



**Casa abierta al tiempo**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

**UNIDAD IZTAPALAPA**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**POSGRADO DE BIOTECNOLOGÍA**

**Condiciones para establecer la relación *Phaseolus vulgaris* - hongo entomopatógeno y su respuesta a estrés inducido por PEG**

**TESIS**

Para obtener el grado de maestría en biotecnología

**P R E S E N T A**

**Emmanuel Agustín Reynoso López**

**DIRECTOR: Dr. Octavio Loera Corral**

**ASESORAS: Dra. Tania Volke Sepúlveda**

**Dra. Claudia Barbosa Martínez**

**CDMX, AGOSTO 2017**



“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001465”

CDMX a 29 de agosto de 2017

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

**Condiciones para establecer la relación *Phaseolus vulgaris* - hongo entomopatógeno y su respuesta a estrés inducido por PEG**

Que presentó:

Emmanuel Agustín Reynoso López

**Comité tutorial:**

Director: Dr. Octavio Loera Corral

Universidad Autónoma Metropolitana

Asesora: Dra. Tania Lorena Volke Sepúlveda

Universidad Autónoma Metropolitana

Asesora: Dra. Claudia Barbosa Martínez

Universidad Autónoma Metropolitana

**Jurado:**

Presidente

Secretaria



Dra. Tania Lorena Volke Sepúlveda



Dra. Claudia Barbosa Martínez

Vocal



Dra. María Flores Cruz

Vocal



Dr. Facundo Rafael Muñiz Paredes

## AGRADECIMIENTOS

- A mis padres, por brindarme su apoyo en todo momento, y por ser mi primer contacto con la botánica, cada concejo y anécdota que ellos me cuentan, tienen un lugar muy apreciado en mi corazón y mente.
- A mis hermanos, por locos y por tener siempre un punto de vista diferente al mío.
- A la Universidad Autónoma Metropolitana por hacerme sentir como en casa.
- A mi director de tesis: Dr. Octavio Loera Corral. Muchas gracias Octavio por brindarme tu apoyo en cada momento que fuese necesario.
- A mis asesoras: Muchas gracias Dra. Tania Volke Sepúlveda por ser parte fundamental del proyecto, haciendo las observaciones precisas para mejorar este trabajo. Muchas gracias Dra. Claudia Barbosa Martínez por tu tiempo y apoyo, tu experiencia me ha ayudado a desarrollarme de manera personal como académica, desde la licenciatura hasta este momento.
- A la Dra. María Flores Cruz muchas gracias por su amable ayuda, sus observaciones y su punto de vista tan apreciado. Al Dr. Facundo Muñiz Paredes, agradezco su disponibilidad y solidaridad que siempre me brindó.
- A mis compañeros de la UAM, todos tienen un lugar importante en mi ser, tanto por compartir sus conocimientos y experiencia, como siendo grandes amigos pasando momentos muy alegres y gratos.
- Al laboratorio de Microscopía electrónica: Cristina, siempre estaré agradecido por tu enorme apoyo. Estimado Dr. José David Sepúlveda Sánchez, gracias por su profesionalismo y por compartir sus magníficas experiencias tanto laborales como de su fructífera filosofía de vida.
- Gracias a todos por estar ahí, por entrelazar nuestros caminos, ya sea por unos momentos o por largos años, nuestras almas permanecerán conectadas de alguna manera como siempre ha sido. La energía siempre nos moverá, es equilibrio y fuerza.

## Resumen

La producción de *Phaseolus vulgaris* (frijol) a nivel mundial no es suficiente para satisfacer las necesidades de consumo humano, esta situación se agrava por el calentamiento global y por el ataque de diferentes tipos de insectos que afectan la producción agrícola de los cultivos. El uso de cepas de hongos entomopatógenos (HE), es una alternativa viable para disminuir las plagas como parte integral del control biológico. Además, se han reportado que algunos HE son endófitos y confirieren protección a las plantas a diferentes tipos de estrés.

El objetivo de este trabajo fue establecer la interacción *in vitro* de *P. vulgaris* con las cepas de HE *Beauveria bassiana* (Bb) Tac 1.1, *Metarhizium robertsii* (Mr) Xoch 8.1 (provenientes de la CDMX) e *Isaria javanica* (If) CHE-CNRCB 303 (proveniente de Colima). Para ello, la implementación de la técnica para la germinación y cultivo *in vitro* de *P. vulgaris* proveniente de Puebla, fue el primer paso para los experimentos posteriores. Se determinó que el medio Murashige – Skoog (MS) con 5 g/L de sacarosa, mostró los mejores crecimientos de *P. vulgaris*.

Se corroboró la interacción planta – hongo entomopatógeno (P-HE), mediante Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) y con pruebas de endofiticidad. También se obtuvieron resultados cuantitativos de la interacción P-HE con las distintas cepas, utilizando las variables de pesos secos, longitud y número de raíces. Se observó que *Metarhizium robertsii* Xoch 8.1, mostró una mejor interacción con *P. vulgaris*, ya que se observó un aumento en el número de raíces de las plantas. Los otros hongos estudiados mostraron una relación P-HE neutral, lo cual significa que no afectan ni favorecen el crecimiento de la planta. Por ello, se seleccionó a *M. robertsii* Xoch 8.1 para el establecimiento de la asociación P-HE en condiciones de estrés por polietilenglicol (PEG). Los resultados indicaron que hay una mejoría en las plantas tratadas con *M. robertsii*, contrastándolas con las plantas control.

Se realizaron mediciones de cantidad de pigmentos, peróxido de hidrógeno y peroxidasa en la asociación P-HE en condiciones de estrés inducido por PEG. La cantidad de pigmentos (clorofila a, clorofila b y carotenoides), en las hojas de plantas estresadas que estuvieron en contacto con *M. robertsii*, presentaron una mayor cantidad de pigmentos.

Este trabajo muestra que además de la aplicación de los HE para el manejo integral de plagas, se les puede conferir otra utilidad en la agricultura, ya que además del control biológico, podrían ayudar a mitigar ciertos tipos de estrés en los que los cultivos se ven afectados.

## Abstract

The production of *Phaseolus vulgaris* (beans) worldwide is not sufficient to meet the needs of human consumption, this situation is aggravated by global warming and by the attack of different types of insects that affect agricultural production of crops. The use of strains of entomopathogenic fungi (HE) is a viable alternative to reduce pests as an integral part of biological control. In addition, some HE have been reported to be endophytic and to confer resistance to different types of stress.

The objective of this work was to establish the *in vitro* interaction of *P. vulgaris* with HE *Beauveria bassiana* (Bb) Tac 1.1, *Metarhizium robertsii* (Mr) Xoch 8.1 (from CDMX) and *Isaria javanica* (If) CHE-CNRCB 303 (from Colima). To this end, the implementation of the technique for *in vitro* germination and cultivation of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) from Puebla was the first step for subsequent experiments. It was determined that the Murashige – Skoog (MS) medium with 5 g/L sucrose, showed the best growths of *P. vulgaris*.

The plant – entomopathogenic fungus interaction (P-HE), was corroborated by Scanning Electron Microscopy (SEM) and endophytic tests. Quantitative results of the P-HE interaction with the different strains were also obtained using the variables of dry weights, length and number of roots. It was observed that *Metarhizium robertsii* Xoch 8.1, showed a better interaction with *P. vulgaris*, since an increase in the number of roots of the plants was observed. The other fungi studied showed a neutral P-HE ratio, which means that they do not affect or favor the growth of the plant. Therefore, *M. robertsii* Xoch 8.1 was selected for the establishment of the P-HE association under conditions of stress by polyethylene glycol (PEG). The results indicated that there is an improvement in the plants treated with *M. robertsii*, contrasting them with the control plants.

Quantities of pigment, hydrogen peroxide and peroxidase were measured in the P-HE association under conditions of stress induced by PEG. The amount of pigments (chlorophyll a, chlorophyll b and carotenoids) in the leaves of stressed plants that were in contact with *M. robertsii* presented a greater amount of pigments.

This work shows that in addition to the application of HE for the integral management of pests, they can be given another utility in agriculture, since in addition to the biological control, they could help to mitigate certain types of stress in which the crops are seen affected.

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>9</b>
1.1 CDMX, características socio-geográficas, climatológicas y agrícolas.....	9
1.2 Características e importancia de <i>Phaseolus vulgaris</i> .....	12
1.3 Uso de polietilenglicol para inducir estrés en las plantas.....	13
1.4 Interacciones planta - microorganismos en la rizósfera.....	15
1.5 Origen evolutivo de los hongos entomopatógenos.....	16
1.6 La importancia de los hongos entomopatógenos en el manejo integral de plagas.....	17
1.7 Hongos endófitos y entomopatógenos.....	18
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>20</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>22</b>
<b>4. HIPÓTESIS.....</b>	<b>22</b>
<b>5. OBJETIVOS.....</b>	<b>22</b>
5.1 Objetivo general.....	22
5.2 Objetivos específicos.....	22
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
6.1 Estrategia experimental.....	23
6.2 Cultivo del inóculo y conservación de la cepa.....	24
6.3 Tratamiento y germinación de semillas de <i>P. vulgaris</i> en condiciones <i>in vitro</i> .....	24
6.4 Tratamiento y germinación de semillas de <i>P. vulgaris</i> en condiciones de huerto urbano.....	25
6.5 Pruebas para establecer la relación P-HE.....	26
6.6 Preparación de muestras para microscopía electrónica de barrido (MEB).....	28
6.7 Pruebas para establecer la relación P-HE en condiciones de estrés inducido por PEG.....	29
6.8 Procedimiento para la extracción de pigmentos.....	30
6.9 Obtención de extractos crudos (EC).....	31
6.10 Peróxido de hidrógeno H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	31
6.11 Peroxidasa total (G-POX).....	31
6.12 Análisis estadístico.....	32
<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>33</b>
7.1 Resultados de la implementación de la técnica de germinación y crecimiento de <i>P. vulgaris</i> .....	33

7.2 Resultados de la germinación de <i>P. vulgaris</i> .....	36
7.3 Resultados preliminares de crecimiento de <i>P. vulgaris</i> en condiciones de huerto urbano.....	37
7.4 Resultados de crecimiento con 14 días de interacción P-HE.....	38
7.5 Resultados de crecimiento con 3 meses de interacción <i>P. vulgaris</i> - <i>M. robertsii</i> .....	40
7.6 Resultados de la prueba de endofiticidad con 14 días de interacción P-HE.....	41
7.7 Resultados de la prueba de endofiticidad con 30 días de interacción P-HE.....	45
7.8 Resultados de la prueba de endofiticidad para plantas con 3 meses de interacción P-HE.....	48
7.9 Resultados de las observaciones por microscopía electrónica de barrido (MEB).....	49
7.10 Resultados de crecimiento de la interacción P-HE en condiciones de estrés por PEG.....	52
7.11 Resultados de la extracción de pigmentos de <i>P. vulgaris</i> en interacción con <i>M. robertsii</i> en condiciones de estrés inducido por PEG.....	58
7.12 Resultados de la extracción de peróxido de hidrógeno de <i>P. vulgaris</i> en interacción con <i>M. robertsii</i> en condiciones de estrés inducido por PEG.....	59
7.13 Resultados de la extracción de peroxidasa de <i>P. vulgaris</i> en interacción con <i>M. robertsii</i> en condiciones de estrés inducido por PEG.....	60
<b>8. DISCUSIÓN.....</b>	<b>61</b>
<b>9. RESUMEN DE RESULTADOS.....</b>	<b>68</b>
<b>10. CONCLUSIONES.....</b>	<b>69</b>
<b>11. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>69</b>
<b>12. REFERENCIAS.....</b>	<b>70</b>

## 1. Introducción

En esta sección, se hará mención de las características socio-geográficas, climatológicas y agrícolas de la CDMX, haciendo hincapié en el problema de estrés hídrico que hay la ciudad y que afecta a los cultivos como *Phaseolus vulgaris* (frijol) que es de enorme importancia económica. Con ello, se hablará de la forma de simular el estrés hídrico en las plantas mediante el uso de polietilenglicol (PEG). También, se abordarán temas como la importancia que tiene el uso de hongos entomopatógenos (HE), como una alternativa viable para el manejo integral de plagas más amigable con el medio ambiente. Además, se mencionarán reportes de HE que actúan como endófitos, confiriéndoles protección a las plantas a distintos tipos de estrés. El conjunto de los temas, mostrará que uno de los problemas clave que afrontan los cultivos de la CDMX, es el estrés hídrico, y es posible, que utilizando cepas de HE provenientes de la CDMX, que actúen como endófitos, ayuden a mitigar ese tipo de estrés, el cual, puede ser simulado utilizando PEG.

### 1.1 CDMX, características socio-geográficas, climatológicas y agrícolas

La Ciudad de México (CDMX), anteriormente conocida como Distrito Federal (D.F.), cuenta con una superficie de 1,500.45 Km<sup>2</sup> y representa el 0.08% de la superficie total del país. Forma parte del Eje Neovolcánico y se encuentra en promedio a 2,240 m sobre el nivel del mar; fue construida sobre un sistema de lagos que en su tiempo abarcaba 1,500 km<sup>2</sup>. Conformaba una de las aglomeraciones urbanas más grandes del mundo con una población de 8.9 millones de habitantes, el 7.5% del total del país, siendo el 99.5% urbana y 0.5% rural; a nivel nacional el promedio es de 78 y 22 % respectivamente (INEGI, 2016; FAO, 2015).

En la mayor parte del territorio de la CDMX se presenta clima templado subhúmedo (87%), en el resto se encuentra clima seco y semiseco (7%) y templado húmedo (6 %). La temperatura media anual es de 16°C. La temperatura más alta, mayor a 25°C, se presenta en los meses de marzo a mayo y la más baja, alrededor de 5°C, en el mes de enero. Las lluvias se presentan en verano, la precipitación total anual es variable: en la región seca es de 600 mm y en la parte templada húmeda (Ajusco) es de 1,200 mm anuales.

El avance de la mancha urbana ha puesto en peligro a todos los ecosistemas que existieron en la CDMX. Los primeros ecosistemas afectados por el desarrollo humano fueron los lagos. La zona urbana ocupa la mayor parte del territorio, pero hacia la parte sur y sureste se encuentran zonas agrícolas, principalmente de temporal, donde se cultiva maíz, frijol, avena y nopal entre otras, siendo importantes también las hortalizas y la floricultura (INEGI, 2016).

La zona de reserva ecológica, al sur y suroeste de la CDMX ocupa la mayor superficie de la entidad y comprende parte de las Sierras Ajusco-Chichinautzin y las Cruces, donde se encuentran los Parques Nacionales Desierto de los Leones y el Ajusco, así como los Dínamos, el Valle de las Monjas y el monte de las Cruces. Se encuentran también algunas reservas ecológicas hacia el norte y este, como la Sierra de Guadalupe, el Parque Nacional Cerro de la Estrella y la Sierra de Santa Catarina. Existen zonas hacia el oeste de la CDMX, en el área de las chinampas de Xochimilco y Tláhuac, donde prospera un pastizal resistente a las concentraciones de sales (INEGI, 2016).

Curiosamente, aunque la CDMX sea el centro político, económico, financiero y cultural más importante del país y que en él se concentre uno de los núcleos de población más grandes del planeta, hace pensar que su carácter es exclusivamente urbano; sin embargo, el 59% del territorio es *Suelo de Conservación*; por lo menos sobre el papel, ya que de acuerdo con el último recuento, dentro de su perímetro se habían construido más de 850 asentamientos irregulares. Conocida como *Suelo de Conservación*, esta área protegida fue creada en 1992 para salvaguardar los servicios ambientales de la ciudad en el cual se llevan a cabo actividades de producción rural y ecológicas; entre las que destacan la producción de maíz, avena forrajera, nopal, frijol, amaranto, alfalfa, hongos seta, hortalizas y flores ornamentales. La reserva se constituye por bosques templados (pino, oyamel, pino-encino y encino), matorrales, pastizales, humedales para fines ecológicos y de conservación (INEGI, 2016; FAO, 2015; CONABIO y SEDEMA, 2016). De la superficie del *Suelo de Conservación*, 62,000 hectáreas son de propiedad social (ejidos y comunidades), en las que habitan pueblos originarios. Cuarenta y seis pueblos aún cuentan con superficies destinadas a actividades agrícolas (aproximadamente 300 km<sup>2</sup> de tierras agrícolas), sumando más de 30 mil hectáreas en cultivos y 7,000 en actividades pecuarias. (GDF, 2007; FAO, 2015). Para evitar una mayor degradación de la zona protegida, el Gobierno de la CDMX está promoviendo la agricultura sostenible en las zonas rurales y la producción de alimentos en la propia ciudad (FAO, 2015).

Existen dos tipos de agricultura: temporal y de riego. En terrenos con pendiente o suelos altamente permeables se práctica la agricultura de temporal (Covarrubias, 2007). La agricultura de riego se localiza principalmente en zonas bajas y planas de Xochimilco y Tláhuac (INEGI, 2016). De la totalidad de las hectáreas dedicadas a las actividades agrícolas, el 93.93% no cuentan con ningún sistema de riego, en tanto que el 6.07% si cuentan con sistemas de riego (SEMARNAT, 2013).

La cosecha de 2012 en la CDMX, alcanzó un valor estimado de más de 100 millones de dólares e incluyó 336,000 toneladas (t) de nopal, 147,000 t de avena forrajera, 12,500 t de papa y 15,000 t de brócoli, 5,374 t de romerito, 1,142 t de espinaca, 991 t de lechuga, 852 de acelga. En el caso del frijol, la producción fue 60,000 t incluyendo la CDMX y los estados de Puebla y México (FAO, 2015). A pesar

de que la CDMX es el principal productor de México de nopal y romerito, se estima que el 80 % de los alimentos que se consumen en la ciudad proceden de otros estados del país o se importan (FAO, 2015; SEMARNAT, 2014).

Casi el 90 % de la producción agrícola se realiza en condiciones de temporal, y el 80 % de la superficie cultivable corresponde a cultivos cíclicos, principalmente avena forrajera y maíz. La producción de plantas con flor, así como la flor de Nochebuena y avena forrajera, generan más de la mitad del valor total de los cultivos cíclicos. El nopal se cultiva en 4,300 ha, más del 90 % de la superficie de cultivos perennes, principalmente en Milpa Alta (FAO, 2015).

En cada una de las Delegaciones Rurales de la CDMX se llevan a cabo actividades agrícolas, donde se producen los cultivos que en la Tabla 1.1 se describen. La delegación que concentra la mayor producción agrícola es la de Milpa Alta (68.50%), seguida de Xochimilco (15.75%), Tláhuac (7.65%), posteriormente Tlalpan (7.54%) y finalmente con una aportación marginal, se encuentran: La Magdalena Contreras, Cuajimalpa y Álvaro Obregón (SAGARPA, 2013).

**Tabla 1.1** Principales cultivos de las delegaciones rurales de la CDMX.

<b>Delegación</b>	<b>Cultivos</b>
<b>Álvaro Obregón</b>	Maíz, frijol y avena
<b>Cuajimalpa</b>	Maíz y avena
<b>Magdalena Contreras</b>	Maíz, frijol, haba y ciruelo
<b>Milpa Alta</b>	Nopal verdura, avena, maíz, amaranto, hortalizas y flores
<b>Tláhuac</b>	Maíz, amaranto, espinaca, romeritos y acelgas, y en forma perenne: alfalfa, pera, higo y nogal.
<b>Tlalpan</b>	Avena forrajera, maíz, papa, chícharo, rosa, pera, higo, manzana, ciruela y durazno
<b>Xochimilco</b>	Maíz, fríjol, amaranto, girasol, sorgo, papa, la veza de invierno y el maíz de ciclo corto para forraje, hortalizas, nopal, calabaza, chayote, chilacayote; frutales como el durazno, la ciruela roja y negra, el tejocote y el capulín.

Según la EAA, el estrés hídrico ocurre cuando la demanda de agua excede la cantidad disponible durante un período determinado o cuando la mala calidad restringe su uso. El estrés hídrico provoca el deterioro de los recursos de agua dulce en términos de cantidad (sobreexplotación de acuíferos, ríos secos, etc.) y de calidad (eutrofización, contaminación de materia orgánica, intrusión salina, etc.) (EAA, 2017). En todo México, un porcentaje aproximado del 75.72% es destinado al sector agrícola, principalmente para el riego de cultivos (CONAGUA, 2014). La CDMX actualmente se encuentra en un nivel muy alto de estrés hídrico, el más alto de todo el país (CONAGUA, 2014). Por si fuera poco, cerca de la mitad del agua disponible en la CDMX es clasificada como altamente contaminada (CONAGUA, 2014).

Los factores abióticos como la radiación solar, el clima, la sequía y la contaminación, así como los factores bióticos como los insectos plaga, virus, hongos y bacterias que atacan a las plantas, afectan de una manera considerable la producción agrícola, elevando sus costos. Los períodos de sequía son una característica inevitable y recurrente de la agricultura mundial y, a pesar de la capacidad de las sociedades humanas para mejorar la predicción de su arribo y para modificar su impacto, la sequía sigue siendo hasta ahora el factor más importante para la seguridad alimenticia de la población humana. Una de las estrategias para contribuir a la solución de esta problemática mundial, es implementar sistemas de mejoramiento dirigidos a la obtención de cultivos resistentes a condiciones ambientales que imponen una limitación de agua (Covarrubias, 2007).

## **1.2 Características e importancia de *Phaseolus vulgaris***

*Phaseolus vulgaris* L. (frijol), pertenece a la familia Fabaceae. Las plantas de frijol son hierbas rastreras y trepadoras con foliolos de tres hojas. El color de sus flores tiene tonalidades rosas, lilas y violetas. Sus semillas, lo que conocemos como frijol propiamente, tienen forma de riñón y crecen en una vaina conocida como legumbre (ejotes, del náhuatl *exotl*) (CONABIO y SEDEMA, 2016). Como otras leguminosas, estas plantas tienen en sus raíces nódulos con bacterias fijadoras de nitrógeno (*Rhizobium*) (McCormack, 2004). Tradicionalmente y desde hace cientos de años, el agricultor mexicano ha sembrado en sus chinampas y milpas, de forma combinada, frijol y maíz (Lara-Flores, 2015). El frijol contiene carbohidratos, alto contenido de proteínas, fibra, grasa, minerales (calcio y hierro) y vitaminas del complejo B como la niacina, riboflavina, ácido fólico y tiamina (CONABIO y SEDEMA, 2016).

La producción mundial de frijol creció a una tasa promedio anual de 1.6% entre 2003 y 2014, para ubicarse en 25.1 millones de toneladas, por tal motivo, es una de las plantas de cultivo más

importantes a nivel mundial (FAO, 2015). En 2014, el 63% de la producción mundial de frijol se concentró en siete países: India (16.4%), Myanmar (14.9%), Brasil (13.1%), Estados Unidos (5.3%), México (5.1%), China (4.1%) y Tanzania (4.1%). En México, el frijol ocupa la cuarta posición en importancia por la superficie que ocupa, después del maíz, pastos y sorgo. En todo México, se producen al año, 965,100 t de frijol (FAO, 2015). Puebla, EDOMEX y CDMX producen una cantidad anual de 60,000 t de frijol (SAGARPA, 2013; INEGI, 2016). Particularmente en México, el frijol es la leguminosa de mayor consumo humano y representa el 36% de la ingesta diaria de proteínas (INEGI, 2016).

### 1.3 Uso de polietilenglicol para inducir estrés en las plantas

El polietilenglicol (PEG) (Fig. 1.3), induce estrés por sequía o estrés hídrico en las plantas (Türkan *et al.*, 2005; Al-Taisan, 2010, Ji *et al.*, 2014). También se sabe que el PEG es causante de hiperhidricidad (toxicidad por una absorción en exceso de agua), en hojas de betabel (Sen y Alikamanoglu, 2013), causando así hipoxia y por lo tanto estrés oxidativo severo (Rojas-Martínez *et al.*, 2010; Verslues *et al.*, 1998), debido a la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS), como el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Por otro lado, también se ha reportado acumulación de PEG en las plantas (Lawlor, 1970; Janes, 1974), inclusive PEG de alto peso molecular de entre 4000 a 8000 g/mol, se ha encontrado en plantas que lo absorben, tanto en raíces como en tallos. Se ha encontrado que la absorción de PEG en plantas de maíz y frijol es relativamente lenta, a una razón de 1 mg de PEG por gramos de peso fresco de la planta (mg/gPf). Sin embargo, cuando las raíces se encuentran dañadas o rotas, la razón es mayor (Blum, 2013). Otros ejemplos de ello son las plantas de *Gossypium hirsutum* (algodón), que absorbieron una menor cantidad de PEG (Lawlor, 1970). En plantas de *Capsicum annuum* (pimiento), el PEG con un mayor peso molecular se concentraba principalmente en las raíces mientras que PEG con menor peso molecular se acumulaban en las hojas (Janes, 1974). Yaniv y Werker (1983) presentaron fotografías sorprendentes de PEG 1500 a 6000 g/mol depositado en las hojas de varias solanáceas expuestas a PEG en la raíz durante 24 h o menos. También PEG se ha presentado en las hojas y raíces más viejas de *Solanum lycopersicum* (tomate) (Jacomini *et al.*, 1988).

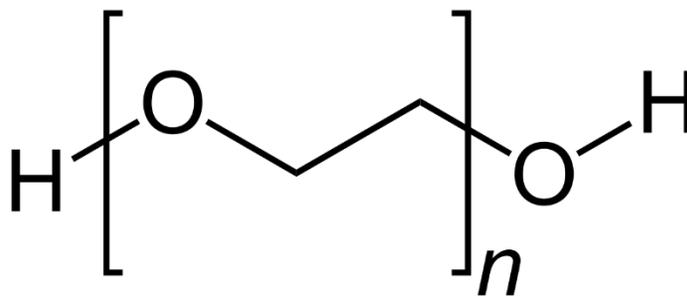


Fig. 1.3 Estructura general del polietilenglicol (PEG). Fuente *Sigma-Aldrich*.

Como se ha mencionado, el PEG induce estrés por sequía o estrés hídrico en las plantas (Türkan *et al.*, 2005; Al-Taisan, 2010, Ji *et al.*, 2014). Las plantas experimentan estrés hídrico ya sea cuando el suministro de agua a sus raíces es limitante o cuando la tasa de transpiración se hace intensa. En consecuencia, la capacidad de las plantas para resistir tal estrés es de inmensa importancia económica. Todas las plantas tienen tolerancia a la escasez de agua, pero la extensión varía de una especie a otra (Rahman *et al.*, 2012). La sequía, como un estrés abiótico, es multidimensional en su naturaleza, y afecta a las plantas en varios niveles de su organización. De hecho, en condiciones de sequía prolongada, muchas plantas se deshidratan y mueren. El estrés hídrico en las plantas reduce el potencial de agua de la célula vegetal y la turgencia, que elevan las concentraciones de los solutos en el citosol y matrices extracelulares. Como resultado, el ensanchamiento celular disminuye llevando a la inhibición del crecimiento y el fracaso reproductivo. Esto es seguido por la acumulación de ácido abscísico (ABA) y osmolitos compatibles como prolina, que causan marchitamiento. En esta etapa, hay sobreproducción de ROS y formación de compuestos de captación de radicales tales como ascorbato y el glutatión (Rahman *et al.*, 2012).

Uno de los puntos críticos es el efecto que ejerce PEG sobre las plantas, lo cual varía desde la especie de planta, la concentración de PEG y el tiempo que estuvieron expuestas (Blum, 2013). Se ha reportado que hojas que contienen PEG, se comportan hidráulicamente diferente de las que no tienen PEG, esto cuando las plantas crecen en medio nutritivo con o sin PEG respectivamente (Blum, 2013). Si el PEG se absorbe dentro de la planta, podría interferir con un crecimiento adecuado de la misma, de hecho una dosis de PEG por arriba del 2.5% afecta la morfología de la planta como se ha observado en *Impatiens walleriana* (belén) de una manera grave, relacionando al PEG como una barrera para la absorción de nutrientes (Burnett, 2005). Los efectos negativos sobre la nutrición mineral (absorción y transporte de nutrientes) y el metabolismo conducen a una disminución en el

área foliar y a la alteración en la partición asimilada entre los órganos (Rahman *et al.*, 2012). Además, el PEG podría causar hiperhidricidad en hojas de betabel (Sen y Alikamanoglu, 2013), causando estrés oxidativo severo (Rojas-Martínez *et al.*, 2010; Verslues *et al.*, 1998). Otro factor que se podría suscitar al usar PEG, es la contaminación mineral, se ha reportado que PEG con pesos moleculares 3000-4000 g/mol, contienen altas concentraciones de fósforo y metales tóxicos como aluminio (Reid, 1978). Algunos autores recomiendan dosis bajas de PEG para desacelerar el crecimiento en plantas de ornato y así facilitar su traslado de un lugar a otro (Burnett, 2005), también se recomienda el uso de membranas semipermeables para evitar el contacto directo con PEG (Blum, 2013).

El uso de PEG 6000 a 8000 g/mol es empírico, era común que durante la época de los años 70 y 80, se añadiera PEG 4000-8000 g/mol, a los medios nutritivos en experimentos fisiológicos para inducir estrés por sequía en los cultivos. Algunos autores reportan de manera teórica o medida, la relación potencial osmótico-concentración, para PEG de diferentes pesos moleculares, la recomendación general, es hacer la revisión de potencial osmótico mediante el uso de un osmómetro o un psicrómetro (Blum, 2013; Michel, 1983; Michel y Kaufmann, 1973).

#### **1.4 Interacciones planta - microorganismos en la rizósfera**

Las interacciones entre las plantas y los microorganismos pueden influir positiva o negativamente en el crecimiento de plantas a través una variedad de mecanismos conocidos. La nodulación de las leguminosas por rizobios, asociaciones de micorrizas, asociaciones endófitas y factores promotores del crecimiento vegetal producidos por bacterias u hongos son los mecanismos establecidos en la mayoría de estos tipos de interacciones. Las poblaciones de microorganismos en la rizósfera tienen influencias sobre diversos aspectos fisiológicos de crecimiento de la planta incluyendo la morfología de la raíz, la relación de peso raíz-brote, la absorción de nutrientes como el calcio, el fósforo y otros minerales (Singh *et al.*, 1999; Bais *et al.*, 2008), la tasa de desarrollo y la floración y el rendimiento del cultivo (revisado en Sasan, 2012).

Los hongos son el segundo grupo más frecuente de los microorganismos en el suelo y en ocasiones la biomasa fúngica excede la biomasa bacteriana. Las interacciones entre plantas y hongos podrían ser beneficiosas, neutrales o perjudiciales. Los hongos patógenos que infectan las raíces, saprófitos y micorrizas, se encuentran entre los tres principales tipos de hongos del suelo (Walton *et al.*, 1994). Las plantas se benefician de estas asociaciones con los hongos a través de una mejor captación de agua y la absorción de minerales, mayor resistencia a patógenos, y la tolerancia al estrés ambiental (Walton *et al.*, 1994). Los beneficios no se limitan a las plantas, ocasionalmente los hongos se

benefician de los nutrientes exudados por las plantas. Los hongos no-mutualistas (por ejemplo, *Fusarium* spp.) también se producen en la rizósfera y en el rizoplano (superficie de la raíz) (Walton *et al.*, 1994). La colonización microbiana de la rizósfera es un primer paso importante en la patogénesis de microorganismos transmitidos por suelo y crucial en la aplicación beneficiosa de microorganismos (Bais *et al.*, 2008).

La capacidad de los hongos micorrízicos para mejorar la tolerancia a la sequía en el trigo ha sido reconocida desde la década de 1980 (Allen, 1991). Las micorrizas también mejoran la resistencia al calor en el espárrago (Matsubara *et al.*, 2000). La colonización por micorrizas también se asocia con la baja regulación de las acuaporinas vegetales, potencialmente disminuyendo la pérdida de agua de la planta al suelo circundante (Porcel *et al.*, 2006). Además, las hifas micorrícicas extra-radicales brindan a las raíces de las plantas un contacto más estrecho con el suelo, facilitando la absorción de agua y/o reduciendo la pérdida de agua debido a los espacios de aire entorno a la raíces (Smith y Read, 2008).

Uno de los principales hongos que tiene una actividad relevante en la rizósfera es *Metarhizium anisopliae*, el cual, es uno de los principales HE a nivel mundial (Greenfield *et al.*, 2016; Vega, 2008; Sasan y Bidochka, 2012). Como se ha mencionado, Hu y St. Leger (2002) mostraron la capacidad de *Metarhizium* (*M. anisopliae* ARSEF 1080) para colonizar la rizósfera. Ellos también mostraron que *Metarhizium* no se distribuye en el suelo al azar si no que muestra asociaciones preferenciales en la rizósfera de la planta. Se ha reportado que *Metarhizium* es más persistente en la rizósfera que en la mayor parte del suelo (Hu y St. Leger, 2002), y que tiene una mayor actividad de control biológico en su interior (Bruck, 2010). El tema de las poblaciones fúngicas en la rizósfera ha sido bien reportado, pero el estudio realizado en 2002 por Hu y St. Leger fue el primer informe de una población de HE creciendo en la rizósfera. Se sugiere que la participación de los exudados de las raíces focalizados en la rizósfera (Hu y St. Leger, 2002) mejora la esporulación *M. anisopliae* en la rizósfera. Diferentes aislados de *M. anisopliae* (F52, IP99, y IP285) han mostrado ser competentes en la rizósfera para *Picea abies*, *Picea glauca* y *Taxus bacata* en medios nutritivos para macetas sin suelo (Bruck, 2010).

### **1.5 Origen evolutivo de los hongos entomopatógenos**

La especificidad de las relaciones planta – hongo entomopatógeno (P-HE), es uno de los temas que más se han discutido debido a que no todas las plantas interactúan con una cepa de hongo endófito o entomopatógeno, debido a las características propias que pueden poseer ambos

organismos, por esta razón no todos los casos presentan una interacción ya sea siendo endófitos o patógenos de la planta, esto por la misma historia evolutiva que tienen tanto las plantas como los hongos (Moonjely *et al.*, 2016; Sasan y Bidochka, 2012; Vega, 2008), inclusive, la interacción puede involucrar no nada más un solo microorganismo, sino de toda una comunidad (Greenfield *et al.*, 2016; Sasan, 2012). Algunos optan por llamar a los hongos entomopatógenos, que además actúan como endófitos (ya sea *Beauveria*, *Isaria* o *Metarhizium*), como hongos endófitos entomopatógenos (Castillo-López *et al.*, 2014), o como hongos endófitos patógenos de insectos, esto debido a la historia evolutiva que han tenido los HE; de ser hongos patógenos de plantas en un inicio de su historia evolutiva, pasaron a ser hongos endófitos, y para finalizar, con una característica recientemente adquirida, la de HE (Moonjely *et al.*, 2016), por lo tanto estudiar la relación es imprescindible para tener un mejor conocimiento en primera instancia de la interacción con las plantas y en conjunto con su efecto que tienen sobre los insectos, por lo tanto, se requieren las condiciones ideales (Greenfield *et al.*, 2016), para que tanto el o los microorganismos (en este caso los HE), como la planta, interaccionen de la manera adecuada a los tratamientos propuestos (Moonjely *et al.*, 2016; Vega, 2008).

### **1.6 La importancia de los hongos entomopatógenos en el manejo integral de plagas**

La actividad agrícola es esencial para la economía y la generación de alimento a nivel mundial. Mantener un ritmo creciente en la productividad agrícola será crucial en las próximas décadas; la FAO señala que la producción de alimentos de primera necesidad, deberá aumentar un 60% para satisfacer el crecimiento de la demanda esperada. El aumento de la producción agrícola es restringido por las pérdidas causadas por los insectos considerados plagas. Para su control, se ha hecho el uso de plaguicidas químicos, pero su aplicación indiscriminada, ha tenido efectos adversos sobre el medio ambiente y la salud humana; además, las plagas han desarrollado resistencia, implicando una menor efectividad de los productos químicos (Dutta *et al.*, 2015; Ortiz-Urquiza *et al.*, 2014). El Control Biológico como parte del Manejo Integral de Plagas, es una alternativa al uso de los agroquímicos. Los hongos entomopatógenos (HE) han sido aprovechados como agentes de control biológico, ya que de forma natural pueden causar enfermedad en los insectos llevando a la generación de epizootias. La mayoría de los bioplaguicidas disponibles comercialmente están formulados a base de los conidios de este tipo de hongos, ya que son las estructuras con las que se dispersan en la naturaleza y al entrar en contacto con los insectos, inician el ciclo infeccioso (Vega, 2008). La selección de hongos que puedan ser eficaces para la aplicación en campo, se ha basado en

características deseables como son la producción eficiente, la infectividad y la seguridad. (Castillo-Minjarez, 2015).

### 1.7 Hongos endófitos y entomopatógenos

Los endófitos son los microorganismos que colonizan asintómicamente el tejido vegetal vivo sin causar efecto alguno inmediato, evidente, o negativo en la planta (Hirsch y Brown, 1992). Anton de Bary (1866), introdujo por primera vez el término "epífitos" a los hongos que viven en la superficie de su anfitrión y "endófitos" para aquellos que viven dentro del tejido de la planta. Más tarde, este término fue expandido a hongos y bacterias, incluyendo actinomicetos, que pasan la totalidad o parte de su ciclo de vida colonizando de manera inter o intracelular el interior de los tejidos vivos sanos del hospedero, típicamente sin causar síntoma aparente de enfermedad. La palabra endófito proviene de dos palabras griegas, "endon" significa dentro y "phyton" significa planta. Los endófitos fueron mencionados por primera vez por Bary en el siglo XIX (Azevedo, 1998) y han sido definidos de muchas maneras. Wilson (1995) definió endófito como el hongo que vive internamente y permanece asintomático durante al menos parte de su ciclo de vida. También describió la naturaleza asintomática de la ocupación endofítica en el tejido vegetal, simbiótica y la relación mutualista entre el endófito y su anfitrión. Sin embargo, algunos endófitos pertenecientes a Ascomycota pueden cambiar sus interacciones de mutualistas a parasitarias con sus anfitriones (saprófitos agresivos o patógenos oportunistas) dependiendo de las condiciones (Vega *et al.*, 2008; Porrás-Alfaro y Bayman, 2011).

Ciertos hongos endófitos y bacterias han mostrado ser eficientes contra los fitopatógenos. Los hongos endófitos son aislados de las plantas y sometidos a las pruebas de actividad antimicrobiana, con el fin de investigar su potencial para la aplicación agrícola (Sasan, 2012). Algunas especies de *Trichoderma* que son competentes en la rizósfera (Ahmad y Baker, 1987) y que se utilizan como hongos de control biológico contra hongos patógenos de plantas (Harman, 2000), también pueden ser endófitos simbiotes de plantas (Yedidia *et al.*, 1999). *Piriformospora indica* y *Sebacina vermifera* también forman asociaciones endofíticas con plantas y se ha reportado que controlan *Gaeumannomyces graminis* var. *tritica* (agente causal de la enfermedad "tómalo todo" en el trigo) (Ghahfarokhi y Goltapeh, 2010). Se ha reportado que los hongos entomopatógenos (HE), como *Beauveria bassiana* y *Lecanicillium* spp., proporcionan un control biológico dual tanto de plagas de insectos como de patógenos de las plantas (Ownley *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2007). Una serie de metabolitos bioactivos producidos por *Beauveria* spp., se usan en la inhibición directa de plagas, así como de patógenos. *Beauveria bassiana* también se ha reportado como endófito en *Gossypium*

*hirsutum* (algodón) (Castillo-López y Sword, 2015), y en *Solanum lycopersicum* (tomate) además de protegerlas contra el patógeno *Rhizoctonia* spp. y *Pythium myriotylum* (Ownley et al., 2010). Además, *B. bassiana* ha sido aislado de muchas plantas colonizadas naturalmente (Vega et al., 2008), así como después de la inoculación en *Zea mays* (maíz) (Vakili, 1991; Bing y Lewis, 1992; Jones, 1994; Lomer et al., 1997; Cherry et al., 1999; Wagner y Lewis, 2000; Lewis et al., 2001), *Solanum tuberosum* (papa) (Jones, 1994), cadillo (Jones, 1994), etc. Hu y St. Leger (2002) mostraron la capacidad de *Metarhizium anisopliae* para colonizar la rizósfera, además, *M. anisopliae* presenta actividad endófito y promueve el crecimiento en *Solanum lycopersicum* (jitomate) (Dutta et al., 2015; García et al., 2011), *Manihot esculenta* (yuca) (Greenfield, 2016), *Brassica napus* (canola) (Batta, 2013). *Metarhizium robertsii* presenta actividad endófito en *Phaseolus vulgaris* (frijoles blancos) (Sasan y Bidochka, 2012), *Panicum virgatum* (pasto varilla) (Sasan y Bidochka, 2012). Algunas cepas de *Isaria* que pueden ser endófitas, se han aislado de *Coffea arabica* L. (café) (Vega et al., 2008). Se presume que *Isaria fumosorosea* también presenta actividad endofítica suprimiendo el crecimiento de hongos fitopatógenos en *Cucumis sativus* (pepino) y en *Fragaria* (fresa) (Kavková y Curn, 2005; Kim et al., 2007).

Se han reportado cepas de hongos endófitos que les confieren protección a las plantas expuestas a diversos tipos de estrés abióticos (Rodríguez y Redman, 2008), bióticos (Prestidge y Gallagher, 1988; Latch, 1993) y/o tanto abióticos como bióticos simultáneamente (Hahn et al., 2008). La colonización de un endófito mejora la tolerancia de una planta a muchos tipos de estrés abiótico, como el calor (Márquez et al., 2007; Khan et al., 2012b), la sequía (Hahn et al., 2008; Gibert et al., 2012), la congelación, la radiación UV-B (Draggen, 2007), la privación de nutrientes, la salinidad (Waller et al., 2005; Khan et al., 2012a), condiciones alcalinas (Bu et al., 2012) y la contaminación por metales pesados (Li et al., 2012; revisados en Rodríguez y Redman 2008). La mejora mediada por hongos del rendimiento en la etapa de germinación se conoce como el vitalismo fúngico (Vujanovic y Vujanovic, 2007). Este proceso es visto como una herramienta moderna para la biotecnología vegetal (Vujanovic y Vujanovic, 2007). Además se han reportado, que los hongos endófitos aumentan la tolerancia al estrés abiótico en plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas maduras (Márquez et al., 2007; Rodríguez et al., 2008).

La inoculación de un endófito puede incrementar el *fitness* o adaptabilidad de una planta confiriéndole tolerancia al estrés por sequía y suelo pobre en nutrientes, o protección contra la herbivoría y a enfermedades por hongos (Kuldau y Bacon, 2008; Hubbard et al., 2014). Uno de estos endófitos es el hongo *Epichloë* sp. (Ascomycota, Clavicipitaceae), que aumenta la biomasa de las plantas y la producción de vástagos en un 10-15% (Oberhofer et al., 2014). Se ha sugerido que la presencia de un endófito mejora el ajuste osmótico de los tejidos de la planta cuando se expone a la

sequía, un mecanismo que puede proteger los meristemas apicales y puede mejorar la supervivencia de vástagos (Elmi y West, 1995). Sin embargo, se ha observado un crecimiento más rápido de plantas inoculadas independientemente del tratamiento de sequía, lo que sugiere que la interacción entre plantas y sus endófitos es generalmente mutualista. El desarrollo de mejoras en las plantas se ha atribuido a las auxinas producidas por los endófitos (De Battista *et al.*, 1990). Estas fitohormonas pueden influir en la división celular, la elongación celular y la asignación de recursos dentro de las plantas (Oberhofer *et al.*, 2014).

Mendarte-Alquisira *et al.* (2016), han reportado que el establecimiento de la asociación endofítica del hongo *Lewia* sp., en la planta de *Festuca arundinacea*. *Lewia* sp., mejoró el crecimiento de la planta, así como también las concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y malondialdehído, y reduce la actividad de glutatión S-transferasa (GST). *Lewia* sp., reduce la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en plantas expuestas a estrés por hidrocarburos e incrementa la actividad de superóxido dismutasa, mientras significativamente reducen la actividad de GST.

*Metarhizium robertsii* se adhiere a los insectos y las plantas usando dos proteínas diferentes, *MAD1* (*Metarhizium* ADhesin-like protein 1) y *MAD2*. Estas se encontraron diferencialmente inducidas en la hemolinfa de los insectos y en los exudados de las raíces de las plantas respectivamente, y produciendo superficies adhesivas de conidios (Wang y St. Leger, 2007). La expresión de *MAD1* y *MAD2* en *Saccharomyces cerevisiae* permitieron que las células de levadura se adhieren a la cutícula del insecto y a las superficies de las plantas, respectivamente. *Metarhizium*, es así, un hongo competente en la rizósfera con incluso más potencial para el control biológico (St. Leger, 2008; Bruck, 2010).

## 2. Antecedentes

Se han reportado cepas de hongos entomopatógenos (HE), que también actúan como endófitos, confiriéndoles protección a las plantas a diferentes tipos de estrés (Vega *et al.*, 2008; Covarrubias, 2007). Además, se ha observado que el uso de cepas de hongos micorrízicos, entomopatógenos, y endófitos, que provienen o se encuentran aclimatados a la zona donde se inoculan, presentan las condiciones óptimas de crecimiento mutualista con las plantas a los cuales han sido propagados (Malinowski y Belesky, 2000; Báez-Pérez *et al.*, 2010).

Además de la colonización de insectos, algunos entomopatógenos pueden colonizar plantas (Vega *et al.*, 2008) y la rizósfera (Hu y St. Leger, 2002; Bruck, 2010), y promover el crecimiento de las plantas (Kabaluk y Erickson, 2007). El HE *Beauveria bassiana* ha sido aislado de muchas plantas colonizadas

naturalmente (Vega *et al.*, 2008), por ejemplo *P. vulgaris* (Parsa *et al.*, 2013). Hu y St. Leger (2002), demostraron la capacidad de *M. anisopliae* para colonizar la rizósfera. Sasan y Bidochka (2012), reportaron a *M. robertsii* con actividad endófito y promotora del crecimiento en *P. vulgaris*.

En la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM-I) se tienen distintas líneas de investigación con cepas HE, desde experimentos con diferentes especies de insectos, pruebas de calidad de los conidios, hasta interacciones con las plantas. Para ello, algunas de las cepas de HE con las que actualmente cuenta la UAM-I son: *Metarhizium anisopliae* CP-OAX, *M. anisopliae* 59, *Beauveria bassiana* 88 e *Isaria fumosorosea* CNRCB1 reasignada como *Isaria javanica* CHE-CNRCB 303 (Gallou *et al.*, 2016), junto con las cepas *Beauveria bassiana* Tac 1.1, *Metarhizium robertsii* Xoch 8.1 e *Isaria fumosorosea* Cuj 2.1 aisladas de suelo de la CDMX y enviadas al Centro Nacional de referencia de Control Biológico (CNRCB) (Estefes-Chávez, 2015; López-Cruceño, 2016). Se han identificado molecularmente algunos de los mejores de estos aislados y se propuso una formulación basada en estos conidios, que resultó similar a un producto comercial basado en *Metarhizium* (López-Cruceño, 2016). También se ha realizado un estudio comparativo de estas cepas en cultivo sólido determinando la producción y calidad de los conidios encontrando que *Metarhizium robertsii* Xoch 8.1 presentó los mejores resultados de viabilidad e infectividad, usando larvas de *Tenebrio molitor*. Al comparar esta cepa con una comercial identificada como *Metarhizium brunneum* (Metasin® de Agrobionsa®), mostró 50% mayor tolerancia al estrés térmico, medido como tiempo de sobrevivencia de los conidios a una temperatura de 42 °C. Se efectuó un escalamiento en la producción de conidios con las cepas de Xoch 8.1 y la comercial. Dicho escalamiento, bajo las condiciones de estudio, no mostró diferencia significativa entre las cepas en cuanto a producción de conidios, germinación y viabilidad (López-Cruceño, 2016). Para el presente estudio se ocuparán cepas de HE aislados de zonas agrícolas de la CDMX, resguardadas en la UAM-I, los cuales están aclimatados a las condiciones geográficas de la región (temperatura, radiación solar, humedad relativa) (Estefes-Chávez, 2015).

El uso de cepas de hongos provenientes de la CDMX sería una buena opción para proporcionar protección a las plantas contra factores estresantes. Algunas de estas cepas aisladas del suelo agrícola de la CDMX como son *Beauveria bassiana*, *Metarhizium robertsii* e *Isaria*, pertenecen a especies de HE con potencial endofítico (Vega *et al.*, 2008; Sasan y Bidochka, 2012; Kim *et al.*, 2007). Si añadimos la potencial capacidad endofítica de estos hongos junto con la capacidad entomopatógena que tienen, sin lugar a dudas serán una mejor alternativa para mantener la mayor cantidad y calidad de las plantas que el uso de plaguicidas (Dutta *et al.*, 2015).

### 3. Justificación

El uso de cepas de HE como parte integral del control biológico de plagas son una alternativa viable para disminuir el uso de plaguicidas químicos y sus repercusiones ambientales; la capacidad de los HE de actuar también como endófitos de plantas añade una ventaja adicional al uso de los HE en campo, pues pueden proporcionar protección a las plantas contra factores estresantes. Evaluar la capacidad de los HE de formar asociaciones endofíticas con plantas de interés comercial, y los efectos protectores de esta asociación contra diversos tipos de estrés, cómo el estrés hídrico, son de particular importancia si consideramos que el cambio climático, y las inundaciones o sequías causadas por este, podría poner en peligro nuestra seguridad alimentaria.

### 4. Hipótesis

El establecimiento *in vitro* de la asociación *Phaseolus vulgaris* – HE proporcionará protección a la planta del estrés inducido por PEG.

#### 5.1 Objetivo general

Establecer la interacción de *Phaseolus vulgaris* con HE en condiciones de estrés inducido por PEG.

#### 5.2 Objetivos específicos

- a) Seleccionar las semillas cultivables y los HE provenientes de la zona agrícola de la CDMX.
- b) Estandarizar las condiciones particulares para la obtención de plantas y el establecimiento de la asociación P-HE bajo condiciones *in vitro*.
- c) Seleccionar las condiciones de cultivo y la cepa de HE que mejoren el crecimiento vegetal.
- d) Determinar el efecto de la asociación *Phaseolus vulgaris* – HE en condiciones de estrés inducido por PEG.



## 6.2 Cultivo del inóculo y conservación de la cepa

Todas las cepas de hongos entomopatógenos (HE), que se utilizaron para el experimento, *Beauveria bassiana* (Bb) Tac 1.1, *Metarhizium robertsii* (Mr) Xoch 8.1 (provenientes de la CDMX) e *Isaria javanica* (If) CHE-CNRCB 303 (proveniente de Colima), están resguardadas en el Centro Nacional de referencia de Control Biológico (CNRCB) (López-Cruceño, 2016; Estefes-Chávez, 2015). Las cepas se inocularon en medio papa dextrosa agar (PDA) de la marca J. T. Baker®. Se cultivaron a 28 °C con un fotoperiodo luz-oscuridad 12:12. Después de 7 días, se conservaron las cepas en agua desionizada estéril (López-Lastra *et al.*, 2002), se almacenaron a 4 °C en viales de vidrio con capacidad de 10 mL, que contenían 4 mL de agua desionizada estéril, en los cuales se colocaron 4 trozos de agar (5 mm<sup>2</sup>) de cada cepa cultivada (García-Ortiz, 2012). Las cepas utilizadas se propagaron a 28 °C por 7 días con fotoperiodo luz-oscuridad 12:12 previo su uso en la interacción con las plantas de *P. vulgaris* (Sasan y Bidochka, 2012).

A partir de los conidios conservados en agua destilada se obtuvieron los inóculos. Para la conservación por liofilización se adicionaron 20 ml de Tween 80 al 0.05% a 3 matraces de 250 mL con 50 mL de medio PDA donde se propagó la cepa durante 7 días, se agitaron en vórtex para posteriormente vaciarlos hasta obtener una suspensión concentrada la cual se filtró con gasa estéril y posteriormente se estandarizó a una concentración de  $1 \times 10^7$  conidios/mL (con/mL), después de obtener esta suspensión se agregó leche descremada (Svelty®) al 10% (previamente esterilizada a 120°C por 10 min), suficiente para obtener una suspensión de conidios con una concentración de  $1 \times 10^7$  con/mL (García-Ortiz, 2012). La leche descremada funciona como agente crio protector (Hernández-Rosas, 2006) para la liofilización (conservación a largo plazo de las cepas).

## 6.3 Tratamiento y germinación de semillas de *P. vulgaris* en condiciones *in vitro*

Cada planta requirió de necesidades específicas para su crecimiento ideal, además, las necesidades germinativas son distintas en cada planta, sin embargo, existen procedimientos generales que se necesitarán llevar a cabo previo a la inoculación con el hongo.

La técnica que se menciona a continuación, ha sido la adecuación para las plantas de *P. vulgaris* (frijol), la cual se seleccionó de los resultados obtenidos en los experimentos preliminares, por lo tanto, forma parte de los resultados (sección 7.2). Las semillas de *P. vulgaris*, obtenidas de la zona agrícola de Cholula, Puebla, se escarificaron térmicamente con el fin de inducir una germinación más rápida, para lo cual se sumergieron en agua destilada a 75 °C durante 60 s (Rojas-Loria, 2010; Alcántara-Martínez, 2013). Una vez escarificadas, las semillas se desinfectaron a través de su lavado

con detergente comercial marca *Roma* al 4% durante 30 min en agitación, después se hicieron 5 enjuagues de 1 min cada uno con agua destilada para eliminar el detergente y se colocaron en una solución de etanol al 70% por 2 min, finalmente, se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 2% marca *Meyer* por 50 min (Mendarte-Alquisira *et al.*, 2016; Alcántara-Martínez, 2013); entre cada cambio las semillas se enjuagaron con agua destilada estéril. Una vez tratadas, las semillas se sembraron en cajas Petri con agar-agua (11 g/L; marca *J.T. Baker*), se mantuvieron en oscuridad a una temperatura de 25 °C de 3-7 días hasta su germinación (Alcántara-Martínez, 2013).

Para la selección de las plántulas se ocuparon semillas germinadas con un tamaño aproximado de la radícula de 2 cm. Posteriormente se trasplantó una semilla germinada por caja Magenta® con 70 mL de medio MS: Murashige-Skoog (MS, 4.4 g/L), sacarosa y Phytigel (1.8 g/L), de la marca *Sigma-Aldrich*, y se colocaron en cámara de incubación (marca *Binder*), a 25 °C con un fotoperiodo de 16 h luz 8 h oscuridad a una intensidad lumínica de 50  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  (Mendarte-Alquisira *et al.*, 2016; Rojas-Loria, 2010; Alcántara-Martínez, 2013). En la Tabla 6.3.1 se muestra la composición del medio MS.

Tabla 6.3.1. Composición del medio Murashige & Skoog (MS)

Compuesto	mg/l
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
KNO <sub>3</sub>	1900
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440
EDTA-Na <sub>2</sub>	37.3
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27.8
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22.3
ZnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	8.6
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.25
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.025
KI	0.83

La tabla muestra la composición del medio MS que se utilizó para el crecimiento de las plantas de *P. vulgaris*.

#### 6.4 Tratamiento y germinación de semillas de *P. vulgaris* en condiciones de huerto urbano

A manera de comprobación, se sembraron semillas de *P. vulgaris* que no germinaron en PDA; después de dos semanas de no haber presentado crecimiento de la radícula en las placas de PDA,

fueron utilizadas para la germinación y crecimiento en huerto urbano en tierra preparada con sustrato de hoja en descomposición junto con tierra negra rica en materia orgánica en descomposición (principalmente abono de vaca, borrego y caballo), en una proporción de 1:1 (hojarasca/tierra negra), esto para poder comparar el crecimiento de las plantas utilizadas en condiciones *in vitro* de laboratorio con plantas puestas a crecer en condiciones de campo, debido a que las plantas no completaron su ciclo biológico en las condiciones propuestas de laboratorio. Se utilizaron 5 macetas con 4 semillas por maceta. Las condiciones climáticas de crecimiento para las plantas fueron al aire libre en contacto con luz solar directa, riego cada 3 días de 300 mL con agua potable, temperaturas según las condiciones climáticas estacionales de la zona de Iztacalco entre los periodos de octubre del 2016 y marzo del 2017. En este periodo se presentaron lluvias esporádicas con poca precipitación.

#### **6.5 Pruebas para establecer la relación P-HE**

Para el caso de *P. vulgaris*, la segunda fase del experimento consistió en seleccionar las condiciones idóneas de crecimiento para la planta en interacción con las cepas de HE (*Bb* Tac 1.1, *Mr* Xoch 8.1 e *If* CHE-CNRCB 303), con sus respectivos controles. Para lo anterior, se tomó como el día 0 cuando las plántulas alcanzaran una longitud del tallo de entre 8-10 cm (4-8 días de crecimiento después de ser trasplantadas en diferentes medios MS con sacarosa y Phytigel), y se seleccionaron al azar las plántulas control, así como las inoculadas con conidios de los HE, a nivel de raíz. Con el fin de obtener una concentración de medio ideal para la interacción P-HE, se prepararon diferentes concentraciones para las tres diferentes cepas, cada caja magenta contenía 1 semilla germinada. Los experimentos preliminares mostraron que la concentración ideal para el establecimiento P-HE es de MS5 (medio MS con 5 g/L de sacarosa y 1.8 g/L de Phytigel) y que la cepa más idónea para la tercera fase del experimento (condiciones de estrés mediado por PEG) fue *M. robertsii* comparando con lo reportado por Sasan y Bidochka (2012). Estos resultados preliminares se encuentran en la sección 7.1 de Resultados.

Las plántulas se inocularon por piquete con cada cepa por separado. Cada inoculación se realizó con asa estéril en una campana de flujo laminar. La punción o piquete fue a nivel de raíz. Las plantas de control fueron inoculadas de manera simulada (libres de endófito) y se trataron de la misma manera, excepto por el uso de agua estéril en lugar del inóculo (Oberhofer *et al.*, 2014). Finalmente las cajas se colocaron en una cámara de crecimiento a una temperatura de 25 °C, con un fotoperiodo de 16

h luz, 8 h oscuridad por 14 días. Este mismo método, se empleó para las plantas ocupadas en la extracción peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (sección 6.10).

Además de los experimentos de 14 días de interacción P-HE, se elaboraron pruebas preliminares de 3 meses de interacción de interacción *Phaseolus vulgaris* – *M. robertsii*. La metodología es exactamente la misma antes mencionada en esta misma sección exceptuando, por el mismo crecimiento rápido de la planta, trasplante de medio nutritivo cada mes, que en este caso fue MS0 (MS sin sacarosa), desde un inicio.

Se revisó el efecto de cada cepa sobre el crecimiento vegetal a través de una inspección visual (análisis cualitativo) y de las siguientes variables cuantitativas: elongación del tallo (desde el hipocótilo hasta la punta apical de la planta como se observa en la Fig. 6.5.1), peso seco de raíz (PSr), peso seco de tallo (PSt) (sin considerar el peso de los cotiledones) y número de raíces, junto con determinaciones de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y peroxidasa (POX) (Mendarte-Alquisira *et al.*, 2016; Alcántara-Martínez, 2013; Rojas-Loria, 2010). Para comprobar el establecimiento P-HE, se realizaron observaciones por microscopía electrónica de barrido (MEB), según se muestra en la sección 6.6 de Materiales y Métodos, junto con pruebas de endofiticidad para comprobar el crecimiento de *M. robertsii*. Para la prueba de endofiticidad, se cortó tejido vegetal de raíz, tallo y hoja de plantas con 14 días de interacción P-HE a partir del día 0, como se detalló más arriba, este día 0 se toma a partir de que las plántulas alcanzaran un tallo de entre 8-10 cm (Fig. 6.5.1). Cada fragmento cortado de raíz, tallo y hoja, se desinfectó utilizando etanol al 70% por 60 segundos y NaClO al 1.5% por 10 min; entre cada cambio se utilizó agua destilada estéril. Para el caso de la raíz hubo un lavado previo con Tween 80 al 0.05% por 3 min, esto para facilitar el desprendimiento de los conidios. Una vez completada la desinfección, se cortaron en 4 partes y se adhirieron a placas con PDA, se incubaron las placas durante 7 días a 28 °C dejando una huella en otra placa de PDA como control. Además, se realizaron pruebas de endofiticidad, junto con los respectivos controles, de cortes tanto en raíz, tallo y hoja de plantas con 30 días de interacción P-HE, y tejido vegetal de raíz y hoja de plantas con 90 días de interacción P-HE a partir del día 0. Se desinfectó utilizando etanol al 70% por 60 segundos y NaClO al 1.2%, 1.8% y 2% para hoja, tallo y raíz por 10 min respectivamente; entre cada cambio se utilizó agua destilada estéril (Greenfield *et al.*, 2016; Parsa *et al.*, Sasan y Bidochka, 2012).

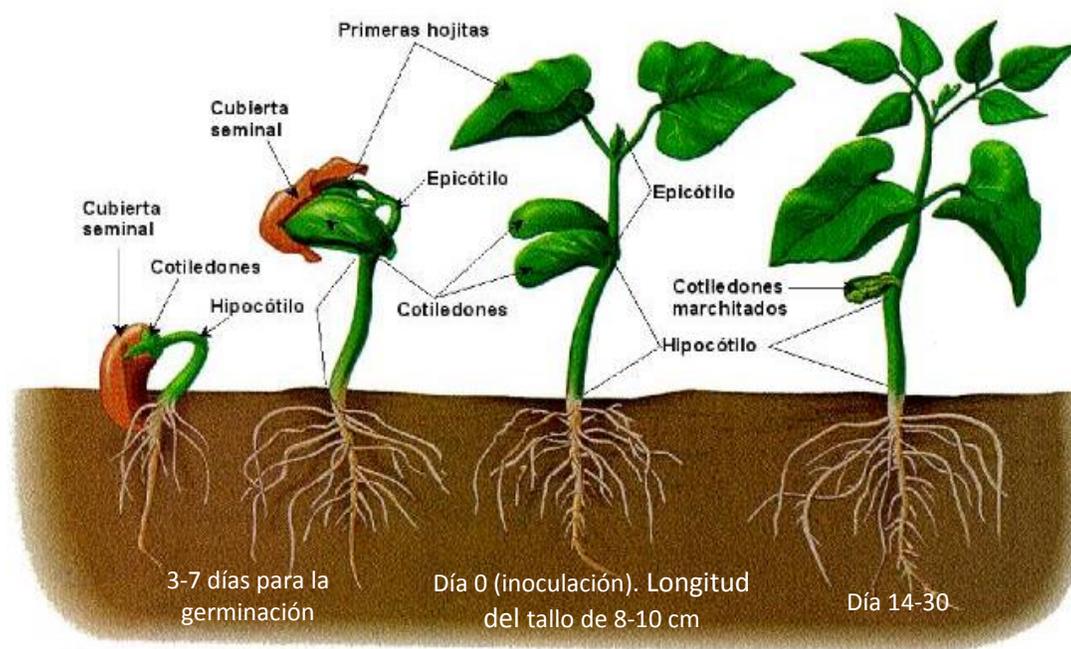


Fig. 6.5.1. Zonas características de *P. vulgaris* y su crecimiento. Se observan las partes importantes de *P. vulgaris* y el tiempo transcurrido entre cada etapa de su crecimiento desde su germinación hasta su maduración. Fuente: cienciasnaturalesonline.com

### 6.6 Preparación de muestras para microscopía electrónica de barrido (MEB)

Se realizaron observaciones del establecimiento P-HE por MEB utilizando la cepa *M. robertsii* con 10 días de interacción en medio MS5 a partir del día 0, la planta control recibió el mismo tratamiento exceptuando la ausencia del HE. El primer paso fue fijar muestras de raíz, tallo y hoja de plantas con 10 días de interacción con *M. robertsii* en glutaraldehído al 3% en solución amortiguadora de fosfatos 0.02 M, pH 7.2 (Gomori, 1955), durante 48 horas. Una vez transcurrido este tiempo, el glutaraldehído se retiró por decantación y se reemplazó inmediatamente por amortiguador de fosfatos 0.02 M, pH 7.2, se realizaron de 3 a 5 lavados de 5 min cada uno. Después del lavado se realizó una deshidratación con soluciones de alcohol (de 30 a 100%) durante 15 min en cada cambio. La deshidratación de las muestras culminó con la desecación al punto crítico utilizando para ello el equipo denominado desecador al punto crítico (SAMDRI-780B. Tousimis®) con CO<sub>2</sub> para lo cual las muestras se colocaron en cápsulas microporosas embebidas en alcohol al 100% e incorporando etiquetas de papel bond escritas a lápiz para identificarlas. Las muestras se montaron en soportes de aluminio y se recubrieron con una capa de oro de 500 Å de grosor en un recubridor de oro (BAL-TEC SDC 050) (Bozzola, et al, 1991); se observaron en un microscopio electrónico de barrido (JEOL modelo JSM-5900LV) y se obtuvo material micrográfico (Bello *et al.*, 2017; Castillo-Minjarez, 2015; Barbosa-Martínez, 2003).

### 6.7 Pruebas para establecer la relación P-HE en condiciones de estrés inducido por PEG

Una vez establecida la relación P-HE, se prosiguió con la tercera fase del experimento, limitar a la asociación P-HE a condiciones de estrés inducido por PEG. En este punto como se detallará más adelante, los resultados preliminares mostraron que *M. robertsii* y el medio MS5 fueron los candidatos idóneos para el crecimiento adecuado de *P. vulgaris*. De la misma manera como se realizó en las pruebas de establecimiento P-HE, se tomó como el día 0 cuando las plántulas alcanzaron una longitud de tallo de entre 8-10 cm (4-8 días de crecimiento después de ser trasplantadas a medio MS5), y se seleccionaron al azar las plántulas control, así como las inoculadas con conidios de *M. robertsii* ( $6 \times 10^6$  con/mL), a nivel de raíz. El estrés se realizó trasplantando a las plantas control e inoculadas con 14 días de interacción P-HE con MS5 y con MS5 más polietilenglicol (PEG) 6000 al 1% y 2%, y PEG 8000 al 7% de la marca *Sigma-Aldrich*, teniendo un diseño factorial 2<sup>2</sup>. El experimento duró un total de 30 días (+/- 1 día) a partir del día 0 (Fig. 2). Este mismo método, se empleó para las plantas ocupadas en la extracción de pigmentos (Sección 4.7), peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (sección 6.10) y peroxidasa (sección 6.11).

Se revisó el efecto de la interacción P-HE en condiciones de estrés inducido por PEG a través de una inspección visual (análisis cualitativo) y de las siguientes variables cuantitativas: elongación del tallo, peso seco de raíz (PSr), peso seco de tallo (PSt) y número de raíces (crecimiento y biomasa), junto con determinaciones de pigmento, peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y peroxidasa (POX). El diagrama del tiempo de experimentación (Fig. 6.7.1), explica de manera gráfica todos los experimentos elaborados.

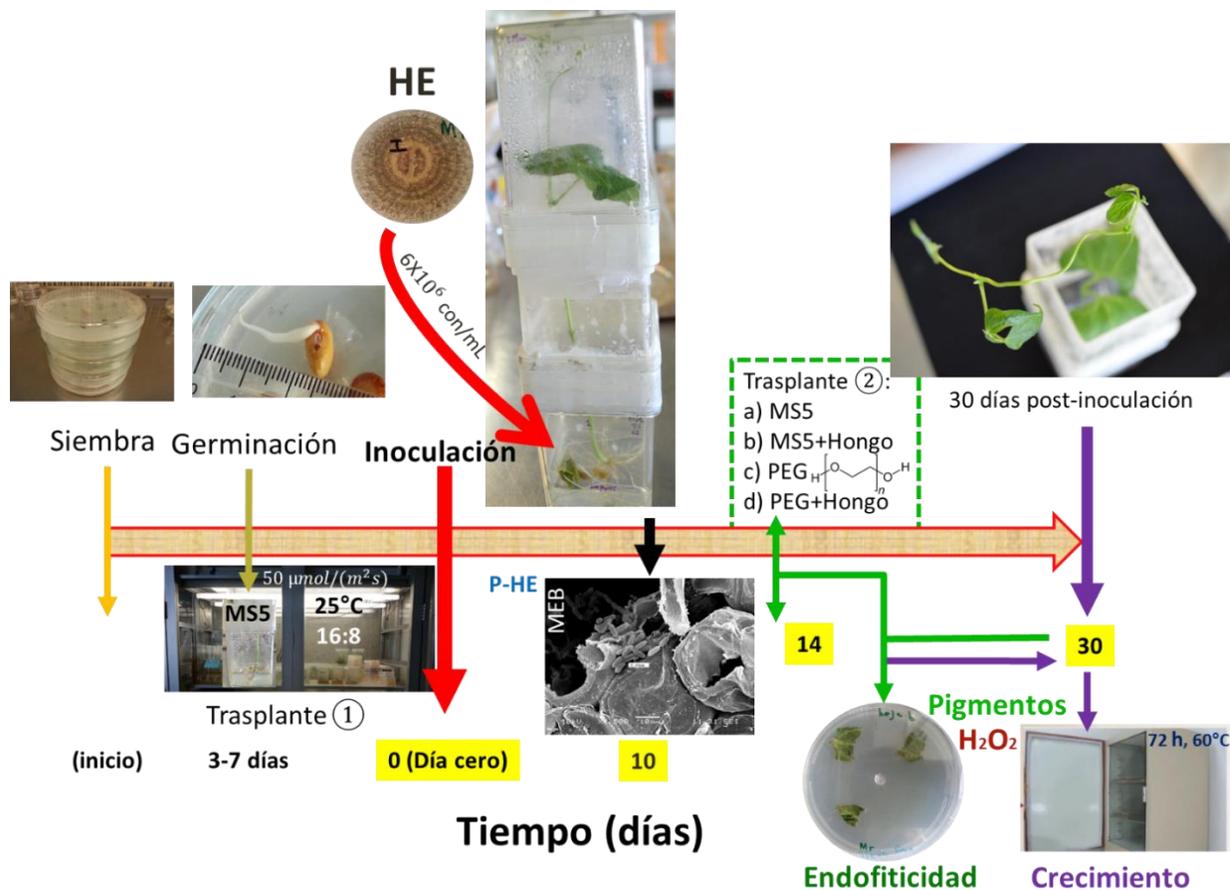


Fig. 6.7.1. Diagrama esquemático del tiempo de experimentación para la interacción P-HE en condiciones de estrés inducido por PEG.

## 6.8 Procedimiento para la extracción de pigmentos

Para la extracción y cuantificación de pigmentos se ocuparon muestras frescas de hoja de *P. vulgaris* tratadas con PEG al 1%, tanto con *M. robertsii* y sin el HE, como se explica en la sección 6.7. De las muestras de hoja se cuantificó tanto el área foliar aproximada como el peso fresco. Para cada tratamiento, se utilizó un solo foliolo lateral a nivel de la tercera trifoliación del tallo. Una vez medido y pesado, el foliolo se cortó en fragmentos pequeños y se maceró con ayuda de mortero con pistilo, se agregaron 3 mL de acetona al 100% al momento de macerar, se recuperó todo el sobrenadante en un tubo Eppendorf de 5 mL agregando 2 mL más de acetona al 100%, de tal manera que el volumen final de la muestra fue de 5 mL. La muestra se homogeneizó en vórtex por 30 s y después se centrifugó a 2500 rpm a 20 °C durante 10 min, se extrajo el sobrenadante, se hizo una dilución 1:5 con agua destilada y las absorbancias se leyeron en un espectrofotómetro UV-visible (Varian, 50 Conc.), utilizando como blanco acetona al 100%. Se ha reportado que con acetona, la clorofila "a" presenta el máximo de absorbancia a 662 nm, la clorofila "b" a 645 y el total de carotenoides a 470

nm. La cantidad de estos pigmentos se calculó de acuerdo con las fórmulas de Lichtenthaler y Wellburn (1985; Dere *et al.*, 1998), que se muestran a continuación:

- $C_a = 11.75 A_{662} - 2.350 A_{645}$
- $C_b = 18.61 A_{645} - 3.960 A_{662}$
- $C_{x+c} = (1000 A_{470} - 2.270 C_a - 81.4 C_b)/227$   
 Donde  $C_a$  = Clorofila "a",  $C_b$  = Clorofila "b",  $C_{x+c}$  = Carotenoides totales

### 6.9 Obtención de extractos crudos (EC)

Para las pruebas de cuantificación de  $H_2O_2$  y POX, se ocuparon extractos crudos de *P. vulgaris*, los cuales fueron previamente tratados con y sin PEG al 1%, tanto con *M. robertsii* y sin la cepa, como se explica en la sección 4.4 y 4.6. Al término del tiempo de cultivo correspondiente, las plántulas se cosecharon y se separaron en raíces y tallos. Las raíces se lavaron con agua destilada para eliminar el medio sobrante. Cada tejido en fresco, se pulverizó por separado con  $N_2$  líquido durante 5 minutos y el pulverizado se almacenó a  $-70^\circ C$  en un ultra congelador (New Brunswick, U9270-0000), para su uso posterior. El tejido pulverizado se resuspendió y homogeneizó con 1 mL de la solución correspondiente por cada 100 mg de tejido fresco. Todas las muestras se trataron a  $4^\circ C$  para la obtención de los extractos crudos (EC) (Alcántara-Martínez, 2013).

### 6.10 Peróxido de hidrógeno $H_2O_2$

Los tejidos frescos fueron homogeneizados en buffer de fosfatos de sodio frío (50 mM, pH 7) con 1% de polivinilpirrolidona y 5 mM de KCN para después ser centrifugados a 12000 rpm por 10 min a  $4^\circ C$ , se extrae el sobrenadante (EC). El EC se mezcló con la solución de reacción que contenía sulfato ferroso amónico (250  $\mu M$ ), sorbitol (100  $\mu M$ ), y naranja de xilenol (100  $\mu M$ ) en etanol al 1% con 25 mM de  $H_2SO_4$ . La mezcla fue incubada a temperatura ambiente ( $23^\circ C$ ) por 30 min, y el complejo formado entre  $Fe^{2+}$  y el naranja de xilenol fue espectrofotométricamente medido a 560 nm (Varian, 50 Conc.). La curva patrón de  $H_2O_2$  fue preparada con agua destilada en un intervalo de concentración de 0.5 a 80  $\mu M$  (Mendarte-Alquícira, 2013; Cheeseman, 2006).

### 6.11 Peroxidasa total (G-POX)

La actividad peroxidasa total se determinó mediante el método descrito por Maehly (1954), usando guayacol (G-POX) como sustrato donador de  $H^+$ . El método cuantifica la tasa de utilización de

peróxido para formar un cromóforo (tetra-guayacol) que absorbe a 415 nm (Chance y Maehly, 1955). Para cada tejido fresco se utilizó buffer de fosfatos de sodio 50 mM (pH 7) con inhibidor de proteasas (P8215, *Sigma*, 5  $\mu$ L/100 mg de tejido fresco); el homogenizado se centrifugó a 14000 rpm a 4°C por 15 min, se extrae el sobrenadante (EC). La mezcla de reacción contenía 200  $\mu$ L de buffer de fosfatos de sodio (50 mM, pH 7), 10  $\mu$ L de guayacol (1% preparado en buffer de fosfatos de sodio 50 mM, pH 7), 20  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 mM preparado en buffer de fosfatos de sodio 50 mM, pH 7) y 10  $\mu$ L de EC. La reacción se inició con la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y en el blanco éste se sustituyó por buffer (50 mM, pH 7). La actividad G-POX se determinó en un lector de microplacas, a través del aumento en la absorbancia a 415 nm, considerando un  $\epsilon$  de 16.8 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Maehly, 1954). Una unidad G-POX se definió como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 mmol de tetra-guayacol por minuto a 26°C y pH 7 (Mendarte-Alquisira *et al.*, 2016; Alcántara-Martínez, 2013).

### 6.12 Análisis estadístico

Se realizaron análisis estadísticos ocupando los paquetes estadísticos de NCSS, SPSS con niveles de significancia  $\alpha = 0.05$ . En la primera etapa experimental se obtuvieron los valores de germinación de las plantas. Para la segunda etapa del experimento, establecimiento P-HE y se obtuvo la interacción más adecuada, tomando en cuenta el crecimiento de la planta. En la tercera etapa experimental se realizó un análisis estadístico factorial en dos fases. En primer lugar, se ocupó la P-HE con los mejores niveles de establecimiento. Después, se evaluó el efecto del estrés inducido por PEG en la interacción Planta-HE. Los datos obtenidos se evaluaron tomando en cuenta el crecimiento de la planta con las variables cuantitativas como peso seco de raíz (PSr), peso seco de tallo (PSt), elongación del tallo y número de raíces.

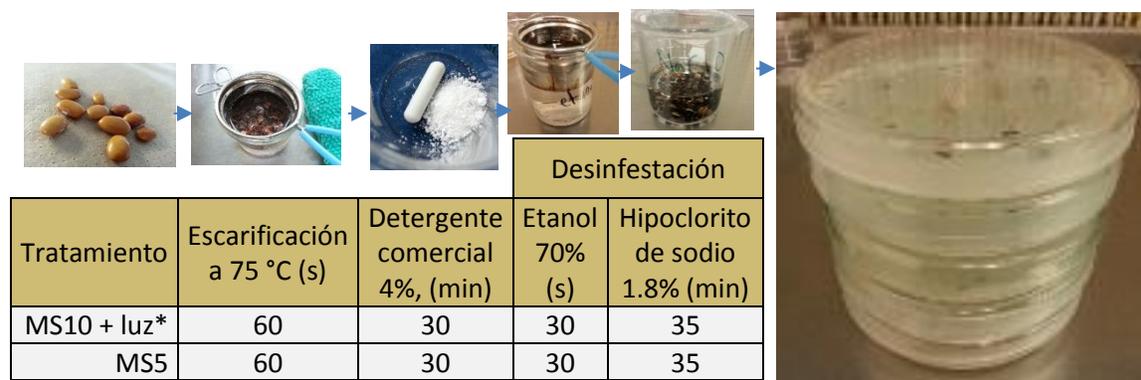
## 7. Resultados

Este capítulo de resultados se dividirá en varias partes, iniciando con la selección de las plantas con las que se ensayó y demostró la interacción planta – hongo entomopatígeno (P-HE). Se presentarán también los ciclos biológicos de estas plantas en condiciones de huerto urbano para mostrar que se trabajó con semillas capaces de producir plantas sanas. Después se presentarán las variables que se midieron en las plantas donde se probó la endofiticidad a partir de distintos cortes de los tejidos vegetales. La parte final corresponde a la prueba de resistencia al polietilenglicol (PEG), causante de estrés de plantas de *Phaseolus vulgaris* comparando con y sin la presencia del HE.

### 7.1 Resultados de la implementación de la técnica de germinación y crecimiento de *P. vulgaris*

Debido a la contaminación frecuente por crecimiento fúngico distinto a los hongos usados, así como de bacterias en las plantas y en los medios de agar-agua y MS (Fig. 7.1.1), también forma parte de los resultados la implementación de la técnica para la germinación y crecimiento de *P. vulgaris* (frijol) en condiciones axénicas (solamente el desarrollo de la planta con o sin (c/s) HE). Para ello, se experimentaron diferentes tiempos de escarificación, inmersión en etanol e inmersión en NaClO para desinfectar, por lo cual, se hicieron 3 experimentos, los cuales se muestran en las Tablas 7.1.1, 7.1.2 y 7.1.3.

Tabla 7.1.1. Diagrama básico para la escarificación y desinfección de las semillas de *P. vulgaris* (Experimento 1)



Se pueden observar las condiciones para el primer experimento donde se probaron 2 medios diferentes MS y para uno de los tratamientos \*con luz desde el inicio de la siembra. 4 cajas Magenta por tratamiento con 2 semillas por caja. MS = medio Murashige-Skoog, MS5 = MS con 5 g/L de sacarosa, MS10 = con 10 g/L de sacarosa, s = segundos, min = minutos.

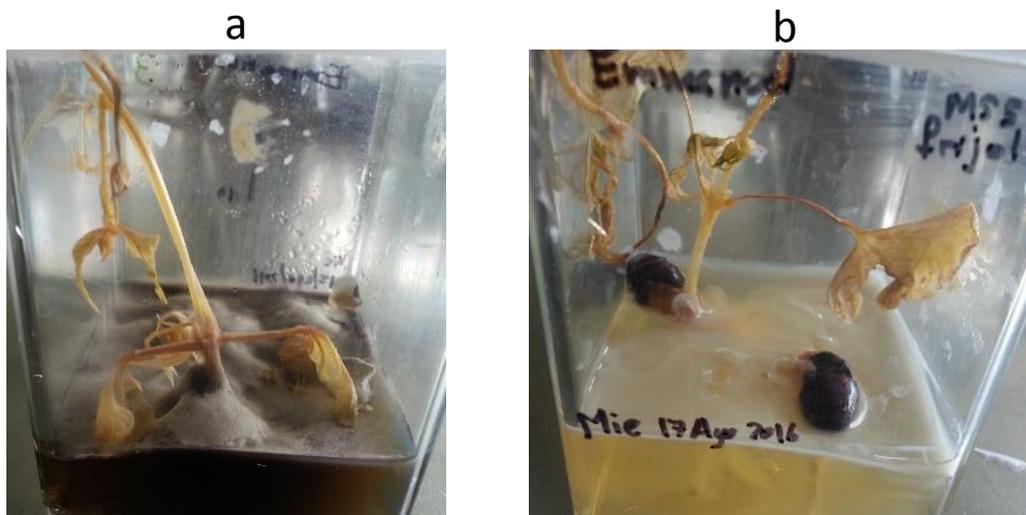


Fig. 7.1.1. Plantas de frijol con MS10 + luz\* presentando contaminación fúngica (a), y plantas con MS5 presentando crecimiento bacteriano (b).

Tabla 7.1.2. Condiciones de escarificación y desinfestación para las semillas de *P. vulgaris* (Experimento 2)

Tratamiento	Escarificación a 75 °C (s)	Detergente comercial 4%, (min)	Desinfestación	
			Etanol 70% (min)	Hipoclorito de sodio (% , min)
MS5	60	30	1	1.8%, 40

Las semillas todavía presentaban contaminación en algunos casos, por esa razón se incrementaron los tiempos de escarificación. MS = medio Murashige-Skoog, MS5 = MS con 5 g/L de sacarosa, s = segundos, min = minutos.

Tabla 7.1.3. Condiciones de escarificación y desinfestación para las semillas de *P. vulgaris* (Experimento 3)

Tratamiento	Escarificación a 75 °C (s)	Detergente comercial 4%, (min)	Desinfestación	
			Etanol 70% (min)	Hipoclorito de sodio (% , min)
<b>a) MS5</b>	<b>60</b>	<b>30</b>	<b>2</b>	<b>2.0%, 50</b>
b) MS5	60	30	2	4.0%, 50

Las semillas presentaban ligera contaminación tanto para el caso "a" como el "b". Se tomó el tratamiento "a" como el más adecuado. MS5 = MS con 5 g/L de sacarosa, s = segundos, min = minutos.

En el experimento 1 (Tabla 7.1.1) se probaron medios y condiciones de desinfestación diferentes, incluyendo los medios MS10 y MS5 y NaClO al 1.8% a diferentes tiempos utilizando 4 cajas Magenta por tratamiento con 2 semillas por caja. Los mejores resultados de este primer experimento con *P.*

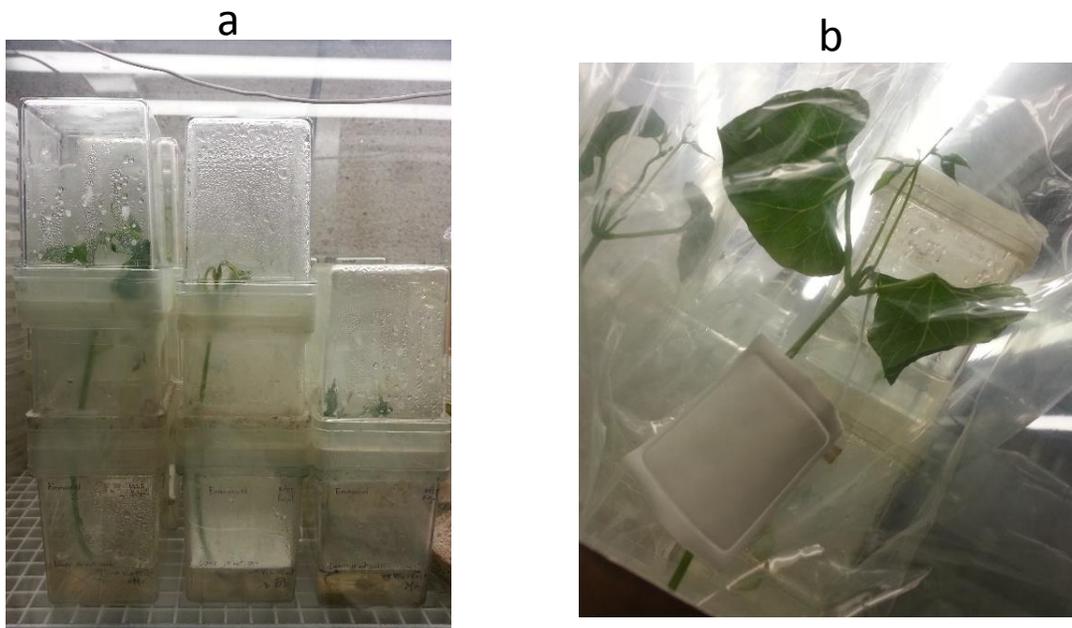


Fig. 7.1.2. Plántulas de *P. vulgaris* dentro de cajas Magenta ajustadas (a), y en bolsas para plantas de la marca Sigma (b). Se puede observar que las plántulas crecieron mejor en las bolsas de Sigma.

*vulgaris* se presentaron con el medio MS5, ya que las plántulas en el medio MS10 presentaron contaminación fúngica (Fig. 7.1.1a), aproximadamente de un 80 %; sin embargo, aunque el medio MS5 fue más adecuado, las plántulas seguían presentando contaminación bacteriana (Fig. 7.1.1b), pero en una menor medida. Se realizó un segundo experimento donde se aumentó el tiempo de inmersión en NaClO al 1.8% (Tabla 7.1.2), y como resultado hubo un menor número de semillas contaminadas por caja. Para seguir aminorando la contaminación de las semillas, se realizó un experimento 3 (Tabla 7.1.3), donde se incrementó la concentración de NaClO y los tiempos de inmersión, dando por resultado leves apariciones fúngicas y bacterianas. Esto dio por resultado que la contaminación se redujo considerablemente. La técnica que mejor se adecuó al tratamiento de germinación y crecimiento de *P. vulgaris* es la “a” (Tabla 7.1.3), ya que una concentración alta de NaClO, podría aumentar la oxidación en las semillas. Las condiciones de “a” son exactamente las mismas mencionadas en la sección 6.3 de Materiales y Métodos como método idóneo de escarificación, desinfección y crecimiento de *P. vulgaris*.

Además de los tratamientos, otra problemática a resolver fue el crecimiento acelerado de *P. vulgaris*, para ello, se tuvieron que ajustar las cajas Magenta (Fig. 7.1.2a), dado que las plántulas alcanzaban una altura del tallo de aproximadamente 10 cm entre 4-7 días después de trasplantar la semilla germinada al medio MS, y una vez alcanzado el tope de la caja, la plántula corría el riesgo de fracturarse, entonces se optó como mejor opción las bolsas para plantas de la marca Sigma (Fig. 7.1.2b), en lugar de usar las cajas Magenta modificadas.

## 7.2 Resultados de la germinación de *P. vulgaris*

Las semillas de *P. vulgaris* del experimento 1 con medio MS5 (Tabla 7.1.1), presentaron una CDG promedio del  $57.1\% \pm 20.20$  con un TMG promedio de  $3.0 \pm 0.88$  días (1 lote con 6 cajas, 7 semillas por caja). En cuanto a las semillas del experimento 2 (Tabla 7.1.2), éstas presentaron una CDG promedio del  $77.1\% \pm 17.68$  con un TMG promedio de  $3.8 \pm 0.79$  días (1 lote con 8 cajas, 6 semillas por caja). Por otro lado, las semillas del experimento 3 tratamiento “a” (Tabla 7.1.3), presentaron una CDG promedio del  $62.5\% \pm 21.65$ , con un TMG promedio de  $4.0 \pm 0.34$  días (1 lote con 3 cajas, 8 semillas por caja; Fig. 7.2.1a). Las semillas del experimento 3 tratamiento “b” (Tabla 7.1.3), presentaron una CDG promedio del 75%, con un TMG promedio de  $3.2 \pm 0.39$  días (1 lote con 3 cajas, 8 semillas por caja; Fig. 7.2.1b).

Como se ha mencionado, los experimentos 1 y 2 presentaron contaminación fúngica y bacteriana, por ello se incrementó la concentración de NaClO, así como el tiempo de inmersión de las semillas en esta solución (experimento 3). En el experimento 3 se probaron 2 concentraciones de NaClO, al 2% y al 4%, en ambos casos las semillas presentaron ligera contaminación, y debido a que no se presentó una diferencia considerable entre la CDG y TMG de “a” y “b”, se optó por el tratamiento “a” (donde se ocupó una concentración de NaClO del 2%), como el más adecuado para germinar y desinfectar las semillas de *P. vulgaris*.

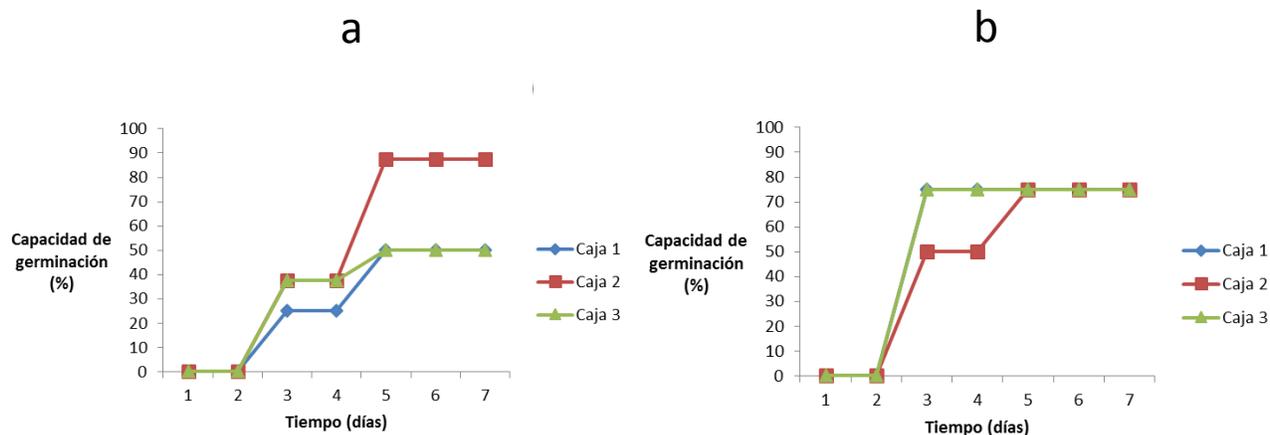


Fig. 7.2.1. Germinación de frijol con NaClO al 2% como desinfectante (a), y con NaClO al 4% (b). Los gráficos muestran la CDG de *P. vulgaris* utilizando concentraciones de NaClO al 2% y al 4% por 50 min para desinfectar las semillas. La caja 1 de la fig. b, no se observa porque las semillas tuvieron una CDG similar a la caja 3 y las curvas se traslapan.

### 7.3 Resultados preliminares de crecimiento de *P. vulgaris* en condiciones de huerto urbano

Debido a que las plantas no completaron su ciclo biológico en las condiciones propuestas de laboratorio, inclusive para plantas con casi 4 meses de crecimiento *in vitro*, se sembraron semillas de *P. vulgaris* en condiciones de huerto urbano, para así comprobar su germinación, crecimiento y productividad de las semillas utilizadas en el experimento.

Los resultados mostraron una germinación del 60 % de las 20 semillas en total utilizadas para este experimento (4 semillas por maceta). También se observó que las plantas en condiciones de campo completan su ciclo (Figs. 7.3.1 y 7.3.2).

A continuación, se describe la cronología del ciclo biológico de las semillas de *P. vulgaris* de Cholula, Puebla: **a)** 19 de octubre 2016, siembra en tierra, **b)** 5-15 de enero 2017, floración (Fig. 7.3.1), **c)** 20 de enero 2017 formación de la vaina (Fig. 7.3.2a), **d)** 30 de enero al 5 de marzo 2017, maduración de la vaina (Fig. 7.3.2b) y **e)** 6 de marzo 2017, cosecha (semillas maduras).

Las semillas de *P. vulgaris* que no germinaron en PDA y que fueron utilizadas para la germinación y crecimiento en huerto urbano, presentaron una capa mucilaginosa. Al inicio se sospechó de crecimiento bacteriano (lo cual todavía no queda del todo descartado), posiblemente esta capa protegió a las semillas de una germinación precoz, como en el caso de la planta *Ocimum basilicum* (albahaca) (Zhou, 2012).



Fig. 7.3.1. *P. vulgaris* puesta en condiciones de huerto urbano con 3 meses de crecimiento. Se puede observar la floración de *P. vulgaris* de semillas no germinadas en el laboratorio. La flecha roja señala la flor (a), además, se puede observar un acercamiento a la flor (b).



Fig. 7.3.2. Maduración de la vaina de *P. vulgaris* puesta en condiciones de huerto urbano con 3-4 meses de crecimiento. Se puede observar el fruto (vainas), no maduro de la planta de *P. vulgaris* con 3 meses de crecimiento (a), además, se puede observar la vaina madura (planta con 4 meses de crecimiento), como indica la flecha roja (b).

#### 7.4 Resultados de crecimiento con 14 días de interacción P-HE

Para este análisis, se tomaron en cuenta las variables cuantitativas como peso seco de raíz (PSr) (Fig. 7.4.1A), peso seco de tallo (PSt) (Fig. 7.4.1B), elongación del tallo (Fig. 7.4.2A) y número de raíces (Fig. 7.4.3A), a partir de plantas con 14 días de interacción con los HE utilizados (*Bb*, *Mr* e *If*). Estos resultados se presentan en las figuras por variable y tratamientos (control y los HE inoculados), las cuales se analizaron con los paquetes estadísticos Prism, NCSS y SPSS. Algunas plantas tratadas con HE presentaron ligera clorosis, sin embargo, esto no afectó su biomasa (Fig. 7.4.4).

Como se puede observar en las figuras de las variables cuantitativas analizadas, ninguno de los tratamientos presentó diferencias significativas (ANOVA,  $\alpha = 0.05$ , comparación de medias por Tukey,  $n = 6, 4, 6, 3$ ). En cuanto al PSr (Fig. 7.4.1A), hay datos entre 40-120 mg, y en el caso de PSt (Fig. 7.4.1B), entre los 100-170 mg. Para el caso de longitud del tallo, la medida se tomó a partir del inicio del tallo (hipocótilo) hasta la punta apical del mismo como indican las flechas rojas de la Fig. 7.4.2B. La longitud oscila entre los 20-35 cm para estos tratamientos (Fig. 7.4.2A). Para el caso de número de raíces (Fig. 7.4.3A), los datos se encuentran entre las 6-25 raíces contabilizadas, en este último punto, cabe señalar una tendencia de crecimiento radial para el tratamiento de *Mr* (Fig. 7.4.3B), a pesar de que estadísticamente no se observen diferencias significativas.

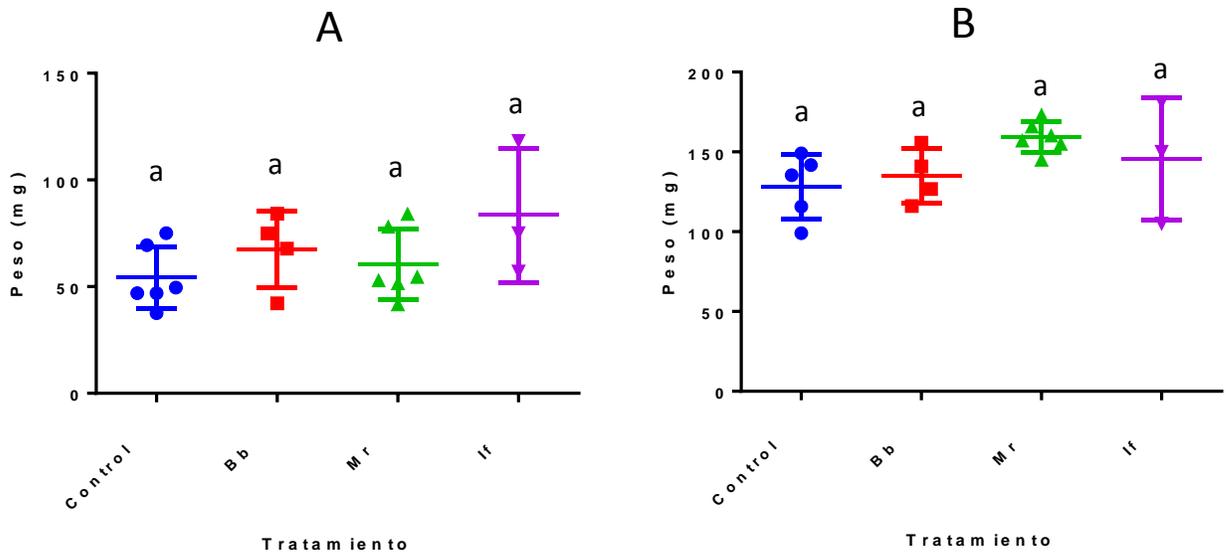


Fig. 7.4.1. Peso seco de raíces (A) y Peso seco de tallos (B). Se puede observar que PSt presenta una mayor biomasa seca que PSr. Las letras diferentes indican diferencias significativas, ANOVA,  $\alpha = 0.05$  (PSr  $p = 0.2117$ ; PSt  $p = 0.1169$ ), comparación de medias por Tukey,  $n = 6, 4, 6, 3$ .

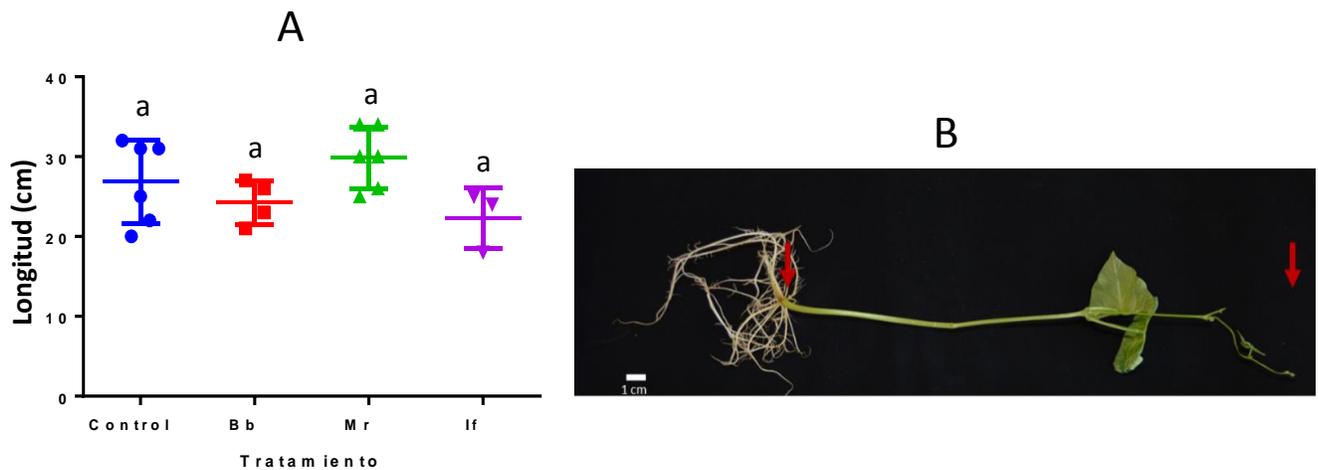


Fig. 7.4.2. Longitud del tallo. Se muestra el gráfico de las longitudes de los tallos medidos en las plantas (A) y un ejemplo de medición con una planta control (B). La medida del tallo se tomó a partir del inicio del tallo (hipocótilo) hasta la punta apical del mismo como indican las flechas rojas (B). Las letras diferentes indican diferencias significativas, ANOVA,  $\alpha = 0.05$  ( $p = 0.0832$ ), comparación de medias por Tukey,  $n = 6, 4, 6, 3$ . cm = centímetros

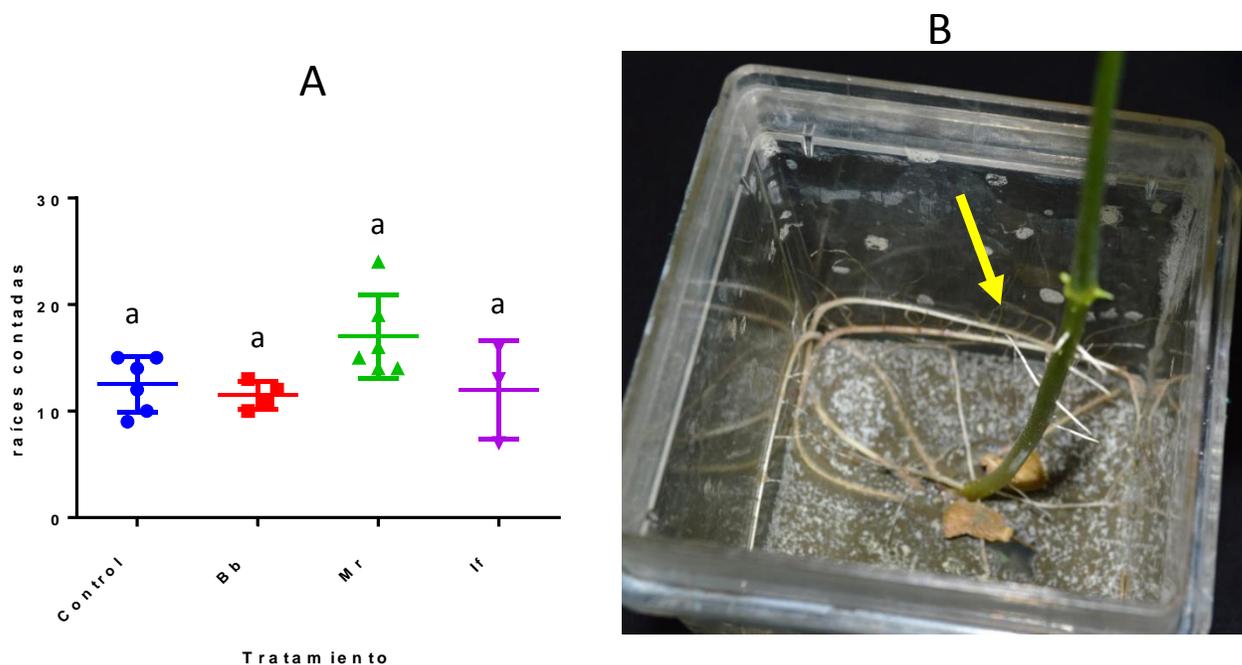


Fig. 7.4.3. Número de raíces. Se puede observar el gráfico del número de raíces contadas por cada planta (A). Algunas de las plantas tratadas con *Mr* presentaron crecimiento radicular entre la parte inicial del tallo (hipocótilo) y las cicatrices de los cotiledones como señala la flecha amarilla (B). Las letras diferentes indican diferencias significativas, ANOVA,  $\alpha = 0.05$  ( $p = 0.0513$ ), comparación de medias por Tukey,  $n = 6, 4, 6, 3$



Fig. 7.4.4. Planta tratada con *Mr*, la flecha blanca indica ligera clorosis en las hojas simples, sin embargo, no afectó su biomasa

### 7.5 Resultados de crecimiento con 3 meses de interacción *P. vulgaris* - *M. robertsii*

Se muestran los resultados cualitativos de crecimiento con 3 meses de interacción *P. vulgaris* - *M. robertsii*. Las plantas se inocularon a los 4 días de trasplantar la semilla germinada al medio MS0 (sin sacarosa). En un inicio se tenían 2 plantas tratadas con *Mr* y 1 planta control, las plantas con *Mr* sobrevivieron (Fig. 7.5.1A), sin embargo, la planta control murió a los 2 meses de crecimiento, justo después de hacer otro trasplante en medio MS0, debido a que el medio estuvo a punto de agotarse

(capa de 5 mm de alto en una caja Magenta). Las plantas tratadas con el HE sobrevivieron casi 4 meses (Fig. 7.5.1B y C); sin embargo, las plantas murieron cuando se realizó el tercer trasplante. De estas plantas se obtuvo prueba de endofiticidad en raíz y en hoja a los 3 meses de interacción que se encuentra en la sección 7.8.

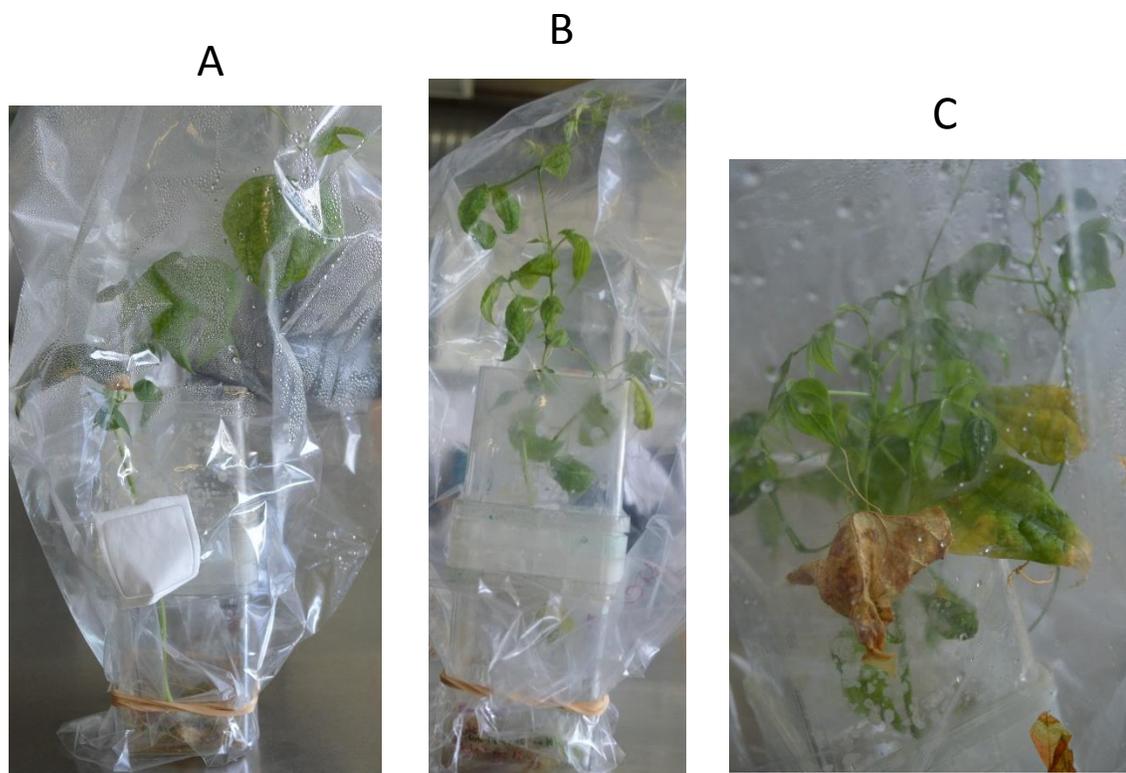


Fig. 7.5.1 Planta con 2 meses de interacción con *Mr* (A) y con 3 meses de interacción (B y C), en medio MS0. Se puede apreciar la gran cantidad de área foliar en las plantas, principalmente en las plantas B y C

#### 7.6 Resultados de la prueba de endofiticidad con 14 días de interacción P-HE

En esta sección se presentan los resultados de las pruebas de endofiticidad para la interacción *P. vulgaris-Mr* de 14 días, en placas con PDA para fragmentos de raíz (Figs. 7.6.1 y 7.6.2), raíz secundaria (Fig. 7.6.3), tallo (Figs. 7.6.4 y 7.6.5) y hoja (Fig. 7.6.6), con sus respectivos controles (huellas), además de vistas de hifas y conidios (Fig. 7.6.5D). Las pruebas resultaron positivas para la zona radicular y tallo. Los números romanos indican la proximidad hacia la zona media de la planta (hipocótilo), entre mayor sea el número, más alejado se encuentra de esta zona. La placa control (huella), de uno de los cortes de raíz (Fig. 7.6.2A), presentó contaminación de *Mr* como indica la flecha amarilla, lo que sugiere realizar una desinfección más agresiva.

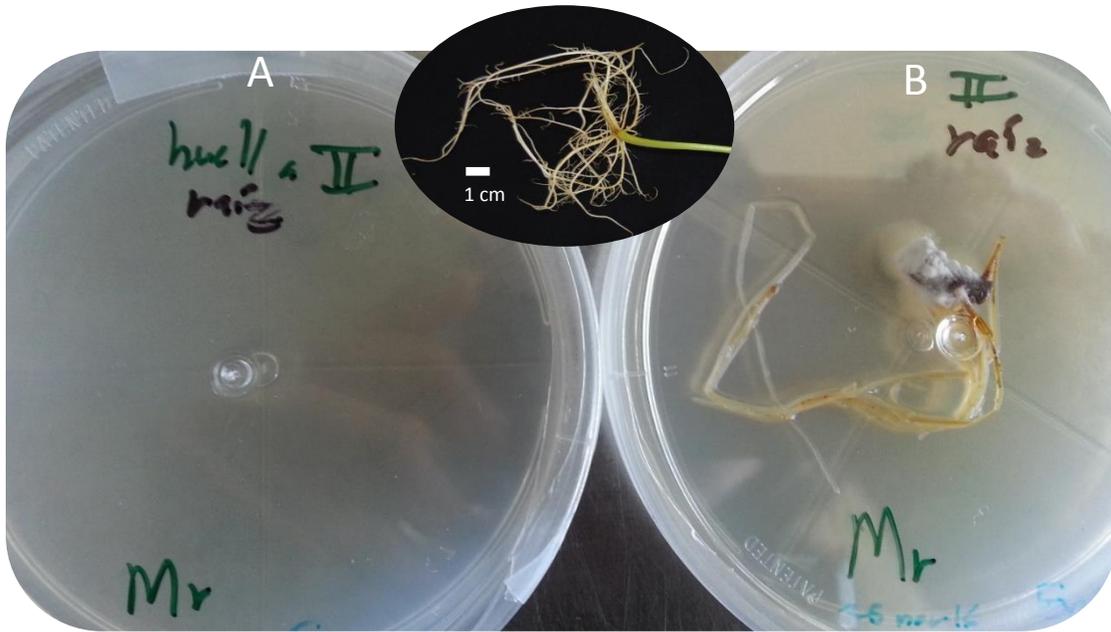


Fig. 7.6.1. Corte de raíz, parte media. 5 días en PDA. Se observa huella (control) (A), y fragmento de raíz con *Mr* (B).

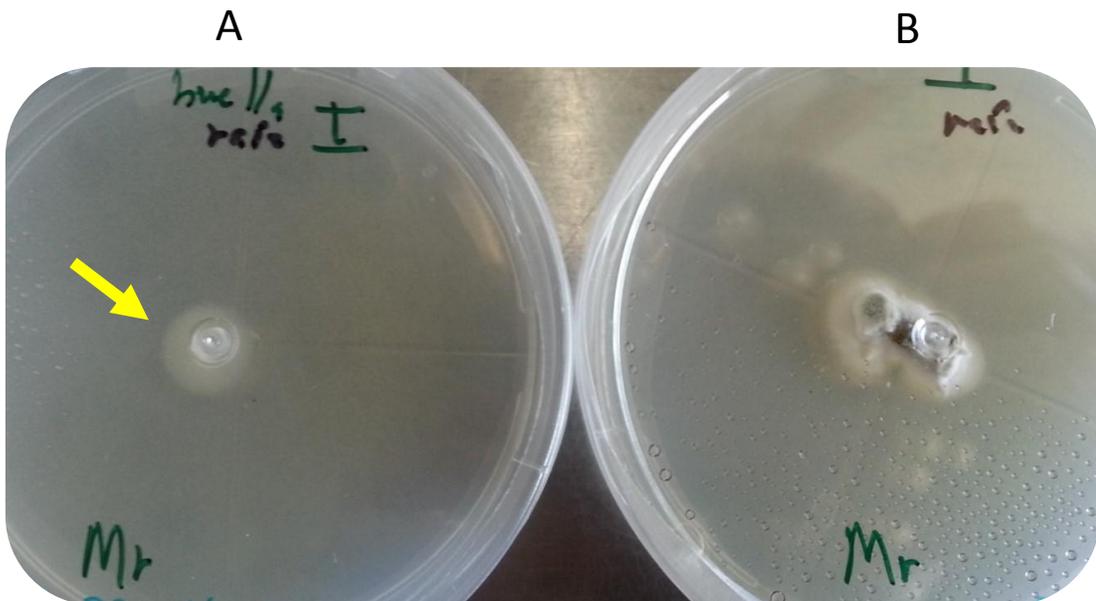


Fig. 7.6.2. Corte de raíz, parte más proximal al tallo. 5 días en PDA. Se observa huella (A), la flecha indica crecimiento de *Mr*, y fragmento de raíz con *Mr* (B).

Cabe aclarar que se hizo un seguimiento de cada una de las placas cada 7 días después de tomar las imágenes, en ninguna creció algo fuera de lo normal de lo ya antes mencionado.



Fig. 7.6.3. Corte de raíz secundaria. 10 días en PDA. Se observa huella (A), y raíz secundaria con *Mr* (B).

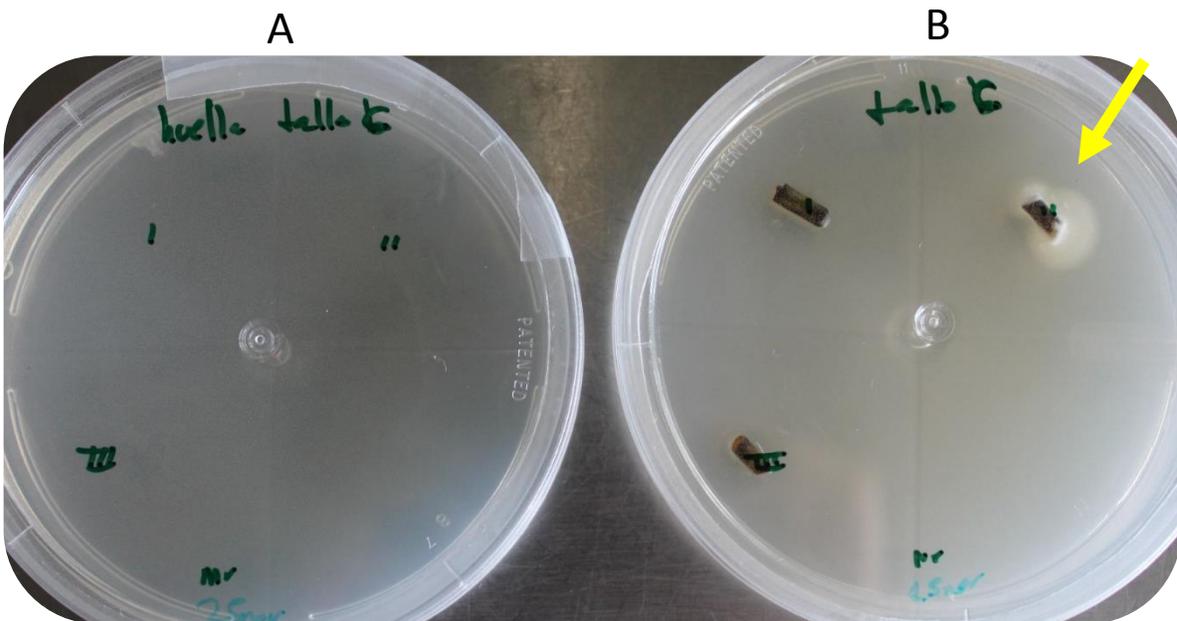


Fig. 7.6.4. Corte de tallo, parte distal (a nivel de los cotiledones). 10 días en PDA. Se observa huella (A), y fragmento de tallo con *Mr* donde la flecha amarilla indica (B).

En las Figura 7.6.3B se puede observar el crecimiento radial característico del género *Metarhizium*, con coloraciones verde oscuras en la zona de los conidios a blancas en la zona de las hifas.

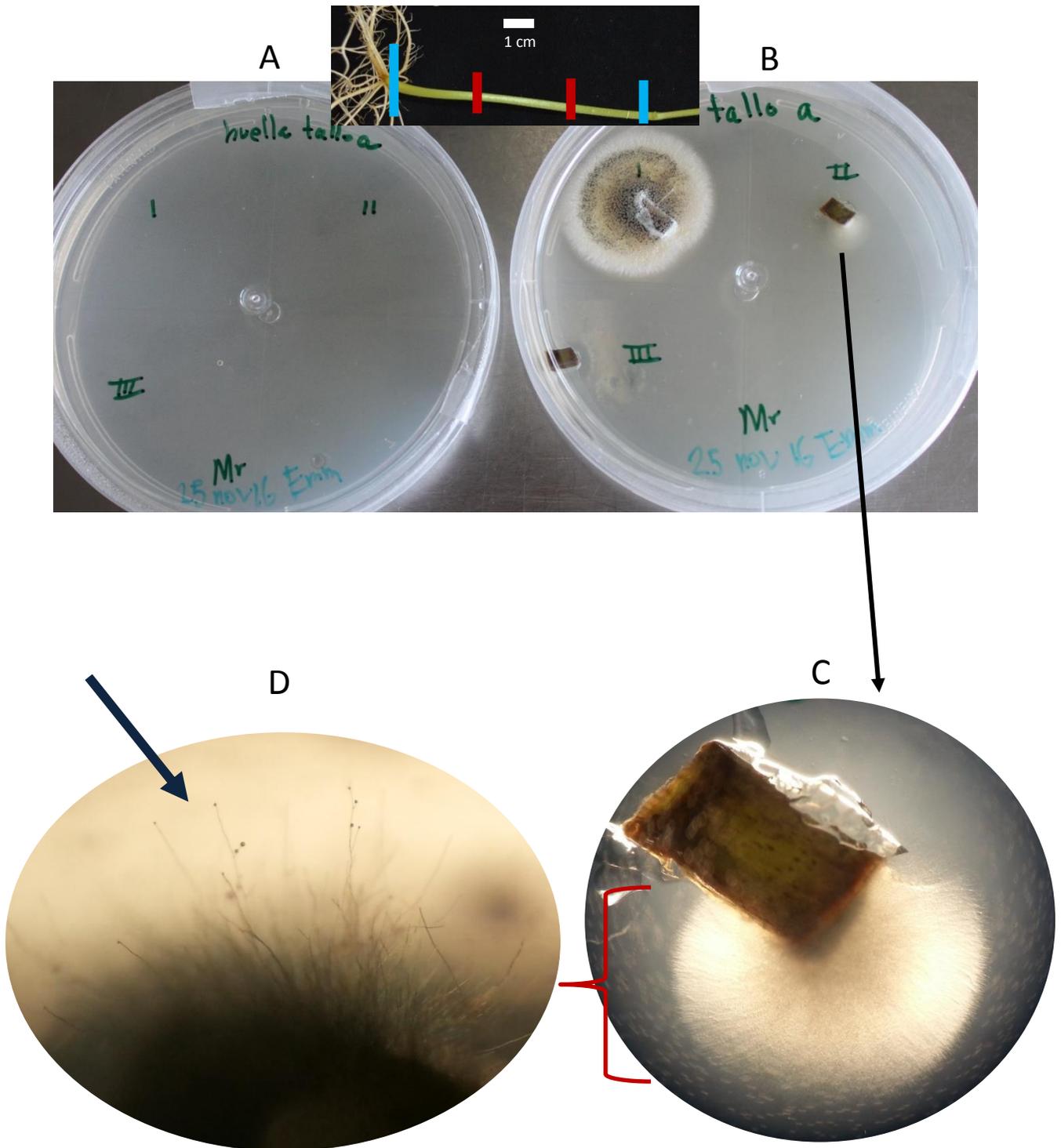


Fig. 7.6.5. Corte de tallo, zona del hipocótilo presentando crecimiento de *Mr.* 10 días en PDA. Se observa huella (A), fragmentos de tallo con *Mr* (B) con un acercamiento (C), e hifas y conidios (flecha), de una etapa inicial de *Mr* con 3 días de crecimiento en PDA a 4X (D).

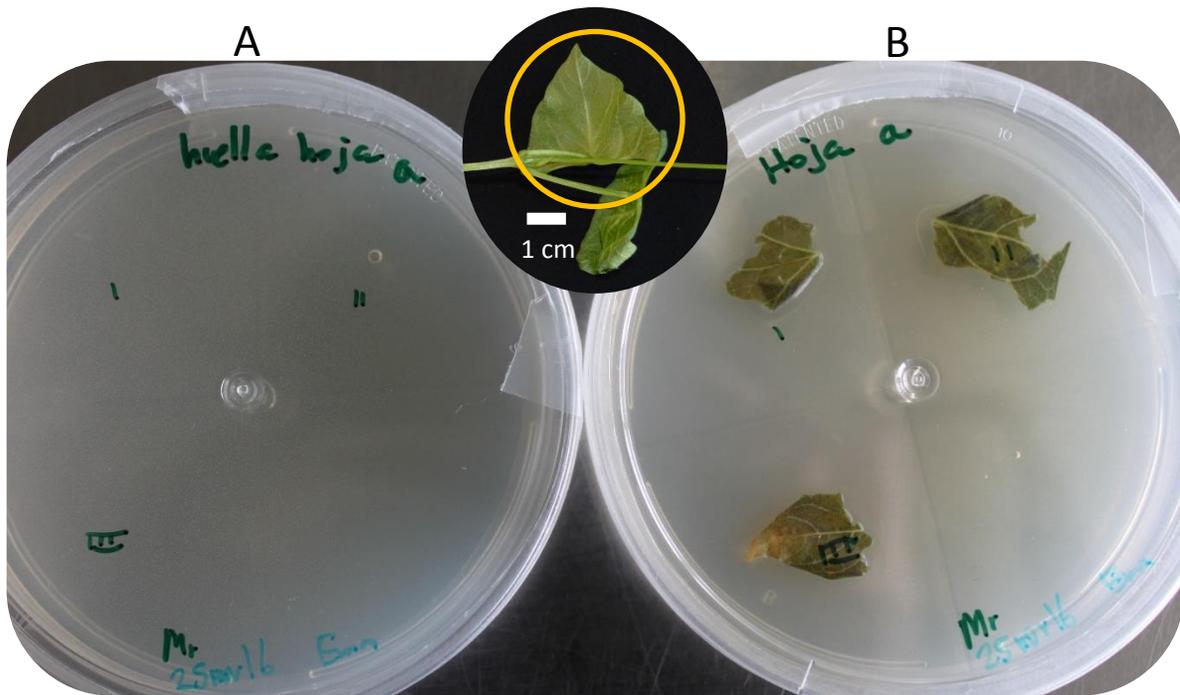


Fig. 7.6.6. Corte de hoja. 10 días en PDA. Se observa huella (A), y fragmentos de hoja sin crecimiento de *Mr* (B).

### 7.7 Resultados de la prueba de endofiticidad con 30 días de interacción P-HE

En esta sección se presentan los resultados de las pruebas de endofiticidad para la interacción *P. vulgaris*-*Mr* de 30 días, puestas en placas con PDA durante 10 días, para fragmentos de raíz (Fig. 7.7.2), tallo (Fig. 7.7.1), y hoja (Fig. 7.7.3), vistas de hifas y conidios en corte de raíz (Fig. 7.7.5), con sus respectivas placas control (huellas).

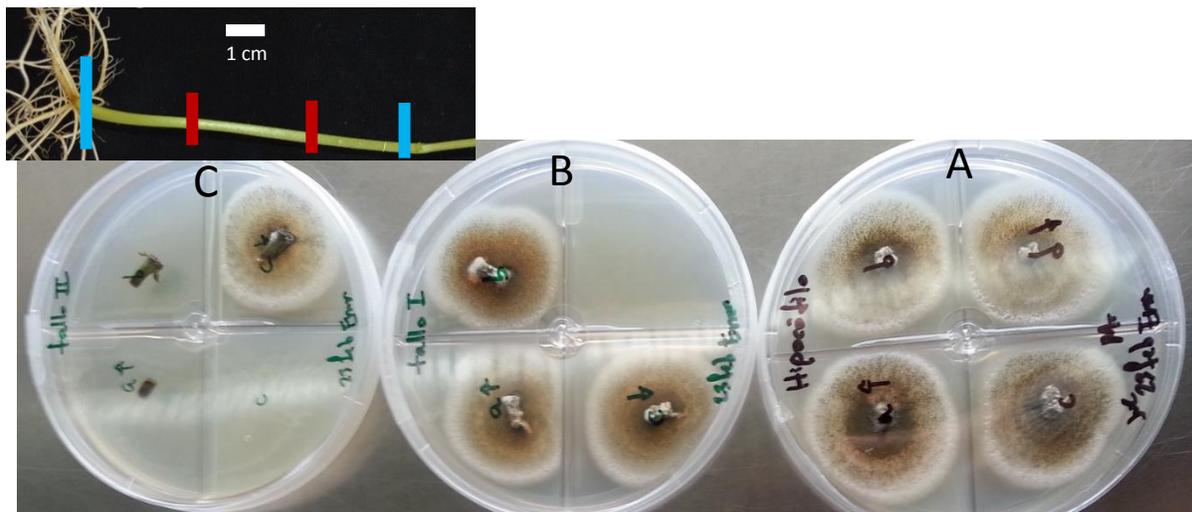


Fig. 7.7.1. Cortes de tallo con 30 días de interacción P-HE. 10 días en PDA. Se muestran los fragmentos de raíz con *Mr* a nivel de hipocótilo (A), entre hipocótilo y marca de los cotiledones (B) y a nivel de la marca de los cotiledones (C).

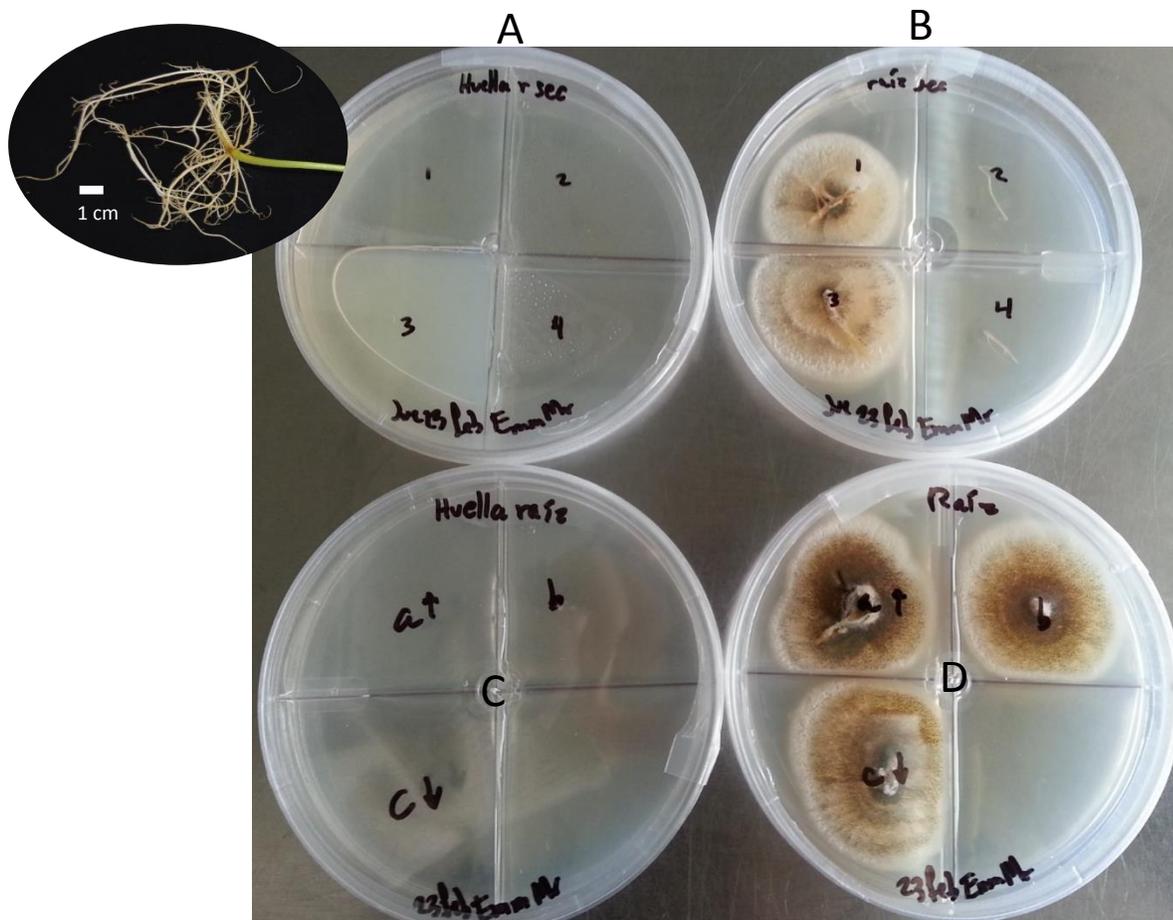


Fig. 7.7.2. Cortes de raíces con 30 días de interacción P-HE. 10 días en PDA. Se muestran los fragmentos de raíz con *Mr* (D), y los de raíces secundarias (B), con sus respectivos controles (C y A).

También se realizó prueba de endofiticidad en planta sin *Mr* (Fig. 7.7.4), donde se demuestra que no hay crecimiento de otro microorganismo. Como se muestra en las figuras, la prueba resulto positiva (crecimiento de *Mr*), para la parte inicial de la raíz, raíz secundaria, la parte inicial del tallo y la parte final del tallo (a nivel de los cotiledones). También se hicieron pruebas en plantas no inoculadas (control, Fig. 7.7.4), resultando negativas.

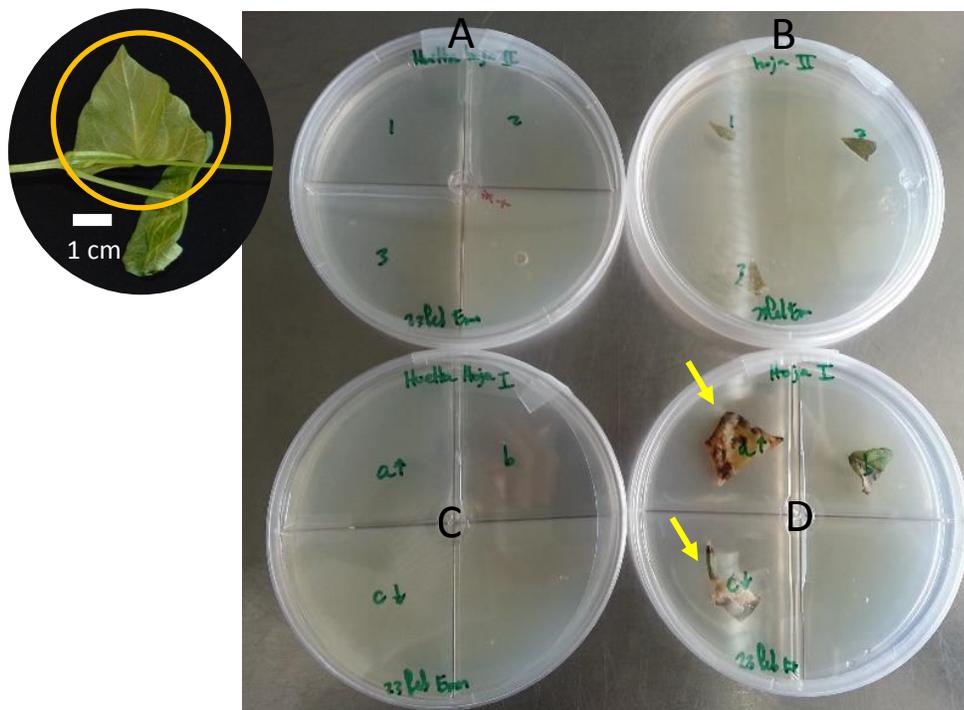


Fig. 7.7.3. Corte de hoja ( $5\text{mm}^2$ ) con 30 días de interacción. 10 días en PDA. Se muestran los fragmentos de hoja de plantas en interacción con *Mr* sin crecimiento del HE (B y D), con sus respectivos controles (A y C). Algunos fragmentos de hoja presentaron oxidación debido al contacto con el  $\text{NaClO}$  (flechas amarillas).

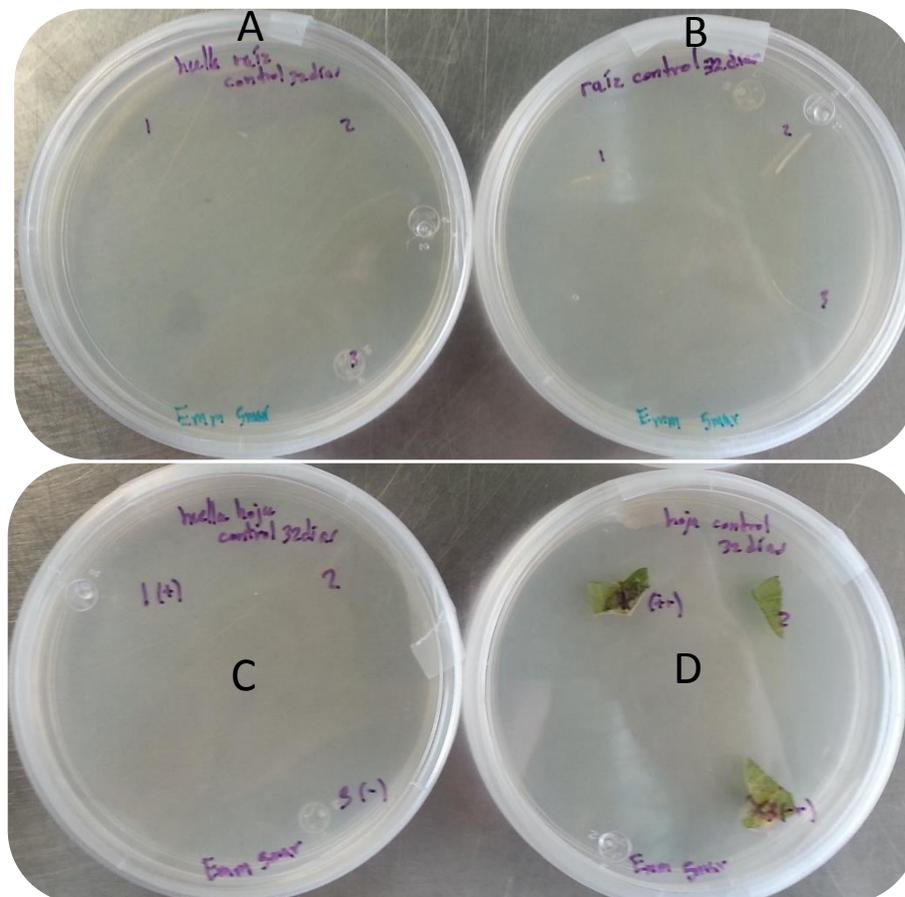


Fig. 7.7.4. Cortes de los controles de hoja y raíz con 30 días sin interacción P-HE. 10 días en PDA. Se muestran los fragmentos de raíz y de hoja de plantas sin *Mr* (B y D), con sus respectivos controles (A y C). Como se observa, no se presentó crecimiento alguno en ninguna de las placas.

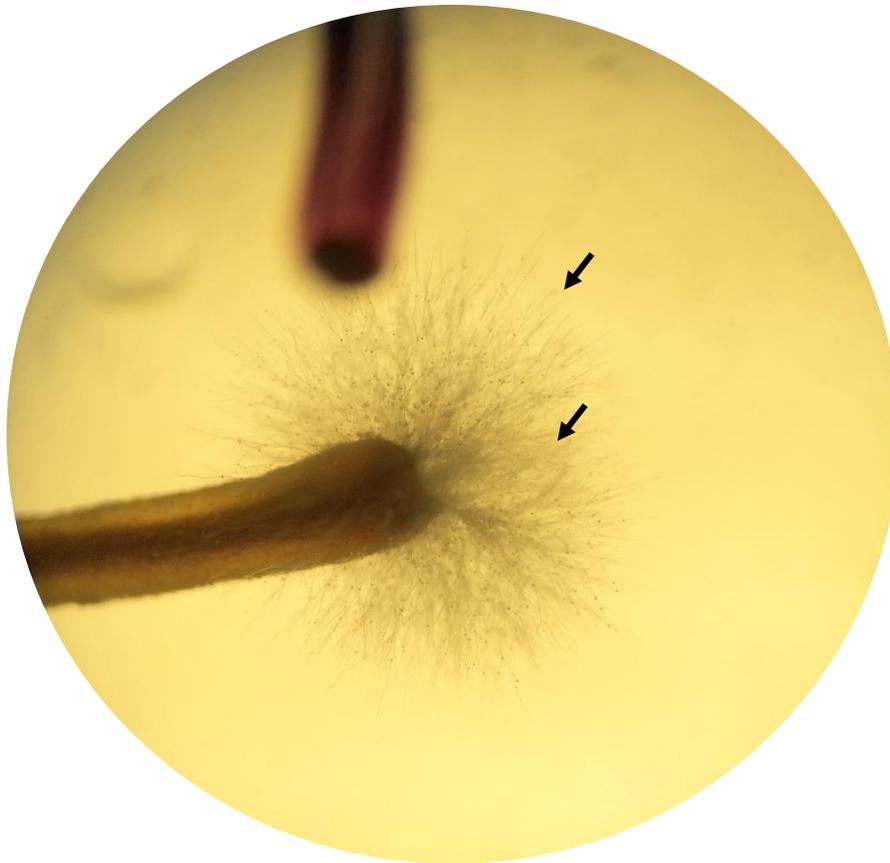


Fig. 7.7.5. Corte de raíz secundaria con 30 días de interacción. 3 días en PDA. Vista de hifas y conidios saliendo del corte de la raíz (flechas negras).

### 7.8 Resultados de la prueba de endofiticidad para plantas con 3 meses de interacción P-HE

Como se mencionó en la sección 7.5, a continuación, se presentan los resultados de las pruebas de endofiticidad para la interacción *P. vulgaris-Mr* de 3 meses, puestas en placas con PDA durante 15 días, para fragmentos de raíz (Figs. 7.8.1B), y hoja (Fig. 7.8.1D), con sus respectivos placas control (huellas) (Figs. 7.8.1A y 7.8.1C).



de raíz, micelio a nivel de hipocótilo (Fig. 7.9.6) y ausencia del hongo a nivel del tallo (Fig. 7.9.7), en plantas con 10 días de interacción con la cepa y su respectivo control.

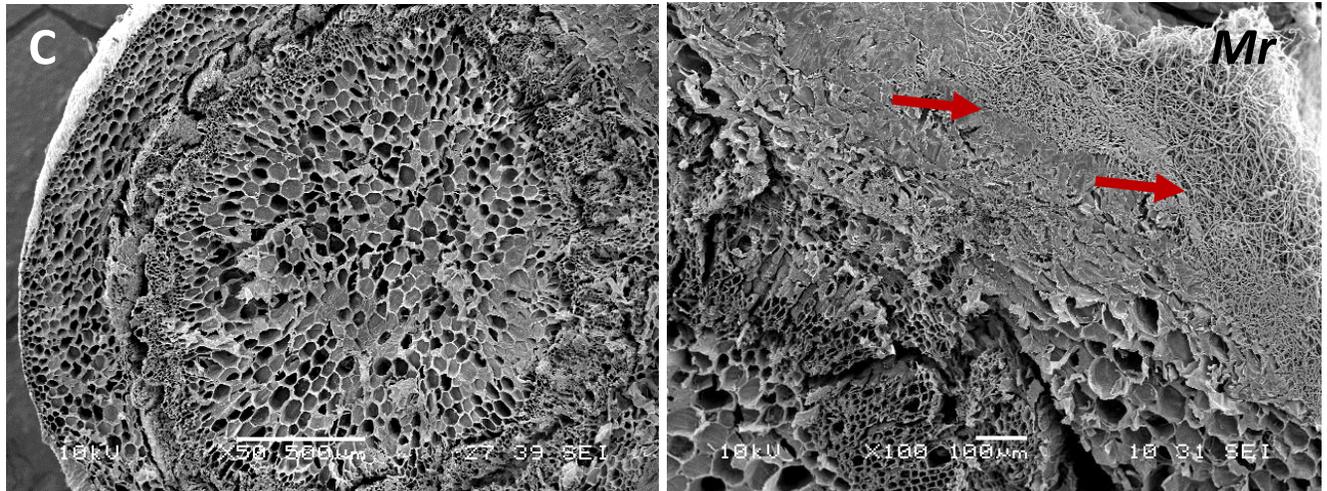


Fig. 7.9.1. Cortes de raíz de *P. vulgaris*. Se observa micelio de *M. robertsii* (*Mr*) en la epidermis de la raíz (flechas rojas), con 10 días de interacción con el HE, y planta control sin hongo (C).

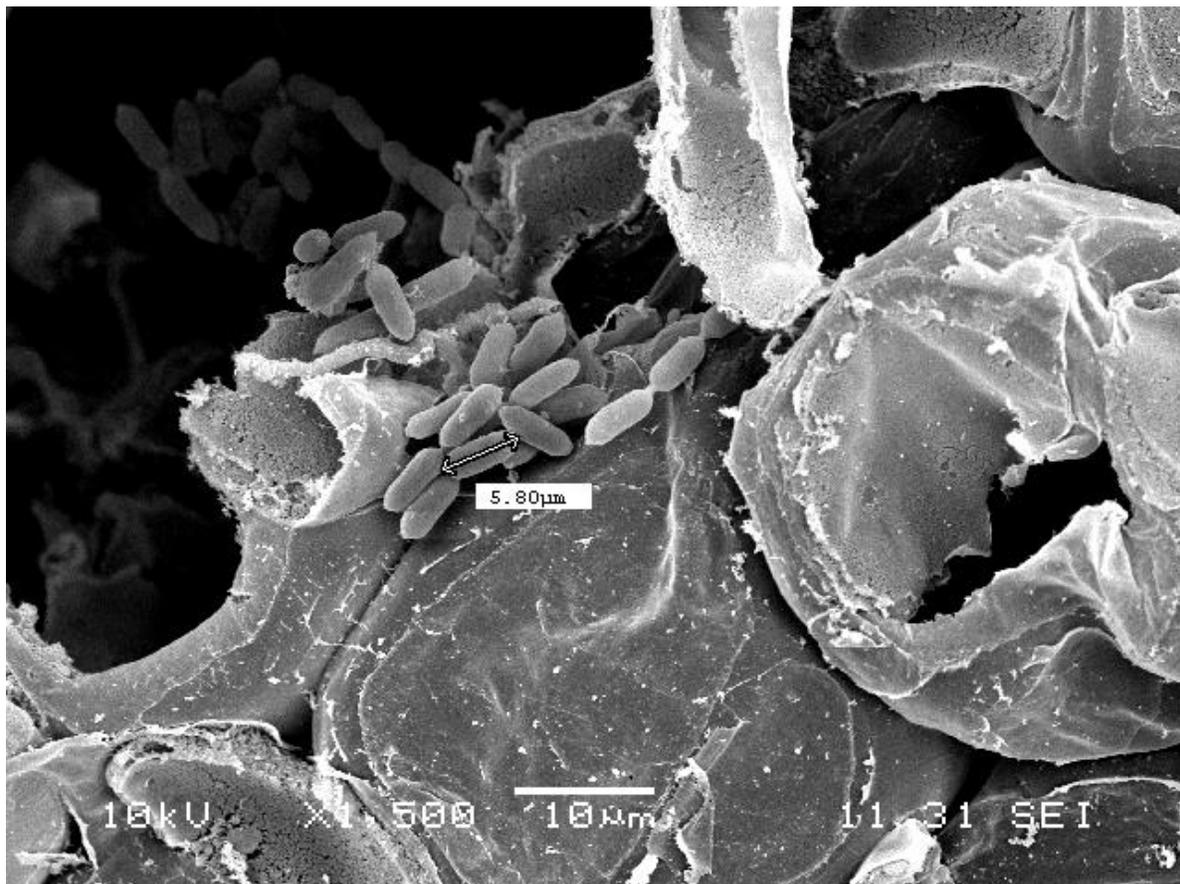


Fig. 7.9.2. Corte de raíz de *P. vulgaris*. Se observan conidios de *M. robertsii* de 5.80 µm. La muestra se tomó a los 10 días de interacción P-HE.

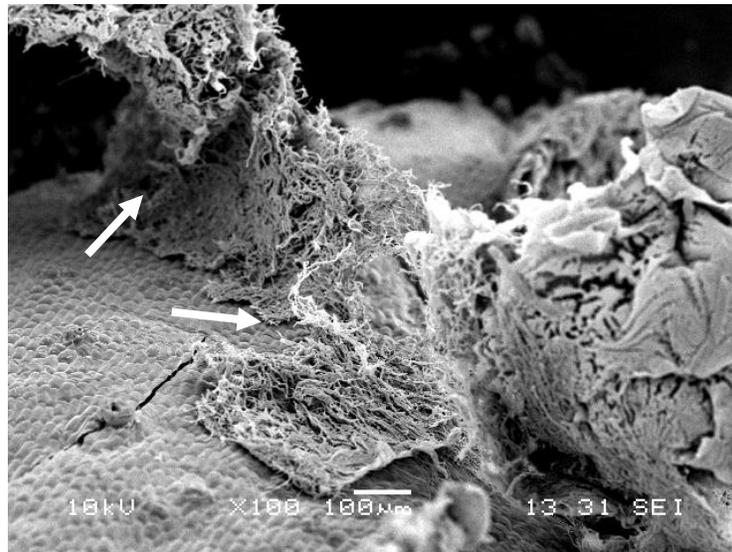


Fig. 7.9.3. Corte de raíz de *P. vulgaris*. Se observa micelio de *M. robertsii* en la epidermis de la raíz (flechas blancas). La muestra se tomó a los 10 días de interacción P-HE.

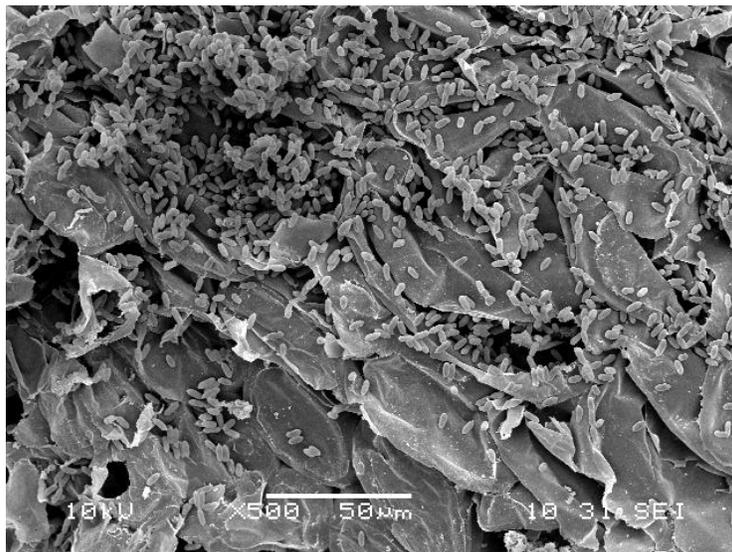


Fig. 7.9.4. Corte de raíz de *P. vulgaris*. Se observan conidios de *M. robertsii*. La muestra se tomó a los 10 días de interacción P-HE.

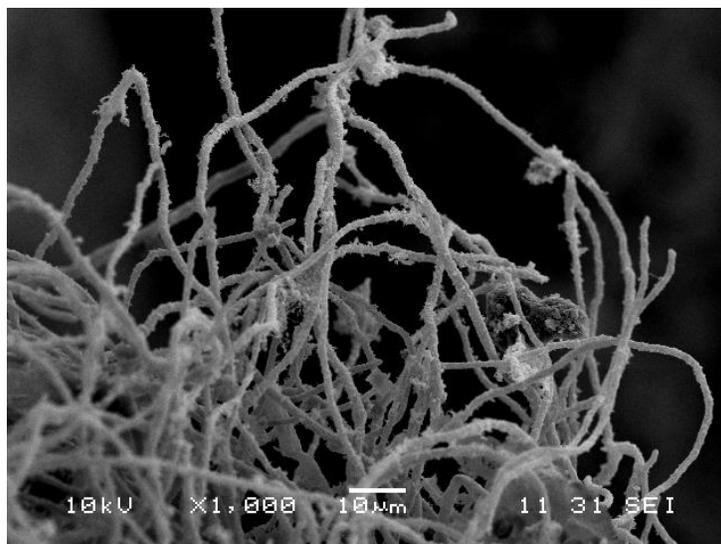


Fig. 7.9.5. Corte de raíz de *P. vulgaris* donde se observa micelio de *M. robertsii*. La muestra se tomó a los 10 días de interacción P-HE.

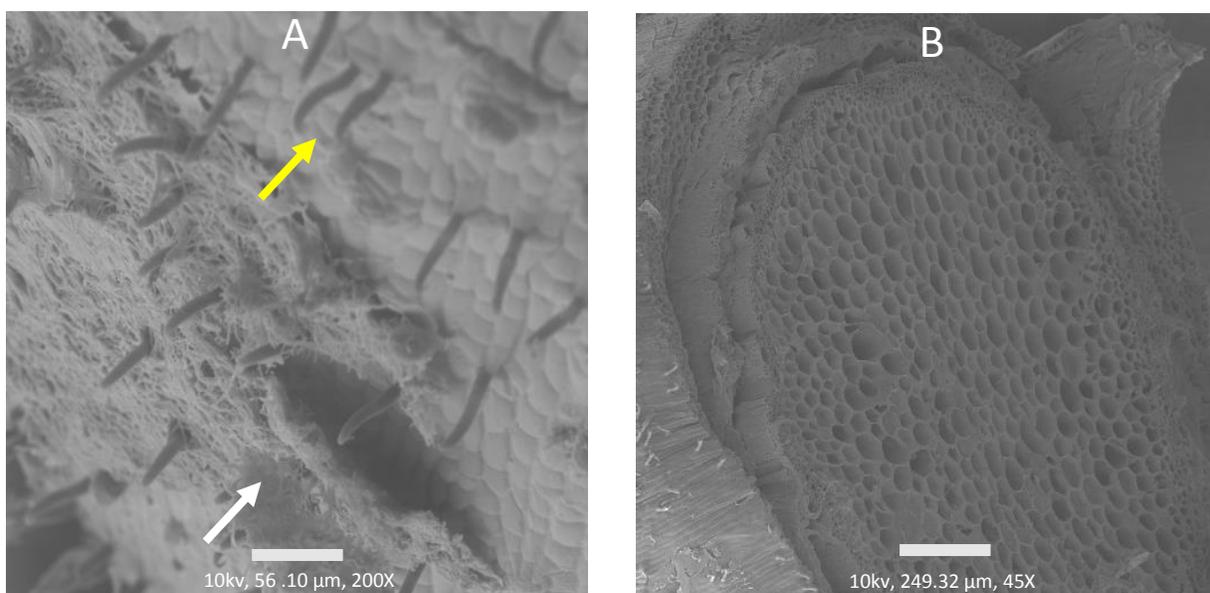


Fig. 7.9.6. Corte a nivel de hipocótilo (A), donde se observa micelio (flecha blanca) de *Mr* y vellosidades (flecha amarilla), y corte a nivel de tallo (debajo de la marca de los cotiledones) (B) de *P. vulgaris* con *M. robertsii*. La muestra se tomó a los 10 días de interacción P-HE.

### 7.10 Resultados de crecimiento de la interacción P-HE en condiciones de estrés por PEG

A partir de los resultados anteriores que muestran una asociación entre *P. vulgaris* y *Mr*, se procedió a las pruebas de estrés por PEG como se describe a continuación. Se tomaron en cuenta las variables cuantitativas peso seco de raíz (PSr), peso seco de tallo (PSt), elongación del tallo y número de raíces. Los datos se visualizan en las figuras 7.10.1-7.10.7 (exceptuando 7.10.6), organizadas por variable y tratamiento de la siguiente manera: control (sin*Mr*), plantas “control” inoculadas (con*Mr*), plantas con PEG sin la presencia de hongo (PEGsin), y con la presencia del hongo (PEG*Mr*), analizados con NCSS y SPSS.

Tomando en cuenta que se deseaba experimentar con diferentes niveles de estrés, los primeros experimentos se llevaron a cabo con PEG 8000 a una concentración de 7% por volumen de medio MS5 (Türkan, *et al.*, 2005). La sobrevivencia en este experimento fue del 66%, las plantas sufrieron un estrés extremo. Subsecuentemente, se redujeron los niveles al 2% y 1% con PEG 6000 (Burnett, *et al.*, 2005), obteniendo un estrés severo y moderado, respectivamente.

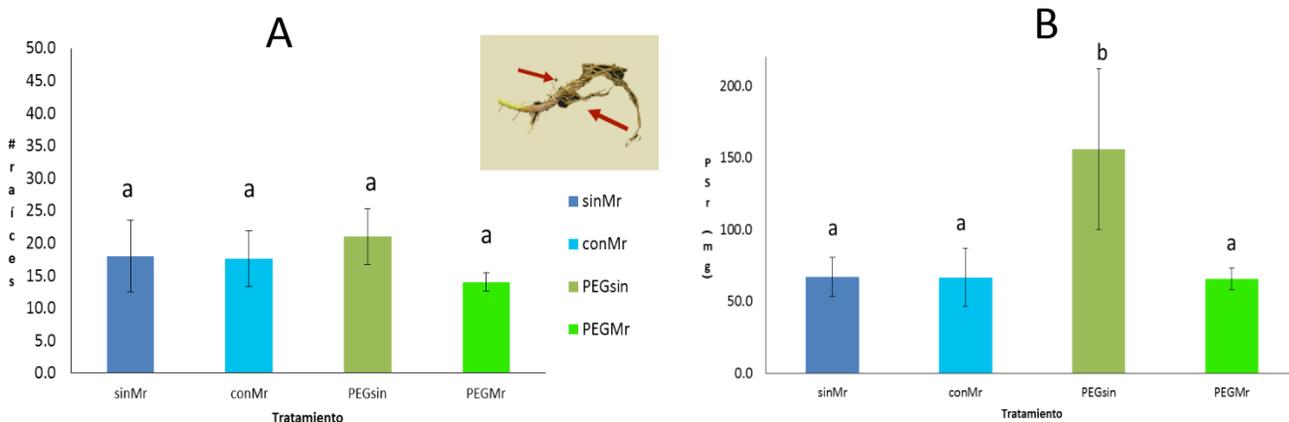


Fig. 7.10.1. Número de raíces (A), y peso seco de raíz (B) por cada planta con medio MS5 + PEG 8000 al 7%. Las letras diferentes indican diferencias significativas, ANOVA,  $\alpha = 0.05$  (# raíces  $p = 0.5188$ ; PSr  $p = 0.0079$ ), comparación de medias por Tukey,  $n = 4, 5, 2, 2$

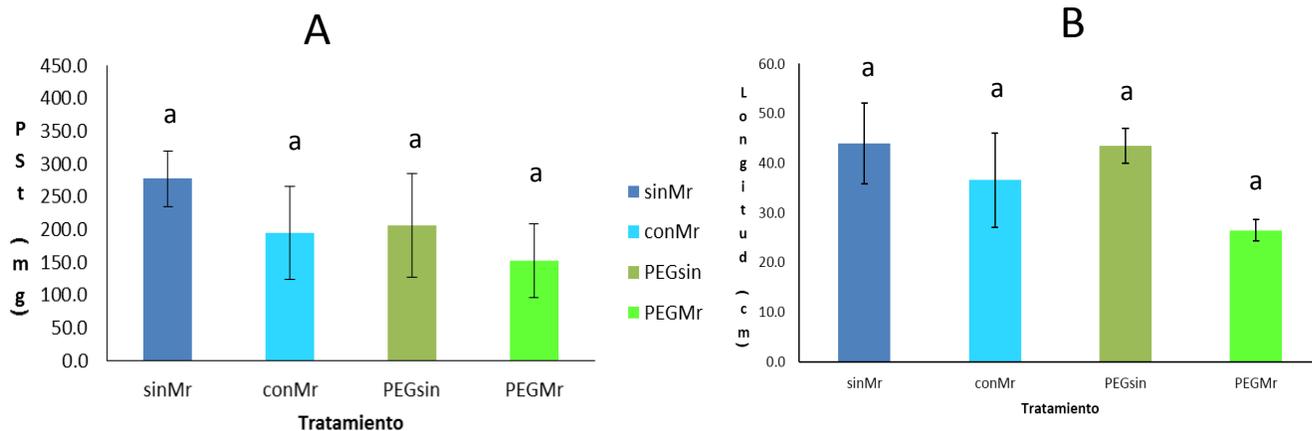


Fig. 7.10.2. Peso seco de tallo (A), y longitud del tallo (B), por cada planta con medio MS5 + PEG 8000 al 7%. Las letras diferentes indican diferencias significativas, ANOVA,  $\alpha = 0.05$  (PSt  $p = 0.1576$ ; Longitud del tallo  $p = 0.1263$ ), comparación de medias por Tukey,  $n = 4, 5, 2, 2$

Se pueden observar los resultados obtenidos de número de raíces (Fig. 7.10.1A), PSr (Fig. 7.10.1B), PSt (Fig. 7.10.2A), y longitud del tallo (Fig. 7.10.2B), por cada planta con medio MS5 + PEG 8000 al 7%, en general, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos (Figs. 7.10.1A y 7.10.2), exceptuando el caso de PSr tratamiento PEGsin (Fig. 7.10.1B), donde se observan diferencias significativas entre los grupos ( $p = 0.0079$ ). Además, la Fig. 7.10.3A, muestra un estrés extremo debido a PEG, como se ha mencionado, la sobrevivencia en este experimento fue del 66%, esto concuerda con lo reportado con plantas de *P. vulgaris* por Blum (2013) y algodón (Lawlor 1970), con respecto a la absorción de PEG hacia el interior de las plantas provocando estrés.

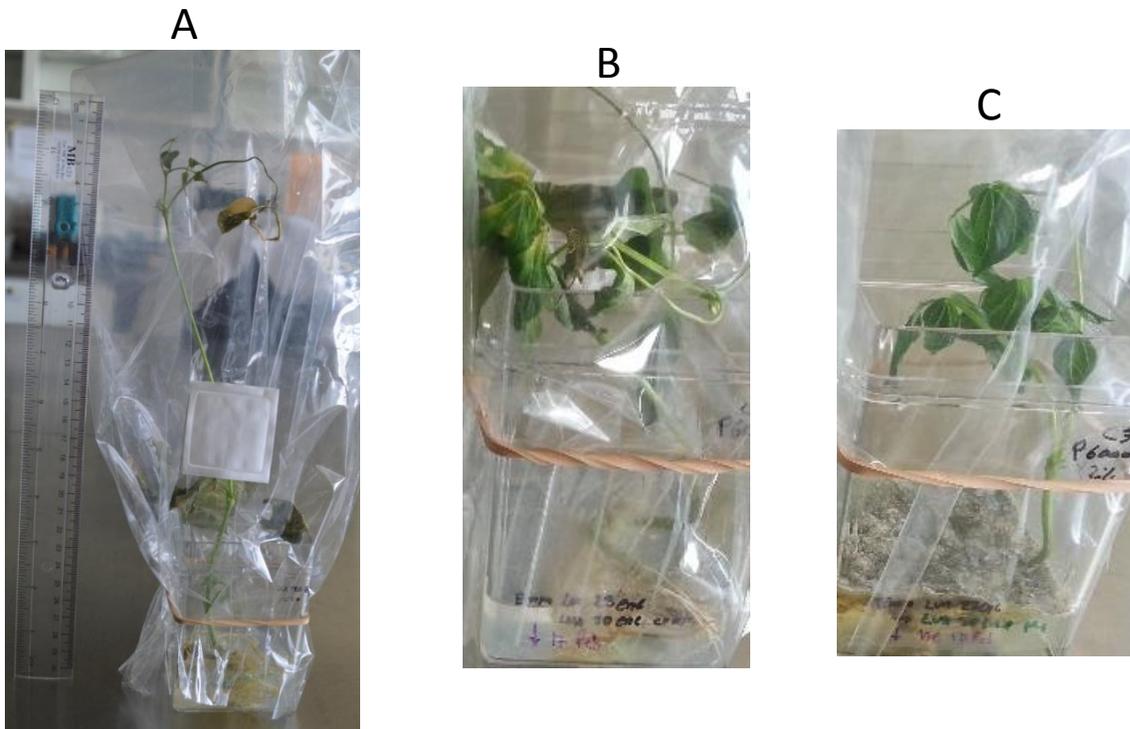


Fig 7.10.3. Plantas en contacto con PEG. Se observa una planta PEGsin (sin *Mr*), con un estrés extremo con medio MS5 + PEG 8000 al 7% (A), una planta PEGsin con medio MS5 + PEG 6000 al 2% (B), y una planta PEGMr (con *Mr*), con medio MS5 + PEG 6000 al 2% (C). El 33% de las plantas con medio MS5 + PEG 8000 al 7% se secaron, entre el segundo y el tercer día después de estar en contacto con PEG, se marchitaron.

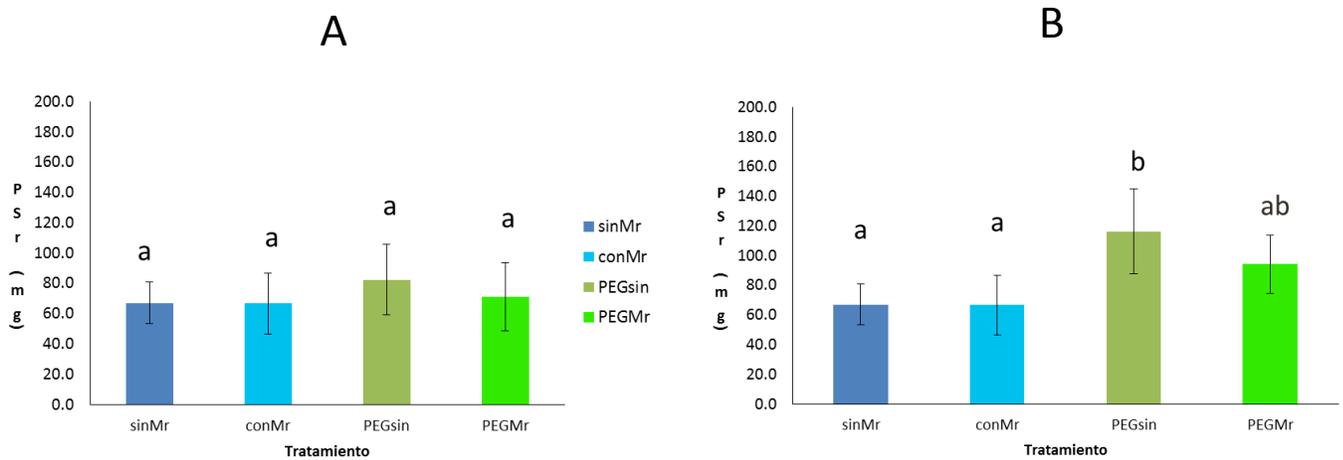


Fig. 7.10.4. Peso seco de raíz por cada planta con medio MS5 + PEG 6000 al 1% (A) y al 2% (B). Las letras diferentes indican diferencias significativas, ANOVA,  $\alpha = 0.05$  (PSr con PEG 6000 al 1%  $p = 0.6705$ ; PSr con PEG 6000 al 2%  $p = 0.009$ ), comparación de medias por Tukey, para **A**  $n = 4, 5, 4, 5$ , para **B**  $n = 4, 5, 4, 6$ .

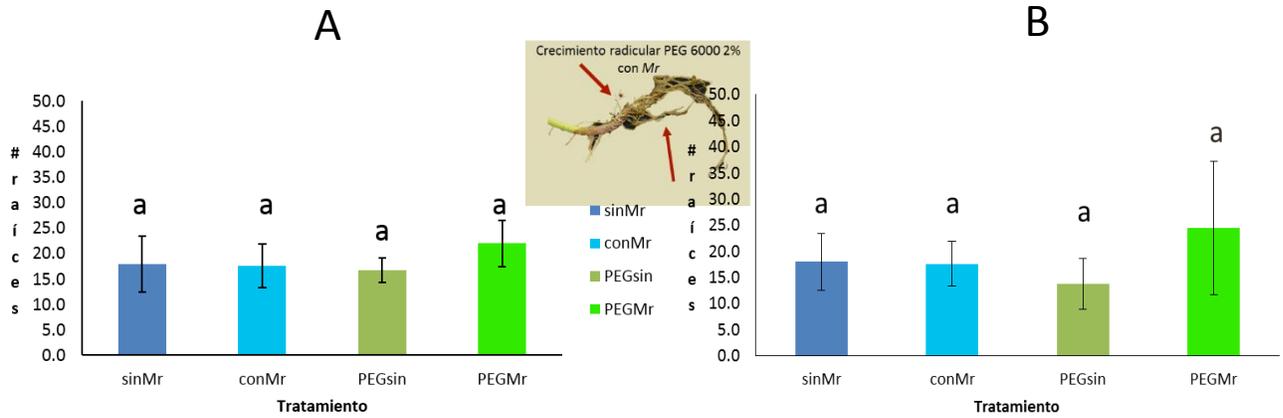


Fig. 7.10.5. Número de raíces por cada planta con medio MS5 + PEG 6000 al 1% (A) y al 2% (B). Las letras diferentes indican diferencias significativas, ANOVA,  $\alpha = 0.05$  (# raíces con PEG 6000 al 1%  $p = 0.470$ ; # raíces con PEG 6000 al 2%  $p = 0.264$ ), comparación de medias por Tukey, para A  $n = 4, 5, 4, 6$ , para B  $n = 4, 5, 4, 6$ .

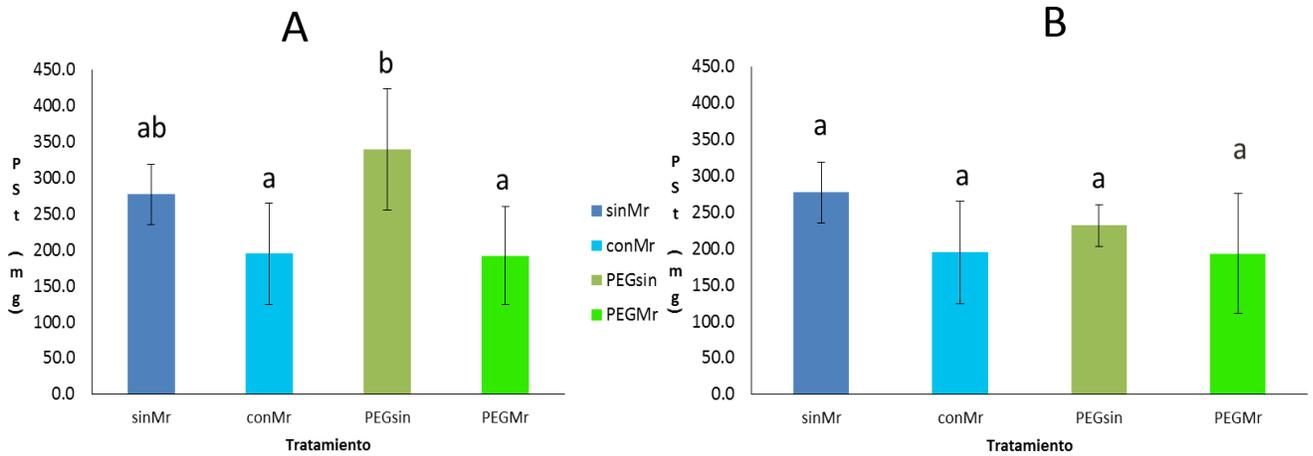


Fig. 7.10.6. Peso seco de tallo por cada planta con medio MS5 + PEG 6000 al 1% (A) y al 2% (B). Las letras diferentes indican diferencias significativas, ANOVA,  $\alpha = 0.05$  (Pst con PEG 6000 al 1%  $p = 0.017$ ; Pst con PEG 6000 al 2%  $p = 0.204$ ), comparación de medias por Tukey, para A  $n = 4, 5, 4, 5$ , para B  $n = 4, 5, 4, 6$ .

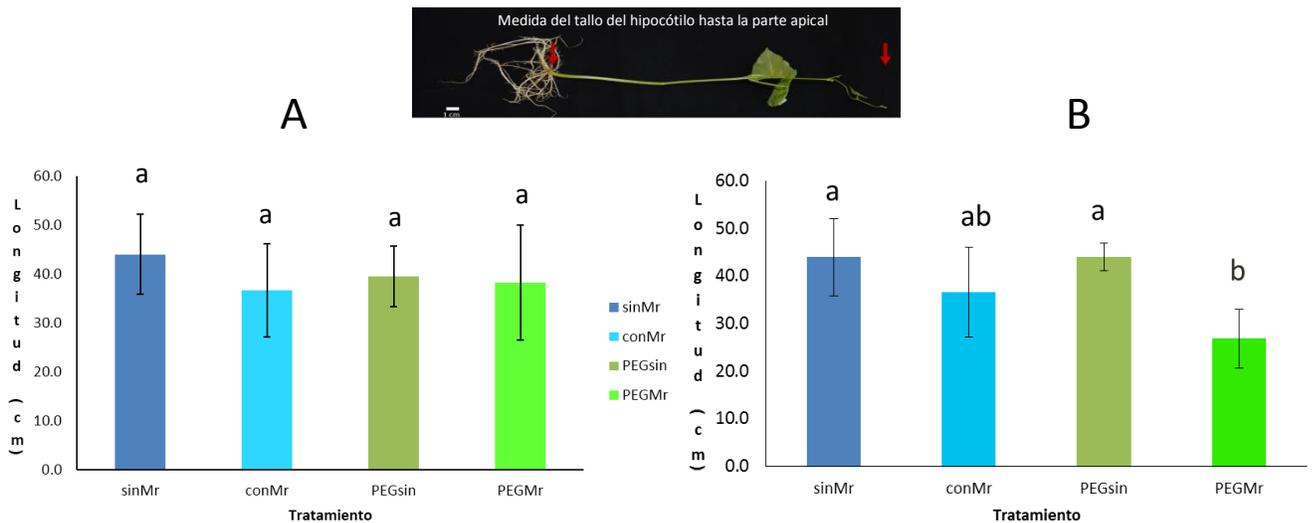


Fig. 7.10.7. Longitud de tallo (cm) por cada planta con medio MS5 + PEG 6000 al 1% (A) y al 2% (B). Las letras diferentes indican diferencias significativas, ANOVA,  $\alpha = 0.05$  (tallo con PEG 6000 al 1%  $p = 0.6873$ ; tallo con PEG 6000 al 2%  $p = 0.005$ ), comparación de medias por Tukey, para A  $n = 4, 5, 4, 5$ , para B  $n = 4, 5, 4, 6$ .

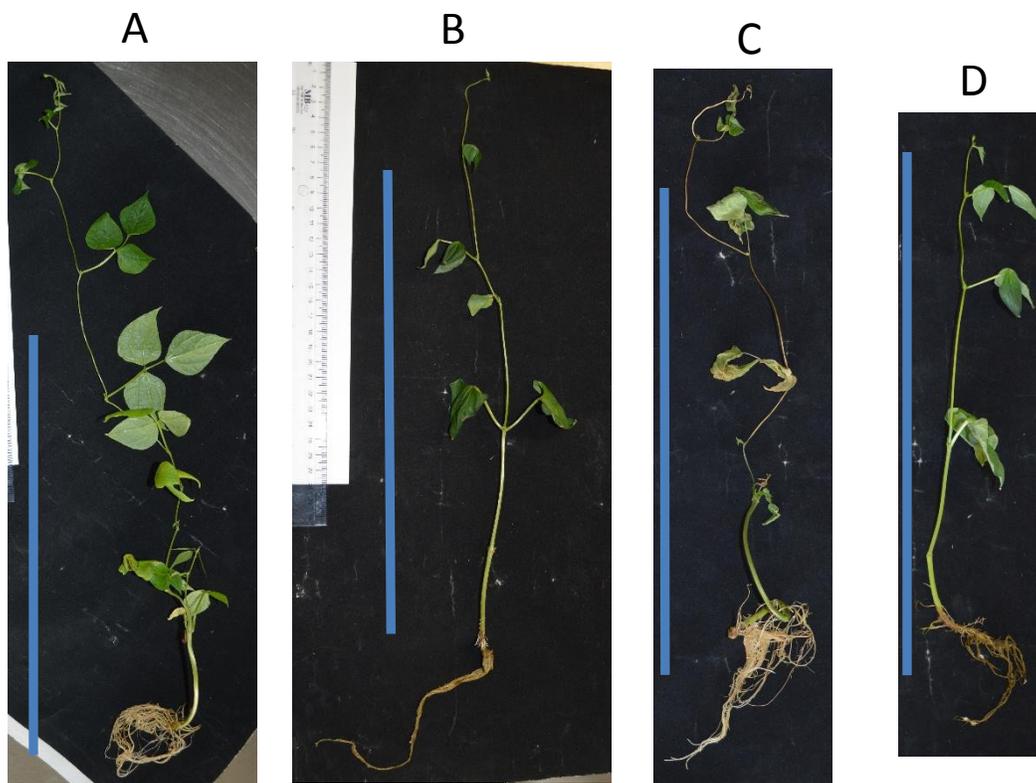


Fig 7.10.8. Plantas tratadas con y sin PEG con 30 días de tratamiento total a partir del día 0. Se observa una planta sin*Mr* tratada con medio MS5 (A), una planta con*Mr* tratada con medio MS5 (B), una planta PEGsin tratada con medio MS5 + PEG 6000 al 2% (C), y una planta PEG*Mr* tratada con medio MS5 + PEG 6000 al 2% (D). Como se puede observar, la planta más perjudicada fue la PEGsin tratada con medio MS5 + PEG 6000 al 2% (C) presentó inicios de marchitamiento entre los días 5-7 después de estar en contacto con PEG. La barra azul indica una escala de 30 cm.

Con respecto a los experimentos elaborados con medio MS5 + PEG 6000 al 2%, el estrés no provocó la muerte de las plantas tratadas, pero en el caso de las plantas sin el HE *Mr*, con medio MS5 + PEG 6000 al 2% (PEGsin), se presentó sequía y marchitamiento. Como se observa en las Figuras 7.10.3B y 7.10.8C, las plantas en contacto con *Mr*, con medio MS5 + PEG 6000 al 2% (PEG*Mr*), se encontraban más sanas que las PEGsin (Figs. 7.10.3C y 7.10.8D), se encontraron diferencias significativas entre grupos, tal es el caso de PSr tratamiento PEGsin (Fig. 7.10.4B), donde difiere de los demás grupos exceptuando de PEG*Mr* con una  $p = 0.009$ , también del caso de longitud de tallo (Fig. 7.10.7B) donde PEG*Mr* difiere de los demás grupos exceptuando de con*Mr* ( $p = 0.005$ ).

Para finalizar este apartado, los experimentos elaborados con medio MS5 + PEG 6000 al 1%, el estrés no provocó la muerte de las plantas tratadas, pero en el caso de las plantas sin el HE *Mr*, con medio MS5 + PEG 6000 al 1% (PEGsin), se presentó sequía y marchitamiento moderado. Como se puede observar en las Figuras 7.10.9A y 7.10.2B, las plantas en contacto con *Mr*, con medio MS5 + PEG

6000 al 1% (PEGMr), se encontraban más sanas que las PEGsin (Figs. 7.10.9B y 7.11.2A), en general, no se encontraron diferencias significativas entre grupos (Figs. 7.10.4A, 7.10.5A y 7.10.7A), exceptuando el caso de PSt tratamiento PEGsin (Fig. 7.10.6A), donde se observan diferencias significativas entre los grupos ( $p = 0.017$ ), a excepción PEGsin con sinMr (Fig. 7.10.6A).

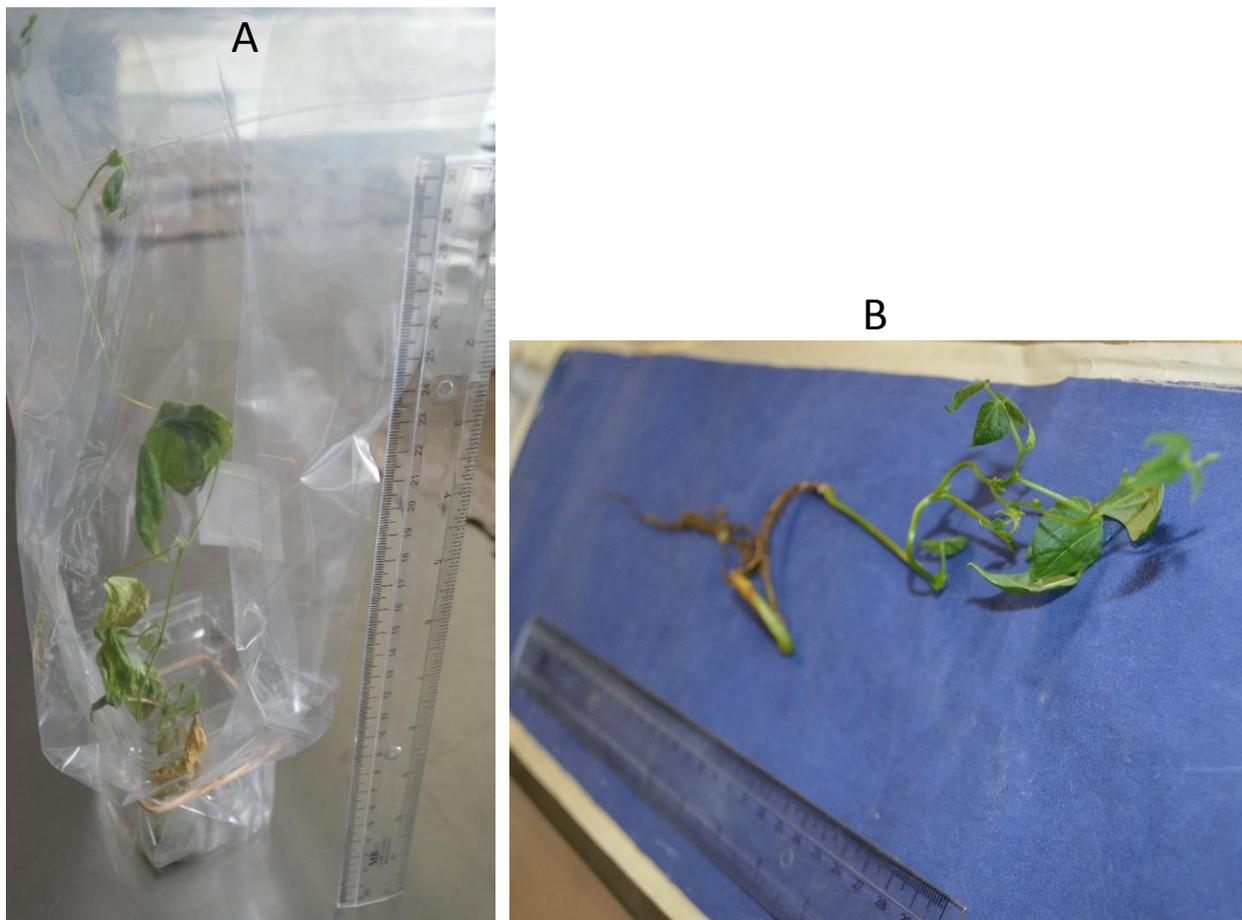


Fig 7.10.9. Plantas tratadas con y sin PEG con 30 días de tratamiento total a partir del día 0. Se observa una planta PEGsin tratada con medio MS5 + PEG 6000 al 1% (A), y una planta PEGMr tratada con medio MS5 + PEG 6000 al 1% (B). Como se puede observar, la planta más perjudicada fue la PEGsin presentó inicios de marchitamiento y clorosis entre los días 10-14 después de estar en contacto con PEG.

### 7.11 Resultados de la extracción de pigmentos de *P. vulgaris* en interacción con *M. robertsii* en condiciones de estrés inducido por PEG

A continuación, de la extracción de pigmentos de *P. vulgaris* en interacción con *M. robertsii* en condiciones de estrés inducido por PEG (medio MS5 + PEG 6000 al 1%). Se pueden observar los diferentes pigmentos medidos en las plantas (clorofila a, b, y carotenoides), en fragmentos de hoja para una planta sin *Mr* (PEGsin) y otra con *Mr* (PEGMr), cabe destacar que el tratamiento de PEGMr sobresale ligeramente de los demás (Fig. 7.11.1).

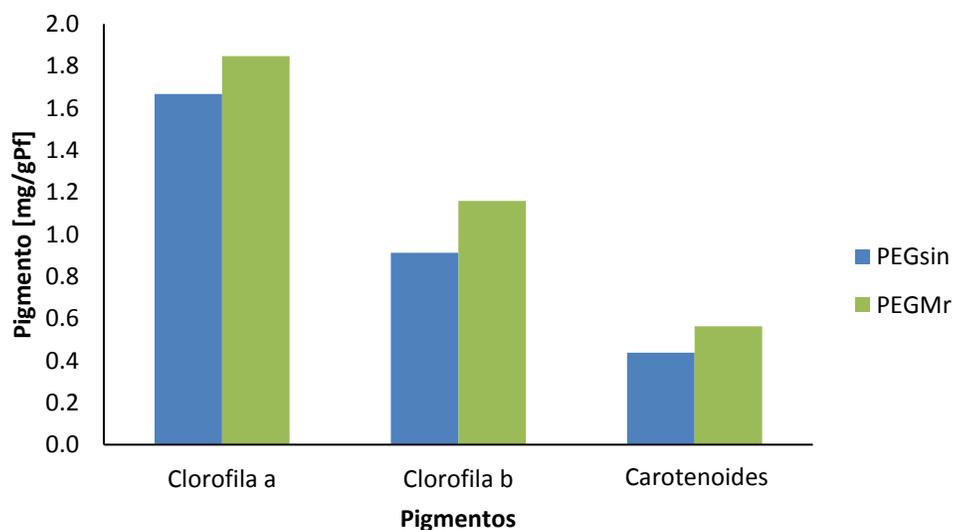


Fig. 7.11.1. Pigmentos de *P. vulgaris* con medio MS5 + PEG 6000 al 1%. Se muestran las mediciones de pigmentos (clorofila a, b, y carotenoides), en fragmentos de hoja para una planta sin *Mr* (PEGsin) y otra con *Mr* (PEGMr), cabe destacar, que el tratamiento de PEGMr sobresale ligeramente de los demás. (mg/gPf) = miligramos de pigmento/gramos de peso fresco de la planta.

En la Fig. 7.11.2 se presentan Plantas en medio MS5 + PEG 6000 1% utilizadas para la prueba de pigmentos. Se observa una planta con PEGsin (Fig. 7.11.2B) y una PEGMr (Fig. 7.11.2A). La planta inoculada con *Mr* (PEGMr), a pesar de tener ligeramente una menor altura, presenta las hojas más verdes y más sanas que las hojas PEGsin.

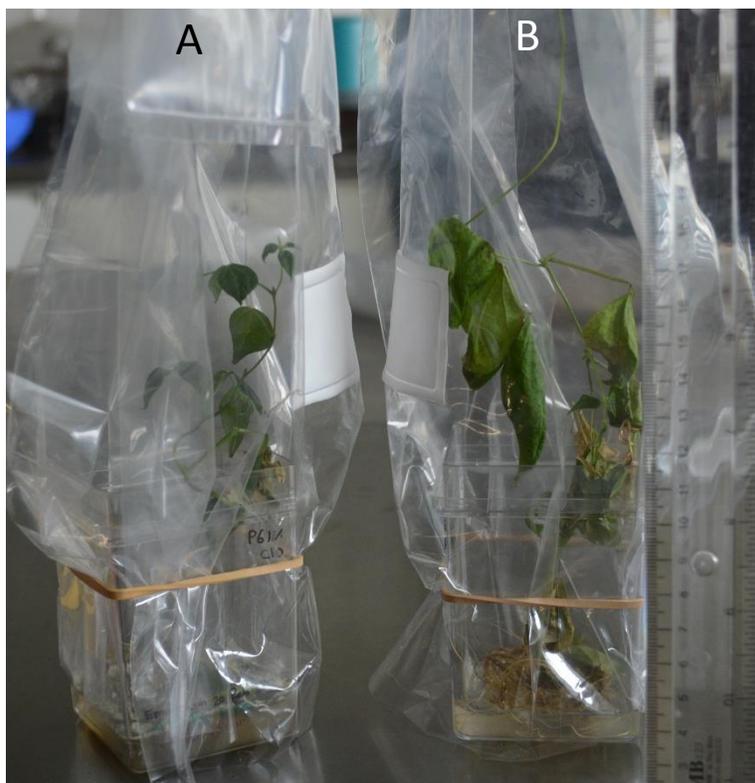


Fig. 7.11.2. Plantas en medio MS5 + PEG 6000 1% utilizadas para la prueba de pigmentos. Se observa una planta con PEGsin (B) y una PEGMr (A). La planta inoculada con *Mr* (PEGMr), a pesar de tener ligeramente una menor altura, presenta las hojas más verdes y más sanas que las hojas PEGsin.

### 7.12 Resultados de la extracción de peróxido de hidrógeno de *P. vulgaris* en interacción con *M. robertsii* en condiciones de estrés inducido por PEG

En este apartado se muestran los resultados de la extracción de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), con 14 días de interacción *P. vulgaris*-*Mr* (Fig. 7.12.1A), y *P. vulgaris* ya establecido con *Mr*, en contacto con medio MS5 + PEG 6000 al 1% (Fig. 7.12.1B), tal se explica en la sección 6.10 de Materiales y métodos.

Se observa que la concentración de  $H_2O_2$  en con*Mr* (interacción *P. vulgaris*-*Mr*), sobresale de las demás (Fig. 7.12.1A), esto seguramente es debido al estrés que se genera con el contacto inicial (establecimiento), donde la planta presenta un periodo de aclimatación al hongo (Mendarte-Alquisira *et al.*, 2016; Cheeseman, 2006).

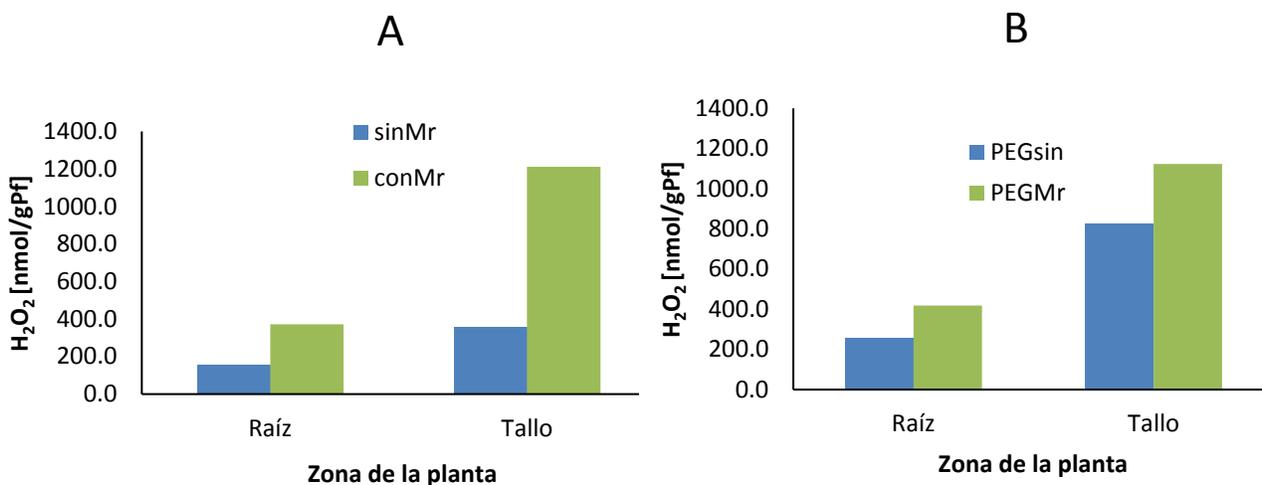


Fig. 7.12.1. Concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la interacción P-HE con medio MS5 + PEG 6000 al 1%. Plantas con interacción P-HE (14 días) (A), y 30 días de interacción con medio MS5 + PEG 6000 al 1% (B). Se muestran las mediciones de raíz y de tallo por separado, cabe destacar, que conMr sobresale de los demás. (nmoles/gPf) = nmoles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/gramos de peso fresco.

Cuando las plantas son sometidas a estrés, la cantidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en PEGsin incrementó considerablemente, pero la cantidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en PEGMr se encuentra casi al mismo nivel (Fig. 7.12.1B), en vez de duplicarse si la planta hubiese sido sometida a un estrés mayor, lo que podría confirmar el establecimiento P-HE (Mendarte-Alquisira *et al.*, 2016; Rojas-Martínez *et al.*, 2010; Cheeseman, 2006), que además, ayudaría a mitigar o amortiguar el efecto del estrés inducido por PEG (Türkan *et al.*, 2005; Burnett *et al.*, 2005).

### 7.13 Resultados de la extracción de peroxidasa de *P. vulgaris* en interacción con *M. robertsii* en condiciones de estrés inducido por PEG

A continuación, se muestran los resultados de la extracción de la enzima peroxidasa, de la interacción *P. vulgaris*-Mr (en contacto por 15 días), que estuvo en contacto con PEG 6000 al 1% (adicionado al medio MS5), por 15 días (30 días en total a partir del día 0) (Fig. 7.13.1), para los tratamientos PEGsin y PEGMr. Como se puede observar en la Fig. 7.13.1, el tratamiento de PEGsin sobresale de los demás, alcanzando un valor de 145 u/gPf (unidades de peroxidasa/gramos de peso fresco). Cabe destacar que los niveles de PEGMr se encuentran muy por debajo de PEGsin, principalmente en tallo.

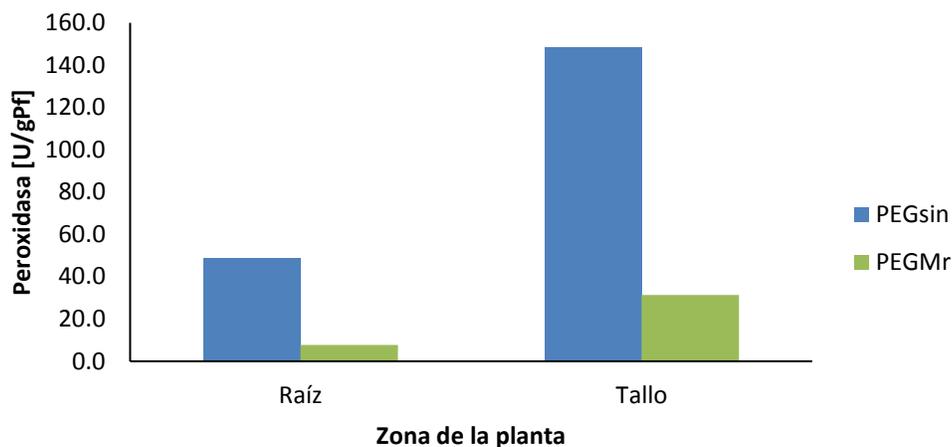


Fig. 7.13.1. Enzima peroxidasa de P-HE + PEG 6000 al 1%. Se muestran las mediciones de raíz y de tallo por separado, cabe destacar, que el tratamiento de PEGsin sobresale de los demás. (u/gPf) = unidades de peroxidasa/gramos de peso fresco.

## 8. Discusión

Para que una asociación planta – hongo entomopatógeno (P-HE) sea exitosa, se necesitan establecer las condiciones para que la planta crezca de manera adecuada, además de que el hongo entomopatógeno (HE) crezca lo suficiente sin afectar a la planta (Moonjely *et al.*, 2016). Con el fin de conocer la productividad de la planta y la capacidad de las semillas para generar plantas sanas, se corroboró en los experimentos de huerto urbano, que las semillas de *Phaseolus vulgaris* provenientes de Puebla completan su ciclo biológico, lo que significa que las plantas presentaron floración y formación de fruto con semilla. (McCormack, 2004; David, 1998).

Como se ha mencionado, las semillas de *P. vulgaris* que no germinaron en agar – agua, y que sí lo hicieron en huerto urbano, presentaron una capa mucilaginosa, posiblemente esta capa protegió a las semillas de una germinación precoz, como en el caso de la planta *Ocimum basilicum* (albahaca) (Zhou, 2012), y en especies de las familias Cruciferae, Euphorbiaceae, Labiatae, Onograceae y Plantaginaceae (Young y Evans, 1973). En algunos casos con las semillas de *P. vulgaris*, la capa de polisacáridos se presentó días después de poner las semillas desinfectadas en las cajas con agar-agua, diferente al caso de la albahaca (Zhou, 2012), y de *Salvia hispanica* L. (chia) (Muñoz *et al.*, 2012), donde con un par de minutos después de hidratar a las semillas, la capa mucilaginosa se presenta (Capitani *et al.*, 2013; Zhou, 2012; Muñoz *et al.*, 2012). Cabe mencionar, que el mucilago

puede influir en la dispersión de las semillas e influir con la humedad requerida durante la germinación (Young y Evans, 1973), como ocurrió con las semillas del *P. vulgaris*.

Los experimentos para montar las condiciones de desinfección, germinación y crecimiento de la planta en los diferentes medios siempre son necesarios, puesto que cada planta, desde especie, variedad, inclusive región y origen, requieren cierto grado de especificidad (Moonjely *et al.*, 2016). Por eso, se ajustan las técnicas para cada tipo de organismo (Alcántara-Martínez, 2013; Rojas-Loria, 2010). Las semillas de *P. vulgaris* provenían de un grupo de agricultores independientes y de cultivos orgánicos, por esta razón las semillas no necesariamente tienen una desinfección profunda o tratamiento con fungicidas, lo que pudo haber propiciado contaminación por hongos (Maitlo *et al.*, 2014), aunque también es posible que las semillas presenten un endófito de inicio (Greenfield *et al.*, 2016; Moonjely *et al.*, 2016).

Es este estudio se usaron plantas de *P. vulgaris* mexicanas en condiciones *in vitro* con 14 días de interacción con las cepas de HE provenientes de México, *Beauveria bassiana* (*Bb*) Tac 1.1, *Metarhizium robertsii* (*Mr*) Xoch 8.1 e *Isaria javanica* (*If*) CHE-CNRCB 303. El establecimiento de *P. vulgaris* proveniente de México con estas cepas de HE, no se había reportado hasta el momento, y es importante mencionarlo por la gran variedad de respuestas que se pueden presentar en una interacción P-HE. Por lo tanto, es muy relevante conocer la composición del medio nutritivo ideal para la germinación y crecimiento de las plantas de *P. vulgaris* y, sobretodo, para establecer una asociación benéfica. Es interesante que el medio nutritivo MS5 (MS + 5 g/L de sacarosa), haya prevalecido sobre MS10 (MS + 10 g/L de sacarosa) y MS0 (MS + sin sacarosa), la decisión de tomar MS5 se debió a que en este medio se presentaron las mejores condiciones de crecimiento e interacción con el HE, desde la baja contaminación bacteriana y/o fúngica, la acelerada tasa de crecimiento de la plántula, hasta el exitoso establecimiento de la planta con el HE. Sin embargo, no se descarta la importancia de hacer más experimentos con los demás medios, principalmente con el medio MS0, en el cual, se presentó un resultado destacable al observar la interacción P-HE hasta por 90 días, verificando el crecimiento del HE tanto en raíz como en hoja mediante la prueba de endofiticidad. Las variables cuantitativas de crecimiento para analizar la interacción P-HE fueron las de peso seco de raíz (PSr), peso seco de tallo (PSt), elongación del tallo y número de raíces (Mendarte-Alquisira *et al.*, 2016; Alcántara-Martínez, 2013; Rojas-Loria, 2010). Greenfield *et al.* (2016), reportaron que plantas de yuca (*Manihot esculenta*), en contacto con cepas de *B. bassiana* presentan un alto nivel de colonización (84%), entre los 7-9 días post inoculación comparadas con plantas con bajo nivel de colonización (40%), analizadas a los 47-49 días post inoculación. También reportaron que *Metarhizium anisopliae* logra un nivel alto de colonización (80%) entre los 7-9 días post inoculación, comparadas con plantas con bajo nivel de colonización (80%), analizadas a los 47-

49 días post inoculación, lo cual sugiere que *M. anisopliae* es más capaz de persistir en el suelo o como un endófito en raíces de yuca a través del tiempo. Comparado con la cepa de *M. robertsii* utilizada en el presente trabajo, la colonización se presentó tanto en raíz y tallo a los 14, 30 y 90 días de interacción P-HE, además, en hoja se presentó a los 90 días de interacción.

Para fijar del tiempo de inoculación, se tomaron en cuenta diversos reportes. Sasan y Bidochka (2012), utilizaron plántulas de *P. vulgaris* con 10 días de crecimiento antes de inocular el hongo *M. robertsii*, mientras que Parsa *et al.* (2013), inocularon a *B. bassiana* en semillas de *P. vulgaris*, aproximadamente al día 14 después de haber plantado la semilla en maceta, el criterio fue usar plántulas con la primera aparición de hojas verdaderas (que en este caso las primeras son hojas simples) (Parsa *et al.*, 2013), lo cual concuerda con lo hecho en la presente tesis; si sumamos el tiempo de germinación (3-5 días), al tiempo transcurrido en medio MS (4-7 días), después de trasplantar las semillas germinadas de *P. vulgaris* se obtiene un promedio de 10 días de crecimiento, donde la longitud del tallo se encuentra entre los 8 a 10 cm, con el apareamiento de las primeras hojas verdaderas.

Para llevar a cabo el establecimiento del hongo dentro de la planta, se requiere de un periodo de interacción P-HE dependiendo de las especies que se están ocupando (Moonjely *et al.*, 2016). Mientras que algunos manejan interacciones de 7-9 días y de 47-49 días para el caso de *Manihot esculenta* (yuca) con *M. anisopliae* y *B. bassiana* (Greenfield *et al.*, 2016), Sasan y Bidochka (2012) manejan interacciones de 60 días *P. vulgaris* – *M. robertsii*. En el presente trabajo se decidió por un tiempo intermedio, ya que no existían antecedentes de la interacción con plantas en condiciones *in vitro* con las cepas de HE provenientes de México. Debido al crecimiento tan rápido que presentó *P. vulgaris*, se decidió optar por una interacción de 14 días de manera inicial, posteriormente experimentar con tiempos de 30 y 90 días como ya se ha mencionado.

Las variables de crecimiento PSr y PSt son de mayor confianza que los pesos frescos, esto por la gran variación que se presenta en la medición de los pesos frescos, desde el momento de extraer la planta del medio, hasta el momento de pesarla en sí. Los retrasos en la medición pueden generar esa gran variación debido a la deshidratación de la planta (Smart *et al.*, 1974). El número de raíces es una variable ya reportada por Sasan y Bidochka (2012), donde se miden el número de raíces laterales de *P. vulgaris* en interacción con una cepa de *M. robertsii*, puesto que medir la longitud de la raíz es complicado debido a que las raíces se enrollan y presentan un crecimiento homorrízico (que todas las raíces tienen un crecimiento uniforme y que la raíz principal solamente se puede observar con facilidad a nivel de hipocótilo). Los resultados muestran que no hay diferencias significativas si se ocupa o no alguno de los HE, por lo cual la interacción P-HE es neutral para las condiciones dadas.

Cabe señalar, que se observó una tendencia a presentar un mayor número de raíces en las plantas que interaccionaron con HE, principalmente en el caso de *Mr*, a pesar de que no se presentaron diferencias significativas. Esto a su vez, podría relacionarse con un estrés generado por la misma interacción P-HE, donde la planta responde entrando en una fase de aclimatación o adaptación al HE, o inclusive a un mejor desarrollo radial para la obtención de un mayor número de nutrientes (Mendarte-Alquisira *et al.*, 2016; Sasan y Bidochka, 2012).

La interacción de 14 días entre *P. vulgaris* y las cepas de HE no modificó significativamente el crecimiento vegetal, por lo cual puede considerarse una interacción neutral, lo cual es positivo, ya que estas cepas de HE (*Bb*, *Mr* e *If*), han sido evaluadas para comprobar su viabilidad e infectividad hacia insectos plaga (López-Cruceño, 2016; Estefes-Chávez, 2015), lo cual quiere decir, que los cultivos en contacto con estos HE, además de que no se verán afectados, los HE proporcionarán el control biológico hacia el insecto plaga al cual vayan dirigidos. La interacción con plantas provenientes del mismo país, pueden ser de gran ayuda para el manejo integral de plagas como alternativa viable para disminuir el uso de los plaguicidas químicos (Dutta *et al.*, 2015 Vega *et al.*, 2008) y para no dañar las comunidades biológicas, aunado a la capacidad entomopatógena que tienen estos hongos.

La sencillez de la prueba de endofiticidad es su gran virtud, ya que teniendo las condiciones adecuadas de desinfestación, sin matar al microorganismo y además contar con las condiciones necesarias de esterilidad en la placa control (huella), es una prueba para verificar crecimiento dentro de la planta. Los resultados en *P. vulgaris*, mostraron crecimiento de *Mr* tanto en raíz, raíces secundarias y en tallo (hasta la zona del hipocótilo), en plantas con sólo 14 días de interacción, y en plantas con 30 días de interacción. De hecho, la prueba resultó positiva para plantas con más de 3 meses de interacción *P. vulgaris* – *Mr*, en este caso, se comprobó crecimiento en raíz y en hoja, mostrando así el crecimiento estable del hongo dentro de la planta, sin afectar su crecimiento. Se ha reportado que crecimiento de HE dentro de plantas desde los 7 hasta los 60 días (Greenfield *et al.*, 2016; Castillo-López *et al.*, 2014; Sasan y Bidochka, 2012), sin embargo en este trabajo se demostró la persistencia de *M. robertsii* en *P. vulgaris* a 90 días, lo cual constituye el mayor tiempo de persistencia reportado.

En algunas cajas control (huella), hubo crecimiento de *Mr* porque el tratamiento de desinfestación no fue eficiente, lo cual sugiere hacer una desinfestación más agresiva (Greenfield *et al.*, 2016; Parsa *et al.*, 2013), quizás aumentar la concentración de NaClO de 2% a 3% e inclusive hasta 4% (Sasan y Bidochka, 2012), solamente para el caso de raíces y tallos. Sin embargo, para el caso de hoja, 1.2% es una concentración adecuada, ya que en el caso de las plantas con 3 meses de interacción, hubo

una prueba de endofiticidad en hoja exitosa con su respectivo control sin crecimiento alguno. También es adecuada porque no mata a *Mr* y además la posibilidad de oxidación en la planta es mínima. A pesar que es comúnmente usada, otras desventajas del uso de la prueba de endofiticidad, es lo laboriosa y propensa a errores que podría llegar a ser, por la razón de contaminación en las cajas, identificación de la cepa, o por el crecimiento lento del HE, por lo tanto, la prueba de endofiticidad puede arrojar resultados falsos positivos o falsos negativos (Parsa *et al.*, 2013). Por eso se recomienda corroborar la especie del hongo a través de métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) (Castillo-López *et al.*, 2014; Parsa *et al.*, 2013).

La microscopía electrónica de barrido, confirmó la interacción entre *P. vulgaris* – *Mr*, donde se observó el micelio en la epidermis de la planta tanto en la raíz como a nivel de hipocótilo en el tallo, además de conidios, en plantas con sólo 10 días de interacción. Con ayuda de MEB, Sasan y Bidochka (2012) reportaron la adhesión del hongo *M. robertsii* a la planta *Panicum virgatum*, además Dai *et al.* (2016) confirmaron que *Bacillus* sp., crece como endófito y promueve el crecimiento en *Wedelia trilobata*. Esta técnica de microscopía también se reportó por Castillo *et al.* (2005) para la confirmación de estreptomicetos endófitos de *Kennedia nigricans*. Probablemente con 4 o 5 días más de interacción el hongo hubiese llegado hasta la zona del tallo (a nivel de cotiledones). Es posible que el gen de la adhesina *MAD2*, el cual facilita la adhesión del hongo *M. robertsii* a la planta como se observó en las microfotografías, ayude a la planta a soportar el estrés inducido por polietilenglicol (PEG) (Sasan y Bidochka, 2012).

Como ya se mencionó en la Sección 7.10, no se encontraron diferencias significativas en el crecimiento entre los grupos de plantas expuestas al medio MS5 + PEG 8000 al 7%, exceptuando el caso de PSr tratamiento PEGsin (plantas con medio MS5 + PEG sin la presencia de hongo). En este caso hubo una mayor cantidad de peso seco en las plantas control sometidas a estrés por PEG que en las plantas con medio MS5 sin el hongo (sin*Mr*) y en las plantas con medio MS5 con hongo (con*Mr*), inclusive mayor que en el tratamiento de plantas con medio MS5 + PEG con la presencia de hongo (PEG*Mr*), con diferencias significativas entre los grupos ( $p = 0.0079$ ). Türkan *et al.* (2005), reportaron datos de pesos secos donde *P. vulgaris* en contacto con PEG 6000 al 10%, presentó un incremento o decremento en los pesos secos dependiendo del tiempo de contacto al cual fueron sometidas las plantas al PEG. Türkan *et al.* (2005) no mencionaron datos de sobrevivencia; si las plantas que ocuparon sufrieron de marchitamiento o sequía que pudiera matarlas al segundo o tercer día de contacto como sucedió en el presente trabajo. Es posible que el marchitamiento entre el segundo y el tercer día después de añadir PEG 8000 al 7% al medio MS5 a las plantas de *P. vulgaris*,

haya sido provocado por la sequía que produce el PEG (Burnett *et al.*, 2005; Al-Taisan, 2010, Ji *et al.*, 2014). Las fotografías mostradas en esta tesis, muestran a las plantas secas y estresadas debido a PEG 8000 al 7% al tercer día. Como se ha mencionado, la sobrevivencia en este experimento fue del 66%, que concuerda con lo reportado sobre el *P. vulgaris* (Blum 2013) y el algodón Lawlor (1970), con respecto a la absorción de PEG hacia el interior de las plantas provocando estrés.

A partir de las concentraciones de PEG reportadas por Burnett *et al.* (2005), se decidió bajar las cantidades usadas a 1% y 2%. Se pudo observar marchitamiento más moderado a estas concentraciones de PEG 6000 mencionando que al 2% se observó una mayor sequía que al 1%. En este caso, las plantas soportaron el estrés (ninguna murió), a diferencia del medio con PEG 8000 al 7%, donde algunas plantas murieron. Una posible explicación del porqué algunas plantas no soportaron esta concentración de PEG, es debido a que, a esa concentración, se pudo haber creado un bloqueo en la absorción del agua causado por el PEG, actuando como un agente secuestrante del agua debido a la conformación química que este polímero tiene. De manera concreta, las plantas soportaron mejor el estrés cuando se encontraban asociadas al hongo, en general, las plantas crecieron mejor, tanto por el color, como por el grado de sequía observado. De manera cuantitativa, los pigmentos ayudan a explicar este resultado. Las plantas estresadas con PEG, en contacto con el hongo, presentaron una mayor cantidad de pigmentos (clorofilas y carotenoides), que las plantas estresadas sin el hongo, lo cual se relaciona con una mayor capacidad fotosintética para el caso de las plantas con *M. robertsii*.

Si contrastamos los tratamientos de PEG 6000 al 1% y al 2%, se observa que los valores de PSr en PEG 2% aumentaron en comparación con los de 1%, tan es así que el tratamiento PEGsin difiere de los controles, pero no de PEGMr lo cual podría ser un fenómeno de acumulación de PEG (Sen y Alikamanoglu, 2013), causando así hipoxia y por lo tanto estrés oxidativo severo (Rojas-Martínez *et al.*, 2010; Verslues *et al.*, 1998). En cuanto al número de raíces, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos de PEG 1% y al 2%, aunque sí sobresale el número de raíces en los tratamientos en presencia de Mr, lo cual concuerda con Sasan y Bidochka (2012), es decir, la planta está generando señales bioquímicas (Mendarte-Alquisira *et al.*, 2016; Cheeseman, 2006), para incrementar el número de raíces y su biomasa si se contrasta este resultado con los datos de PSr. En este punto, es interesante señalar que, si comparamos las plantas tratadas con el PEG al 2%, la variable del número de raíces con el PSr del tratamiento PEGsin, se presenta una tendencia inversa, es decir, entre menor es el número de raíces, mayor la biomasa (Blum, 2013; Jacomini *et al.*, 1988). Esto no quiere decir que la planta se encuentre sana, al contrario, los casos más severos de estrés se observaron en los tratamientos de PEGsin (Figuras 7.10.3A, 7.10.3B, 7.10.8C, 7.10.9A y 7.11.2B). Conjuntando todos estos datos, se observa una posible tendencia de acumulación de PEG

dentro de las plantas (Jacomini *et al.*, 1988; Lawlor, 1970), ya que en los resultados obtenidos de los pesos secos de *P. vulgaris* con la presencia de PEG aumentaron, lo cual afectó a las plantas provocando un marchitamiento severo.

A continuación, se hará una breve discusión de los resultados obtenidos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y de peroxidasa. Mendarte-Alquisira *et al.* (2016), reportaron que el establecimiento de una asociación endofítica puede incrementar significativamente la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y de peróxidos lipídicos, donde la planta presenta un periodo de aclimatación al hongo (Mendarte-Alquisira *et al.*, 2016; Cheeseman, 2006). Como se observó en la interacción *P. vulgaris* – *M. robertsii*, la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue mayor en la interacción P-HE que en la planta sin el HE. Cuando las plantas se someten a estrés, la cantidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el tratamiento PEGsin incrementó considerablemente, pero la cantidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el tratamiento PEGMr, se encuentra casi al mismo nivel (fig. 7.12.1B), de tal manera que el hongo posiblemente, ayudó a mitigar o amortiguar el efecto del estrés inducido por PEG. Lo anterior, sugiere que el hongo causa un efecto positivo para el control del estrés oxidante generado por el PEG (Mendarte-Alquisira *et al.*, 2016; Rojas-Martínez *et al.*, 2010).

En el caso de peroxidasa, ocurre algo muy similar a lo que paso con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pero en mayor medida. Cuando las plantas son sometidas a estrés, la cantidad de peroxidasa en PEGsin incrementó 7 veces respecto al tratamiento PEGMr (fig. 7.13.1), indicando altos niveles de estrés en comparación a un estado inicial mucho menor, lo cual puede ser la explicación de que el HE ya se encuentra aclimatado a la planta, y por lo tanto, ayudó mitigando el estrés oxidativo causado por PEG (Mendarte-Alquisira *et al.*, 2016; Rojas-Martínez *et al.*, 2010; Cheeseman, 2006). Se ha reportado una regulación a la baja en la actividad de peroxidasa, por efecto de un endófito, la cual, puede ser atribuida a la degradación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por catalasas (Mendarte-Alquisira *et al.*, 2016; Mhamdi *et al.*, 2010). Debido al estrés inducido por PEG en las plantas, las concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumentaron y con ayuda del hongo, por la acción de las peroxidases, las concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> disminuyeron.

La importancia agronómica, ecológica y social que tienen las investigaciones para mejorar los cultivos, ya sea por el daño causado al ecosistema o el inminente cambio climático, tienen una gran relevancia. Cada vez es más difícil obtener cultivos asequibles y sanos, poco a poco los precios se disparan y la demanda mundial por los alimentos parece no terminar. Poder experimentar con los hongos entomopatógenos y saber que pueden ser endófitos protegiendo a los cultivos por diversos tipos de estrés, puede ser una vía prometedora para poder generar más cultivos a nivel nacional y mundial.

## 9. Resumen de resultados

- Las condiciones idóneas para la germinación y crecimiento *in vitro* de *Phaseolus vulgaris* (frijol), proveniente de Cholula, Puebla en cámara de incubación fueron a 25 °C, con un fotoperiodo de 16 h luz 8 h oscuridad a una intensidad lumínica de 50  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$ , en medio MS5, utilizando caja Magenta como maceta y bolsas *Sigma* para plantas, esto para mantenerlas aisladas.
- En las condiciones de desinfestación de las semillas, se ocupó etanol al 70% por 2 min y NaClO por 50 min
- *P. vulgaris* completa su ciclo biológico en condiciones de huerto urbano.
- La interacción de 14 días P-HE *in vitro* fue neutral (no afecta ni favorece a la planta), para *P. vulgaris* y las cepas de HE utilizadas (*Metarhizium robertsii* (*Mr*) Xoch 8.1, *Beauveria bassiana* (*Bb*) Tac 1.1 e *Isaria javanica* (*If*) CHE-CNRCB 303), en las condiciones propuestas. Esto puede ser beneficioso porque los HE creciendo en las plantas podrían ejercer el efecto entomopatógeno contra los insectos plaga. La interacción de 30 días de *P. vulgaris* – *Mr* siguió manteniendo un efecto neutral.
- Las pruebas de endofiticidad muestran crecimiento de *Mr* tanto en raíz y tallo a los 14 y 30 días de interacción. La prueba en hoja dio positiva a los 90 días de interacción.
- La asociación P-HE es estable hasta los 90 días de interacción, lo cual no se había reportado.
- La prueba de MEB muestra a *Mr* adherido a la epidermis de *P. vulgaris*, lo que podría ser la explicación del efecto barrera o de amortiguamiento que se genera por el estrés inducido por PEG, quizás ligado al gen *MAD2* encargado de la adhesión del hongo hacia la planta.
- La interacción *P. vulgaris* – *Mr* en condiciones de estrés inducido por PEG, presenta un efecto positivo hacia la planta. Las imágenes muestran el daño ocasionado por PEG a las plantas sin *Mr* (sequía y marchitamiento), además las pruebas preliminares de pigmentos (mayor contenido de clorofila a, b y carotenoides en plantas con *Mr*), peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), y peroxidasa, sugieren una tendencia positiva de que *Mr* aminora el choque producido por PEG, lo cual quiere decir, que hay un efecto benéfico del hongo hacia la planta.

## 10. Conclusiones

- Se establecieron las condiciones para germinación y crecimiento *in vitro* de *Phaseolus vulgaris* L. (frijol).
- La interacción P-HE presenta un efecto neutral en *Phaseolus vulgaris*.
- La asociación *P. vulgaris* – *M. robertsii* (además de ser entomopatógeno), fue de carácter endófito y neutro.
- El PEG ocasiona efecto cuantitativo en las plantas de frijol, sin embargo, la asociación estable entre *P. vulgaris* – *M. robertsii* proporciona protección del estrés causado por PEG a través de un mejor crecimiento, con plantas visiblemente más saludables y menos marchitas, muy probablemente asociado a un mayor número de raíces, y a una mayor cantidad de pigmentos fotosintéticos.

## 11. Perspectivas

- Corroborar el estrés oxidativo, debido a que no hubo repeticiones y no sabemos si es un fenómeno real.
- Realizar estudios moleculares donde se compruebe por PCR la presencia endófito del HE
- Corroborar la idea de que la interacción P-HE promueve la resistencia al ataque de insectos.
- A mediano plazo, se planea hacer el escalamiento a invernadero y de ser posible a experimentos en campo. En este caso, se puede considerar otra molécula distinta a PEG por los diferentes efectos que tiene sobre la planta y porque todavía se desconoce exactamente qué es lo que provoca en la planta como factor estresante. En este sentido, es recomendable inducir el estrés salino o estrés generado por hidrocarburos.

## 12. Referencias

- Ahmad, J.S., Baker, R., 1987. Rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 77: 182-189.
- Allen, M.F., 1991. The ecology of mycorrhizae. Cambridge University Press, Cambridge.
- Al-Taisan, W., 2010. Comparative Effects of Drought and Salt Stress on Germination and Seedling Growth of *Pennisetum divisum* (Gmel.) Henr. *American Journal of Applied Sciences*. 7. 10.3844/ajassp.2010.640.646.
- Azevedo, J.L., 1998. Microorganismos as endofíticos. In: Melo IS and Azevedo JL, editors. *Ecologia Microbiana, Brazil: Editora Embrapa, Jaguariuna, Sao Paulo*. p. 117-137.
- Bais, H.P., Broeckling, C.D., Vivanco, J. M., 2008. Root exudates modulates plant-microbe interactions in the rhizosphere. Pg: 241-253. In P. Karlovsky (ed.), *Secondary Metabolites in Soil Ecology*. *Soil biology* 14. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Batta, Y.A., 2013. Efficacy of endophytic and applied *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorokin (Ascomycota: Hypocreales) against larvae of *Plutella xylostella* L. (Yponomeutidae: Lepidoptera) infesting *Brassica napus* plants. *Crop Prot.* 44, 128–134.
- Bello, M.A., Ruiz-León, Y., Sandoval-Sierra, J.V., Rezinciuc, S., Diéguez-Uribeondo, J., 2017. Scanning Electron Microscopy (SEM) Protocols for Problematic Plant, Oomycete, and Fungal Samples. *J. Vis. Exp.* (120), e55031, doi:10.3791/55031
- Bing, L.A., Lewis, L.C., 1992. Temporal relationships between *Zea mays*, *Ostrinia nubilalis* (Lep: Pyralidae) by endophytic *Beauveria bassiana*. *Entomophaga* 37,525–536.
- Blum, A., 2013. Use of PEG to induce and control plant water deficit in experimental hydroponics culture. (Plantstress: Tel Aviv) Available online at: <http://www.plantstress.com/methods/PEG.htm> [Verificado 20 marzo 2017].
- Bruck, D.J., 2010. Fungal entomopathogens in the rhizosphere. *Biocontrol* 55, 103–112.
- Bu, N., Li, X., Li, Y., Ma, C., Ma, L., Zhang, C., 2012. Effects of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> stress on photosynthesis and antioxidative enzymes in endophyte infected and non-infected rice. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 78: 35–40.
- Burnett, S., van Iersel, M., Thomas, P., 2005. PEG 8000 alters morphology and nutrient composition of hydroponic *Impatiens*. *Hortic Sci* 40:1768–1722
- Capitani, M. I., Ixtaina, V. Y., Nolasco, S. M., Tomás, M. C., 2013. Microstructure, chemical composition and mucilage exudation of chia (*Salvia hispanica* L.) nutlets from Argentina. *J. Sci. Food Agric.*, 93: 3856–3862. doi:10.1002/jsfa.6327

Castillo, U., Myers, S., Browne, L., Strobel, G., Hess, W. M., Hanks, J. and Reay, D., 2005. Scanning electron microscopy of some endophytic streptomycetes in snakevine-*Kennedia nigricans*. *Scanning*, 27: 305–311. doi:10.1002/sca.4950270606

Castillo-López, 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. ISSN 1049-9644, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.03.010>.

Castillo-López, D., Zhu-Salzman, K., Ek-Ramos, M.J., Sword, G., 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. e103891. 10.1371/journal.pone.0103891.

Castillo-Minjarez, J., 2015. Determinación del momento de aplicación de pulsos con 26% de oxígeno para el mejoramiento de la calidad de los conidios de *Isaria fumosorosea*. Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México.

Cheeseman, J.M., 2006. Hydrogen peroxide concentration in leaves under natural conditions. *J Exp Bot* 57:2435–2444

Cherry, A.J., Lomer, C.J., Djegui, D., Shulthess, F., 1999. Pathogen incidence and their potential as microbial control agents in IPM of maize stem borers in West Africa. *BioControl* 44: 301–327.

Comisión Nacional del Agua (CONAGUA), 2014. Estadísticas del Agua en México. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT).

Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO) y Secretaría del Medio Ambiente del Distrito Federal (SEDEMA), 2016. La biodiversidad en la Ciudad de México. [conabio/sedema](http://conabio/sedema). México.

Covarrubias, A., 2007. Sobrevivir al estrés: cómo responden las plantas a la falta de agua. *Revista Biotecnología*. México. Vol. 14: pp. 252-262.

Dai, Z.C., Fu, W., Wan, L.Y., Cai, H.H., Wang, N., Qi, S.S., Du, D.L., 2016. Different Growth Promoting Effects of Endophytic Bacteria on Invasive and Native Clonal Plants. *Frontiers in Plant Science*, 7, 706. <http://doi.org/10.3389/fpls.2016.00706>

David, S., 1998. Producing bean seed: handbooks for small-scale bean producers. Handbook 1. Network on Bean Research in Africa, Occasional Publications Series, No. 29. CIAT, Kampala, Uganda.

De Bary, A., 1866. *Morphologie and Physiologie der Pilze, Flechten and Myxomyceten*, Holfmeister's Handbook of Physiological Botany. Germany : Leipzig; vol. 2.

De Battista, J.P., Bacon, C.W., Severson, R., Plattner, R.D., Bouton, J.H., 1990. Indole Acetic Acid Production by the Fungal Endophyte of Tall Fescue. *Agron. J.* 82:878-880. doi:10.2134/agronj1990.00021962008200050006x

Dere, S., Günes, T., Sivaci, R., 1998. Spectrophotometric determination of chlorophyll – a, b and total carotenoid contents of some algae species using different solvents. *Turk. J. Bot.* 22 (1), 13–18.

Draggen, S., 2007. General characteristics of arctic species and their adaptations in the context of changes in climate and ultraviolet-B radiation levels. In: *Encyclopedia of Earth*. Eds: Cutler J. Cleveland, Washington, DC: Environmental Information Coalition National Council for Science and the Environment, USA.

Dutta, P., Kaushik, H., Bhowmick, P., Puzari, K.C., Hazarika, G.N., 2015. *Metarhizium anisopliae* as endophyte has the ability of plant growth enhancement. *International Journal of Current Research* Vol. 7, Issue, 04, pp.14300-14304.

Elmi, A.A., West, C.P., 1995. Endophyte infection effects on stomatal conductance, osmotic adjustment and drought recovery of tall fescue. *New Phytologist.* 131: 61–67.

Estefes-Chávez, A., 2015. Evaluación de la producción y calidad de hongos entomopatógenos aislados de 5 Delegaciones agrícolas del Distrito Federal. Tesis de Especialización en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México.

European Environment Agency (EAA), 2017. Diccionario académico de tópicos ambientales. <http://epaedia.eea.europa.eu/alphabetical.php?letter=W&gid=108#viewterm> (consultado el 27 de agosto de 2017).

Food and Agriculture Organization (FAO), 2015. Agricultura urbana y periurbana en América Latina y el Caribe.

Gallou, A., Serna-Domínguez, M.G., Berlanga-Padilla, A.M., Ayala-Zermeño, M.A., Mellín-Rosas, M.A., Montesinos-Matías, R., Arredondo-Bernal, H.C., 2016. Species clarification of isolates used as biocontrol agents against (Hemiptera: Liviidae) in Mexico, *Fungal Biology*, Volume 120, Issue 3, Pages 414-423, ISSN 1878-6146, <http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2015.11.009>.

García-Ortiz, N., 2012. Producción de conidios de *Metarhizium anisopliae* var *lepidiotum* en atmósferas oxidantes. México: Tesis de maestría: Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.

Ghahfarokhi, R.M., Goltapeh, M.E., 2010. Potential of the root endophytic fungus *Piriformospora indica*; *Sebacina vermifera* and *Trichoderma* species in biocontrol of take-all disease of wheat *Gaeumannomyces graminis* var *tritici* *in vitro*. *Journal of Agricultural Technology* 6(1): 11-18.

Gibert, A., Volaire, F., Barre, P., Hazard, L., 2012. A fungal endophyte reinforces population adaptive differentiation in its host grass species. *New Phytologist.* 194: 561–571.

Gobierno del Distrito Federal (GDF), 2007. Programa General de Desarrollo del Gobierno del Distrito Federal, 2007-2012. México, DF.

Greenfield, M., Gómez-Jiménez, M.I., Ortiz, V., Vega, F.E., Kramer, M., Parsa, S., 2016. *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* endophytically colonize cassava roots following soil drench inoculation. *Biological Control*, Volume 95, April, Pages 40-48, ISSN 1049-9644, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.01.002>.

Hahn, H., McManus, M.T., Warnstorff, K., Monahan, B.J., Young, C.A., Davies, E., Tapper, B.A., Scott, B., 2008. *Neotyphodium* fungal endophytes confer physiological protection to perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) subjected to a water deficit. *Environmental and Experimental Botany*. 63: 183–199.

Harman, G. E. 2000. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Diseases* 84: 377-393.

Hirsch, G., Braun, U., 1992. Communities of parasitic microfungi. In: Winterhoff W, editor. *Handbook of vegetation science*. Kluwer Academic Publisher. p. 225-250.

Hu, G., St. Leger, R.J., 2002. Field studies using recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 6383–6387.

Hubbard, M., Germida, J.J., Vujanovic, V., 2014. Fungal endophytes enhance wheat heat and drought tolerance in terms of grain yield and second-generation seed viability. *J Appl Microbiol*, 116: 109–122. doi:10.1111/jam.12311

Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI), 2016.

Jacomini, E., Bertani, A., Mapelli, S., 1988. Accumulation of polyethylene glycol 6000 and its effects on water content and carbohydrate level in water-stressed tomato plant. *Can.J.Bot.*66:970-973.

Janes, B.E., 1974. The effect of molecular size concentration in nutrient solution and exposure time on the amount and distribution of polyethylene glycol *Plant Physiol*. 54: 226-229.

Ji, H., Liu, L., Li, K., Xie, Q., Wang, Z., Zhao, X., & Li, X., 2014. PEG-mediated osmotic stress induces premature differentiation of the root apical meristem and outgrowth of lateral roots in wheat. *Journal of Experimental Botany*, 65(17), 4863–4872. <http://doi.org/10.1093/jxb/eru255>

Jones, K.D., 1994. Aspects of the biology and biological control of the European corn borer in North Carolina. Ph.D. Thesis, North Carolina University, Raleigh, NC.

Kabaluk, J.T., Ericsson, J.D., 2007. *Metarhizium anisopliae* seed treatment increases yield of field corn when applied for wireworm control. *Agronomy Journal* 99, 1377–1381.

- Kavková, M., Curn, V., (2005). *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) as a potential mycoparasite on *Sphaerotheca fuliginea* (Ascomycotina: Erysiphales). *Mycopathology*. 159:53-63.
- Khan, A.L., Hamayun, M., Khan, S.A., Kang, S.M, Shinwari, Z.K., Kamran, M., Rehman, S.U., Lee, I.J, 2012a. Pure culture of *Metarhizium anisopliae* LHL07 reprograms soybean to higher growth and mitigates salt stress. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 28: 1483–1494.
- Khan, A.L., Hamayun, M., Radhakrishnan, R., Waqas, M., Kang, S.M, Kim, Y-H, Shin, J.H, Choo, Y.S, Kim, J.G, Lee, I.J, 2012b. Mutualistic association of *Paecilomyces formosus* LHL10 offers thermotolerance to *Cucumis sativus*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 101: 267–279.
- Kim, H.Y., Choi, G.J., Lee, H.B., Lee, S.W., Lim, H.K., Jang, K.S., Son, S.W., Lee, S.O., Cho, K.Y., Sung, N.D. and Kim, J.C., 2007. Some fungal endophytes from vegetable crops and their anti-oomycete activities against tomato late blight. *Letters in Applied Microbiology*, 44: 332–337. doi:10.1111/j.1472-765X.2006.02093.x
- Kuldau, G., Bacon, C.W. 2008. Clavicipitaceous endophytes: their ability to enhance resistance of grasses to multiple stresses. *Biological Control* 46: 57–71.
- Lara-Flores, M., 2015. El cultivo del frijol en México. *Revista Digital Universitaria* [en línea]. 1 de febrero, Vol. 16, No.2 [Consultada: 20 de enero 2017]. Disponible en Internet: <http://www.revista.unam.mx/vol.16/num2/art09/index.html>> ISSN: 1607-6079.
- Latch, G.C.M., 1993. Physiological interactions of endophytic fungi and their hosts. Biotic stress tolerance imparted to grasses by endophytes, *Agriculture, Ecosystems & Environment*, Volume 44, Issue 1, Pages 143-156, ISSN 0167-8809, [http://dx.doi.org/10.1016/0167-8809\(93\)90043-O](http://dx.doi.org/10.1016/0167-8809(93)90043-O).
- Lawlor, D.W., 1970. Absorption of polyethylene glycols by plants and their effects on plant growth. *New Phytol.*69:501-514.
- Lewis, L.C., Bruck, D.J., Gunnarson, R.D., Bidne, K.G., 2001. Assessment of plant pathogenicity of endophytic *Beauveria bassiana* in Bt transgenic and non transgenic corn. *Crop Science* 41, 1395–1400.
- Li, X., Bu, N., Li, Y., Ma, L., Xin, S., Zhang, L., 2012. Growth, photosynthesis and antioxidant responses of endophyte infected and non-infected rice under lead stress conditions. *Journal of Hazardous Materials*. 213: 55–61.
- Lichtenthaler, H.K., Wellburn, A.R., 1985. Determination of Total Carotenoids and Chlorophylls A and B of Leaf in Different Solvents. *Biol. Soc. Trans.* 11. 591-592.
- Lomer, C.J., Cherry, A., Denis, D., 1997. Systemic *Beauveria* isolates for control of maize stem borers in Africa. In: *Proceedings of the 30th Annual Meeting of the Society of Invertebrate Pathology*. Banff, Canada. p. 44.

- López-Cruceño, B., 2016. Producción y formulación de conidios de hongos entomopatógenos aislados del territorio de la Ciudad de México. Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México.
- Maitlo, S.A., Syed, R.N., Rustamani, M.A., Khuhro R.D., Lodhi, A.M., 2014. Comparative efficiency of different fungicides against *Fusarium* wilt of chickpea (*Cicer arietinum* L.). Pak. J. Bot., 46(6); 2305-2312.
- Malinowski, D.P., Belesky, D.P., 2000. Adaptations of Endophyte-Infected Cool-Season Grasses to Environmental Stresses: Mechanisms of Drought and Mineral Stress Tolerance. Crop Sci. 40:923-940. doi:10.2135/cropsci2000.404923x
- Márquez, L.M., Redman, R.S., Rodriguez, R.J., Roossinck, M.J., 2007. A virus in a fungus in a plant-three way symbiosis required for thermal tolerance. Science. 315: 513–515.
- Matsubara Y., Kayukawa Y., Fukui H., 2000. Temperature-stress tolerance of asparagus seedlings through symbiosis with arbuscular mycorrhizal fungus. J Jap Soc Hortic Sci 69:570–575.
- McCormack, J.H., 2004. Bean seed production, an organic seed production manual for seed growers in the Mid-Atlantic and Southern U.S. Cricket Rakita Carolina Farm Stewardship Association. December 28. Version 1.4.
- Mendarte-Alquisira, C., Gutiérrez-Rojas, M., González-Márquez, H., Volke, T., 2016. Improved growth and control of oxidative stress in plants of *Festuca arundinacea* exposed to hydrocarbons by the endophytic fungus *Lewia* sp.. Plant and Soil. 411. 347-358. 10.1007/s11104-016-3035-6.
- Mhamdi, A, Queval, G., Chaouch, S., Vanderauwera, S., Van Breusegem, F., Noctor, G., 2010. Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models. J Exp Bot 61:4197–4220
- Michel, B.E., 1983. Evaluation of the Water Potentials of Solutions of Polyethylene Glycol 8000. Plant Physiol. 72:66–70.
- Michel, B.E., Kaufmann, M.R., 1973. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. Plant Physiol. 51:914-917.
- Moonjely, S., Barelli, L., Bidochka, M.J., 2016. Insect Pathogenic Fungi as Endophytes, Advances in Genetics, Volume 94, Pages 107-135, ISSN 0065-2660, <http://dx.doi.org/10.1016/bs.adgen.2015.12.004>.
- Muñoz, L.A., Cobos, A., Diaz, O., Aguilera, J.M., 2012. Chia seeds: Microstructure, mucilage extraction and hydration, Journal of Food Engineering, Volume 108, Issue 1, Pages 216-224, ISSN 0260-8774, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.06.037>
- Oberhofer, M., Güsewell, S., Leuchtman, A., 2014. Effects of natural hybrid and non-hybrid *Epichloë* endophytes on the response of *Hordelymus europaeus* to drought stress. New Phytologist 201, 242-253.

Ortiz-Urquiza, A., Luo, Z., Keyhani, N., 2014. Improving mycoinsecticides for insect biological control. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 99. doi:10.1007/s00253-014-6270-x.

Ownley, B.H., Gwinn, K.D., Vega, F.E., 2010. Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. *BioControl* 55:113–28.

Parsa, S., Ortiz, V., Vega, F. E., 2013. Establishing Fungal Entomopathogens as Endophytes: Towards Endophytic Biological Control. *J. Vis. Exp.* (74), e50360, doi:10.3791/50360

Porcel, R., Aroca, R., Cano, C., Bago, A., Ruiz-Lozano, J.M., 2006. Identification of a gene from the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus irregularis* encoding for a 14-3-3 protein that is up-regulated by drought stress during the AM symbiosis. *Microb. Ecol.* 52, 575–582.

Porrás-Alfaro A, Bayman P (2011) Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. *Annu Rev Phytopathol* 49:291–315.

Prestidge, R.A., Gallagher, R.T., 1988. Endophyte fungus confers resistance to ryegrass: Argentine stem weevil larval studies. *Ecological Entomology*. 13: 429–435.

Rahman, I.M., Lisar, S., Motafakkerzad, R., Hossain, M., 2012. *Water Stress in Plants: Causes, Effects and Responses*, Water Stress, Prof. Ismail Md. Mofizur Rahman (Ed.), ISBN: 978-953-307-963-9, InTech, doi: 10.5772/39363.

Reid, C.P., Bowen, G.D., McCleod, S., 1978. Phosphorus contamination in polyethylene glycol. *Plant Physiol.* 61:708-709.

Rodríguez, R., Redman, R., 2008. More than 400 million years of evolution and some plants still can't make it on their own: plant stress tolerance via fungal symbiosis. *Journal of Experimental Botany*. 59: 1109–1114.

Rojas-Loria, C.C., 2010. Efecto de la interacción hongo- *Dodonaea viscosa* L. Jacq en la fitorremediación de plomo en un sistema *in vitro*. México: Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

Rojas-Martínez, L., Visser, R.G., de Klerk, G.J., 2010. The hyperhydricity syndrome: waterlogging of plant tissues as a major cause. *Propag Ornament Plants*. 10(4): p.169-175.

Sasan, R. K., 2012. The analysis of *Metarhizium robertsii* potential as endophytic plant root coloniser, plant growth enhancer and antagonist to bean root pathogen *Fusarium solani* f. *sp. phaseolis*. Brock University, Centre for Biotechnology. St. Catharines, Ontario.

Sasan, R.K., Bidochka, M.J., 2012. The insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* (Clavicipitaceae) is also in endophyte that stimulates plant root development. *Am. J. Bot.*, 99, 101-107.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), 2013. Anuario Estadístico de acuicultura y pesca 2011. Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca. México. En: <<http://www.siap.gob.mx/wpcontent/uploads/2013/12/Anuario-estadistico-de-Acuicultura-y-Pesca-2011-.pdf>>, última consulta: 14 de abril de 2016.

Secretaría de Desarrollo Urbano y Vivienda (SEDUVI), 2015. Decreto que contiene el Programa Delegacional de Desarrollo Urbano para la CDMX.

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), 2013. Plan rector sistema producto hortalizas del Distrito Federal.

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), 2014. Ficha técnica de cultivos en México.

Sen, A., Alikamanoglu, S., 2013. Antioxidant enzyme activities, malondialdehyde, and total phenolic content of PEG-induced hyperhydric leaves in sugar beet tissue culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*. 49. 10.1007/s11627-013-9511-2.

Singh, S. P., Teran, H., Munoz, C.G., Takegami, J.C., 1999. Two cycles of recurrent selection for seed yield in common bean, *Crop Science*, 39, pp. 391–397.

Smith, S.E., Read, D.J., 2008. Mycorrhizal symbiosis, 3rd edition Elsevier and Academic, New York, London, Burlington, San Diego.

St. Leger, R.J., 2008. Studies on adaptations of *Metarhizium anisopliae* to life in the soil. *Journal of Invertebrate Pathology* 98: 271-276.

Türkan, İ., Bor, M., Özdemir, F., Koca, H., 2005. Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress, *Plant Science*, Volume 168, Issue 1, Pages 223-231, ISSN 0168-9452, <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.07.032>.

Vakili, N.G., 1991. Biocontrol of stalk rot in corn. In: Proceedings of the Fortyfourth Annual Corn and Sorghum Industry Research Conference, December 6–7, 1989, Chicago. IL. American Seed Trade Association, Washington, DC. pp. 87–105.

Vega F.E., Posada F., Aime M.C., Pava-Ripoll M., Infante F., Rehner S.A., 2008. Entomopathogenic fungal endophytes. *Biol Control* 46:72–82

Vega, F., 2008. Insect pathology and fungal endophytes. *Journal of Invertebrate Pathology* 98, 277–279.

Verslues, P.E., Ober, E.S., Sharp, R.E., 1998. Root growth and oxygen relations at low water potentials. Impact of oxygen availability in polyethylene glycol solutions. *Plant Physiol*.116:1403-1412.

Vujanovic, V, 2007. Mycovitality—a new concept of plant biotechnology. *Can. J. Plant Pathol*. 29(4): 451–451

Wagner, B.L., Lewis, L.C., 2000. Colonization of corn, *Zea mays*, by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 3468–3473.

Waller, F., Achatz, B., Baltruschat, H., Fodor, J., Becker, K., Fischer, M., Heier, T., Hüchelhoven, R., Neumann, C., von Wettstein, D., Franken, P., Kogel, K.H., 2005. The

endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102(38): 13 386 – 13 391. doi:10.1073/pnas.0504423102. PMID: 16174735

Walton, B.T., Guthrie, E.A., Hoylman, A.M., 1994. Toxicant degradation in the rhizosphere. In Bioremediation through rhizosphere technology.

Wang, C., St. Leger, R., 2007. The *MAD1* Adhesion of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the *MAD2* Adhesion enables attachment to plants. *Eukaryotic Cell* 6: 808-816.

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

Yaniv, Z., Werker, E., 1983. Absorption and secretion of polyethylene glycol by Solanaceous plants. *J.Exp.Bot.*34:1577-1584.

Yedidia, I., Benhamou, N., Chet., I., 1999. Induction of defence responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 1061-1070.

Young, J., Evans, R., 1973. Mucilaginous Seed Coats. *Weed Science*, 21(1), 52-54. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/4042251>

Zhou, D., 2012. Seed Germination Performance and Seed Coat Mucilage Production of Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.). Virginia Tech. Thesis for the degree of master. 12-03. <http://hdl.handle.net/10919/49553>



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00239

Matrícula: 2153804269

CONDICIONES PARA ESTABLECER  
LA RELACIÓN *Phaseolus  
vulgaris*- HONGO  
ENTOMOPATÓGENO Y SU  
RESPUESTA A ESTRÉS INDUCIDO  
POR PEG.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD AUTÓNOMA IZTAPALAPA

30 AGO 2017

COORDINACIÓN DE SISTEMAS ESCOLARES

En la Ciudad de México, se presentaron a las 10:00 horas del día 29° del mes de agosto del año 2017 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. TANIA LORENA VOLKE SEPULVEDA  
DRA. MARIA FLORES CRUZ  
DR. FACUNDO RAFAEL MUÑIZ PAREDES  
DRA. CLAUDIA BARBOSA MARTINEZ



EMMANUEL AGUSTÍN REYNOSO LOPEZ  
ALUMNO

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA

DE: EMMANUEL AGUSTIN REYNOSO LOPEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. EDITH FONCE ALQUICIRA

PRESIDENTA

DRA. TANIA LORENA VOLKE SEPULVEDA

VOCAL

DRA. MARIA FLORES CRUZ

VOCAL

DR. FACUNDO RAFAEL MUÑIZ PAREDES

SECRETARIO

DRA. CLAUDIA BARBOSA MARTINEZ