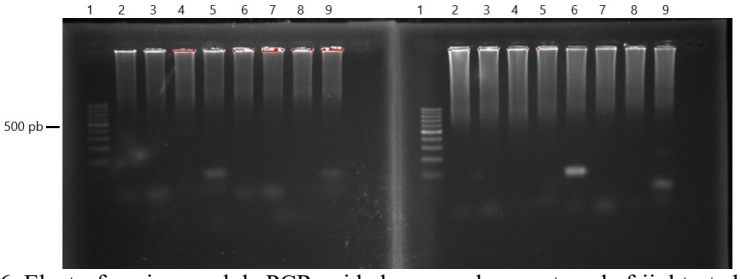


Figura 56. Electroforesis en gel de PCR anidado-cepas de muestras de frijol tratadas con BB37 de experimento B. Carril 1:marcador 100 pb (Promega) en geles izq. y der. Carriles 2-5 y 6-9 de muestras BB37 1-2 y 2-2 (gel izq) y muestra BB37 3-1 y 1-1 (gel der.) sin lavar. Todas las muestras son PCR anidado-cepas (28S/I-IV) con la primera reacción doble y la segunda reacción para los sitios de inserción I-IV.

Resultados del Objetivo 5. Determinar el desempeño de la técnica con prueba de campo en frijol var. Pinto Saltillo, con las cepas GHA, BBPTG4 y BB37.

7.13 Prueba de campo en frijol con cepas de *B. bassiana*

Se realizó prueba de campo en frijol var Pinto Saltillo, aplicado las cepas GHA, BBPTG4 y BB37 en el ciclo tardío de agosto-diciembre del 2018. Se agregó al terreno arcilloso gallinaza para aportar materia orgánica en una proporción de 1 kg/ha. y posteriormente se sembró frijol en ocho carriles a lo largo de 41 metros del terreno (Fig. 7). El terreno se delimitó con rafia de manera transversal a los carriles para delimitar las parcelas y las zonas con las diez plantas que se inocularon de cada parcela (Fig. 58).

Figura 58. Delimitación de las plantas a tratar con rafia.

Posteriormente se aplicaron los nueve tratamientos en cada uno de los cuatro bloques (Fig. 59).

Figura 59. Aplicación de tratamientos en plantas de frijol var. Pinto Saltillo

Además, al material enviado a campo se le realizó la prueba molecular para confirmar que el patrón de inserción de intrones de cada una de las cepas enviadas fuera el obtenido con anterioridad (Fig. 60).

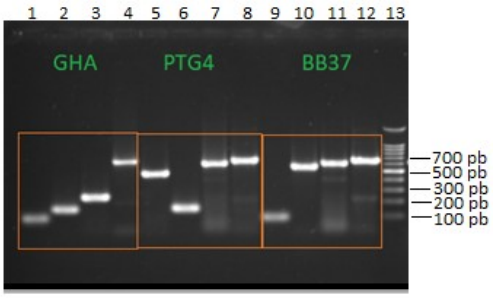


Figura 57. Electroforesis en gel del patrón de inserción de IDGI proveniente de cepas enviadas a prueba de campo. PCR directo de sitios de IDGI I-IV en ADN de conidios de GHA (carril 1-4), BBPTG4 (carril 5-8), BB37 (carril 9-12) y carril 13 marcador de 100 pb (Promega).

El ciclo de aproximadme 90 días inicio con la siembra del frijol el 3 de septiembre del 2018 y terminó el 28 de noviembre del 2018. Se realizó la aplicación de los microrganismos pasadas las cuatro semanas de crecimiento

(el 3 de octubre del 2018), las cuales fueron a nivel suelo y foliar. Cabe destacar que antes de la fecha de término del ciclo hubo helada en la zona y el cultivo se secó (Fig. 61).

Figura 58. Cultivo de frijol quemado por helada en la zona.

Aún con los contratiempos se muestrearon entre cinco y siete plantas de cada uno de los tratamientos por cada uno de los bloques, pero no se pudo identificar el establecimiento del endófito en los tejidos muestreados por el método de plaqueo de tejido en PDA, posiblemente por lo maltratado y seco del tejido.

Además, se realizó el tamizaje molecular de 29 muestras de hojas, y por la mala calidad de ADN por las condiciones del tejido seco, (datos no mostrados) no se pudo detectar ninguna muestra positiva para Bb por el método de PCR anidado-Bb (Landa *et al,* 2013) (Fig. 62).

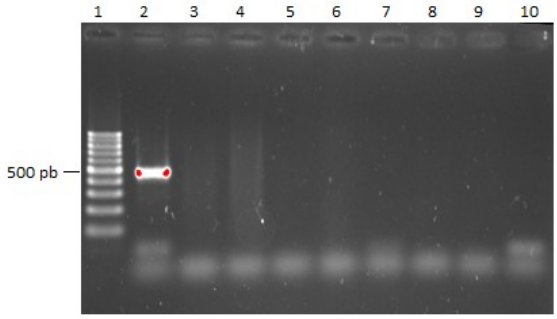


Figura 59. Electroforesis en gel de PCR anidado-Bb (ITS-Bb) en muestras de ADN de hojas provenientes de prueba de campo. Carril 1 marcador de 100 pb (Promega), carriles 2 control positivo de cepa BBPTG4, carriles 3-10: T1R1, T1R3, T1R4, T2R1, T5R3, T3R1, T5R1, T3R4. T=tratamiento, R= repetición.

Por lo tanto, no fue posible aplicar la técnica diseñada de PCR anidado-cepas (estandarizada en el presente proyecto) ya que no se detectó absolutamente ninguna muestra positiva para Bb por la mala calidad del tejido.

Además, se midieron variables morfológicas y de rendimiento de los tratamientos aplicados. Para el caso de ciertas variables como peso fresco y numero de hojas de la guía central no se determinaron, ya que las plantas después de la helada venían maltratadas y secas.

A continuación, se detallan las variables de longitud de la guía central, no. de vainas totales por planta, no. de vainas normales *vs* vainas vanas (vainas sin frijoles), peso de todas las semillas de cada planta por tratamiento, y peso de 100 semillas por tratamiento. Se observó un efecto significativo en la longitud de la guía central, siendo esta más corta en el tratamiento control absoluto T1 en comparación con los tratamientos T4-T9 ($P < 0.05$) los cuales son los tratamientos de endófitos aplicados de manera foliar y al suelo (Fig. 63). Dicha significancia también se observa en comparación del control absoluto (T1) que no tiene tensoactivo, con el control de aplicación del tensoactivo Inex-A al suelo (T3), lo cual demuestra que por sí solo está teniendo un efecto significativo en el desarrollo de la planta. No se observó diferencia significativa entre el control absoluto sin tensoactivo y el tratamiento T2 (control de aplicación foliar con el tensoactivo Inex-A sin endófitos).

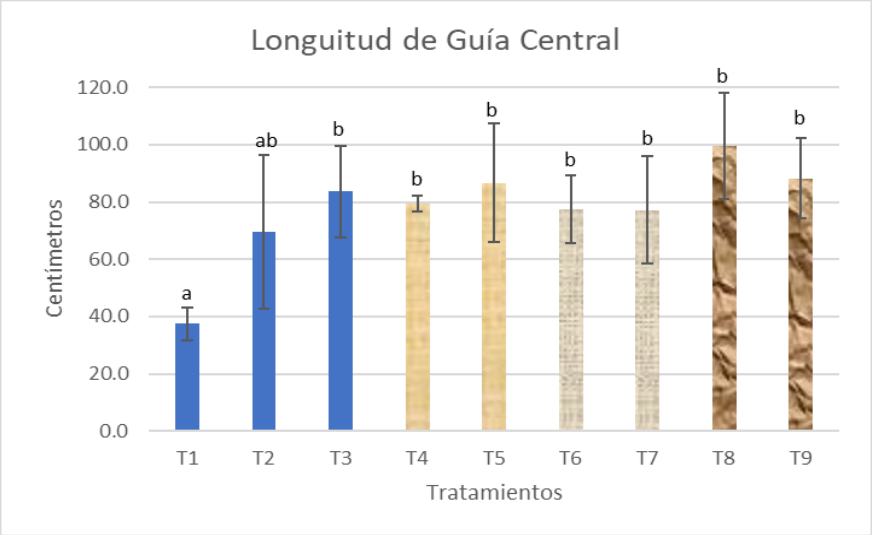


Figura 60. Medias (±DE) de longitud de guía central de los nueve tratamientos en campo con y sin endófitos. T1 control absoluto, T2 control foliar, T3 control suelo, T4 y T5 GHA foliar y suelo, respectivamente, T6 y T7 BBPTG4 foliar y suelo, respectivamente, T8 y T9 BB37 foliar y suelo, respectivamente (P ≤0.05).

Las variables de vainas, totales (Fig. 64), vainas normales (Fig. 65), vainas vanas (Fig. 66) y peso de semillas totales por planta (Fig. 67) no se observaron con diferencias significativas más sin embargo esto se puede deber a que hay datos con una dispersión alta y se considera que esto puede ser producto de la helada y no tanto que no hubiera diferencia entre los tratamientos.

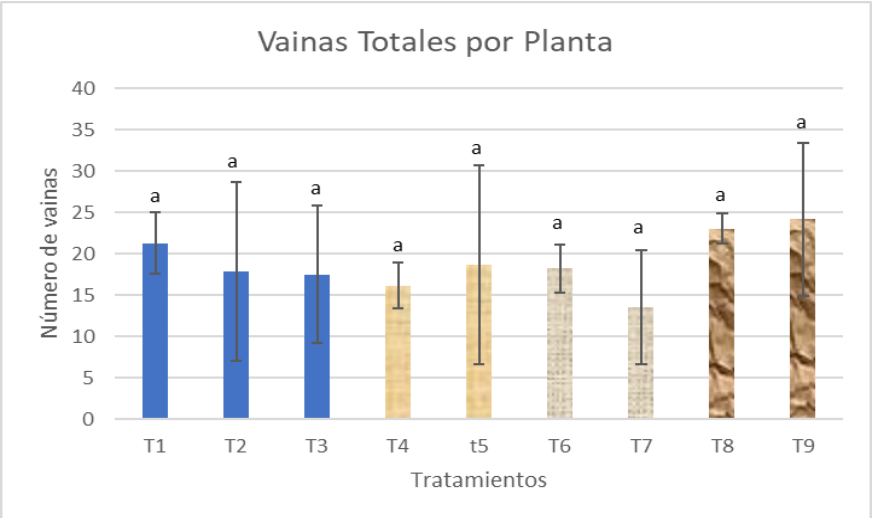


Figura 61. Medias (±DE) de número de vainas totales de los nueve tratamientos en campo con y sin endófitos. T1 control absoluto, T2, control foliar, T3 control suelo, T4 y T5 GHA foliar y suelo respectivamente, T6 y T7 BBPTG4 foliar y suelo respectivamente, T8 y T9 BB37 foliar y suelo, respectivamente.

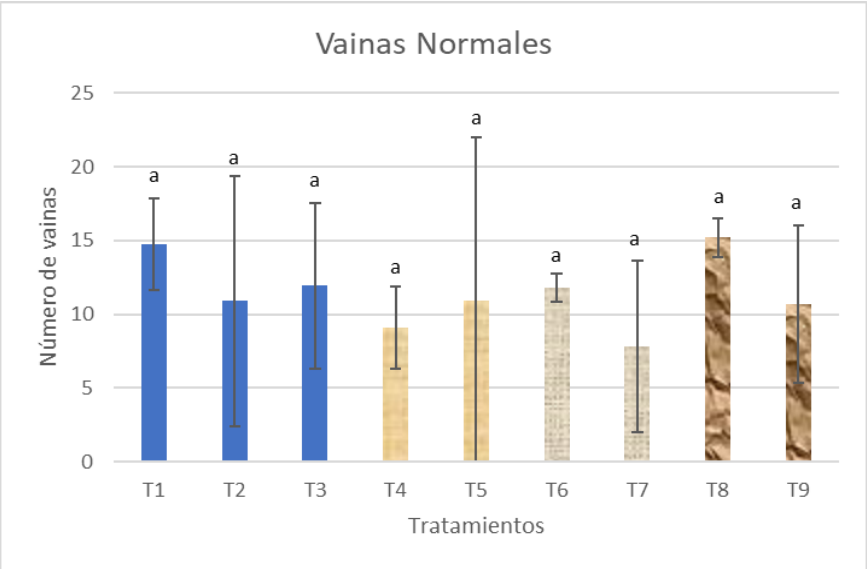


Figura 62. Medias (±DE) de número de vainas normales de los nueve tratamientos en campo con y sin endófitos. T1 control absoluto, T2 control foliar, T3 control suelo, T4 y T5 GHA foliar y suelo respectivamente, T6 y T7 BBPTG4 foliar y suelo respectivamente, T8 y T9 BB37 foliar y suelo, respectivamente.

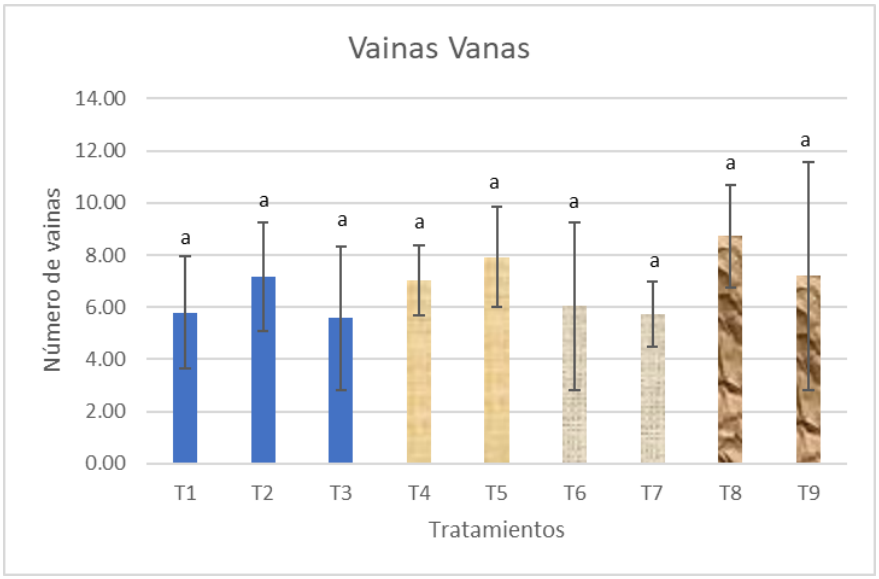


Figura 63. Medias (±DE) de número de vainas vanas (sin frijoles) de los nueve tratamientos en campo con y sin endófitos. T1 control absoluto, T2 control foliar, T3 control suelo, T4 y T5 GHA foliar y suelo respectivamente, T6 y T7 BBPTG4 foliar y suelo respectivamente, T8 y T9 BB37 foliar y suelo, respectivamente.

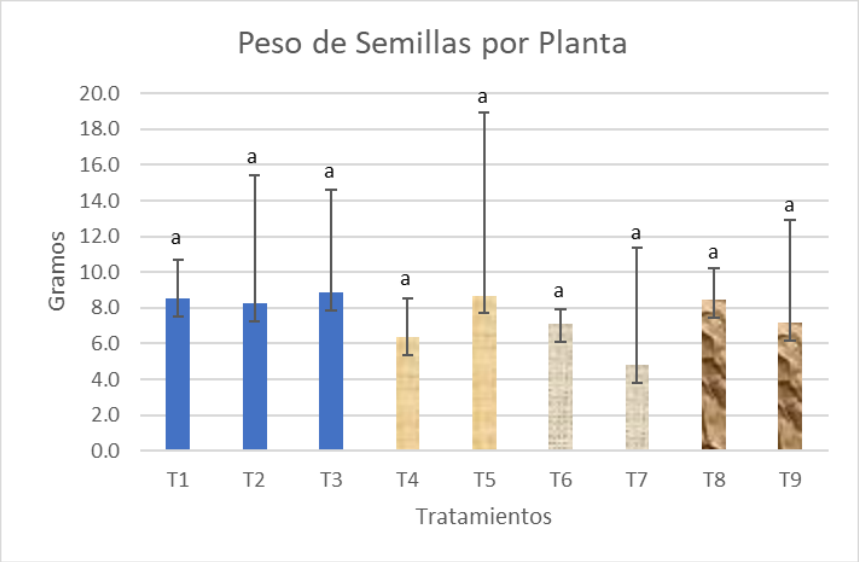


Figura 64. Medias (±DE) peso de semillas totales por planta de los nueve tratamientos en campo con y sin endófitos. T1 control absoluto, T2 control foliar, T3 control suelo, T4 y T5 GHA foliar y suelo respectivamente, T6 y T7 BBPTG4 foliar y suelo respectivamente, T8 y T9 BB37 foliar y suelo, respectivamente.

La variable de peso de 100 semillas por tratamiento se encontró que existe un menor rendimiento en los tratamientos con los endófitos (T4-T9) en comparación con el control absoluto T1 ($p < 0.05$), pero se destaca también que en todos los tratamientos se utilizó el tensoactivo Inex-A a excepción del control absoluto T1 (agua), siendo entonces el efecto del tensoactivo que se puede observar en los controles con solo tensoactivo T2 y T3 de aplicaciones foliar y suelo respectivamente, los cuales tuvieron un efecto significativo sobre el cultivo cuando era aplicado a nivel del suelo (Fig. 68).

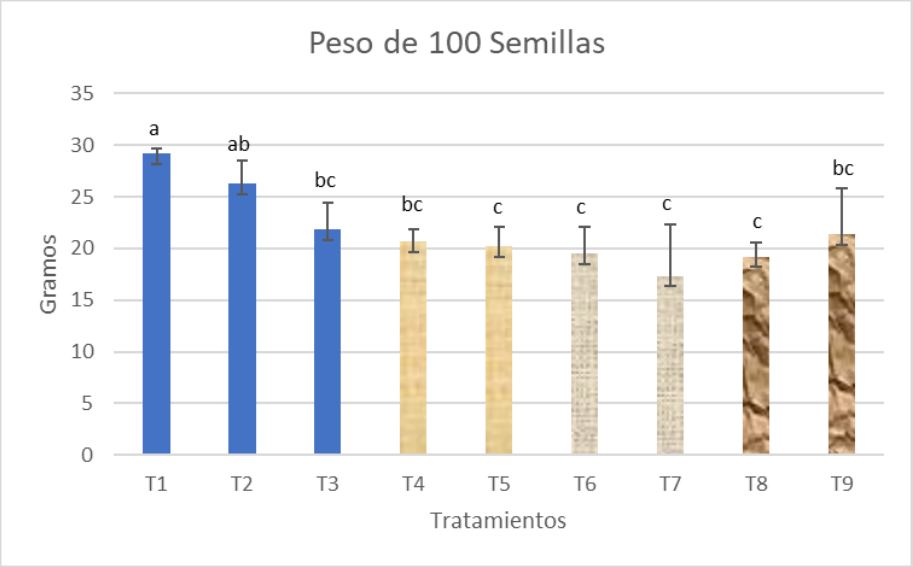


Figura 65. Medias (±DE) de peso de 100 semillas de los nueve tratamientos en campo con y sin endófitos. T1 control absoluto, T2 control foliar, T3 control suelo, T4 y T5 GHA foliar y suelo respectivamente, T6 y T7 BBPTG4 foliar y suelo respectivamente, T8 y T9 BB37 foliar y suelo, respectivamente ($P \leq 0.05$).

8. DISCUSIÓN

En el presente proyecto se diseñó una técnica molecular que ayudó a discernir entre tres cepas de *B. bassiana* cuando estas fueron aplicadas artificialmente en tejido de frijol var. Pinto Saltillo a nivel laboratorio. La técnica consistió en un PCR anidado que ayudó a la amplificación de cuatro sitios de inserción de IDGI del gen 28S del ADNr de *B. bassiana*, estando como endófito en frijol ya que dichos patrones de inserción son distintivos entre las tres cepas aquí probadas (Fig. 11).

El uso de un PCR directo se descartó desde un principio ya que, en pruebas con el ADN de una de las cepas en diversas concentraciones y en mezcla con ADN de frijol, se observó que no se podían detectar cantidades pequeñas o menores a 1,000 pg del ADN del endófito por medio de dicha técnica (Fig. 17).

El uso de un PCR anidado (PCR anidado-cepas) ayudó a detectar los patrones distintivos de inserción de IDGI de cada cepa en algunas muestras, observándose un límite de detección de hasta un picogramo de *B. bassiana* por cada 10 ng de ADN de frijol (Fig. 19), consistiendo la primera reacción de un PCR tipo *touchdown* para la amplificación de una parte de la región 3'OH del gen 28S del ADNr, la cual contenía los cuatro sitios de inserción de intrones Ec2563, Ec24469, Ec2066 y Ec1921 descritos por Wang *et al.* (2003); siendo dicha amplificación con los oligonucleótidos diseñados 28Sfw y 28Srv2. Para la segunda reacción se usó como muestra la reacción anterior de forma directa y los cuatro pares de oligonucleótidos (con la sustitución de uno de los oligonucleótidos originalmente diseñados) y las condiciones de PCR descritos por Wang *et al.* (2003), variando también el uso de enzima *Taq* polimerasa, la cual permitió la amplificación de los intrones.

Tradicionalmente, el estudio de endófitos involucra el lavado de trozos de tejido vegetal para retirar los epifitos y su posterior posicionamiento en placas con PDA o algún otro medio, para que el hongo endófito crezca y de esta manera se pueda determinar el porcentaje de establecimiento en base a la frecuencia de aparición en el tejido lavado

(Parsa *et al*. 2013; Sun y Dong Guo, 2012). Algunas de las principales desventajas del anterior método es el trabajo laborioso (Posada *et al*. 2007) y que puede dar falsos negativos debido a que el uso de cloro y otros químicos en el lavado pueden dejar no viables a los endófitos para que crezcan en el agar y que además aunque si crezcan, no se tiene la certeza que sea la cepa que se aplicó.

En la actualidad existen pocas metodologías moleculares para dar monitoreo especifico de cepas de Bb cuando son aplicadas en algún cultivo. Entre ellas, destaca la técnica para dar monitoreo descrita por Landa *et al.* (2013), basada en la transformación del organismo con la proteína verde fluorescente para poder dar monitoreo a la cepa 04/01 tip utilizando un microscopio de fluorescencia, siendo la principal desventaja, el trabajo laborioso para la correcta transformación de cada una de las cepas (que para dicho estudio fue solamente una). Este mismo grupo, estandarizó otras dos metodologías para la detección y cuantificación de Bb por medio de un PCR anidado y un PCR cuantitativo respectivamente, con oligonucleótidos que son capaces de amplificar solo muestras que contengan la especie como endófito, más sin embargo dichas técnicas no diferencian entre cepas.

Otra de las técnicas para dar monitoreo utiliza la amplificación del gen *ef1*α también con un PCR anidado *touchdown* con su posterior secuenciación (Mckinnon *et al.* 2018), lo cual cuando se tiene un amplio número de muestras resulta poco práctico, costoso y laborioso.

Uno de los principales problemas del desarrollo de la técnica de detección de cepas (PCR anidado-cepas) basado en la amplificación de los sitios de inserción de IDGI, fue que el gen 28S al ser conservado entre especies, los cuatro pares de oligonucleótidos que flanquean los sitios de inserción descritos por Wang *et al* (2003) y utilizados también como parte del PCR anidado-cepas en el presente proyecto, amplifican también en el genoma de la planta (Fig. 15 y 16), principalmente los correspondientes a los sitios de inserción III y IV (donde se insertan los intrones Bb3 y Bb4), apareciendo bandas intensas en las amplificaciones en muestras de genoma de planta de frijol sin inocular. Para las amplificaciones de los sitios I y II (donde se insertan intrones Bb1 y Bb2) las amplificaciones mostraron bandas más tenues y erráticas, es decir a veces aparecían y a veces no cuando se

amplificaban del genoma de plantas sin inocular (Fig. 15 y 16); por lo que habría la posibilidad que las muestras al momento de ser analizadas tuvieran endófitos sin intrones insertados de tipo Bb1 y Bb2, por lo que aparecían las bandas amplificadas leventemente y sin intrones.

Un análisis *in silico* del genoma de las plantas de frijol, chile , sorgo y maíz, con los cuatro pares de oligonucleótidos mostraron una alta paridad con el ADN de frijol y también con los genomas de las otras plantas analizadas, principalmente para la detección de los sitios de inserción III y IV, lo cual explica la alta intensidad de las bandas en frijol sin inocular, además se observa también una menor paridad o hibridación con los sitios de los oligonucleótidos para los intrones Bb1 y Bb2, principalmente con este último haciendo aparentemente una mala hibridación con el extremo 3'OH para poder amplificar dicho sitio del genoma de la planta (Tabla 6), lo cual podría explicar también la tenuidad esta banda (Fig. 15 y 16).

Para el sitio de inserción I, se observó una mala paridad en solo uno de los oligonucleótidos, pero esta no fue en el extremo 3'OH. En general se observó que ambos pares de oligonucleótidos (para el sitio de inserción I y II) no hibridan bien con el genoma de la planta (lo cual podría explicar la tenuidad de ambas bandas) pero también es una característica deseada en los oligonucleótidos para el PCR anidado-cepas por su falta de interacción con el ADN vegetal, sin embargo los sitios de inserción III y IV se observaron idénticos tanto en el genoma de Bb como en el de todas las plantas analizadas.

Como dato adicional del análisis *in silico*, se observó además que, todos los genomas de plantas analizados (frijol, sorgo chile, maíz) mostraron los cuatro sitios de inserción para intrones del grupo I (como en *B. bassiana)* principalmente en cloroplastos o mitocondrias, siendo algunos sitios idénticos a los de Bb (los cuales podrían favorecer la inserción de algún intrón) y otros con algunos cambios, en los cuales no se podría insertar dichos intrones (datos no mostrados). Además, se observó que, aunque todas las plantas tenían los cuatros sitios, algunos idénticos y otros con diferencias, en ningún genoma se observó intrones insertados, más sin embargo si se han reportado intrones del grupo I insertados en genomas de plantas vasculares, uno en mitocondria (Cho *et al.* 1998) y otro en cloroplastos (Eckardt 2007)

solamente. Remarcado que en literatura no se encontró alguna referencia relacionado a que las plantas tengan los sitios de inserción para intrones del grupo I, pero sin intrones, solo se mencionan la presencia de los dos intrones existentes mencionados anteriormente.

El patrón de inserción de intrones obtenido de cada monospórico aquí evaluado mostró un perfil distintivo: GHA tuvo solamente el intrón Bb4 insertado, BBPTG4 tuvo los intrones Bb1, Bb3 y Bb4 insertados y la cepa BB37 los intrones Bb2, Bb3 y Bb4 insertados (Fig. 11), siendo en esta pequeña muestra de tres cepas de *B. bassiana* el intrón Bb4 el más representativo estando presente en todas las muestras (100%), seguido del intrón Bb3 (66.6%) y los intrones Bb1 y Bb2 estando presente en una muestra (33.3%) cada uno.

En un análisis más extensivo de 125 muestras Wang y cols, describen al intrón Bb4 como el intrón más frecuente con un 86.4 % de aparición y el resto de los intrones con una frecuencia de alrededor de un 30% (Wang *et al*. 2003). Por otro lado, dicho estudio reportó también las secuencias de inserción de los cuatro sitios siendo CCACT v AATAGGGAA, GGGAT v AACTGGCCT, GACCCT v GTTGAGCTTG y TGACT v CTCTTAAGG para inserción de los intrones Bb1, Bb2, Bb3 y Bb4 respectivamente. Así mismo, al secuenciar cada uno de los amplicones obtenidos del perfil de inserción se observó que: GHA, BBPTG4 y BB37 tienen los mismos sitios de inserción reportados a excepción del sitio para el intrón Bb2 en las tres cepas, el cual tiene un cambio en la penúltima base de T/C de la secuencia de 13 pb que se reconocen para la inserción.

Para determinar la efectividad de la técnica de PCR anidado-cepas en plantas de frijol inoculadas con Bb, se procedió primero a determinar el mejor método de aplicación en frijol, utilizando conidios de Bb. Se observó que tanto en suelo estéril como en suelo no estéril se dio un mejor establecimiento del endófito cuando era aplicado en vía foliar por el envés de la hoja, seguido de la aplicación foliar por el haz, para ambos suelos estéril y no estéril (Fig. 24 y 25); resultados similares se han observado no solo en otras pruebas con frijol (Afandi *et al.* 2019), sino también en otros cultivos como opio (Landa *et al*. 2013), sorgo (Tefera y Vidal 2009), chile (Allegrucci *et al.* 2020), tomate (Gurulingappa *et al.* 2010) mostrado dichos

estudios mejores resultados de establecimiento con aplicaciones foliares, pero, depende del tipo de cultivo y otras características ya que otros cultivos resultan ser mejores los establecimientos aplicando los inóculos en semilla o al suelo (Jaber 2018; Afandi *et al.* 2019).

En cuanto al resto de las aplicaciones se observó un contraste con el uso de suelos estéril y no estéril, ya que el uso de suelo estéril afecto el establecimiento a nivel de semilla (obteniendo 0% de establecimiento en dicha aplicación en todos los tejidos analizados), pero no afecto el establecimiento en aplicaciones al suelo (Fig. 24). Pero, se observó lo contrario con el uso de suelo no estéril, ya que no se afectó el establecimiento a nivel de semilla, pero si se afectó por completo el establecimiento a nivel de aplicaciones al suelo (Fig. 25); observándose la influencia del medio de cultivo sobre el establecimiento, lo cual concuerda con lo obtenido por Tefera & Vidal, quienes concluyen también que el medio de cultivo influencia el grado de colonización (suelo estéril, no estéril y vermiculita) en un estudio en sorgo (Tefera y Vidal 2009), donde observaron también el mismo comportamiento de mayor establecimiento en suelo y menor en semilla usando suelo estéril y viceversa mayor establecimiento en semilla y menor en suelo utilizando suelo no estéril.

En el segundo ensayo de este proyecto, realizado también con un suelo no estéril pero de tipo vertisol procedente de una localidad de Marín Nuevo León, se repitió el mismo resultado que en el experimento anterior con suelo no estéril, observándose mejor la inoculación por aspersión foliar por el envés, seguido del haz, semilla y no establecimiento a nivel del suelo (Fig. 39) destacando que aunque ambos tipos de suelo no estéril, fueron muy diferentes (el primero con aparente mayor cantidad de materia orgánica y el segundo de color claro tipo arcilloso y aparente menor materia orgánica), tuvieron resultados similares en cuanto al establecimiento y tipo de inoculación. Se destaca además que se escogió también el uso de conidios sobre el uso de blastosporas ya que tuvo un mejor establecimiento del endófito (Fig. 39 y 40).

Se observó un efecto adverso del tensoactivo Tritón X-100 cuando eran aplicado a nivel de semilla ya que hubo más deformidades en las primeras hojas de plantas emergidas, plantas más pequeñas o no emergidas,

además dicha frecuencia de deformidades fue más marcada en suelo estéril (Fig. 26 y 27). Adicionalmente, se hicieron pruebas con otros tensoactivos como Tween 20, Tween 80, Inex A, todos mostrado algún grado de toxicidad en los conidios del endófito (por baja en viabilidad) y en la planta, cuando era aplicada en semilla y de manera foliar (ambos resultados no mostrados). Aunque diversos estudios mencionan en sus metodologías el uso de tensoactivos, no se reporta si hay algún efecto negativo en los tensoactivos usados sobre las plantas, los cuales suelen ser en general Tritón X-100 y Tween 80, entre otros, pero también dichos estudios se observa estuvieron faltos de controles absolutos (sin aplicación del tensoactivo), para cuestiones de comparación de los efectos del acarreador tensoactivo sobre la planta y/o conidios (Parsa *et al.,* 2013; Tefera y Vidal 2009; Greenfield *et al.* 2016, Jaber y Enkerli 2016).

El uso de la técnica de PCR anidado-cepas analizado en tejidos de raíz, tallo y hoja de algunos tratamientos muestreados mostró utilidad ya que se pudo observar el patrón de GHA en muestras donde se había aplicado la cepa (Fig. 34) y hasta en controles negativos sin aplicar (Fig. 32). Aquí cabe destacar que todas las pruebas se hicieron en tejido sin lavar, siendo el tejido de hojas el más practico y con buena resolución para la obtención del perfil de inserción de IDGI, utilizando la cepa GHA. Existe un estudio donde se detectó la cepa GHA con la técnica de SCARS con un límite de detección de 100 pg en muestras de suelo, pero esta técnica solo se diseñó para buscar Bb en muestras de suelo y hojas no estando Bb como endófito (Castrillo *et al.* 2003).

Adicionalmente en otros ensayos realizados donde se probaron las tres cepas GHA, BBPTG4 y BB37 inoculadas en plantas de frijol distintas, para determinar si la técnica era capaz de discernir entre cada una, se obtuvieron resultados diversos. Primero se observó, que no todas las muestras positivas para *B. bassiana* detectadas por la técnica de PCR anidado-Bb (Landa y cols 2013) pudieron ser detectadas por la técnica PCR anidado-cepas (Tabla 7), esto puede ser porque esta última tiene un límite de detección de 1 pg de ADN de hongo por cada 10 ng de ADN de planta, mientras la técnica de Landa *et al.* (2013), tiene un límite de detección más sensible, de 0.1 pg de hongo por cada 10 ng de ADN de vegetal, por lo que

en muestras que si sean positivas para *B. bassiana*, no siempre se podrá obtener el perfil al menos que la carga de ADN fúngico sea al menos el límite de detección. También se hace la observación que la técnica PCR anidado-Bb es la amplificación una región (ITS) que es muy variable entre especies de hongos y de otros organismos, por eso tiene un límite de detección más bajo, ya que el ADN vegetal no interviene en las dos reacciones de amplificación, en cambio, en el PCR anidado-cepas, en la segunda reacción, correspondiente a la amplificación de los sitios de inserción de IDGI, como es una zona conservada entre especies interacciona con el ADN vegetal (Fig. 15 y 16), por lo que es menos sensible.

Se observó también que en muestras sin lavar (Fig. 33 y 34), se puede hacer una mejor detección de la cepa GHA que con las muestras lavadas (Fig. 50 y 51), ya que en muestras sin lavar hay mayor cantidad del ADN proveniente del endófito en las muestras del genoma del frijol. Se observó también que en muestras sin lavar solo se requirió hacer una vez la primera reacción y posteriormente la segunda para detectar el perfil de inserción de IDGI (Fig. 33 y 34), pero en muestras lavadas, fue necesario hacer la primera reacción dos veces y posteriormente hacer la reacción de la detección del perfil de IDGI para poder observar el perfil de GHA (Fig. 50), de lo contrario haciendo la primera reacción solo una vez no se observaba el perfil completo (Fig. 51). Al analizar muestras de frijol lavadas con inoculaciones previas de BBPTG4 o BB37, se observó una mayor dificultad para encontrar una muestra positiva (ya que tienen más intrones insertados) y la generación del amplicón de la primera reacción es considerablemente más largo (2,657 pb y 2,812 pb respec.) que el de GHA (1,550 pb).

No fue posible determinar el perfil de IDGI en muestras de frijol sin lavar con inoculaciones con BBPTG4 y BB37, debido a problemas con los reactivos de la primera reacción, pero el hecho de poder haber detectado en muestras lavadas el perfil de IDGI, denota que sería más sencillo determinar dicho perfil en muestras sin lavar.

Para probar la efectividad de la técnica en un cultivo de frijol en campo, se muestreó tejido de plantas previamente inoculadas con las tres cepas, pero como hubo una helada en la zona del cultivo, el follaje de las plantas se secó, por lo que, al realizar el método de plaqueado de tejido de

hojas en PDA, no se encontró establecimiento positivo o endófito viable en ninguna de las muestras analizadas. A pesar de lo seco del tejido se realizó extracción de ADN a diversas muestras las cuales mostraron un alto nivel de degradación (datos no mostrados) y lo cual pudo haber contribuido a que no se obtuviera ninguna muestra positiva al realizar la prueba de PCR anidado-Bb de Landa *et al.* (2013). Así, al no tener muestras positivas para Bb, no se pudo probar la técnica de PCR anidado-cepas de muestras provenientes de un cultivo en campo.

Seguidamente, aun con las malas condiciones del tejido se lograron, medir y analizar algunas de las variables fisiológicas y de rendimiento en controles absolutos, controles con tensoactivos y tratamientos con las tres cepas. Los resultados mostraron un efecto adverso del tensoactivo utilizado, ya que dichos controles aplicados al suelo muestran por si solos un efecto en la medición del peso de 100 semillas con mediciones de peso significativamente menor ($p < 0.05$) en el control con tensoactivo aplicado al suelo que el control absoluto (Fig. 68); además se observó también dicha significancia en todos los tratamientos con las cepas en comparación con el control absoluto, teniendo un mejor rendimiento en este último (Fig. 68). Así mismo, se observó dicha variable mejor en la BB37, seguida de GHA y BBPTG4; pero dichas diferencias no fueron significativas; sin embargo hay estudios que si reportan diferencias significativas en las variables de crecimiento medidas donde se aplican diferentes cepas de Bb (Jaber 2015; Greenfield *et al.* 2016; Raad *et al.* 2019; Bamisile *et al.* 2020; Barra-Bucarei *et al.* 2020; Volkova *et al.* 2020), así como también donde no se observan diferencias entre las cepas utilizadas (Jaber y Enkerly 2016), como es el actual estudio, pero el cual no es concluyente por el efecto de la helada.

Otra variable también con diferencia significativa ($P < 0.05$), fue la longitud de la guía central observándose plantas más cortas en el control absoluto y plantas más largas en los tratamientos con las cepas, lo cual coincide con el estudio de Volkova *et al.* (2020) donde también observaron plantas de frijol más largas en 3 de 11 cepas de Bb. Sin embargo hay que considerar que una planta más alta (alargada) no siempre corresponde a un efecto de una planta más saludable, ya que la anterior variable (plantas más alargadas en los tratamientos con las cepas que en el control absoluto) podría

también explicarse posiblemente por la baja en clorofila, que, aunque en este estudio no se midió dicha variable, ni tampoco en el de Volkova *et al.* (2020), en otros estudios como el de Greenfiel *et al.* (2016), se hace la asociación de baja en la clorofila en plantas inoculadas con *B. bassiana* en Yuca (*Manihot esculenta*), lo cual podría explicar en el actual estudio 1) las plantas más largas, las cuales tienden a alargarse por falta de luz y/o por baja en clorofila y como resultado se podría reflejar un 2) menor rendimiento, como lo mostrado en el actual estudio. Aunque existe otro estudio donde se remarca el aumento de clorofila en maíz con una de las tres cepas de Bb probadas, se hace la observación también de un crecimiento neutral o negativo en plantas de maíz con las tres cepas (incluida la que hizo que aumentara la clorofila), sugiriendo además en este estudio (por la realización de microarreglos con dos de las cepas), que las respuestas de las interacciones de la planta con el hongo eran moduladas por la planta y quizá en algunas ocasiones podrían ser también dependientes de cada aislado (Mcninnon 2017). Otra posible relación que existe entre la clorofila y los intrones del grupo I en general es que las plantas tienen un único intrón del grupo I en los cloroplastos (Eckardt *et al.* 2007) llamado *tan-UAA* (el cual interrumpe el gen del ARNt de la Leucina) y el cual cuando se muta (y se afecta el splicing de dicho intrón) se crean plantas deficientes de clorofila (Asakura y Barkan 2007). Debido a que se observaron diferencias significativas en la altura de las plantas, proponemos que pudiera ser por la afectación en la clorofila y/o cloroplastos, ya que como los cloroplastos tiene en su genoma también ADNr para la síntesis de algunas proteínas (Harris *et al* 1994) y como se ha demostrado que puede haber inserciones de intrones del grupo I homólogos de diferentes organelos y en organismos distantemente relacionados (Turmel *et al.* 1995), pudiera ser que alguno de los intrones del grupo I de Bb o de sus proteínas para el desempeño de los ribosomas pudiera estar afectado la maquinaria o función de los cloroplastos y/o clorofila en la planta y por eso se estén alargando las plantas en busca de luz.

Por otro lado, diversas variables importantes como de peso fresco y seco, no. de hojas en la guía principal, no. de frijoles en 10 vainas representativas, no se pudieron determinar por qué las plantas estaban muy

maltratadas debido a la helada. Se destaca que múltiples estudios concluyen que *B. bassiana* causa un potenciamiento en el crecimiento, por el hecho de observar plantas más largas (Afandi *et al.* 2019; Volvoka *et al.* 2020), pero una planta larga frecuentemente podría ser también el resultado de un efecto adverso relacionado con la falla en la captación de luz u otros factores de nutrición; además en cultivos donde al final la importancia económica radica no en la vigorosidad de la planta si no el rendimiento del cultivo (como en este caso el frijol), harían falta más enfocar los futuros estudios a probar si realmente el uso de *B. bassiana* ayuda al rendimiento del cultivo como en este caso el frijol var. Pinto Saltillo ya que hay cultivos en los que se ha probado aumentos en el rendimiento de hasta 40 % como es el caso del trigo (Sánchez-Rodríguez *et al.* 2017), por lo que posiblemente juegue un papel muy importante la genética de compatibilidad de las variedades de los cultivos con las diversas cepas de Bb.

9. CONCLUSIONES

Se estableció metodología que ayuda a discernir entre tres cepas de *B. bassiana*: GHA, BBPTG4 y BB37 sin necesidad de secuenciar, cuando son inoculados como endófitos en plantas de frijol var Pinto Saltillo a nivel laboratorio. Dicha técnica está basada en un PCR anidado que amplifica en la primera reacción toda la zona 3'OH del gel 28S del ADNr de Bb estando como endófito, y la segunda reacción son cuatro amplificaciones anidadas que amplifican los sitios de inserción por separado para obtener un patrón. La técnica fue capaz de discernir entre las tres cepas porque tienen perfiles de inserción de intrones diferentes. El acoplamiento de la metodología descrita por Landa y cols (2013) como parte del filtrado de muestras positivas resulto en menor trabajo para la búsqueda de los perfiles de las cepas en las plantas inoculadas. El ADN del endófito en la muestra a analizar debe ser mayor a un 1 pg de ADN por cada 10 ng de ADN de planta para poder ser detectado. Es más sencillo detectar la cepa GHA de muestras sin lavar que en muestras lavadas (lo mismo debe ser para las otras dos cepas, pero no se pudo confirmar por completo). Una desventaja de la técnica es que el ADN de la planta también amplifica los sitios de inserción de intrones.

Se reportó un cambio en el sitio de inserción II en las tres cepas diferente al único reportado, y que las plantas no tienen intrones insertados, pero sí tienen los cuatro sitios de Bb, algunos de estos, siendo similares en las plantas, si permitieran la inserción de algún intrón del grupo I y otros, con diferencias, no permitirían la inserción de dichos intrones.

Se encontró que la mejor manera de aplicar *B. bassiana* en plantas de frijol para lograr el mejor establecimiento, es por el método de aspersión a nivel foliar por el envés de la hoja.

Además, se encontró que los tensoactivos utilizados para inocular tienen efectos adversos sobre la semilla y sobre la planta emergida. Las cepas aquí utilizadas en cultivo de frijol var. Pinto Saltillo a nivel de campo se observan pudieran tener un efecto adverso sobre el rendimiento de este y en diversas variables que no fue posible mediarlas todas por el efecto de helada. Un posible mecanismo de acción adverso del hongo es por medio de la baja

de la clorofila, ya que se reportaron plantas significativamente más largas y con menor rendimiento que el control absoluto, por lo que la medición de dicha variable en futuros trabajos seria de toral importancia para poder hacer una correlación entre la baja de este parámetro y el establecimiento del endófito Bb en frijol.

10. PERSPECTIVAS

Dar seguimiento a cepas en campo es desafiante ya que existen diversas variables que no pueden ser controladas como a nivel laboratorio, sin embargo sigue existiendo la necesidad de contar con técnicas que además de ser practicas sean económicas para poder analizar el mayor número de muestras posibles y de esta manera tener un resultado más confiable y con la menor variabilidad posible; por lo que se buscará afinar los costos de metodología con otras enzimas y material más económico.

Encontrar una posible correlación entre los tipos de intrones del grupo I de los endófitos y la genética de cada planta, podría ayudar a hacer una mejor selección del cultivo, donde *B. bassiana* como endófito sea más compatible y se obtengan además los resultados benéficos de protección de la planta contra insectos plaga.

11. ANEXOS

ANEXO A

Conservación de monospóricos en aceite mineral

Una vez obtenidos los monospóricos se procedió a guardarlos en aceite mineral estéril para su conservación genética a 4 °C. Para lograrlo se tomó cada placa con el crecimiento radial de cada hongo por separado y bajo el mechero se cortó con un bisturí estéril toda al área de la placa en cuadros de aproximadamente 1 cm^2; posteriormente, se tomaron los cuadros con el bisturí y se colocaron en tubos eppendorf de 1.5 mL con 600 µL de aceite mineral estéril, se agregaron alrededor de 3-4 cuadros por tubo dejándolos perfectamente sumergidos en el aceite. Los tubos se etiquetaron y guardaron a 4 °C para su uso posterior. Para extraer los hongos del aceite mineral cuando fuera necesario, se realizó como sigue: se tomó un cuadro de agar con hongo sumergido en aceite mineral, se puso directamente en una placa con agar de PDA y se tomó con el asa la muestra del hongo mezclado con el aceite y se estrió por toda la placa, dejando la placa crecer por varios días en obscuridad a 25°C hasta que se observaron las colonias; se tomó con el asa una muestra de alguna colonia, y se creció en 15 mL de caldo PDB por cinco días a 25 °C. Del cultivo en caldo se tomó una asada, se estrió sobre una placa con PDA y se dejó crecer por siete días en obscuridad a 25 °C, luego se tomó una asada de dicha placa, y se volvió a crecer en 100 mL de PDB por cinco días, para finalmente volver a estriar una placa con el último crecimiento en caldo. Dicha placa se dejó creciendo por siete días a 25 °C y se guardó en el refrigerador, para su posterior uso.

ANEXO B

PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA SECUENCIACIÓN

I. Secuenciación de intrones del grupo I de cada cepa

Se prepararon los doce fragmentos amplificados de las tres cepas para enviar a secuenciar. Para lograrlo, se realizaron las amplificaciones con reacciones de 50 μL (sección 6.4 pero ajustado a 50 μL) y se corrieron y en un gel de agarosa con las condiciones anteriormente descritas. Posteriormente con ayuda de un bisturí se cortaron las bandas del gel a purificar y se guardaron en tubos eppendorf por separado.

II. Purificación de fragmentos de PCR

Para la purificación de fragmentos de PCR cortados de los geles de agarosa se utilizó el kit de PROMEGA A2180, el cual se describe a continuación. Se agregaron 100 μL del *Direct Purification Buffer* del kit a un tubo eppendorf estéril de 1.5 mL y 30-300 μL de la banda del PCR cortada del gel que se quisiera purificar por separado. Se agregó a cada tubo 1 mL de resina del kit y se le dio vortex por 1 min. Se ensambló la jeringa y el filtro y se agregó el contenido de la mezcla de la banda del gel con los reactivos antes mencionados a la jeringa; se filtró el contenido para que la banda de PCR quedara atrapada en él. Se lavó el filtro con 2 mL de isopropanol al 80%, empujando suavemente con la jeringa el contenido del isopropanol para que pasara a través del filtro. Se desensambló la jeringa del filtro y se colocó este último en un tubo eppendorf de 1.5 mL y se centrifugó a 10,000 rpm/2 min para secarlo. Se colocó el filtro en un tubo eppendorf nuevo y estéril de 1.5 mL y se adicionaron 50 μL de agua inyectable estéril (previamente filtrada en un filtro de 0.25 μm) y se dejó reposar por 1 min, para después centrifugarlo por 20 s a 14,000 rpm para recuperar el fragmento de PCR.

III. Ligación de fragmentos de pCR a vector PGEM-T

Una vez purificadas las bandas de PCR, se ligaron a un vector llamado pGEM-T easy Vector (Fig. 3), utilizando la siguiente fórmula para obtener la cantidad de inserto de cada purificación por separado:

$$\frac{\text{ng de vector} \times \text{kb de inserto}}{\text{kb vector}} \times \frac{3}{1} = \text{Cantidad de inserto}$$

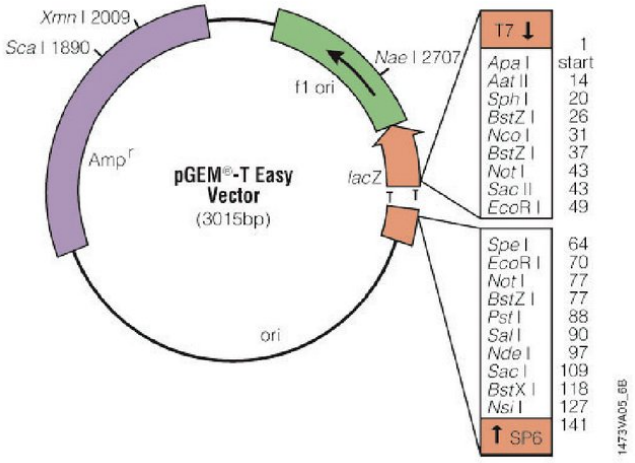


Fig. 5. Vector pGEM-T easy vector con gen resistencia a ampicilina

Una vez calculada la cantidad de inserto para cada fragmento purificado por separado, se procedió a realizar cada una de las reacciones de ligación de los fragmentos anteriormente purificados por medio de la siguiente reacción: 5 µL del Buffer 2x de ligación, 1 µL del vector pGEM-T easy (50 ng), producto de PCR o inserto según la fórmula anterior y 1 µL de T4 ligasa (30 U/µL), aforado a 10 µL con agua del kit de ligación. La ligación se incubó a temperatura ambiente por 15 min.

IV. Preparación de bacterias calcio competentes

Se prepararon bacterias calcio competentes de la cepa Top10 de *E. coli* libres de resistencia a ampicilina. Primero se preparó un pre-inoculo colocando en un tubo eppendorf con 1 mL de medio LB, se inoculó con una asada de la cepa Top10 y se dejó creciendo por 12 h. Pasado el tiempo, se tomó una asada de la bacteria crecida y se estrió en una placa con agar LB, tratando de arrastrar el estriado para separar colonias y se dejó crecer por 24 h. Posteriormente, se picó una colonia aislada y se inoculó en 5 mL de medio LB y se puso a crecer a 2500 rpm/20 h a 37 °C. Del pre-inoculo se tomaron 2 mL y se inocularon a 100 mL del medio LB estéril. Después de

aproximadamente 3.5 h, se checó la densidad óptica del cultivo a 600 nm, para revisar que alcanzara una densidad entre 0.3 y 0.4. Una vez alcanzada la densidad óptica, se pasaron 100 mL de medio a tubos estériles de 50 mL, previamente incubados en hielo para prevenir que el crecimiento continuara. Se dejaron los tubos con las bacterias en el hielo por 10 min y se movieron ocasionalmente. Se centrifugó el contenido de los tubos a 4,000 rpm/10 min a 4 °C y se decantó el sobrenadante con mucho cuidado. Se resuspendieron los pellets de las bacterias en 5 mL de $CaCl_2$ al 0.1 M, se incubaron por 5 min, se centrifugaron a 3,000 rpm/15 min/4 °C y se descartó el sobrenadante. Se volvieron a agregar 5 mL de $CaCl_2$ al 0.1 M, se incubó en hielo por 20 min, se centrifugó a 3,000 rpm/15 min/4 °C, se descartó el sobrenadante y finalmente se agregaron 4 mL de $CaCl_2$ al 0.1 M. Si las bacterias calcio-competentes se usaban el mismo día de la preparación, no se agregaba glicerol, pero si las bacterias se guardaban a -80°C, se les agregaba glicerol para que quedaran a una concentración final del 30%. Es decir, por cada 2 mL de bacterias se agregaron 3 mL de glicerol al 50% y se alicuotaron en tubos de 0.6 mL con cantidades de 100 μL por tubo guardados a -80 °C.

V. Transformación de colonias con vectores ligados

Una vez purificados los fragmentos a secuenciar y ligados cada uno por separado a los vectores pGEM-T easy vector, se procedió a transformar las ligaciones a bacterias calcio-competentes sin resistencia a ampicilina, para obtener clonas que nos ayudaran a producir grandes cantidades del plásmido transformado. Para lograrlo, se tomaron 5 μL de la reacción de ligación (apartado III) y se colocó en un tubo de 1.5 mL incubado en hielo. Se agregaron 100 μL de las bacterias calcio-competentes y se dejó incubar en hielo por 20 min, posteriormente se dio un pequeño golpe en el tubo para que se mezclara el contenido, evitando pipetear ya que las células calcio-competentes son frágiles. Después se dio un choque térmico en un baño de agua a 42 °C/45-50s, y se pusieron los tubos en hielo por 2 min. Finalmente, se agregó al tubo 1 mL de LB sin ampicilina y se incubaron las células a 37 °C/1 h/150 rpm de agitación en un termomixer, para posteriormente pasar a

plaquear la transformación en placas con LB mezcladas con el antibiótico Ampicilina/IPTG/X-GAL.

VI. Placas LB con ampicilina/IPTG/X-Gal

Una vez que se transformaron las bacterias calcio-competentes con las ligaciones, se sembraron por expansión con asa de vidrio, agregando de 100-200 μL de la transformación en placas de LB con ampicilina/IPTG/X-GAL, para buscar colonias positivas para transformación (de color blanco) de las negativas (de color azul) con ayuda de los reactivos de IPTG y X-GAL en el agar LB. Se preparó IPTG 0.1 M (inhibidor del operón Lac-Z) agregando 1.2 g del reactivo a 50 mL de agua destilada y se guardó a -20 °C. Se preparó el reactivo X-GAL (sustrato para la enzima β-galactosidasa con color azul) a una concentración de 50 mg/mL, agregando 100 mg en 2 mL de *N*,*N*'-dimetil-formamida la cual al prepararse se cubrió con aluminio y se guardó a -20 °C. Para la preparación de las placas de LB con los reactivos de IPTG y X-GAL, primero se esterilizó el medio de cultivo LB en un matraz de 250 mL, antes de que gelificara el medio, se le agregó el antibiótico de ampicilina a una concentración de 100 μg/mL y se vertió el medio a las placas Petri estériles. El día que se utilizaron las placas se adicionaron 100 μL de IPTG y se extendió con asa de vidrio, al igual que 20 μL de X-GAL, el cual también se extendió con asa de vidrio, esto para permitir que las bacterias crecidas con el inserto mostraran un color blanco y las negativas sin el inserto un color azul.

VII. Búsqueda de clonas con inserto y secuenciación

Una vez sembradas las transformaciones en placas con medio LB con ampicilina/IPTG/X-GAL, se procedió a dejarlas crecer por 24-48 h para posteriormente buscar colonias de color blanco (clonas con inserto). Para confirmar que las clonas fueran positivas para el inserto, se tomó una asada de algunas colonias blancas y una clona de la placa del control negativo sin transformar (como control negativo), se depositaron en 1 mL de LB con ampicilina por duplicado y se pusieron a crecer por 24 h en agitación a 2500 rpm. Posteriormente se hizo la búsqueda del inserto en uno de los duplicados

de cada clona, utilizando la solución *Dye* (6% de sucrosa/1% de azul de bromofenol). Para lograrlo, pasadas las 24 h de crecimiento, se centrifugó uno de los duplicados a 5000 rpm/5 min, se descartó el sobrenadante, se agregaron 20 μL de solución *Dye* al pellet de bacterias y se le dio un vortex por 1 min para que se liberara el plásmido; posteriormente se centrifugaron los tubos a 14,000 rpm/5 min y se cargó 10 μL del sobrenadante centrifugado en un gel de agarosa al 1%. El gel se y corrió y tiño con la condición antes mencionada (ver apartado 15.4) y para seleccionar las clonas con el inserto, se escogieron las clonas que se observaran más pesadas en el gel que el control negativo sin transformar.

Una vez seleccionadas las clonas positivas para cada inserto, se procedió a crecerlas por separado en 15 mL de LB con ampicilina (100 μg/mL) por 24 h, y se realizó la extracción de ADN por medio del Kit A1270 de PROMEGA, según como indica el proveedor. Para la obtención de las secuencias, las purificaciones de los plásmidos con los fragmentos de PCR a secuenciar se enviaron Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, Morelos, MX.

12. BIBLIOGRAFÍA

Afandhi A, Widjayanti T, Emi AAL, Tarno H, Afiyanti M, Handoko RNS. 2019. Endophytic fungi *Beauveria bassiana* Balsamo accelerates growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Chemical and Biological Technologies in Agriculture, 6(1),11.

Akello J, Dubois T, Coyne D, Kyamanywa S. 2008. Endophytic *Beauveria bassiana* in banana (*Musa* spp.) reduces banana weevil (*Cosmopolites sordidus*) fitness and damage. Crop Protection, 27,1437-1441.

Allegrucci N, Velazquez MS, Russo ML, Vianna MF, Abarca C, Scorsetti AC. 2020. Establishment of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* as an endophyte in *Capsicum annuum* and its effects on the aphid pest *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae). Revista de Biología Tropical, 68(4),1084-1094.

Arechavaleta M, Bacon CW, Hoveland CS, Radcliffe DE. 1989. Effect of the tall fescue endophyte on plant response to environmental stress. Agronomy Journal, 81,83–90.

Arnold AE, Engelbrecht BM. 2007. Fungal endophytes double minimum leaf conductance in seedlings of a tropical tree. Journal of Tropical Ecology, 23,369–372.

Arnold AE, Lutzoni F. 2007. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? Ecology, 88,541–549.

Asakura Y, & Barkan A. (2007). A CRM domain protein functions dually in group I and group II intron splicing in land plant chloroplasts. The Plant cell, 19(12), 3864–3875.

Bamisile BS, Akutse KS, Siddiqui JA, Xu Y. 2021. Model application of entomopathogenic fungi as alternatives to chemical pesticides: prospects, challenges, and insights for next-generation sustainable agriculture. Frontiers in Plant Science 12, 741804.

Bamisile BS, Dash CK, Akutse KS, Keppanan R, Wang L. 2018. Fungal endophytes: beyond herbivore management. Frontiers in Microbiology, 9,544.

Bamisile BS, Dash CK, Akutse KS, Qasim M, Ramos Aguila LC, Wang F, Keppanan R, Wang L. 2019. Endophytic *Beauveria bassiana* in foliar-treated *Citrus limon* plants acting as a growth suppressor to three successive generations of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae). Insects, 10(6),176.

Bamisile BS, Senyo Akutse K, Dash CK, Qasim M, Ramos Aguila LC, Ashraf HJ, Huang W, Hussain M, Chen S, & Wang L. 2020. Effects of seedling age on colonization patterns of *Citrus limon* plants by endophytic *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* and their influence on seedlings growth. Journal of Fungi, 6,29.

Baron NC, Rigobelo EC. 2022. Endophytic fungi: a tool for plant growth promotion and sustainable agriculture, Mycology, 13(1),39-55.

Barra-Bucarei L, González MG, Iglesias AF, Aguayo GS, Peñalosa MG, Vera PV. 2020. *Beauveria bassiana* multifunction as an endophyte: growth promotion and biologic control of *Trialeurodes vaporariorum*, (Westwood) (Hemiptera: Aleyrodidae) in tomato. Insects, 11(9),591.

Biswas C, Dey P, Satpathy S, Satya P. 2012. Establishment of the fungal

entomopathogen *Beauveria bassiana* as a season long endophyte in jute *Corchorus olitorius* and its rapid detection using SCAR marker. BioControl, 57(4),565-57.

Bonfante P, Anca IA. 2009. Plants, Mycorrhizal Fungi, and Bacteria: A Network of Interactions, Annual Review of Microbiology, 63, 363–383.

Carroll G. 1988. Fungal endophytes in stems and leaves – from latent pathogen to mutualistic symbiont. Ecology, 69,2–9.

Castillo-López] D, Zhu-Salzman K, Ek-Ramos MJ, Sword GA. 2014. The entomopathogenic fungal endophytes *Purpureocillium lilacinum* (formerly *Paecilomyces lilacinus*) and *Beauveria bassiana* negatively affect cotton aphid reproduction under both greenhouse and field conditions. PloS one, 9(8),e103891.

Castrillo LA, Brooks WM.1998. Differentiation of *Beauveria bassiana* isolates from the darkling beetle, *Alphitobius diaperinus*, using isozyme and RAPD analyses. Journal of Invertebrate Pathology, 72(3),190-6.

Castrillo LA, Vandenberg JD, Wraight SP. 2003. Strain-specific detection of introduced *Beauveria bassiana* in agricultural fields by use of sequence-characterized amplified region markers. Journal of Invertebrate Pathology, 82(2),75–83.

Chang J, Wu S, Liu Y, Yang Y, Tsai Y. 2021. Construction and selection of an entomopathogenic fungal library from soil samples for controlling *Spodoptera litura*. Frontiers in Sustainable Food Systems, 5,1-14.

Cho, Y. et al. 1998.Explosive invasion of plant mitochondria by a group I intron. Proceedings of the National Academy of Sciences, 95(24),14244–14249.

Cho Y, Qiu Y-L, Kuhlman P, Palmer JD. 1998. Explosive invasion of plant mitochondria by a group I intron. Proceedings of the National Academy of Sciences, 95(24),14244-14249.

Clay K, Schardl CL. 2002. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. The American Naturalist, 160,S99–S127.

Clay K. 1988. Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. Ecology, 69(1),10–16.

Chandra KD, Bamisope SB, Ravindran K, Muhammad Q, Yongwen L, Saif UI, Mubasher H, Liande W. 2018. Endophytic entomopathogenic fungi enhance the growth of *Phaseolus vulgaris* L. (Fabaceae) and negatively affect the development and reproduction of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). Microbial Pathogenesis, 125,385-392.

De Bary A. 1866. Morphologie und Physiologie der Pilze, Flechten und Myxomyceten Vol. 2. Leipzig: Hofmeister's Handbook of Physiological Botany.

De Faria MR and Wraight SP. 2007.Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. Biol Control, 43:237-256.

De Longevialle AF, Small ID, Lurin C. 2010. Nuclearly encoded splicing factors implicated in RNA splicing in higher plant organelles, Molecular Plant, 3(4),691–705.

De Mandal S, Sonali Singh S, Hussain K, Hussain T. 2021. Plant–microbe association for mutual benefits for plant growth and soil health. In: Yadav

AN, Singh J, Singh C, Yadav N. (eds), Current Trends in Microbial Biotechnology for Sustainable Agriculture. Springer, Singapore.

DePriest PT. 1993. Small subunit rDNA variation in a population of lichen fungi due to optional group-I introns. Gene, 134,67-74

Dhar S, Jindal V, Jariyal M, Gupta VK. 2019. Molecular characterization of new isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and their efficacy against the tobacco caterpillar, *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae). Egypt Journal of Biolgy Pest Control, 29(1),8.

Dudeja SS, Giri R, Saini R, Suneja-Madan P, and Kothe E. 2012. Interaction of endophytic microbes with legumes. Journal of Basic Microbiology, 52,248–260.

Dujon B.1989. Group-I introns as mobile genetic elements: facts and mechanistic speculations - a review. Gene, 82,91-114.

Cyril D, Enjalbert J, Fournier E, Delmotte F, Barres B, Carlier J, Tharreau D, and Giraud T. 2007. Challenges of microsatellite isolation in fungi. Fungal Genetics and Biology, 44,933–49.

Eckardt N. A. (2007). Chloroplast Intron Splicing Mechanisms. The Plant Cell, 19(12),3838.

Ek-Ramos MJ, Zhou W, Valencia CU, Antwi JB, Kalns LL, Morgan GD, Kerns DL. Sword GA. 2013. Spatial and temporal variation in fungal endophyte communities isolated from cultivated cotton (*Gossypium hirsutum*). Plos One, 8(6),e66049.

Ek-Ramos M J, Gomez-Flores R, Orozco-Flores AA, Rodríguez-Padilla C, González-Ochoa G, Tamez-Guerra P. 2019. Bioactive products from plant-endophytic Gram positive bacteria. Frontiers in Microbiology, 10,463.

Estrada ME, Camacho MV, Benito C. 2017. The molecular diversity of different isolates of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. as assessed using intermicrosatellites (ISSRs). Cellular and Molecular Biology Letters, 12(2),240-52.

Ferus P, Barta M, Konôpková J. 2019.Endophytic fungus *Beauveria bassiana* can enhance drought tolerance in red oak seedlings. Trees, 33, 1179–1186.

Furuie JL, Stuart AKDC, Voidaleski MF, Zawadneak MAC, Pimentel IC. 2022. Isolation of *Beauveria* strains and their potential as control agents for *Lema bilineata* Germar (Coleoptera: Chrysomelidae). Insects, 13(1),93.

Garrido-Jurado I, Landa BB, Quesada-Moraga E. 2016. Detection and quantification of the entomopathogenic fungal endophyte *Beauveria bassiana* in plants by nested and quantitative PCR. Methods in Molecular Biology, 1477,161-6.

Greenfield M, Gómez-Jiménez MI, Ortiz V, Vega FE, Kramer M, Parsa S. 2016. *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* endophytically colonize cassava roots following soil drench inoculation. Biological Control, 95,40-48.

Guesmi-Jouini J, Garrido-Jurado I, López-Díaz C, Halima-Kame BM, Quesada-Moraga E. 2014. Establishment of fungal entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Bionectria ochroleuca* (Ascomycota: Hypocreales) as endophytes on artichoke *Cynara scolymus*. Journal of Invertebrate Pathology, 119,1–4.

Gurulingappa P, Sword GA, Murdoch G, McGee PA. 2010. Colonization of crop plants by fungal entomopathogens and their effects on two insect pests when in planta. Biological Control, 55,34-41.

Hajek AE, Leger RJ St. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect host. Annual Review of Entomology, 39,293-322.

Harris EH, Boynton JE, Gillham NW. (1994). Chloroplast ribosomes and protein synthesis. Microbiological Reviews, 58(4),700–754.

Jaber L. R. (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(6), 1525–1535.

Jaber LR, Enkerli J. 2016. Effect of seed treatment duration on growth and colonization of *Vicia faba* by endophytic *Beauveria bassiana* and *Metarhizium brunneum*. Biological Control, 103,187–195.

Jaber LR. 2015. Grapevine leaf tissue colonization by the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* s.l. and its effect against downy mildew. BioControl, 60,103–112.

Saikkonen K, Faeth SH, Helander M, Sullivan TJ. 1998. Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. Annual Review of Ecology and Systematics, 29(1),319-343.

Kambrekar DN, Aruna J. 2018. Isolation of *Beauveria bassiana* from different host plants and its pathogenicity against sorghum stem borer, *Chilo partellus swinhoe*. Journal Entomology and Zoology Studies, 6,577-581.

Kasambala DT, Meadow R, Meyling NV, Klingen I. 2021. Natural occurrence of entomopathogenic fungi as endophytes of sugarcane (*Saccharum officinarum*) and in soil of sugarcane Fields. Insects, 12(2),160.

Kim JJ, Jeong G, Han JH, Lee S. 2013. Biological control of aphid using fungal culture and culture filtrates of *Beauveria bassiana*. Mycobiology, 41(4),221–224.

Kuhsel MG, Strickland R, Palmer JD. 1990. An ancient group I Intron shared by eubacteria and chloroplasts, Science. American Association for the Advancement of Science, 250(4987),1570–1573.

Kuldau G, Bacon C. 2008. Clavicipitaceous endophytes: Their ability to enhance grass resistance to multiple stresses. Biological Control 46,57-71.

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, 36,47.

Landa BB, López-Díaz C, Jiménez-Fernández C, Montes-Borrego M, Muñoz-Ledesma FJ, Ortiz-Urquiza A, Quesada-Moraga E. 2013. In-planta detection and monitorization of endophytic colonization by a *Beauveria bassiana* strain using a new-developed nested and quantitative PCR-based assay and confocal laser scanning microscopy. Journal of Invertebrate Pathology, 114,128–138.

Jaber LR, Nida MS. 2014. Endophytic colonisation of squash by the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) for managing Zucchini yellow mosaic virus in cucurbits. Biocontrol Science and Technology, 24(10),1096-1109.

Lee SJ, Kim S, Kim JC, Lee MR, Hossain MS, Shin TS, Kim TH. 2017. Entomopathogenic *Beauveria bassiana* granules to control soil-

dwelling stage of western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae). BioControl, 62,639–648.
Lefort M, McKinnon AC, Nelson TL, Glare TR. 2016. Natural occurrence of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* as a vertically transmitted endophyte of *Pinus radiata* and its effect on above- and below-ground insect pests. New Zealand Plant Protection, 69,68-77.
Lopez D, Sword G. 2015. The endophytic fungal entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Purpureocillium lilacinum* enhance the growth of cultivated cotton (*Gossypium hirsutum*) and negatively affect survival of the cotton bollworm (*Helicoverpa zea*). Biological Control, 89,53-60.
Malinowski DP, Belesky DP. 2000. Adaptations of endophtye-infected cool-season grasses to environmental stresses: mechanisms of drought and mineral stress tolerance. Crop Science, 40,923–940.
Mantzoukas S, Lagogiannis I, Mpousia D, Ntoukas A, Karmakolia K, Eliopoulos PA, Poulas K. 2021. *Beauveria bassiana* endophytic strain as plant growth promoter: The case of the grape vine *Vitis vinifera*. Journal of Fungi. 7(2),142.
Martínez-Arias C, Sobrino-Plata J, Gil L, Rodríguez-Calcerrada J, Martín JA. 2021. Priming of plant defenses against *Ophiostoma novoulmi* by elm (*Ulmus minor* Mill.) fungal endophytes. Journal of Fungi, 7(9),687.
McKinnon, A. 2017. Interactions between isolates of the fungus *Beauveria bassiana* and *Zea mays* (Thesis submitted in partial fulfilment of the requirements for the Degree of Doctor of Philosophy). Lincoln University.
McKinnon AC, Glare TR, Ridgway HJ, Mendoza-Mendoza A, Holyoake A, Godsoe WK, Bufford JL. 2018. Detection of the Entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the rhizosphere of wound-stressed *Zea mays* plants. Frontiers in Microbiology, 9,1161.
Greenfield M, Pareja R, Ortiz V, Gómez-Jiménez MI, Vega FE, Parsa S. 2015. A novel method to scale up fungal endophyte isolations. Biocontrol Science and Technology, 25(10),1208-1212.
Mitina GV, Tokarev YS, Movila AA, Yli-Mattila T. 2011. Polymorphism of *Beauveria bassiana* (Deuteromycota: Hyphomycetes) strains isolated from *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in Moldova. Ticks and Tick-borne Diseases, 2(1),50–54.
Moloinyane S, Nchu F. 2019. The Effects of Endophytic *Beauveria bassiana* inoculation on infestation level of *Planococcus ficus*, growth and volatile constituents of potted greenhouse grapevine (*Vitis vinifera* L.). Toxins, 11(2),72.
Nair DN, Padmavathy S. 2014. Impact of endophytic microorganisms on plants, environment and humans. The Scientific World Journal, 250693.
Neuvéglise C, Brygoo Y, Riba G. 1997. 28s rDNA group-I introns: a powerful tool for identifying strains of *Beauveria brongniartii*. Molecular Ecology, 6(4),373-381.
Newton AC, Fitt BD, Atkins SD, Walters DR, Daniell TJ. 2010. Pathogenesis, parasitism and mutualism in the trophic space of microbe-plant interactions. Trends in Microbiology, 18(8),365-373.
Occhipinti A. 2013. Plant coevolution: evidences and new challenges. J. Plant Interact. 8, 188–196.
Ownley BH, Griffin MR, Klingeman WE, Gwinn KD, Moulton JK, Pereira RM. 2008. *Beauveria bassiana*: endophytic colonization and plant disease

control. Journal of Invertebrate Pathology, 98(3),267–270.
Parsa S, Ortiz V, Vega FE. 2013. Establishing fungal entomopathogens as endophytes: towards endophytic biological control. Journal of Visualized Experiments, 74,2–5.
Perotto S, Nepote-Fus P, Saletta L, Bandi C, Young JPW. 2000. A diverse population of introns in the nuclear ribosomal genes of *Ericoid* mycorrhizal fungi includes elements with sequence similarity to endonuclease-coding genes. Molecular Biology and Evolution, 17, 44–59.
Petrini O. 1991. Fungal endophytes of tree leaves. In: Microbial Ecology of Leaves, Andrew JH, Hirano SS. (eds) Brock/Springer Series in Contemporary Bioscience. Springer, New York, NY. 176.
Porras-Alfaro A, Bayman P. 2011. Hidden Fungi, Emergent Properties: Endophytes and Microbiomes. Annual Review of Phytopathology, 49,291–315.
Posada F, Aime MC, Peterson SW, Rehner SA, Vega FE. 2007. Inoculation of coffee plants with the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). Mycology Research, 111(6),748-57.
Posada FJ, Chaves FC, Gianfagna TJ, Pava-Ripoll M, Hebbar P. 2010. Establishment of the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* as an endophyte in cocoa pods (*Theobroma cacao* L.). Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica, 13(2),71-78.
Poveda J, Abrril-Urias P, Escobar C. 2020. Biological control of plant-parasitic nematodes by filamentous fungi inducers of resistance: *Trichoderma*, mycorrhizal and endophytic fungi. Frontiers in Microbiology, 11,14.
Quesada-Moraga E, Landa BB, Muñoz-Ledesma J, Jiménez-Diáz RM, Santiago-Alvarez. C. 2006. Endophytic colonisation of opium poppy, Papaver somniferum, by an entomopathogenic *Beauveria bassiana* strain. Mycopathologia, 161(5),323–329.
Jaber LR. (2015). Grapevine leaf tissue colonization by the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* s.l. and its effect against downy mildew. BioControl, 60,103-112
Raad M, Glare TR, Brochero HL, Müller C, Rostás M. 2019. Transcriptional reprogramming of *Arabidopsis thaliana* defence pathways by the entomopathogen *Beauveria bassiana* correlates with resistance against a fungal pathogen but not against insects. Frontiers in Microbiology, 10.
Rajab L, Ahmad M, Gazal I. 2020. Endophytic establishment of the fungal entomopathogen, *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuil., in cucumber plants. Egypt Journal of Biology Pest Control, 30,143.
Ramakuwela T, Hatting J, Bock C, Vega FE, Wells L, Mbata GN, Shapiro-Ilan D. 2020. Establishment of *Beauveria bassiana* as a fungal endophyte in pecan (*Carya illinoinensis*) seedlings and its virulence against pecan insect pests. Biological Control, 140,104102.
Rath AC. 2000. The use of entomopathogenic fungi for control of termites, Biocontrol Science and Technology, 10(5),563-581.
Reay S, Brownbridge M, Cummings N, Nelson TL, Souffre B, Lignon C, Glare T. 2008. Isolation and characterization of *Beauveria* spp. associated with exotic bark beetles in New Zealand *Pinusradiata* plantation forests. Biological Control, 46,484-494.
Rehner S, Buckley E. 2003. Isolation and characterization of microsatellite loci from the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Ascomycota:

Hypocreales). Molecular Ecology Notes, 3,409-411.
Reinek A, Bischoff-Schaefer M, Rondot Y, Galidevara S, Hirsch J, Devi KU. 2014. Microsatellite markers to monitor a commercialized isolate of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in different environments: Technical validation and first applications, Biological Control, 70,1–8.
Rodríguez RJ, Henson J, Van Volkenburgh E, Hoy M, Wright L, Beckwith F, Kim Y, Redman RS. 2008. Stress tolerance in plants via habitat-adapted symbiosis. International Society of Microbial Ecology, 2,404–416.
Rodriguez RJ, White JF Jr, Arnold AE and Redman RS. 2009. Fungal endophytes: diversity and functional roles. New Phytologist, 182,314-330.
Russo ML, Scorsetti AC, Vianna MF, Cabello M, Ferreri N, Pelizza S. 2019. Endophytic effects of *Beauveria bassiana* on corn (*Zea mays*) and its herbivore, *Rachiplusia nu* (Lepidoptera: Noctuidae). Insects, 10(4),110.
Reay SD, Brownbridge M, Gicquel B, Cummings NJ, Nelson TL, Isolation and characterization of endophytic *Beauveria* spp. (Ascomycota: Hypocreales) from *Pinus radiata* in New Zealand forests. Biological Control, 54(I),52-60.
Saikkonen K, Ion D, Gyllenberg M. 2002. The persistence of vertically transmitted fungi in grass metapopulations. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 269,1397–1403.
Saikkonen K, Faeth SH, Helander M, Sullivan TJ. 1998. Fungal endophytes: A continuum of interactions with host plants. Annual Review of Ecology and Systematics, 29(1),319–43.
Saldanha R, Mohr G, Belfort M, Lambowitz AM. 1993. Group I and group II introns, The FASEB Journal, 7(1),15–24.
Sánchez-Rodríguez AR, Raya-Díaz S, Zamarreño AM, García-Mina JM, del Campillo MC, Quesada-Moraga E. 2018. An endophytic *Beauveria Bassiana* strain increases spike production in bread and durum wheat plants and effectively controls cotton leafworm (*Spodoptera littoralis*) larvae. Biological Control, 116,90–102
Sánchez-Rodríguez AR, Del Campillo MC, Quesada-Moraga E. 2015. *Beauveria bassiana:* An entomopathogenic fungus alleviates Fe chlorosis symptoms in plants grown on calcareous substrates. Scientia Horticulturae, 197,193-202.
Sani I, Ismail SI, Abdullah S, Jalinas J, Jamian S, Saad N. 2020. A review of the biology and control of whitefly, *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae), with special reference to biological control using entomopathogenic fungi. Insects 11(9),619.
Schardl CL, Young CA, Hesse U, Amyotte SG, Andreeva K, Calie PJ. 2013. Plant-symbiotic fungi as chemical engineers: multi-genome analysis of the Clavicipitaceae reveals dynamics of alkaloid loci. PLoS Genetics,9(2).
Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spoug, JL, Levesque CA, Chen W, Bolchacova E, Voigt K, Crous PW. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. Proceedings of the National Academy of Science, 109,6241–6246
Schulz B, Guske S, Dammann U, Boyle C. 1998. Endophyte-host interactions. II. Defining symbiosis of the endophyte-host interaction. Symbiosis, 25, 213–227.
Schulz B, Rommert AK, Dammann U, Aust HJ, Strack D. 1999. The endophyte-host interaction: a balanced antagonism? Mycological

Research, 10,1275–1283.
Shaalan RS, Gerges E, Habib W, Ibrahim L. 2021. Endophytic colonization by *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* induces growth promotion effect and increases the resistance of cucumber plants against *Aphis gossypii*. Journal of Plant Protection Research, 61,358-370.
Sn B, Ghosh SK, Thippaiah M, Rajgopal NN. 2018. Survey on natural occurrence of endophytes in maize (Zea mays L.) Ecosystem. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 7, 2526-2533.
Stone JK, Polishook JD, White JR. 2004. Endophytic fungi. In: Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods, Mueller G, Bills GF, Foster MS, (eds). Burlington, MA, USA: Elsevier Academic Press, pp 241–270.
Sun X, Guo LD. 2012. Endophytic fungal diversity: review of traditional and molecular techniques. Mycology, 3: 65-76.
Takatsuka, J. 2007. Characterization of *Beauveria bassiana* isolates from Japan using inter-simple-sequence-repeat-anchored polymerase chain reaction (ISSR-PCR) amplification. Applied Entomology and Zoology, 42, 563-571.
Thurkathipana N, Mikunthan G. 2008. Eco-friendly management of hadda beetle using *Beauveria bassiana* in Brinjal. Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences, 73(3), 597–602.
Urtz B, Rice WC. 2000. Purification and characterization of a novel extracellular protease from *Beauveria bassiana*. Mycological Research, 104,180-186.
Valadez-Lira JA, Hernández-Ruiz ED, López Torres MO, Orozco-Flores A, Garza-González R, Ibarra-Alemán F, Tamayo-Mejía F, Rodríguez-Padilla C, Tamez Guerra P. 2014. Distribution analysis of the large rDNA subunit group I intron in *Beauveria bassiana.* In: Biotechnology Summit, Universidad del Mar, Campus Huatulco Mexico, October 8-10.
Valderrama-F AM, Cristancho-A MA, Cháves-C B. 2000. Analysis of genetic variability of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* by RAPO markers. Revista Colombiana de Entomología, 26(1),25–29.
Van Dam NM. 2009. How plants cope with biotic interactions. Plant Biology, 11(1),1-5.
Vega FE. 2018. The use of fungal entomopathogens as endophytes in biological control: a review. Mycologia, 110(1),4–30.
Vega FE. 2008. Insect pathology and fungal endophytes. Journal of Invertebrate Pathology, 98,277–279.
Volkova N, Levchenko M, Uspanov A, Lednev G. 2020. Screening of fungal strains of the genus *Beauveria* for their ability to form endophytic relations with *Phaseolus* plants. BIO web of conferences, 18,00029.
Wagner BL, Lewis LC. 2000. Colonization of corn, *Zea mays*, by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Applied and Environmental Microbiology, 66(8),3468–3473.
Wang S, Miao X, Zhao W, Huang B, Fan M, Li Z, Huang Y. 2005. Genetic diversity and population structure among strains of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, as revealed by inter-simple sequence repeats (ISSR). Mycology Research, 109(Pt 12),1364-1372.
Wang C, Li Z, Typas MA, Butt TM. 2003. Nuclear large subunit rDNA group I intron distribution in a population of *Beauveria bassiana* strains: phylogenetic implications, 107,1189–1200.

Wang C, Fan M, Li Z, Butt TM. 2004. Molecular monitoring and evaluation of the application of the insect-pathogenic fungus *Beauveria bassiana* in southeast China. Journal of Applied Microbiology, 96(4),861–870.

Wei Q, Liu Y. 2021. Method for observing *Beauveria bassiana* colonization in plants, MethodsX, 8,101364.

Wilson D. 1995. Endophyte: the evolution of a term, and clarification of its use and definition. Oikos 73, 274–276.

Woodson SA. 2005. Structure and assembly of group I introns. Current opinion in. Structure Biology, 15, 324–30.

Zabalgogeazcoa I. 2008. Review fungal endophytes and their interaction with plant pathogens, 6,138–146.

Zhang M, Yan J, Reitz S, Wu S, Gao Y. 2021. *Beauveria bassiana* as fungal endophyte for the potential control of the potato tuber moth *Phthorimaea operculella* on potatoes. Research square, DOI: https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-726671/v1