

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

ACTIVIDAD ENDÓFITA Y PROMOTORA DEL
CRECIMIENTO DE *Metarhizium robertsii* EN CAÑA
DE AZÚCAR

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

IBT. ROBERTO CARLOS SOTELO VALDEZ

TUTOR: IRENE DE LA CONCEPCIÓN PEREA
ARANGO

CO-TUTOR: DR. VICTOR MANUEL HERNÁNDEZ
VELÁZQUEZ

CUERNAVACA, MORELOS



El presente proyecto se llevó a cabo en el Laboratorio de Botánica Estructural y en el Laboratorio de Control Biológico del Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB) perteneciente a la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM) y bajo la Dirección de la Dra. Irene de la Concepción Perea Arango y Co-dirección del Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante mis estudios de Maestría (Número de Becario: 1044092).

Al Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB) de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, por darme la oportunidad de poder realizar mis estudios en la Maestría en Biotecnología dentro de sus instalaciones.

A mi directora de tesis, la Dra. Irene de la Concepción Perea Arango, por aceptarme bajo su dirección y dentro de su grupo de trabajo, por el apoyo, dedicación y comprensión brindados durante mi formación académica.

A mi codirector de tesis, el Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez, por aceptarme tener bajo su dirección, así como por permitirme realizar gran parte de mis experimentos dentro de su grupo de trabajo durante mi formación académica.

Al Dr. Guadalupe Peña Chora por aceptar ser parte de mi comité tutorial, por sus observaciones y recomendaciones.

A la Dra. Susana Valencia Díaz por formar parte de mi comité tutorial, por asesorarme con el diseño experimental y por sus observaciones y comentarios durante el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Edgar Martínez Fernández por formar parte de mi comité tutorial, por sus comentarios y observaciones para mejorar el presente proyecto.

A la Mtra. Silvia Hernández por su amistad, consejos, y apoyo, por sus observaciones y consejos en pro del presente proyecto de maestría.

A la Mtra. Alicia Fonseca González por su valiosa amistad y por apoyarme en todo momento con los experimentos del laboratorio.

A mis compañeros del Laboratorio de Botánica Estructural y del Laboratorio de Control Biológico.

DEDICATORIA

A mi familia, amigos y profesores.

"Es fácil vivir para los demás, todos lo hacen. Te pido que
vivas para ti mismo"

-Ralph Waldo

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	5
2. ANTECEDENTES	7
2.1. La caña de azúcar	7
2.2. Clasificación Taxonómica	8
2.3. Morfología	8
2.3.1. Las raíces	8
2.3.2. El tallo	9
2.3.3. Las hojas	10
2.3.4. Inflorescencia	11
2.4. Requerimientos edafoclimáticos y nutricionales de la caña de azúcar	12
2.4.1. Climatización	12
2.4.2. Temperatura	12
2.4.3. Luz solar	13
2.4.4. Precipitación	13
2.4.5. Suelos	13
2.5. Etapas de crecimiento de la caña de azúcar	13
2.6. Generalidades de los Hongos	15
2.7. Interacciones de los hongos con las plantas	16
2.8. Los hongos endófitos	16
2.8.1. Propiedades fisiológicas de los hongos endófitos	17
2.8.2. Hongos endófitos y su asociación con plantas hospederas.	18
2.9. <i>Metarhizium robertsii</i>	21
2.9.1. Clasificación taxonómica	22
2.9.2. Actividad endófito y entomopatógena de <i>Metarhizium</i>	22
2.9.3. ° como promotor del crecimiento	26
3. JUSTIFICACIÓN	28
4. HIPÓTESIS	29
5. OBJETIVOS	29
5.1. Objetivo general	29
5.2. Objetivos específicos	29
6. MATERIALES Y MÉTODOS	30

6.1 Área de Estudio	30
6.2 Preparación del Inóculo	30
6.3 Conteo de conidios en cámara de Neubauer improved y ajuste de concentración de la suspensión inicial a una concentración final	31
6.4 Preparación del sustrato	33
6.5 Aclimatación de plántulas de caña de azúcar (<i>saccharum officinarum</i>).....	33
6.6 Inoculación de las plántulas de caña de azúcar.....	34
6.7 Evaluación de la actividad endófito de <i>M. robertsii</i> en raíces de caña de azúcar	35
6.8 Evaluación de la actividad endófito de <i>M. robertsii</i> en tejido aéreo de la caña de azúcar	36
6.9 Evaluación de la actividad promotora de crecimiento de <i>M. robertsii</i> en caña de azúcar	37
7. Determinación de clorofilas A y B en plantas de caña de azúcar inoculadas con <i>M. robertsii</i>	37
7.1. Análisis estadístico.....	37
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
8.1 Evaluación de la actividad endófito de <i>M. robertsii</i> en raíces y tejido aéreo en plantas de caña de azúcar	38
8.2 Evaluación de la actividad promotora de crecimiento de <i>M. robertsii</i> en caña de azúcar	42
8.3 Determinación de clorofila A y B en plantas de caña de azúcar inoculadas con <i>M. robertsii</i>	47
9. CONCLUSIONES	49
10. PERSPECTIVAS.....	50
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Raíz de la caña de azúcar.....	9
Figura 2. Tallo de la caña de azúcar y las principales partes que lo componen	10
Figura 2. Hoja de la caña de azúcar y las partes que la componen	11
Figura 3. Inflorescencia o flor de la caña de azúcar	12
Figura 4. Etapas de crecimiento de la caña de azúcar	13
Figura 5. Respuesta inmune de las plantas al reconocer moléculas microbianas señal, activando dos diferentes sistemas de defensa	19
Figura 6. Mecanismos propuestos en la interacción entre hongos endófitos y sus plantas hospederas.	20
Figura 7. Colonización endofítica de células corticales de raíz de frijol por <i>M. robertsii</i> fusionado a una proteína verde fluorescente.	23
Figura 9. Cultivo de <i>M. robertsii</i> HPI-017 en medio SDA.....	30
Figura 10. Cuadrantes que se usaron para el conteo en la cámara de Neubauer.....	31
Figura 11. Mezcla de sustratos peat moss y vermiculita en proporción 2:1.....	32
Figura 12. Plántulas de caña de azúcar.	33
Figura 13. Raíces en segmentos colocados en portaobjetos para su observación al microscopio.....	34
Figura 14. Porcentaje de colonización de <i>M. robertsii</i> HPI-017 en tejido aéreo (tallos y hojas) de caña de azúcar de la variedad CP72–2086 a los 90 ddi.....	38
Figura 8. Porcentaje de colonización de <i>M. robertsii</i> HPI-017 en raíces de caña de azúcar de la variedad CP72–2086 a los 30 ddi.....	38
Figura 9. Porcentaje de colonización de <i>M. robertsii</i> HPI-017 en raíces de caña de azúcar de la variedad CP72–2086 a los 60 ddi.	40
Figura 10. Porcentaje de colonización de <i>M. robertsii</i> HPI-017 en raíces de caña de azúcar de la variedad CP72–2086 a los 90 ddi.....	40
Figura 11. Actividad endófitas de <i>M. robertsii</i> HPI-017 en raíces de caña de azúcar variedad CP 72-2086 a los 60 ddi	41
Figura 19. Tratamientos de plantas de caña de azúcar de la variedad CP72-2086 inoculadas con <i>M. robertsii</i>	45
Figura 20. Contenido de Clorofila A y B en plantas de caña de azúcar inoculadas con <i>M. robertsii</i> a los 90 ddi.....	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Etapas del cultivo de caña de azúcar.....	14
Tabla 2. Clasificación taxonómica de <i>Metarhizium robertsii</i> (Metschn.) Sorokīn, 1883 (GBIF Secretariat, 2019).....	22
Tabla 3. Evaluación de la actividad endófito de <i>Metarhizium</i> sobre diferentes cultivos.	24
Tabla 4. Actividad endófito y entomopatogena de <i>M. robertsii</i> sobre diferentes plagas y cultivos.....	26
Tabla 5. Tratamientos llevados a cabo para el estudio de la actividad endófito promotora de crecimiento de <i>M. robertsii</i> en Caña de azúcar.....	29
Tabla 6. Evaluación de la actividad promotora de crecimiento de <i>M. robertsii</i> en caña de azúcar.....	44

RESUMEN

En el presente estudio se evaluó la actividad endófito y promotora de crecimiento de *Metarhizium robertsii* HPI-017 en plantas de caña de azúcar. Se llevaron a cabo 3 tratamientos: 1) Plantas sin inocular (Solución de Tween 0.01 %, control), 2) Plantas con 100 mL de inóculo (2.0×10^8 conidios/mL) en el sustrato, 3) Plantas inoculadas sobre toda la planta por aspersión empleando un atomizador con 100 mL de suspensión con 2.0×10^8 conidios/mL a la caña de azúcar. Posteriormente se seleccionaron al azar segmentos de raíces que fueron teñidas con azul de tripano que se observaron bajo el microscopio para así determinar si *M. robertsii* HPI-017 es capaz de colonizar estas raíces. También se evaluaron parámetros de crecimiento como la longitud del tallo, diámetro del tallo, longitud de la raíz, número de hojas, peso seco de la raíz, peso seco del tejido vegetal aéreo (tallo y hojas) y contenido de clorofilas A y B para evaluar el efecto de *M. robertsii* HPI-017 en el desarrollo y fisiología de las plantas de caña. Los resultados obtenidos demostraron porcentajes de colonización de las raíces mayores al 90%. Además, se observó colonización del tejido aéreo de las plantas y una respuesta favorable de *M. robertsii* HPI-017 en desarrollo de las plantas de caña de azúcar con diferencias estadísticamente significativas en la evaluación de los parámetros antes mencionados.

Palabras clave: hongos endófitos, Caña de azúcar, Colonización, promotor, crecimiento, clorofilas. *M. robertsii*

ABSTRACT

In the present study, the endophytic and growth-promoting activity of *Metarhizium robertsii* HPI-017 in sugarcane plants was evaluated. Three different treatments methods were used: 1) Plants without inoculation (Tween Solution 0.01%, control), 2) Plants with 100 ml of inoculum (2.0×10^8 conidia/mL) in the substrate, 3) Plants inoculated over the entire plant by spraying using an atomizer with 100 ml of suspension with 2.0×10^8 conidia/mL to the sugar cane. Subsequently, root segments were randomly selected and stained with trypan blue and observed under the microscope to determine if *M. robertsii* HPI-017 is capable of colonizing these roots. Growth parameters such as stem length, stem diameter, root length, number of leaves, root dry weight, dry weight of aerial plant tissue (stem and leaves) and chlorophyll A and B content were also evaluated. to evaluate the effect of *M. robertsii* HPI-017 on the development and physiology of sugarcane plants. The results obtained showed percentages of root colonization greater than 90%. In addition, colonization of the aerial tissue of the plants and a favorable response of *M. robertsii* HPI-017 in the development of the sugarcane plants were observed, with statistically significant differences in the evaluation of the aforementioned parameters.

Keywords: endophytic fungi, sugarcane, colonization, promoter, growth, chlorophylls.
M. robertsii

1. INTRODUCCIÓN

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) representa una de las fuentes más importantes de azúcar en México y el mundo. En México la producción alcanza hasta un total de 847,447 ha de siembra en 16 estados de la república (SIAP, 2020). Sin embargo, el desarrollo y crecimiento de este cultivo puede verse afectado por factores bióticos y abióticos que impactan directamente en los rendimientos de las cosechas.

Aunado a lo anterior es común que la caña de azúcar tenga deficiencias en los nutrimentos y condiciones climáticas en las que se desarrolla, afectando de esta manera la productividad de la misma. La composición de los suelos puede llegar a ser pobre por lo que es necesario el uso de fertilizantes que aporten los elementos necesarios para obtener un cultivo de calidad. Sin embargo, el uso desmedido de fertilizantes genera daños que impactan en el medio ambiente, tales como; la degradación de los suelos, contaminación de los recursos hídricos y deterioro en la salud del ser humano, entre otros (FAO, 2019).

Por lo anterior se busca implementar nuevas alternativas, amigables con el medio ambiente ante el uso indiscriminado de fertilizantes químicos, usando microorganismos benéficos capaces de conferirle a las plantas una mejor absorción de los nutrientes. Entre estos microorganismos se encuentran las bacterias, nemátodos, algas y hongos benéficos, que puedan generar relaciones simbióticas benéficas. Recientemente se sabe que los hongos endófitos tienen la capacidad promotora de crecimiento, colonizando principalmente las raíces de las plantas, una vez dentro tienen la capacidad de conferir resistencia contra patógenos e insectos, promover el crecimiento, al metabolizar compuestos como el ácido 1-aminociclopropano1-carboxílico (ACC) o por la producción reguladores de crecimiento) (Deng y Cao, 2017).

Anteriormente se conocía que *Metarhizium spp.* estaban adaptados como entomopatógenos de insectos, no obstante, muchas de las especies se asocian como endófitos con la rizosfera de las plantas, promoviendo su crecimiento y confiriéndoles resistencia contra estrés abiótico como tolerancia a sequías, alta salinidad, resistencia a bajas temperaturas y bajo pH (Raya-Díaz et al. 2017),

Teniendo en cuenta el reciente descubrimiento de la actividad endófitra de los hongos entomopatógenos e impacto que tienen las relaciones simbióticas entre hongos endófitos y plantas, en el presente trabajo se evaluó la actividad endófitra y promotora de crecimiento de *M. robertsii* HPI-017 en plantas de caña de azúcar de la variedad CP 72-2086.

2. ANTECEDENTES

2.1. La caña de azúcar

Saccharum officinarum L. comúnmente conocida como caña de azúcar, caña dulce, caña miel o simplemente caña, es una Poaceae tropical perenne de tallos fibrosos, altos y gruesos proveniente de Nueva Guinea e introducida en Egipto alrededor del 647 D.C. y un siglo después a España (Ramírez, 2008).

Representa una de las fuentes más importantes de azúcar en México y en más de 130 países donde se cultiva para la provisión de alimentos e insumos en la industria sacroquímica y bioenergética. Las características que le dan a este cultivo un alto valor económico se deben a que es una especie altamente productiva, muy eficiente en el uso de insumos y recursos productivos (Gómez-Merino et al. 2017; Castillo et al. 2018; Duarte-Almeida et al. 2006).

En México, la producción de la caña de azúcar forma la agroindustria más importante, posicionándolo entre los 10 principales países productores de azúcar. Según el SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera) en el año 2020 se sembró un total de 847,447 ha en 16 estados que conforman la república mexicana, generando así una gran cantidad de empleos directos e indirectos y aportando 1.98 % del PIB manufacturero, 16.44 % del PIB agropecuario y 8.29 % del PIB de la industria alimentaria (Gómez-Merino et al. 2017).

En el Estado de Morelos se sembraron 24,000 ha en el año 2020 con un rendimiento de 101.805 ton/ha (SIAP, 2020) permitiendo de esta manera que se generen productos con valor agregado y contribuyendo a que la caña sea uno de los cultivos comerciales de primera importancia, sin embargo, el desarrollo y crecimiento de este cultivo puede verse perjudicado por factores bióticos y abióticos, impactando directamente en los rendimientos de las cosechas.

2.2. Clasificación Taxonómica

La clasificación taxonómica de la caña de azúcar se presenta a continuación (Ecured, 2017):

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Liliopsida
SubClase:	Commelinidae
Orden:	Poales
Familia:	Poaceae
Género:	<i>Saccharum</i>
Especie:	<i>officinarum</i> L.

2.3. Morfología

Es una gramínea tropical que alcanza una altura de 5 m de altura, con tallos macizos y gruesos que llegan a medir hasta 6 cm de diámetro (CONADESCUA, 2015); en los cuales se forma y acumula un jugo rico en sacarosa que posteriormente se cristaliza en los ingenios para producir azúcar. Como subproductos se genera melaza y bagazo; la melaza se utiliza para la producción de bebidas alcohólicas y el bagazo para la producción de papel y combustibles. (Bautista-Gálvez y González-Cortes 2005).

A continuación, detallaremos las partes que componen a la caña de azúcar (Bustamante, 2015):

2.3.1. Las raíces

Las raíces son fibrosas y llegan a extenderse en más de 78 cm en suelos en los cuales la profundidad se los permita, aproximadamente el 80 % del total de las raíces se encuentra dentro de los primeros 35 cm de profundidad del suelo. Su función es absorber agua y nutrientes y estructuralmente permiten a la planta tener un mejor anclaje al suelo. La raíz se divide en raíz primaria; la cual deriva del meristemo apical radicular, raíces adventicias, derivadas de meristemos intercalares y que a su vez se subdividen en raíces primordiales y permanentes. Las primeras son raíces delgadas que la planta eliminará una vez que comienza a desarrollarse, estas se ramifican y

adsorben agua y minerales. Las segundas se desarrollan una vez que han brotado los nuevos tallos, estas se distinguen de las primordiales por ser más gruesas y largas (Figura 1).

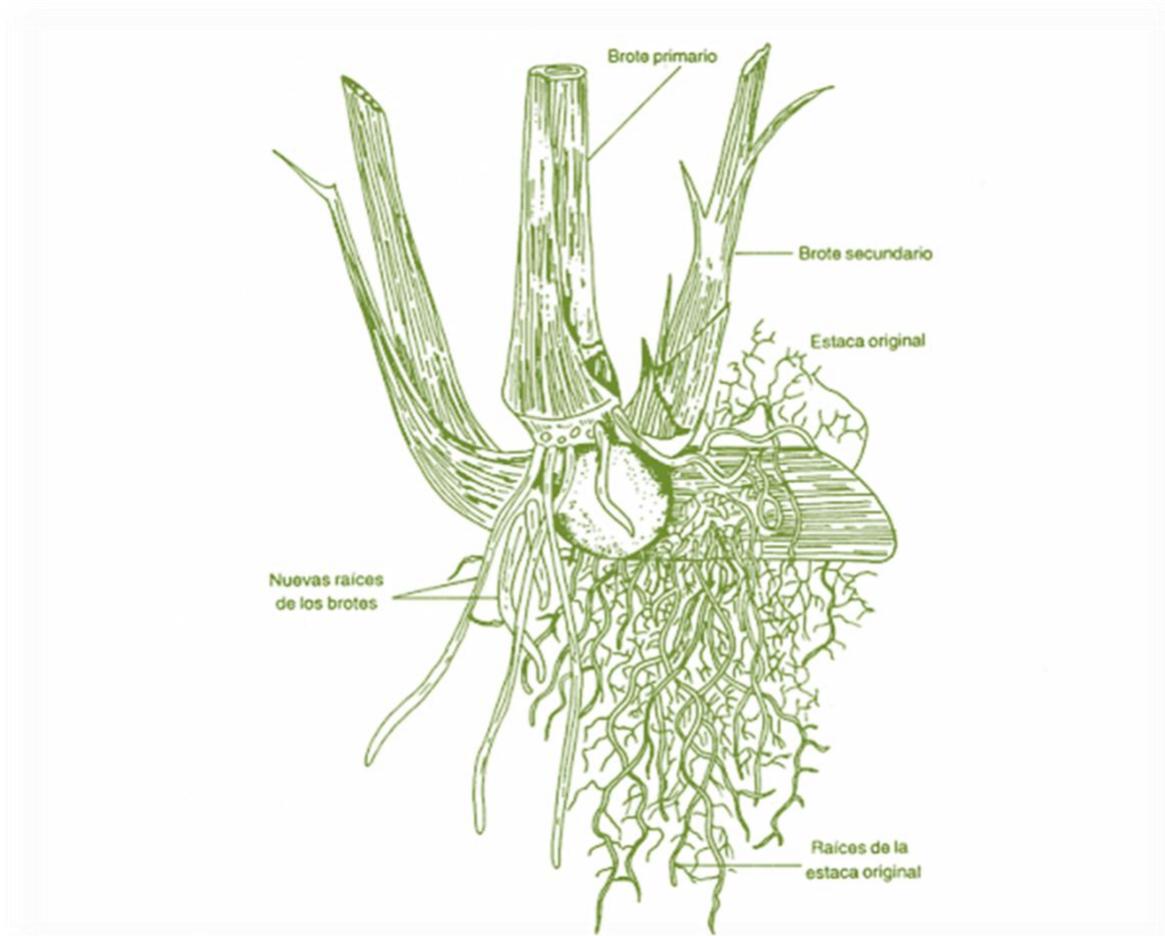


Figura 12. Raíz de la caña de azúcar

Fuente: Estévez, 2008

2.3.2. El tallo

El tallo por su parte se encuentra dividido en nudos y entrenudos, el primero es la parte del tallo donde emerge la hoja y que consta de una cicatriz foliar, una zona radical, un anillo de crecimiento, una banda cerosa y de yemas, mientras que el segundo; comprende el espacio que existe entre cada nudo y se compone del canal de la yema, las secciones corchosas, las rajaduras y tricomas. Su longitud difiere entre las diferentes variedades que existen y va desde los 2 y hasta 5 m de altura y su grosor de los 5 y hasta los 6 cm de diámetro. Adicionalmente el desarrollo de la planta se compone de una parte sólida y una líquida; la sólida es la fibra y la líquida

está compuesta principalmente por agua y sacarosa, aunque también en menor medida por sales y ácidos orgánicos (Figura 2).

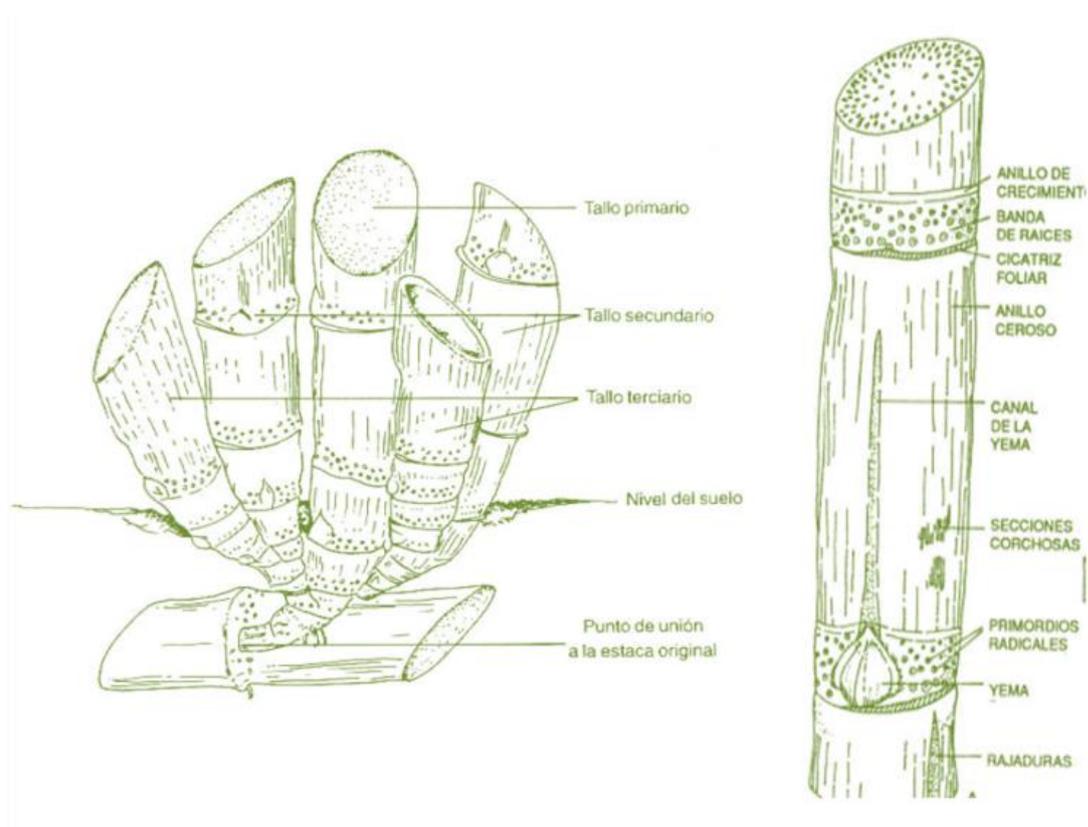


Figura 13. Tallo de la caña de azúcar y las principales partes que lo componen.

Fuente: Estévez, 2008

2.3.3. Las hojas

Las hojas por su parte tienen forma de vaina y miden generalmente de entre 0.90 a 1.5 m de largo y de 1 a 10 cm de ancho, nacen de los entrenudos del tallo, son largas y tienen la función de realizar la fotosíntesis y de proteger a la yema, al caerse nacen nuevas de los nudos superiores. Las partes que la componen son; la lámina foliar, que es ancha y larga, realizando actividad fotosintética, la nervadura central; es una estructura que recorre la lámina, la yagua o vaina; es de forma cilíndrica con mayor anchura en la base y estrechándose gradualmente hasta la banda lígular, su función es dar soporte a la hoja en cada nudo (Figura 3).

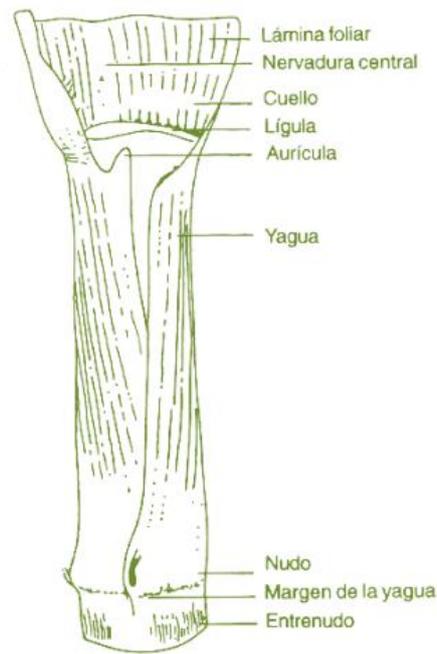


Figura 14. Hoja de la caña de azúcar y las partes que la componen.

Fuente: Estévez, 2008

2.3.4. Inflorescencia

Finalmente, en la cúspide de la caña de azúcar se encuentra la inflorescencia (Figura 4), que, es una espiga compuesta; estructuralmente, es una inflorescencia, estas mismas son hermafroditas, su tamaño, forma y color varía dependiendo de la especie y variedad de caña, alcanzando longitudes de hasta 1 m (Díaz y Portocarrero, 2002).

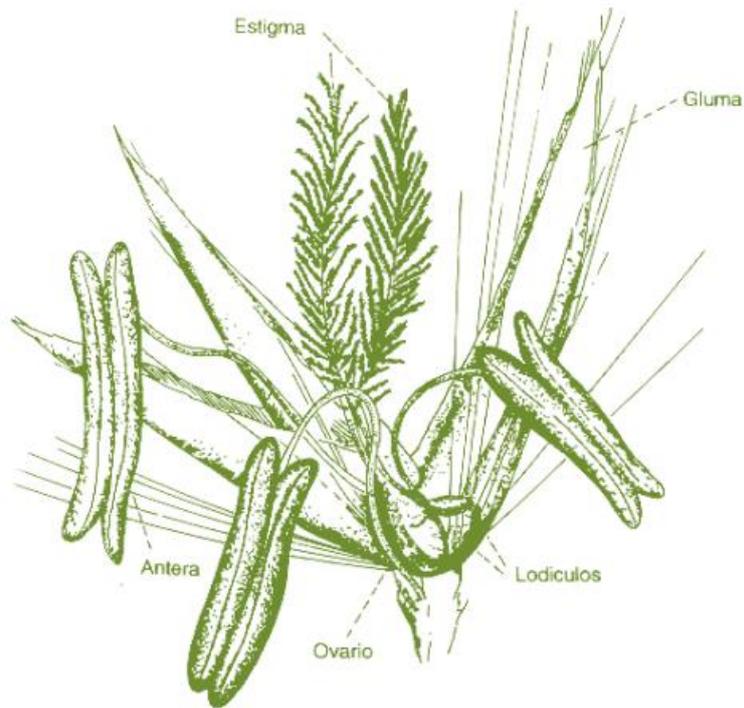


Figura 15. Inflorescencia o flor de la caña de azúcar.

Fuente: Estévez, 2008

2.4. Requerimientos edafoclimáticos y nutricionales de la caña de azúcar

2.4.1. Características de hábitat

El cultivo se desarrolla bien en suelos franco arcillosos, profundos y fértiles de zonas tropicales y subtropicales con altitudes de 0 a 1000 m sobre el nivel del mar y con un pH óptimo de 6.5 aunque también tolera pH de 4 a 8.3 (INFOAGRO 2021).

2.4.2. Temperatura

Una óptima temperatura para su crecimiento va por encima de los 24 °C, y se considera óptima una temperatura que oscila entre 32-38 °C. Temperaturas por debajo de los 20 °C propician a una germinación y desarrollo lentos (INFOAGRO 2021).

2.4.3. Luz solar

Para un buen rendimiento de este cultivo son necesarias grandes cantidades de radiación solar incidente. Ya que las hojas superiores interceptan más del 70% de la radiación solar y transforman hasta el 2% de la radiación solar incidente en biomasa (INFOAGRO 2021).

2.4.4. Precipitación

Los requerimientos hídricos óptimos van de 1200 a 1700 mm anuales para el desarrollo vegetativo mientras que para la producción y acumulación de carbohidratos se necesitan de condiciones con menor aporte hídrico (Vásquez, 2017; INFOAGRO, 2021).

2.4.5. Suelos

La caña de azúcar es un cultivo adaptable y por tanto puede desarrollarse en suelos marginales con cambios en la fertilidad del suelo. Son 16 elementos nutritivos los que son necesarios para el desarrollo de dicho cultivo, los cuales son el carbono, el hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, fósforo, potasio, magnesio, azufre, calcio, zinc, cloro, boro, cobre, manganeso, hierro y molibdeno (Quintero, 1995).

2.5. Etapas de crecimiento de la caña de azúcar

El crecimiento y desarrollo de la caña de azúcar es variable, puede durar desde 14 y hasta 17 meses. Pasando por cuatro etapas: germinación, amacollamiento, crecimiento rápido y maduración, ver Figura 5, y tabla 1. (SAGARPA, 2015).

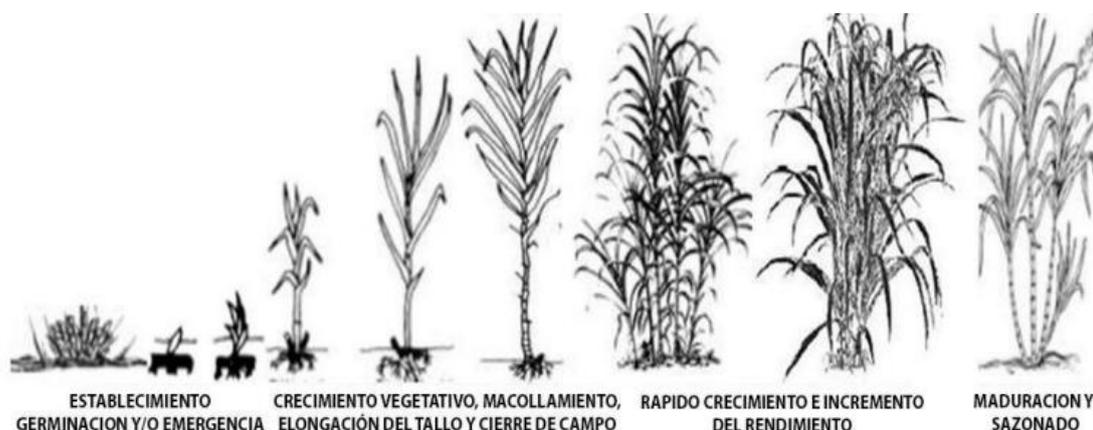


Figura 16. Etapas de crecimiento de la caña de azúcar.

Fuente: Bustamante, 2015

Tabla 1. Etapas del cultivo de caña de azúcar.

Etapas	Evento	Duración	Temperatura óptima de desarrollo
Germinación	Crecimiento y desarrollo de órganos primordios latentes de la yema.	7 a 10 días prolongándose hasta 35 días.	24 a 37 °C
Amacollamiento	Brote de tallos a partir de las articulaciones nodales.	85 días aproximadamente.	30 °C
Crecimiento rápido	Formación y elongación de la caña de azúcar.	Comienza alrededor de los 120 días después de la plantación y hasta los 180 días se define la población de tallos.	30 °C
Maduración	Síntesis y acumulación de sacarosa en los tallos.	2 a 3 meses	30 °C

A menudo es común que la caña de azúcar tenga deficiencias en los nutrimentos y condiciones climáticas en las que se desarrolla, afectando de esta manera la productividad de la misma. La composición de los suelos puede llegar a ser pobre por lo que es necesario el uso de fertilizantes que aporten los elementos necesarios para obtener un cultivo de calidad. Entre estos elementos se encuentra principalmente el nitrógeno (N), el potasio (K) y el fósforo (P); el N favorece el amacollamiento de la planta, el K además de ayudar al crecimiento está relacionado con el transporte de azúcares de las hojas a los tallos y el P es indispensable para sintetizar clorofila y sacarosa en el tallo (Aucatoma et al., 2015).

El uso de fertilizantes nitrogenados a menudo se suministra en cantidades variadas de acuerdo a las especificaciones de cada uno de ellos. Estos mejoran considerablemente los rendimientos de los cultivos, sin embargo, estos fertilizantes son utilizados por los agricultores desmedidamente generando daños que impactan en el medio ambiente (FAO, 2019). Además, llegan a ser costosos por lo que algunos agricultores no son capaces de costearlos, limitando así su uso y reduciendo el rendimiento y calidad del cultivo.

Ante el uso indiscriminado de fertilizantes químicos, se están implementando alternativas amigables con el medio ambiente como lo es; el uso de microorganismos benéficos capaces de conferir a las plantas una mejor absorción de los nutrientes que por sí solas serían incapaces de asimilar o que lo asimilan en bajas cantidades. Entre estos microorganismos se encuentran bacterias, nematodos, algas, microatrópodos y hongos benéficos que pueden generar relaciones simbióticas, confiriéndole a las plantas promotores de crecimiento e influenciando en las propiedades físicas y químicas del suelo, además de cumplir con el papel de organismos entomopatógenos (Sarabia, et al. 2010)

2.6. Generalidades de los Hongos

Los hongos pertenecen al reino Fungí, en el que se incluyen aquellos organismos carecientes de cloroplastos y, por ende, heterótrofos. Crecen de forma filamentosa multicelular, estos filamentos se conocen como hifas. Las redes de hifas se ramifican y tienen múltiples núcleos genéticamente idénticos por lo que se considera un organismo único, denominado técnicamente como micelio, poseen paredes celulares compuestas por quitina y células con especialización funcional (Samson, 2011; Moreno, 2018)

Estos organismos eucariotas obtienen su alimento mediante la secreción de enzimas, pues gracias a ellas pueden absorber las sustancias orgánicas disueltas a través de su superficie celular, es decir, realizan una nutrición osmoheterotrófica (Raghukumar, 2017). La mayoría de los hongos son filamentosos, la estructura celular básica es la hifa, un compartimento en forma tubular que está rodeado de una pared celular rígida de glucano, quitina y glicoproteínas. Estas hifas se ramifican hasta formar una red denominada como micelio, mismo que conforma el cuerpo

vegetativo de los hongos pluricelulares (Arias, 2013). En la naturaleza, el micelio de muchos hongos es capaz de colonizar y penetrar tejidos de plantas, insectos y humanos, esto, a través de determinados órganos y producción de enzimas (Samson, 2011). Los hongos generalmente se reproducen de diferentes maneras, por medio de esporas generadas sexualmente o asexualmente. Cuando no se reproducen por medio de esporas, lo hacen por fragmentación (Webster y Weber, 2007).

2.7. Interacciones de los hongos con las plantas

Los hongos pueden establecer asociaciones mutualistas, desarrollarse en la superficie de las plantas y habitar en muchos tejidos vegetales. Influyendo en el metabolismo de las plantas, así como de las vías de señalización hormonal, confiriendo nuevas capacidades biosintéticas o nutricionales. Entre los diferentes tipos de hongos capaces de realizar estas asociaciones, se encuentran hongos micorrízicos, parásitos biotrofos y necrótrofos, colonizadores de tejido vegetal muerto. Llevando su ciclo de vida dentro diferentes órganos de la planta como hongos endófitos (Friesen et al, 2011; Moreno, 2018).

2.8. Los hongos endófitos

El término endófito quiere decir “dentro de la planta” (*endon*: dentro, *phyton*: planta). De Bary's (1866) definió a los endófitos como todos los organismos con capacidad de colonizar tejidos internos de las plantas, aunque en 1995, Wilson, refirió este término únicamente a microorganismos como bacterias y hongos filamentosos que colonizan tejidos de plantas. Las asociaciones planta-hongo datan de la era paleozóica, encontrándose evidencia en raíces fósiles del árbol *Amyelon radicans*. Los hongos endófitos generalmente pertenecen al filo *Ascomycota* y *Basidiomycota* siendo ubicuos en plantas. Con base en la relación evolutiva, la taxonomía, las plantas hospederas y el nicho ecológico, los endófitos se dividen en dos grupos, el primero engloba a los endófitos Clavicipitaceos o Clase I que habitan en algunas gramíneas y el segundo grupo incluye a los endófitos no Clavicipitaceos o endófitos de Clase II, los cuales se asocian asintóticamente en tejidos de plantas no vasculares, helechos, coníferas y angiospermas (Sánchez-Fernández et al, 2013; Gómez, 2014; Hyde y Soyong, 2008; Friesen et al. 2011; Khan et al. 2013). Si bien las asociaciones simbióticas entre hongos y plantas son antiguas, algunas de ellas

aún no son del todo entendidas. Lo que sí se sabe es que inducen a cambios en el desarrollo y composición química de las plantas, siendo importante ya que puede impactar en otros organismos que se alimentan de las mismas plantas (Hartley y Gange, 2009).

Los endófitos proporcionan beneficios a su hospedero mediante la producción de metabolitos secundarios como alcaloides, ciclohexanos, flavonoides, hidrocarburo, quininas y terpenos (Lemons et al, 2005; Rana et al. 2019) con propiedades biológicas para disminuir el efecto de hongos y bacterias causantes de enfermedades, además, esta asociación mutualista puede estar involucrada en la resistencia sistémica inducida; estos mecanismos favorecen a las plantas con mayores tasas de germinación, mayor densidad y biomasa (Abello y Kelum, 2006).

Los hongos endófitos a menudo tienen especificidad a su hospedero. También pueden exhibir especificidad de órganos y tejidos como los endófitos de los géneros *Phomopsis*, *Phoma*, *Colletotrichum* y *Phyllosticta* que tienden a colonizar plantas no relacionadas taxonómicamente, adaptándose a distintas condiciones fisiológicas de su hospedero (Deng y Cao, 2017).

2.8.1. Propiedades fisiológicas de los hongos endófitos

Recientemente se sabe que los hongos endófitos tienen la capacidad promotora de crecimiento, colonizando principalmente las raíces de las plantas, una vez dentro tienen la capacidad de conferir resistencia contra patógenos e insectos, promover el crecimiento al metabolizar el precursor de etileno del estrés ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) o el ácido indol acético (IAA), citoquininas, que actúan como reguladores de crecimiento en las plantas (Deng y Cao, 2017). Al estudiar el potencial metabólico de los hongos endófitos se han cuantificado diversas hormonas vegetales, estas mismas son moléculas de señalización que pueden desempeñar un rol importante en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Actualmente se sabe que los hongos endófitos tienen la capacidad de sintetizar hormonas vegetales, principalmente giberlinas, estas hormonas tienen funciones metabólicas importantes en la germinación de semillas, elongación del tallo, floración, senescencia y formación de frutos en las plantas (Khan et al. 2013)

2.8.2. Hongos endófitos y su asociación con plantas hospederas

Desde que una semilla germina hasta que una planta desarrolla sus frutos, los hongos endófitos tienen la capacidad de asociarse a las diferentes partes de la planta; semillas (espermosfera), raíces (rizósfera), tallos (caulosfera), hojas (filoplano), flores (anosfera) y frutos (laimosfera y carposfera) protegiendo al hospedero contra fitopatógenos, y facilitando la solubilización de nutrientes como fósforo, nitrógeno, zinc y potasio (Rana, 2019).

Las plantas utilizan dos principales mecanismos de resistencia contra patógenos; la resistencia específica en la cual las plantas emplean principalmente genes de resistencia a patógenos fúngicos, estos genes se activan cuando los genes de avirulencia están presentes en el patógeno, cuando estos genes están ausentes o tienen baja expresión pueden ser muchos los patógenos que pueden hospedarse en las plantas. El segundo mecanismo es conocido como resistencia poligénica que consiste en la expresión de otros genes que en conjunto le confieren a las plantas resistencia. Una resistencia diferente a las ya mencionadas, es la resistencia inducida; la adquieren las plantas cuando han sido sometidas a factores como microbios no patógenos, productos químicos o razas de patógenos que no son compatibles con el hospedero (Ganley et al. 2008).

Aunque los hongos endófitos proveen a las plantas beneficios para su desarrollo y protección, la colonización no se lleva a cabo con gran facilidad ya que antes de ser colonizados, los hospederos activan una respuesta inmune. Esta respuesta inmune cuando están siendo colonizadas, utiliza estrategias que se conocen como patrones moleculares asociados a microbios (MAMP) a través de receptores de reconocimiento de patrones que se encuentran en la superficie celular (PRR) de esta forma le proporcionan a MAMP inmunidad activada (MTI) adicionalmente se reduce la susceptibilidad activada por efectores (ETS) y otro sistema en el que las plantas reconocen las moléculas producidas por microorganismos mediante receptores moleculares activando en respuesta la inmunidad activada por efectores (ETI), ver Figura 6, (Lorito et al. 2010; Yan et al. 2019). Este mecanismo involucrado en la interacción de los hongos endófitos y el sistema inmune de la planta no es del todo claro. Por lo que se propone que los hongos endófitos logran sobrevivir dentro de los tejidos vegetales sin producir síntomas mediante dos mecanismos; el primer es a través de la producción de metabolitos tóxicos para contrarrestar los del hospedero

y generar una respuesta de defensa externa a la del hospedero al influir en la concentración de fitohormonas. El segundo mecanismo propone que las plantas desintoxican los metabolitos de defensa constitutivos y secretan enzimas líticas.

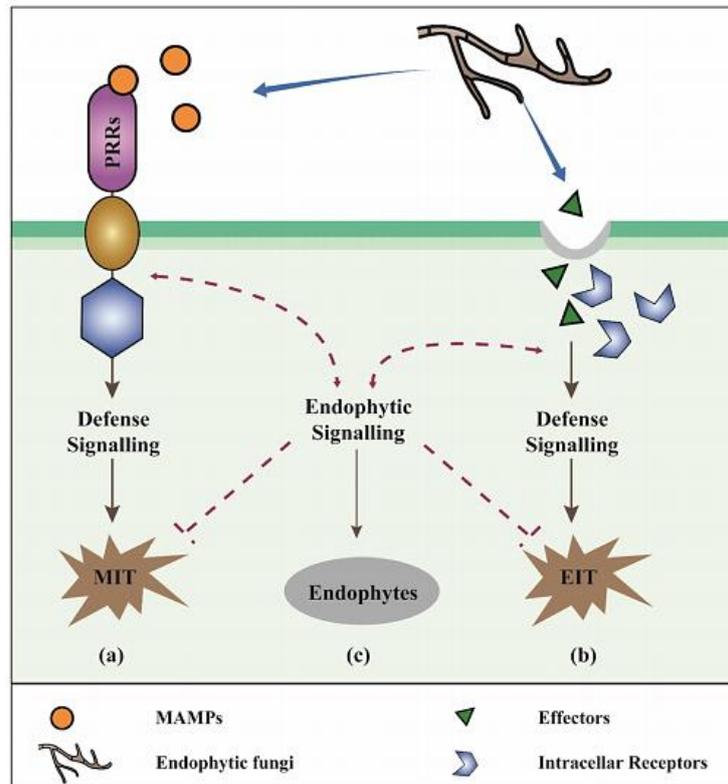


Figura 17. Respuesta inmune de las plantas al reconocer moléculas microbianas señal, activando dos diferentes sistemas de defensa. a) Las plantas reconocen patrones moleculares asociados a microbios (MAMP) a través de receptores de reconocimiento de patrones localizados en la superficie celular (PRR) en la planta hospedera, de modo que se conduce a la inmunidad activada por MAMP (MIT). b) Los efectores producidos por los microbios pueden ser reconocidos por los receptores intracelulares de las plantas, activando así la inmunidad activada por efectores (ETI). c) Los microbios benéficos pueden evadir la respuesta de defensa de las plantas, lo que le permite colonizar exitosamente las raíces del hospedero.

Fuente: Yan et al. 2019.

Existe una hipótesis propuesta por Schulz (2002), denominada “antagonismo equilibrado” (Figura 7) la cual propone que existe un equilibrio entre la respuesta de defensa de las plantas en respuesta a los endófitos y el efecto tóxico que estos hongos tienen en las plantas. Los endófitos toleran la defensa del hospedero logrando sobrevivir dentro de este mismo sin generar síntomas de enfermedad. Si la virulencia del hongo así como la defensa de la planta hospedera se encuentran en equilibrio, la colonización se mantiene asintomática, de no ser así los endófitos mueren o causan enfermedades en su hospedero (Yan et al. 2019).

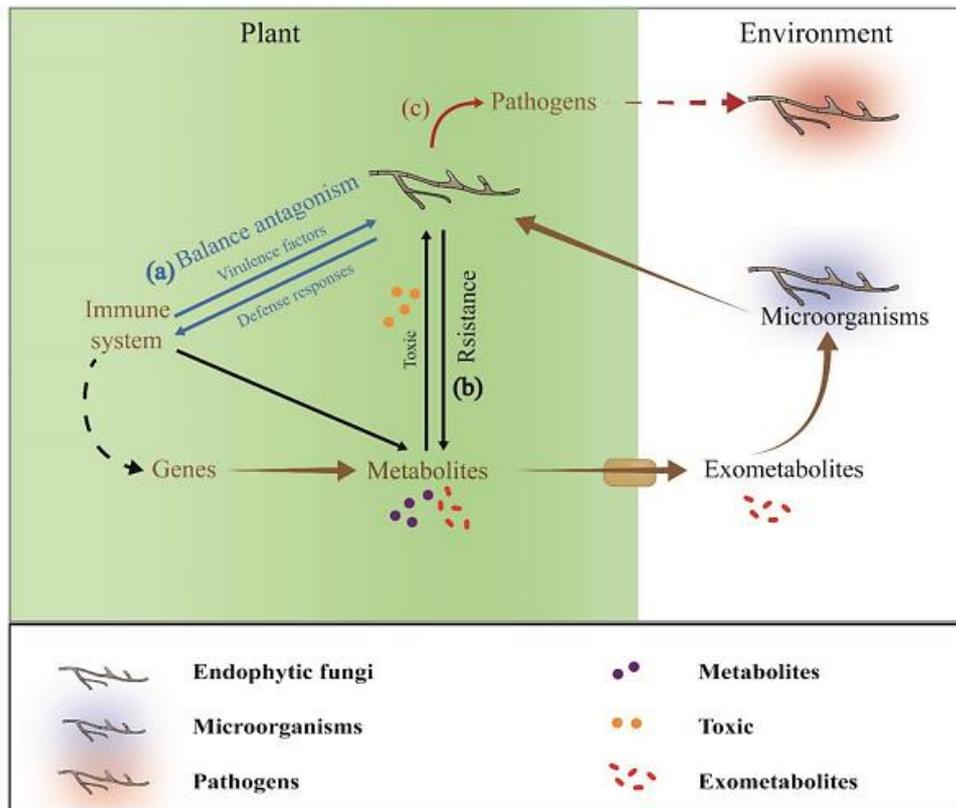


Figura 18. Mecanismos propuestos en la interacción entre hongos endófitos y sus plantas hospederas. Las plantas secretan metabolitos para formar sus comunidades microbianas mientras que los microorganismos colonizan a las plantas como endófitos (Flechas café). a) Los endófitos activan factores de virulencia como respuesta a la defensa de sus hospederos y de esa manera poder colonizar a la planta (flechas azules). b) los endófitos reducen la respuesta inmune de las plantas mediante mecanismos complejos (flechas negras). c) bajo condiciones intrínsecas o ambientales los endófitos se convierten en patógenos latentes.

Fuente: Yan et al. 2019.

Se conoce que en la mayoría de las plantas se encuentran endófitos y que estos colonizan sistemáticamente a las gramíneas, por lo que son los más estudiados, en especial los del género *Neotyphodium*, la evidencia indica que tienen efectos importantes en el rendimiento de las plantas así como actividad contra herbívoros. En algunos estudios donde se demuestran estos efectos se encontró que el hongo endófito *Chaetomium globosum* LK4 aislado de plantas de *Capsicum annuum* que se desarrolla en ambientes estresados por sequía promueve tanto, la brotación como el aumento de la biomasa vegetal y la tasa fotosintética. Los endófitos *Exophiala* sp. LHL08 y *Paecilomyces formosus* LHL10 f aislados de raíces de pepino ayudaron a las plantas a sobrevivir en un ambiente de salinidad (60 y 120 mM), sequía y temperaturas entre 5 °C y 40 °C, las plantas inoculadas mostraron mayor biomasa

vegetal, contenido de clorofila y área foliar a diferencia de las plantas no inoculadas que presentaron un crecimiento vegetal limitado (Khan 2013). Por otro lado, Redman y colaboradores, 2001 evidenciaron en plantas que las especies *Colletotrichum magna* (ruta-1), *C. orbiculare* (683), *C. gloeosporioides* (95-41A), *C. musae* (927) y *C. magna* (L2.5) colonizaron exitosamente los tejidos de las plantas confiriéndoles tolerancia a sequia, además de estimular el crecimiento de las mismas. En plantas de arroz inoculadas con hongos endófitos de clase 2; *Fusarium culmorum* (FcRed1), *Curvularia protuberata* (Cp4666D) y *Curvularia protuberata* (CpYNP5C) mostraron tolerancia a la salinidad, sequía y a bajas temperaturas, así como un aumento en la tasa de crecimiento (Redman et al. 2011).

Se ha planteado la idea de que algunos hongos endófitos son pasajeros influyentes, es decir, que tienen un efecto directo en el rendimiento de la planta mientras que otros no tienen ese papel funcional sino que simplemente se encuentran ahí por accidente. Un hongo endófito puede tener más de un papel, por ejemplo, los hongos entomopatógenos además de matar plagas de insectos pueden atacar a otros hongos patógenos de las plantas, aumentar la tolerancia a sequías, resistencia a bajas temperaturas, a bajo pH, alta salinidad, tolerancia a metales pesados y conferir protección contra insectos herbívoros, tal es el caso de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium robertsii* (Vega, 2008; Mejía et al. 2008; Rana et al. 2019; Yan et al. 2019).

2.9. *Metarhizium robertsii*

Metarhizium robertsii anteriormente conocido como *Metarhizium anisopliae* es un entomopatógeno fúngico generalizado de insectos, garrapatas y ácaros. Se distribuye ampliamente en ambientes entre los que se encuentran bosques, sabanas, zonas costeras y desiertos (Zeng et al. 2017). Fue uno de los primeros hongos en ser producido y aplicado a escala comercial en cultivos de caña de azúcar para restaurar su funcionalidad. Este hongo se emplea como un componente de una estrategia integrada de manejo de plagas o como micoinsecticida inundativo (Leger, 2007). Ha sido evaluado como opción potencial para el control de *Aeneolamia spp*, *Aeneolamia postica* Walker y *Prosapia simulans* Walker (por mencionar algunos) en cultivos de caña de azúcar, con una mortalidad efectiva de hasta el 98.7 %, disminuyendo así el uso de insecticida y mejorando el rendimiento de este cultivo

(Bautista-Gálvez y González-Cortés 2005; Guzmán-Campos et al. 2018). El proceso de infección es similar al de otros hongos entomopatógenos; primero la conidia se adhiere a la superficie del huésped y la penetración del tegumento, seguido por la germinación y formación del aparato de penetración, lo que da paso a la formación de hifas en el hemocele (Greenfield et al. 2014; Castillo, 2006; Zeng et al. 2017).

2.9.1 Clasificación taxonómica

El género *Metarhizium* descrito inicialmente por Sorokin (1883), quien identificó a este género como el causante de la enfermedad conocida como muscardina verde en larvas infectadas con *Anisoplia austriaca*. Hoy en día se considera a la especie *M. robertsii*, nombrada por *Metschnikoff*, como el organismo representativo del género *Metarhizium* (Driver et al. 2000), Tabla 2.

Tabla 2. Clasificación taxonómica de *Metarhizium robertsii* (Metschn.) Sorokīn, 1883 (GBIF Secretariat, 2019).

Reino	Fungí
Filo	Ascomycota
Clase	Sordariomycetes
Orden	Hypocreales
Familia	Clavicipitaceae
Género	<i>Metarhizium</i>
Especie	<i>Metarhizium robertsii</i> (Metschn.) Sorokīn, 1883

2.9.2. Actividad endófito y entomopatógena de *Metarhizium*

La rizosfera es la zona que rodea las raíces de una planta, caracterizada por ser un sitio de interacciones entre plantas, bacterias, hongos, nematodos, protistas, e insectos. Los hongos pueden influir en el desarrollo y salud de las plantas, solubilizando nutrientes, produciendo fitasas y protegiendo a la planta contra patógenos (Liao et al. 2014). A los hongos del género *Metarhizium* se les conocía en un inicio como agentes que controlan las plagas de insectos, aunque recientemente

se sabe que este tipo de hongos establecen asociaciones con la rizosfera vegetal y el rizoplasma de la raíz y bajo determinadas condiciones, coloniza endofíticamente las células corticales de la raíz, lo que indica que la entomopatogenicidad, no es el único, ni el principal estilo de vida de *Metarhizium spp.* (Liao et al. 2014; Lahey 2020). Se ha reportado la habilidad de *Metarhizium* de colonizar raíces (Tabla 3); Greenfield y colaboradores (2016) reportaron en plantas de yuca (*Manihot esculenta*) que los niveles de colonización de *M. robertsii* fueron mayores en la porción proximal de la raíz que en la porción distal de las raíces, además de que no encontraron actividad endófitica en ninguna muestra de tallo y hoja. Por otro lado, García y colaboradores (2011) aplicaron diferentes concentraciones de una suspensión de conidios de *M. robertsii* en el sustrato de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*), encontrando actividad endófitica en brote, raíces y tallos, lo cual sugiere movilidad vertical del hongo. En plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*), empleando una cepa de *M. robertsii* que expresa GFP, se observó la colonización de células corticales (Figura 8) y espacios intracelulares de la raíz (Sasan y Bidochka, 2012). Por su parte Lahey y colaboradores (2020) demostraron que *M. brunneum* y *M. robertsii* colonizaron preferente el hipocótilo en frijol común y maíz dulce, observando una mayor colonización para el maíz (*Zea mays*) por ambos *Metarhizium* en las regiones de la raíz proximal al hipocótilo, esto debido a que es la zona de la planta en contacto más temprano con los conidios del suelo, mientras que en las hojas no se observó ninguna colonización fúngica. En centeno (*Secale cereale*) y canola (*Brassica napus*) también se demostró la actividad endófitica de *M. robertsii*, detectando mayor colonización en raíces y menor en el tejido foliar mientras que los efectos de promoción de crecimiento fueron demostrados parcialmente, pues, aunque la altura de las plantas fue mayor respecto a las plantas no inoculadas, los análisis no demostraron diferencias estadísticamente significativas (Ahmad et al. 2020). La colonización endófitica por parte de este hongo se asocia además a pasto varilla (*Panicum virgatum*), frijol (*P. vulgaris*), cebada (*Hordeum vulgare*) y arroz (*Oryza sativa*) (Sasan y Bidochka, 2012; Moonjely et al. 2019), ver Tabla 3. Estudios en campo, también han demostrado que *M. robertsii* es endófito de maíz; este hongo se recuperó exclusivamente de las secciones de la raíz, llegando a la conclusión de que estas cepas no colonizan partes de la planta por encima del suelo (Liao et al. 2014).

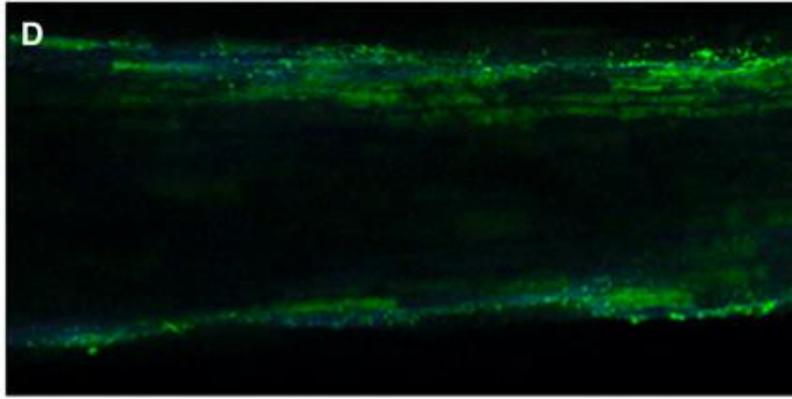


Figura 19. Colonización endofítica de células corticales de raíz de frijol por *M. robertsii* fusionado a una proteína verde fluorescente.

Fuente: Sasan y Bidochka, 2012.

Tabla 3. Evaluación de la actividad endófito de *Metarhizium* en diferentes cultivos.

Nombre del cultivo	Hongo endófito	Zona de la planta	Zona de inoculación	Referencia
Yuca (<i>Manihot esculenta Crantz</i>)	<i>Metarhizium robertsii</i>	Rizosfera, con mayor colonización que en la porción distal de las raíces	Raíz de la planta aplicando a la superficie del suelo alrededor de la base de la planta	Greenfield et al. 2016
Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	<i>Metarhizium robertsii</i>	Brote, raíces y tallos.	Aplicando directamente al sustrato, cerca de la base del brote de las plántulas a tres diferentes concentraciones	García et al. 2011
Frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	<i>Metarhizium robertsii-GFP</i>	Células corticales, crecimiento intracelular.	Semillas	Sasan y Bidochka, 2012
Maíz (<i>Zea mays</i>)	<i>Metarhizium robertsii</i>	Raíz	Semillas	Liao et al. 2014

En centeno (<i>Secale cereale</i>) y canola (<i>Brassica napus</i>)	<i>M. robertsii</i>	Raíces y hojas	Semillas	Ahmad et al. 2020
Pasto varilla (<i>Panicum virgatum</i>), frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	<i>M. robertsii</i>	Raíz	Semillas e inoculación al sustrato en cajas Petri	Sasan y Bidochka, 2012
Cebada (<i>Hordeum vulgare</i>)	<i>M. robertsii</i>	Raíz	Raíz de la planta aplicando a la superficie del suelo alrededor de la base de la planta	Moonjely et al. 2019

También se ha reportado su efecto positivo como promotor del crecimiento en plantas de maíz, yuca, fresa y tomate (Liao et al. 2014; Greenfield et al. 2016; Canassa et al. 2019; García et al. 2011). Además de su actividad endófito, tiene actividad entomopatógena, por lo que es considerado como una alternativa en el manejo integrado de plagas. Evaluaciones del efecto entomopatógeno de este hongo sobre el control del gusano cogollero (*S. frugiperda*) en maíz presentaron un índice de daño promedio de 16.8, es decir, un 50 % menos respecto a plantas control que no fueron sometidas a la aplicación de *M. robertsii* (Lezama et al. 2004). Guzmán-Camposeco y colaboradores en el 2018 por su parte han demostrado una reducción significativa de *A. postica* y *P. simulans* en la caña de azúcar, así como un incremento en el rendimiento en el cultivo. En fresa (*Fragaria x ananassa*) se han reportado reducciones en el número de huevos de *Tetranychus urticae* en comparación con tratamientos control, además, la actividad endófito de *M. robertsii* mejoró significativamente el crecimiento del cultivo y sus frutos (Canassa et al. 2019). En la Tabla 4 se resumen estos resultados. Por su parte en caña de azúcar solo se ha visto que se aumenta el rendimiento del cultivo, pero no se ha determinado la actividad endófito de *M. robertsii* y tampoco se han reportado estudios sobre su actividad entomopatógena sobre *D. magnifactella*.

Tabla 4. Actividad endófitica y entomopatogena de *M. robertsii* sobre diferentes plagas y cultivos.

Nombre del Cultivo	Plaga (hospedero)	Actividad endófitica	Referencia
Maíz (<i>Zea mays</i>)	<i>Spodoptera frugiperda</i>	No evaluada	Lezama et al. 2004
Caña de azúcar (<i>S. officinarum</i>)	<i>Aeneolamia Postica</i>	No evaluado	Guzmán-Camposeco, et al. 2018
Caña de azúcar (<i>S. officinarum</i>)	<i>Prosapia simulans</i>	No evaluado	Guzmán-Camposeco, et al. 2018
Fresa (<i>Fragaria x ananassa</i>)	<i>Tetranychus urticae</i>	Aumento en el crecimiento del cultivo y frutos	Canassa et al. 2019

2.9.3. *M. robertsii* como promotor del crecimiento

Metarhizium spp. están adaptados como entomopatógenos de insectos, no obstante muchas de las especies se asocian con la rizosfera de las plantas promoviendo su crecimiento y confiriéndoles resistencia contra estrés abiótico como tolerancia a sequias, alta salinidad, resistencia a bajas temperaturas y bajo pH (Raya-Díaz et al. 2017), además se ha informado que ciertos hongos de este género prevalecen en asociaciones simbióticas con plantas específicas en una área geográfica determinada (Moonjely y Bidochka, 2019). Liao y colaboradores (2014) probaron la hipótesis de que algunos *Metarhizium spp.*, entre ellos *M. robertsii* son promotores de crecimiento en maíz. Sus resultados demuestran un aumento significativo en la formación del collar de la hoja, la longitud del tallo, la biomasa promedio de la mazorca y la biomasa promedio del tallo y follaje, encontrando su mayor impacto en el rendimiento de las plantas de maíz durante el crecimiento vegetativo temprano.

Otros estudios han reportado este mismo efecto de *M. robertsii* en el crecimiento de las plantas de tomate, donde se observó mayor altura en la planta, la longitud de la raíz, el brote y peso seco de la raíz en comparación con plantas de tomate no tratadas con el hongo (García et al. 2011). En cultivos de fresa, *M. robertsii* ayudó a aumentar el peso seco de raíces y hojas. Además, incrementó el rendimiento en los frutos (Canassa et al. 2019).

No hay muchos informes publicados sobre los efectos de *M. robertsii* utilizados como microorganismo promotor del crecimiento en plantas y tampoco existen reportes detallados sobre este efecto promotor en la caña de azúcar.

3. JUSTIFICACIÓN

Los hongos que se asocian con las raíces de las plantas pueden residir dentro de la rizosfera, el rizoplasma y colonizar las raíces, desarrollando un micelio externo que favorece a las plantas, debido a que pueden captar mejor nutrientes, agua y minerales. Recientemente se sabe que *Metarhizium robertsii*, además de ser un hongo entomopatógeno puede vivir como endófito dentro de tejidos vegetales mejorando las fuentes nutritivas y por ende el crecimiento de su hospedero. Por lo anterior resulta de gran importancia saber si *M. robertsii* se desarrolla como endófito en la caña de azúcar y conocer si coloniza diferentes tejidos como raíces, tallos y hojas o si solo tiene especificidad por alguno de ellos. Así como también conocer si este hongo tiene actividad promotora de crecimiento al proveer de nutrientes a las plantas de caña de azúcar y favoreciendo con aumento significativo en el desarrollo de las mismas.

4. HIPÓTESIS

- *Metarhizium robertsii* es endófito de la caña de azúcar y favorece el desarrollo y crecimiento de la planta.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

- Determinar la actividad endófito y promotora de crecimiento de *Metarhizium robertsii* caña de azúcar.

5.2. Objetivos específicos

- Analizar el tipo de colonización de *M. robertsii* como endófito en caña de azúcar.
- Determinar la actividad promotora de crecimiento de *M. robertsii* en caña de azúcar en condiciones de invernadero.
- Determinar la cantidad de clorofilas A y B presentes en las plantas de caña de azúcar.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Área de Estudio

El presente trabajo se realizó en el municipio de Temixco, Morelos, localizado al noroeste del Estado, en las coordenadas 18° 51' de latitud norte y los 99° 14' de longitud oeste del meridiano de Greenwich, con una temperatura promedio de 30 °C y altitud de 1,280 msnm. Donde las plantas de caña de azúcar se mantuvieron en condiciones de invernadero.

Parte de los experimentos que lo requirieron se llevaron a cabo en el laboratorio de Botánica Estructural y en el laboratorio de Control Biológico del Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB) de la UAEM.

6.2 Preparación del Inóculo

Para el Estudio se utilizó el hongo *M. robertsii* cepa: HPI-017 anteriormente identificada como *M. anisopliae* aislada de coleópteros en cultivos de Maíz en Tetela del Volcán, Morelos. Misma que fue proporcionada por el Laboratorio de Control Biológico del CEIB.

La cepa se hizo crecer en medio agar dextrosa Sabouraud (SDA) enriquecido con sacarosa y extracto de levadura. Para preparar el medio de cultivo, se usaron 65 g de Sabouraud y se homogenizó con ayuda de un agitador magnético en 1 L de agua destilada, adicionalmente se añadieron al medio 8.0 g de sacarosa y 8.0 g de extracto de levadura, posteriormente el medio se esterilizó en autoclave a 121 °C, 20 psi durante 20 minutos. Una vez que el medio se encontraba a una temperatura tolerable se vació en cajas Petri estériles de 90 x 15 mm. Las cepas se incubaron por 15 días a 28 °C.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación se procedió a preparar una suspensión de conidios para obtener el inóculo de *M. robertsii* HPI-017 que se aplicó a las plantas de caña de azúcar. La suspensión inicial se preparó raspando las cajas Petri (Figura 9) y diluyendo el hongo en 10 mL de solución de tween al 0.01 %, hasta obtener 1 L de suspensión. Se realizaron 2 diluciones seriadas a partir de esta suspensión. Las diluciones se prepararon tomando 1 mL de la suspensión inicial y se añadieron 9 mL

de tween al 0.01 %, obteniendo así una dilución 1/10 y finalmente se tomó 1 mL de la dilución 1/10 y se añadió a 9 mL de tween al 0.01 %, para obtener una dilución 1/100.



Figura 9. Cultivo de *M. robertsii* HPI-017 en medio SDA

6.3 Conteo de conidios en cámara de Neubauer improved y ajuste de concentración de la suspensión inicial a una concentración final

El conteo de conidios de *M. robertsii* HPI-017 se realizó para obtener un inóculo que se aplicó a las plantas de 2.0×10^8 conidios/mL. El conteo de los conidios se realizó utilizando un hemocitómetro o cámara de Neubauer, la cámara se llenó con 10 μ l de la dilución 1/100, este tipo de cámaras contienen dos compartimentos, uno en la parte superior y otro en la parte inferior de la misma (Figura 10), ambos compartimentos fueron llenados. Para realizar el conteo se utilizó un microscopio (LEICA DM500) a un objetivo del 40x. El conteo se realizó en los cuatro cuadrantes superiores e inferiores de los extremos de la cámara (Figura 10) en ambos compartimentos. Para el conteo se tomaron en cuenta aquellos conidios contenidos en el interior de los cuadrantes y aquellos que se encontraban en la primera línea de las tres líneas que delimitan los cuadrantes.

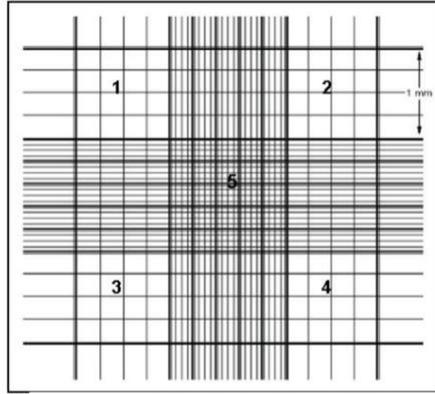


Figura 10. Cuadrantes que se usaron para el conteo en la cámara de Neubauer. Se utilizaron los cuadrantes 1, 2, 3 y 4, el volumen correspondiente es de el volumen correspondiente es de: $4 \times (1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 0,1 \text{ mm}) = 4 \times 0,1 \text{ mm}^3$.

Para estimar la concentración en la suspensión inicial se utilizó la siguiente fórmula:

$$c_i = \frac{N^{\circ} \text{ de conidios}}{\# \text{ cuadros contados}} \times \frac{1 \text{ cuadro}}{1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 0,1 \text{ mm}^3} \times \frac{1000 \text{ mm}^3}{1 \text{ cm}^3} \times \frac{1 \text{ cm}^3}{1 \text{ mL}} \times \text{factor de dilución}$$

Una vez que se calculó la concentración inicial de conidios se procedió a realizar un cálculo del volumen final al que tiene que ajustarse la suspensión inicial para obtener una concentración de 2.0×10^8 conidios/mL, para ello se utilizó la siguiente formula:

$$V_f = \frac{C_i \times V_i}{C_f}$$

Donde:

V_f : es el volumen final.

V_i : es el volumen de la suspensión inicial (9ml)

C_i : es la concentración estimada de la suspensión inicial

C_f : es la concentración final que se necesita (2.0×10^8)

Las plantas fueron inoculadas dentro de las primeras 24 horas de preparado el inóculo, con la finalidad de tener el mayor número posible de conidios viables.

6.4 Preparación del sustrato

El sustrato empleado para el trasplante de las plántulas de caña de azúcar a macetas, consistió en una mezcla de peat moss y vermiculita en una proporción 2:1. Se colocaron y mezclaron en una tina de plástico hasta que se obtuvo una mezcla homogénea (Figura 11). Posteriormente la mezcla fue colocada en bolsas de polipapel para su esterilización en autoclave a 121 °C y 1.5 Kg/cm² de presión por 20 min, la esterilización se realizó por duplicado. Posteriormente el sustrato fue colocado en bolsas de invernadero de 1 kg que previamente fueron esterilizadas bajo luz UV.



Figura 11. Mezcla de sustratos peat moss y vermiculita en proporción 2:1.

6.5 Multiplicación *in vitro* y aclimatación de plántulas de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*)

Plántulas de caña de azúcar *in vitro* provenientes de laboratorios InPlanta, Orizaba, Veracruz, México, variedad CP 72-2086 contenidas en frascos (Figura 12a) con medio Murashige y Skoog (MS), fueron extraídas, para posteriormente ser multiplicadas en medio MS suplementado con ácido indolacético (AIA) 1 µM . Una vez obtenidos los brotes de 3 a 5 cm se cultivaron en medio MS sin la adición de AIA. Se extrajeron plántulas de 8 cm y enseguida se lavaron las raíces con agua destilada estéril para eliminar los residuos del medio MS. Posteriormente, en condiciones de invernadero las plántulas se colocaron en las bolsas de invernadero (volumen 2 L) con el sustrato previamente esterilizado y se regaron cada tercer día con agua corriente sin la adición de ningún fertilizante. Las plántulas permanecieron

a la intemperie en el municipio de Temixco, Morelos, México a una temperatura promedio de 30 °C (Figura 12b).

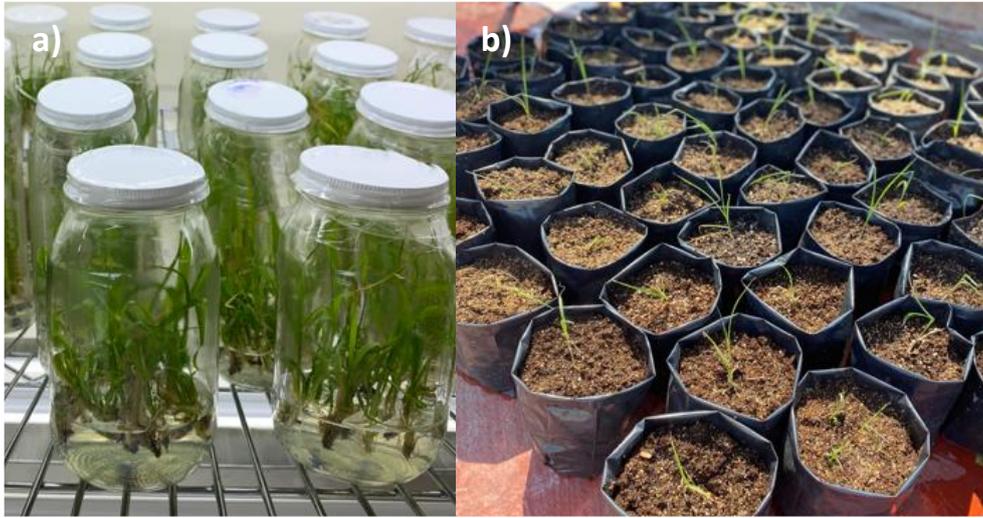


Figura 12. Plántulas de caña de azúcar. a) Cultivo *in vitro* de caña de azúcar de aproximadamente 2 meses de edad. b) plántulas recién trasplantadas a sustrato peatmos: vermiculita.

6.6 Inoculación de las plántulas de caña de azúcar

Transcurridos 20 días después de la aclimatación de las plántulas de caña de azúcar se procedió aplicar el inóculo de conidios de *M. robertsii* HPI-017. El diseño experimental fue en bloques completos al azar con 3 tratamientos inoculados por aspersión y aplicación directa en suelo: 1) Plantas sin inocular (Solución de Tween 0.01 %, control), 2) Plantas con 100 ml de inóculo (2.0×10^8 conidios/mL) en el sustrato, 3) Plantas inoculadas sobre toda la planta por aspersión empleando un atomizador con 100 ml de suspensión con 2.0×10^8 conidios/mL (Tabla 6). Se realizaron 3 repeticiones por tratamiento. El ensayo fue llevado a cabo en el municipio de Temixco, Morelos, México a una temperatura promedio de 30 °C. La duración del ensayo fue de 90 días, realizando cada 30 días la colecta de material y toma de datos. Durante este periodo las plantas fueron regadas con agua corriente cada tercer día, procurando mantener el sustrato húmedo para el desarrollo del hongo.

Tabla 5. Tratamientos llevados a cabo para el estudio de la actividad endófito y promotora de crecimiento de *M. robertsii* en caña de azúcar, variedad CP 72 20-86.

Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3
Plantas de caña de azúcar sin inocular (control).	Plantas de caña de azúcar inoculadas directamente al sustrato.	Plantas de caña de azúcar inoculadas por aspersión

6.7 Evaluación de la actividad endófito de *M. robertsii* en raíces de caña de azúcar

Se seleccionaron 3 plantas de caña de azúcar al azar por tratamiento, cada planta se cosechó cuidando que las raíces no se rompieran, posteriormente se lavaron con agua destilada hasta eliminar por completo los residuos de sustrato. Una vez que las raíces estaban limpias se secaron en toallas de papel para enseguida cortarlas en fragmentos de aproximadamente 1 cm. Estos fragmentos se colocaron en una solución de fijación (FFA): Formaldehído (10 mL) – ácido acético (5 mL) – alcohol 50 mL - agua (35 mL), y se dejaron reposar toda una noche. Al día siguiente las raíces fueron enjuagadas con agua hasta retirar el FFA, una vez que la muestra estuvo libre de FFA se añadió una solución de KOH al 5 % p/v, y se colocaron en baño maría a una temperatura entre los 90 -100 °C durante 10 min, seguido por un segundo enjuague con agua hasta retirar la solución de KOH, para enseguida teñir las raíces con una solución de azul de tripano 0.04 % en lactoglicerol: ácido acético (2 mL) – glicerol (2 mL) – EtOH (6 mL). Las muestras se colocaron nuevamente en baño maría a 90° C durante 1 hora, transcurrido ese tiempo se retiró la solución de azul de tripano y se transfirieron las muestras a una solución de lactoglicerol (ácido acético 1% en glicerol 50/50 v/v) para mantenerlas conservadas.

Para visualizar si *M. robertsii* HPI-017 colonizó las raíces de la caña de azúcar se seleccionaron 50 segmentos de raíces al azar por planta de aproximadamente 1 cm de longitud se colocaron al azar varios segmentos sobre un porta objetos (Figura 13), con ayuda de una micropipeta se añadió un poco de agua a manera de que el cubreobjetos se adhiriera, para posteriormente observar las muestras en microscopio óptico a un aumento de 4x.

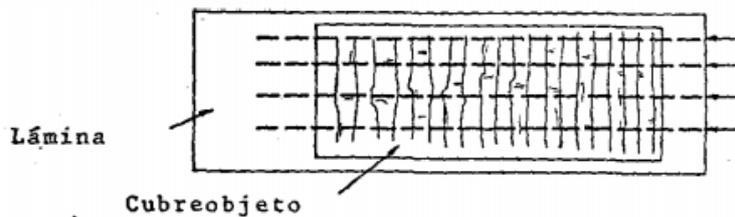


Figura 13. Raíces en segmentos colocados en portaobjetos para su observación al microscopio.

El porcentaje de colonización se calculó utilizando la siguiente fórmula (Sieverding, 1983):

$$\text{Porcentaje de colonización (\%)} = \frac{\text{Número de campos colonizados}}{\text{Número total de campos observados}} \times 100$$

6.8 Evaluación de la actividad endófito de *M. robertsii* en tejido aéreo de la caña de azúcar

Para evaluar si el tallo, así como el follaje de la caña de azúcar fueron colonizados por *M. robertsii* HPI-017 se determinó el porcentaje de colonización para lo cual se recolectaron tallos y hojas. Posteriormente se sometieron a un tratamiento de desinfección en el cual se sumergieron durante tres minutos en hipoclorito de sodio al 1.5 %, enseguida se realizó un lavado con etanol al 70 % durante dos minutos, y finalmente se realizaron varios lavados con agua destilada estéril. La eficacia de esterilización se evaluó inoculando 100 µL del último lavado de agua en medio de cultivo SDA.

Las plantas se secaron con toallas de papel estériles y se cortaron en trozos pequeños de 3 cm de longitud en una campana de flujo laminar. Posteriormente los trozos de plantas se inocularon en medio SDA contenido en cajas Petri con la adición de cloranfenicol (250 mg/L) para evitar el crecimiento de bacterias. Las cajas Petri se incubaron a 28 °C durante 15 días. Se determinó el porcentaje de colonización realizando un conteo de los fragmentos donde creció el hongo, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de colonización (\%)} = \frac{\text{Número de fragmentos colonizados}}{\text{Número total de fragmentos por caja}} \times 100$$

6.9 Evaluación de la actividad promotora de crecimiento de *M. robertsii* en caña de azúcar

Se seleccionaron 5 plantas al azar por tratamiento para evaluar la actividad promotora de crecimiento de *M. robertsii* HPI-017, se extrajeron de las macetas de invernadero con cuidado de no dañar a la planta, se eliminó el sustrato y enseguida se realizó un enjuague con agua de las raíces hasta eliminar por completo los residuos de sustrato. Se secaron las plantas con toallas de papel, con ayuda de una cinta métrica se procedió a medir la longitud del tallo y raíz, y con ayuda de un vernier digital se midió el diámetro del tallo. Finalmente, para evaluar el peso seco de las raíces se procedió a secar el material vegetal en un horno a 60 °C.

7. Determinación de clorofilas A y B en plantas de caña de azúcar inoculadas con *M. robertsii*

Se seleccionaron 5 plantas al azar a los 90 ddi (días después de la inoculación) por tratamiento, para medir el contenido de clorofilas A y B utilizando un Medidor Electrónico del Contenido de Clorofila FALKER®. Las mediciones se realizaron en la hoja más joven de las plantas de caña de azúcar, calibrando primero el equipo para posteriormente registrar el contenido de clorofilas A y B.

7.1. Análisis estadístico

Con los datos recabados anteriormente de los experimentos ya mencionados se realizó una prueba de Análisis de Varianza, utilizando pruebas de comparación múltiple de medias Tukey con un nivel de significancia del 95 % para determinar diferencias significativas entre tratamientos usando el software de Minitab® 19.0.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Evaluación de la actividad endófitica de *M. robertsii* en raíces y tejido aéreo en plantas de caña de azúcar

Metarhizium robertsii HPI-017 aplicado en una solución de tween al 0.01 % en plantas de caña de azúcar variedad CP 72-2086 colonizó las raíces con diferentes porcentajes de acuerdo al tiempo y al tratamiento realizado (Figura 18). Se evaluaron los porcentajes de colonización a los 30 ddi, con un porcentaje para el tratamiento 2 de 75.59 %, para el tratamiento 3 de 70.32 % (Figura 15), mientras que a los 60 ddi se obtuvieron porcentajes de 76.93 % y 72.94 % para los tratamientos 2 y 3 respectivamente (Figura 16). Finalmente, a 90 ddi el porcentaje de colonización para el tratamiento 2 fue 91.28 % y para el tratamiento 3 de 89.15 % (Figura 17). Los resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos realizados ($P < 0.05$) obteniéndose el mayor porcentaje de colonización de las raíces a los 90 ddi. Para las plantas del tratamiento 1 (Control) no se observó colonización por *M. robertsii* HPI-017.

Para evaluar la actividad endófitica de *M. robertsii* HPI-017 en tejido aéreo de la caña de azúcar, es decir, tallo y hojas, se recolectaron estos tejidos, se cortaron, se colocaron en cajas Petri con medio SDA y se evaluó el crecimiento de *M. robertsii* HPI-017 por segmento colonizado, observando principalmente estructuras de hifas. A los 30 y 60 ddi no se observaron estas estructuras, fue hasta los 90 ddi que se presentó este crecimiento (Figura 14), sin embargo, no se observó en los segmentos de todas las plantas. Se obtuvo un promedio de 16.67 % y 16.63 % para los tratamientos 2 y 3 respectivamente.

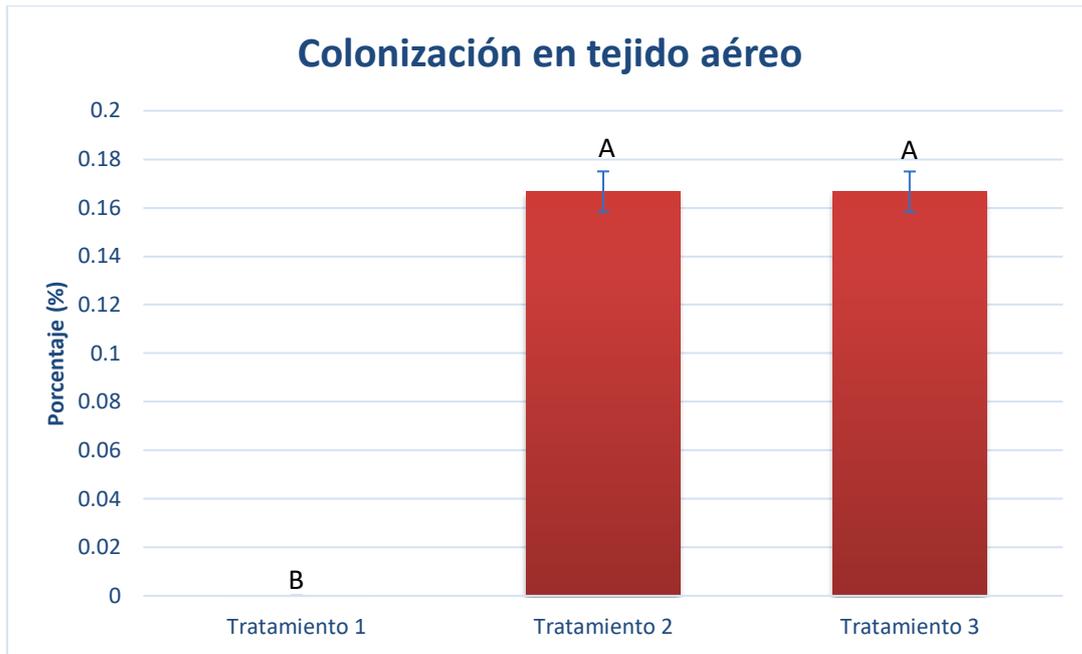


Figura 14. Porcentaje de colonización de *M. robertsii* HPI-017 en tejido aéreo (tallo y hojas) de caña de azúcar de la variedad CP72–2086 a los 90 ddi (Tratamiento 1: Plantas sin inocular; Tratamiento 2: Plantas inoculadas con *M. robertsii* directamente al sustrato; Tratamiento 3: Plantas inoculadas con *M. robertsii* por aspersión). Letras distintas indican diferencias significativas, Tukey ($P < 0.05$).

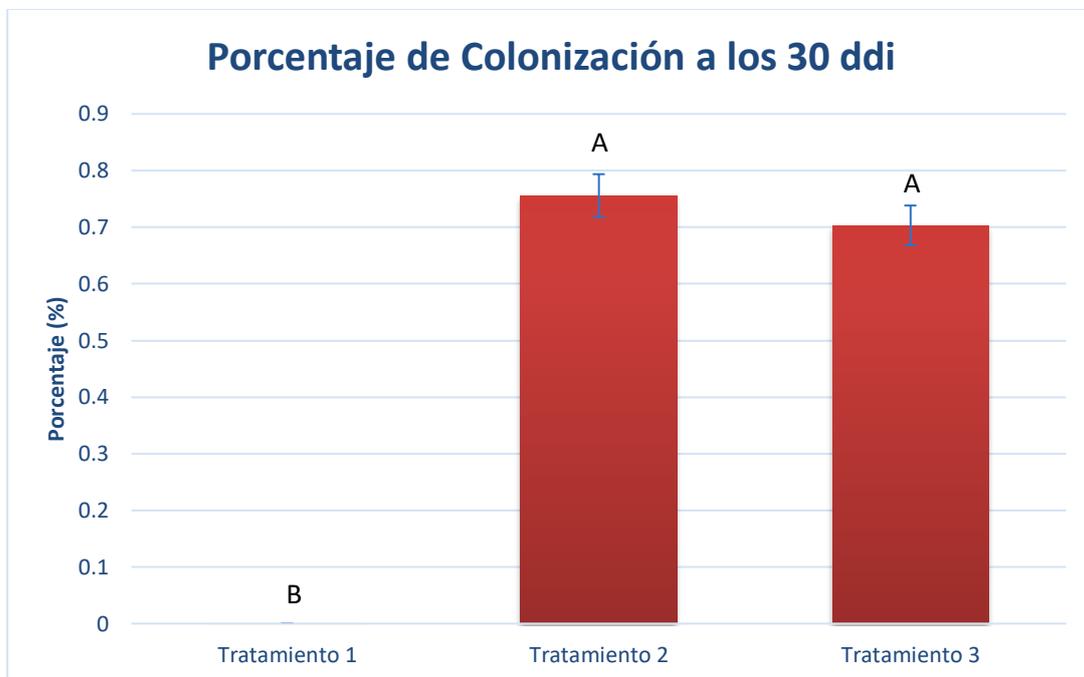


Figura 20. Porcentaje de colonización de *M. robertsii* HPI-017 en raíces de caña de azúcar de la variedad CP72–2086 a los 30 ddi (Tratamiento 1: Plantas sin inocular; Tratamiento 2: Plantas inoculadas con *M. robertsii* directamente al sustrato; Tratamiento 3: Plantas inoculadas con *M. robertsii* por aspersión). Letras distintas indican diferencias significativas, Tukey ($P < 0.05$).

A pesar de que *M. robertsii* era considerado únicamente un entomopatógeno fúngico con gran potencial para controlar plagas en diversos cultivos. Los resultados que aquí se muestran se suman con los obtenidos por Greenfield y colaboradores (2014), en los cuales demostraron que *M. robertsii* colonizó la porción próxima de la raíz de yuca, específicamente obtuvimos colonización en la rizosfera de las plantas de caña de azúcar (Figura 18) que fueron inoculadas directamente al sustrato y por aspersión en el área foliar. A diferencia de los resultados obtenidos por Greenfield y colaboradores (2014) y Liao y colaboradores (2014), donde reportaron en plantas de tomate y maíz, respectivamente, que, *Metarhizium* se recuperó exclusivamente de las secciones de raíz, llegando a la conclusión de que *Metarhizium* no coloniza partes de la planta por encima del suelo, nuestros resultados evidenciaron actividad endófito en hojas y tallos de algunas plantas de caña de azúcar a los 90 ddi, sin observarse este fenómeno a los 30 y 60 ddi. Por su parte los resultados reportados por García y colaboradores (2011) en plantas de tomate concuerdan con los resultados aquí obtenidos, en los cuales *M. robertsii* presentó actividad endófito en brote, raíces y tallos.

Lo anterior puede deberse a que *M. robertsii* adquiere los nutrientes necesarios principalmente de la colonización de la rizosfera y no del tejido vegetal joven, esto puede respaldarse con estudios que indican que *M. robertsii* se beneficia de los nutrientes cuando se lleva a cabo la colonización saprofita, es decir, en cuanto el tejido vegetal envejece, *M. robertsii* coloniza este tejido para verse beneficiado de sus nutrientes (Posada y Vega 2005). Por lo que podríamos decir que el crecimiento de *M. robertsii* únicamente observado a los 90 ddi se debe a que partes del tejido vegetal habían envejecido y, por lo tanto, esto permitió que *M. robertsii* colonizara partes por encima de la rizosfera (Ownley et al. 2009).

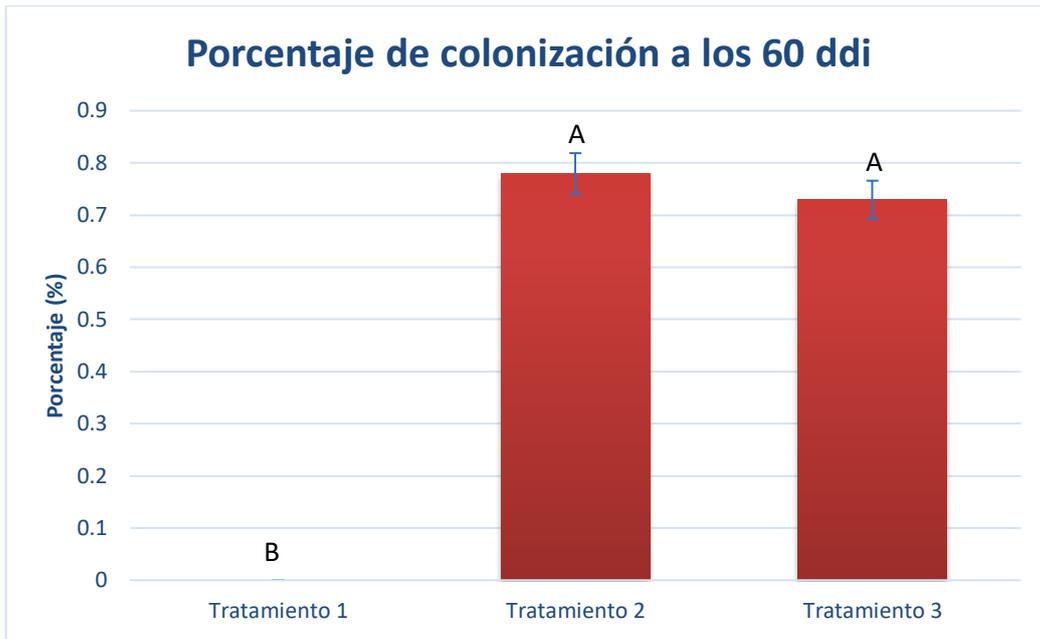


Figura 21. Porcentaje de colonización de *M. robertsii* HPI-017 en raíces de caña de azúcar de la variedad CP72–2086 a los 60 ddi (Tratamiento 1: Plantas sin inocular; Tratamiento 2: Plantas inoculadas con *M. robertsii* directamente al sustrato; Tratamiento 3: Plantas inoculadas con *M. robertsii* por aspersión). Letras distintas indican diferencias significativas, Tukey ($P < 0.05$).

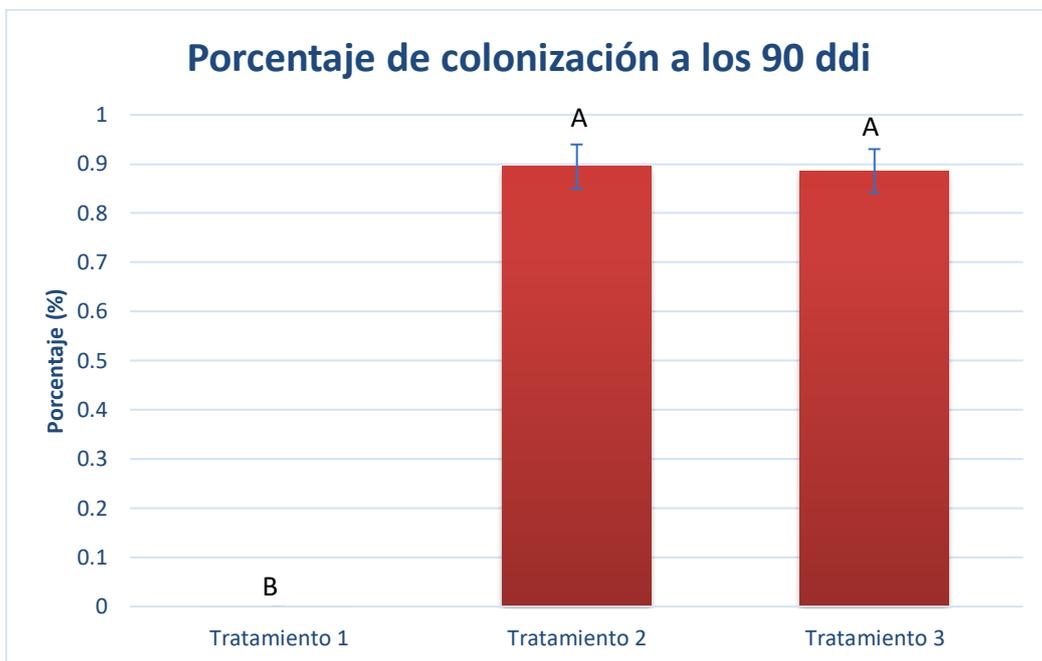


Figura 22. Porcentaje de colonización de *M. robertsii* HPI-017 en raíces de caña de azúcar de la variedad CP72–2086 a los 90 ddi (Tratamiento 1: Plantas sin inocular; Tratamiento 2: Plantas inoculadas con *M. robertsii* directamente al sustrato; Tratamiento 3: Plantas inoculadas con *M. robertsii* por aspersión). Letras distintas indican diferencias significativas, Tukey ($P < 0.05$).

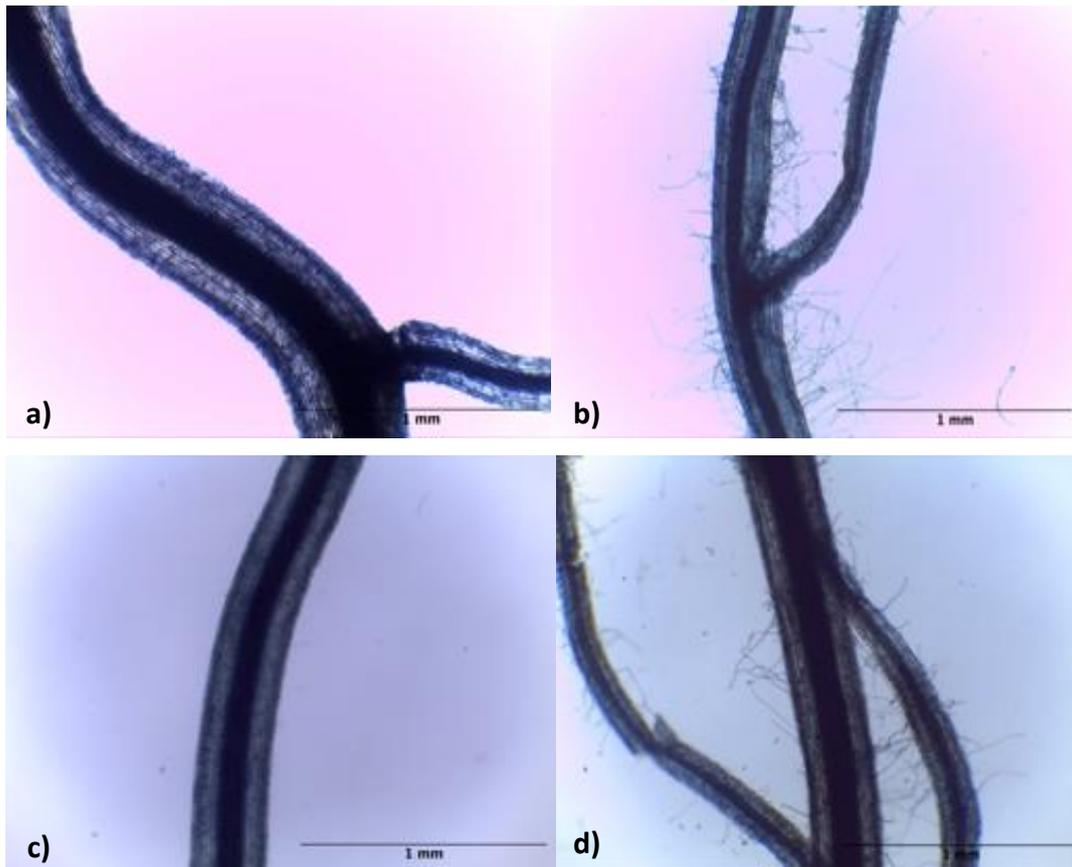


Figura 23. Actividad endófitas de *M. robertsii* HPI-017 en raíces de caña de azúcar variedad CP 72-2086 a los 60 ddi observadas bajo un aumento 4x. a) y c) Tratamiento 1: Plantas sin inocular , b) Tratamiento 2; plantas inoculadas con *M.robertsii* directamente al sustrato, d) Tratamiento 3: plantas inoculadas con *M. robertsii* por aspersión.

8.2 Evaluación de la actividad promotora de crecimiento de *M. robertsii* en caña de azúcar

A los 30, 60 y 90 días después de la inoculación de *M. robertsii* HPI-017 en las plántulas de caña de azúcar se observaron diferencias en los parámetros de crecimiento evaluados (Figura 19). Se evaluaron las variables de longitud del tallo, diámetro de los tallos, longitud de las raíces, número de hojas, peso seco de las raíces y peso seco de la parte aérea (tallos y hojas).

De acuerdo al análisis estadístico, a los 30, 60 y 90 ddi se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas $P < 0.05$ en la mayoría los parámetros de las plantas que fueron inoculadas con *M. robertsii* HPI-017 directamente al sustrato (Tratamiento 2) y aquellas que fueron inoculadas por medio de aspersión

(Tratamiento 3) respecto a plántulas que no fueron inoculadas (Tratamiento 1), Tabla 6, Figura 19.

A los 30 ddi todos los parámetros evaluados a excepción de la longitud de la raíz del tratamiento 2 respecto al Tratamiento 1 (control), fueron estadísticamente significativas, observándose tallos más altos y gruesos, mayor cantidad de hojas, y presentando mayor peso seco en la raíz y parte aérea de las plantas (tallo y hojas). Por su parte en el tratamiento 3, a pesar de observar plantas más vigorosas respecto al Tratamiento 1, estas no presentaron diferencias estadísticamente significativas con las plantas del Tratamiento 1 y las plantas del tratamiento 3.

A los 60 ddi todos los parámetros evaluados a excepción del diámetro del tallo, presentaron diferencias estadísticamente significativas. Por lo tanto, resulta interesante que, haciendo una comparación entre plantas del tratamiento 1 y plantas del tratamiento 2 a los 30 y 60 ddi se observa que a los 30 ddi las raíces mantuvieron crecimientos similares y los tallos fueron más gruesos en el tratamiento 2 respecto al control, pero a los 60 ddi, pasa lo contrario; las raíces del tratamiento 2 son más largas respecto al control y el grosor de los tallos se mantienen similares.

Tabla 6. Evaluación de la actividad promotora de crecimiento de *M. robertsii* en caña de azúcar. Se evaluó el crecimiento de la longitud del tallo, diámetro del tallo, longitud de la raíz, número de hojas por planta, peso seco de la raíz y peso seco de la parte aérea (tallo y hojas) en plantas de caña de azúcar CP72-2086 inoculadas con *M. robertsii* directamente al sustrato (Tratamiento 2) e inoculadas por asperjación (Tratamiento 3). Los parámetros se evaluaron a los 30, 60 y 90 ddi. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas, Tukey (P<0.05).

		Parámetros evaluados ^a					
ddi	Tratamientos	Longitud del tallo (cm)	Diámetro del tallo (mm)	Longitud de la raíz (cm)	Cantidad de hojas por planta	Peso seco raíz(g)	Peso seco parte aérea (g)
30	Tratamiento 1	7.92 ± 1.08 B	2.60 ± 0.65 B	33.24 ± 2.84 A	2.59 ± 0.31 B	0.52 ± 0.31 B	0.51 ± 0.11 B
	Tratamiento 2	11.06 ± 2.63 A	4.04 ± 0.49 A	38.44 ± 5.89 A	3.39 ± 0.31 A	0.94 ± 0.14 A	0.82 ± 0.19 A
	Tratamiento 3	10.00 ± 1.44 AB	3.82 ± 0.96 AB	35.42 ± 4.17 A	2.63 ± 0.30 B	0.70 ± 0.70 AB	0.72 ± 0.18 AB
60	Tratamiento 1	8.96 ± 0.80 B	5.04 ± 0.30 A	32.66 ± 2.93 B	2.64 ± 0.13 B	0.32 ± 0.13 B	0.57 ± 0.09 B
	Tratamiento 2	11.76 ± 1.60 A	6.34 ± 1.09 A	43.68 ± 3.64 A	3.02 ± 0.21 A	1.40 ± 0.42 A	1.44 ± 0.42 A
	Tratamiento 3	11.58 ± 1.50 A	5.66 ± 1.45 A	42.08 ± 4.84 A	2.81 ± 0.29 AB	1.00 ± 0.25 A	1.00 ± 0.47 AB
90	Tratamiento 1	8.92 ± 0.35 B	5.94 ± 0.73 B	39.80 ± 3.82 B	2.75 ± 0.20 B	2.46 ± 0.71 B	1.408 ± 0.46 B
	Tratamiento 2	12.92 ± 0.74 A	8.74 ± 1.37 A	46.50 ± 2.55 A	3.84 ± 0.10 A	4.02 ± 0.58A	3.376 ± 0.73 A
	Tratamiento 3	12.74 ± 0.94 A	7.60 ± 0.51 A	46.18 ± 3.40 A	3.39 ± 0.30 A	3.41 ± 0.82 AB	3.114 ± 0.46 A

Por su parte, los parámetros de crecimiento evaluados en el tratamiento 3 a los 60 ddi demostraron ser estadísticamente diferentes en comparación a las plantas del tratamiento 1, a excepción del diámetro del tallo, el número de hojas y el peso seco de la parte aérea, es decir, aunque las plantas inoculadas siempre demostraron ser más vigorosas que las plantas de caña de azúcar no inoculadas, el análisis estadístico no demostró diferencias significativas únicamente en cuanto a las variables ya mencionadas.

Finalmente, la cosecha de las plantas de caña de azúcar a los 90 ddi de los tratamientos 2 y 3, mostraron diferencias estadísticamente significativas en todos los parámetros evaluados respecto a las plantas de caña de azúcar que no fueron inoculadas con *M. robertsii*

La asociación de *M. robertsii* con la rizosfera de las plántulas de caña de azúcar jugo un papel importante durante la colonización de las mismas, pues favoreció al crecimiento de la caña de azúcar. Nuestros resultados coinciden con los estudios realizados por otros autores que demostraron la actividad promotora de crecimiento de *M. robertsii* (Raya-Díaz et al. 2017; Liao et al. 2014; García et al. 2011.; Canassa et al. 2019). En caña de azúcar variedad CP72-2086 observamos actividad endófito de *M. robertsii* principalmente en las raíces, dando como resultado un aumento en la altura y diámetro del tallo, así como en el follaje, pudimos evidenciar que *M. robertsii* HPI-017 promueve el crecimiento y resistencia de la caña de azúcar, prevaleciendo en una asociación simbiótica benéfica planta-hongo (Moonjely y Bidochka, 2019). Lia y colaboradores (2014), también demostraron que algunas especies de *Metarhizium* son promotores de crecimiento en maíz. Se ha informado que esta promoción en el crecimiento de las plantas se asocia a que *M. robertsii* produce hormonas de crecimiento, encontrándose en mayor proporción las auxinas, favoreciendo de esta manera a las plantas de caña de azúcar con mayor crecimiento vegetativo y un aumento en la tasa fotosintética (Dutta et al. 2015). Recientes estudios, demuestran que *M. robertsii* aumentó el contenido de clorofilas A y B en plantas de *Arabidopsis*, maíz y tomate (González-Pérez et al. 2022) además, metabolitos como alcaloides, ciclohexanos, flavonoides, hidrocarburo, quininas y terpenos pueden relacionarse con una mayor formación de pelos radicales, lo que potencializa la adquisición de los nutrientes como el fósforo, nitrógeno, zinc y potasio (Rana, 2019), necesarios para el desarrollo de plantas vigorosas.

Estudios han reportado que los endófitos tienen efectos importantes en el crecimiento de las plantas que se desarrollan en ambientes estresantes, ya que, a pesar de estas condiciones, poco favorables para su crecimiento se ha observado un aumento de la biomasa vegetal. (Sasan y Bidochka, 2012).

En el presente estudio *M. robertsii* HPI-017 creció principalmente en la rizosfera de las plantas, lo cual está relacionado con factores como la taxonomía de las plantas hospedadoras, el nicho ecológico, así como la estación del año y la temperatura (Sánchez-Fernández et al, 2013; Gómez, 2014; Hyde y Soyong, 2008).

Tratamiento 1

Tratamiento 2

Tratamiento 3

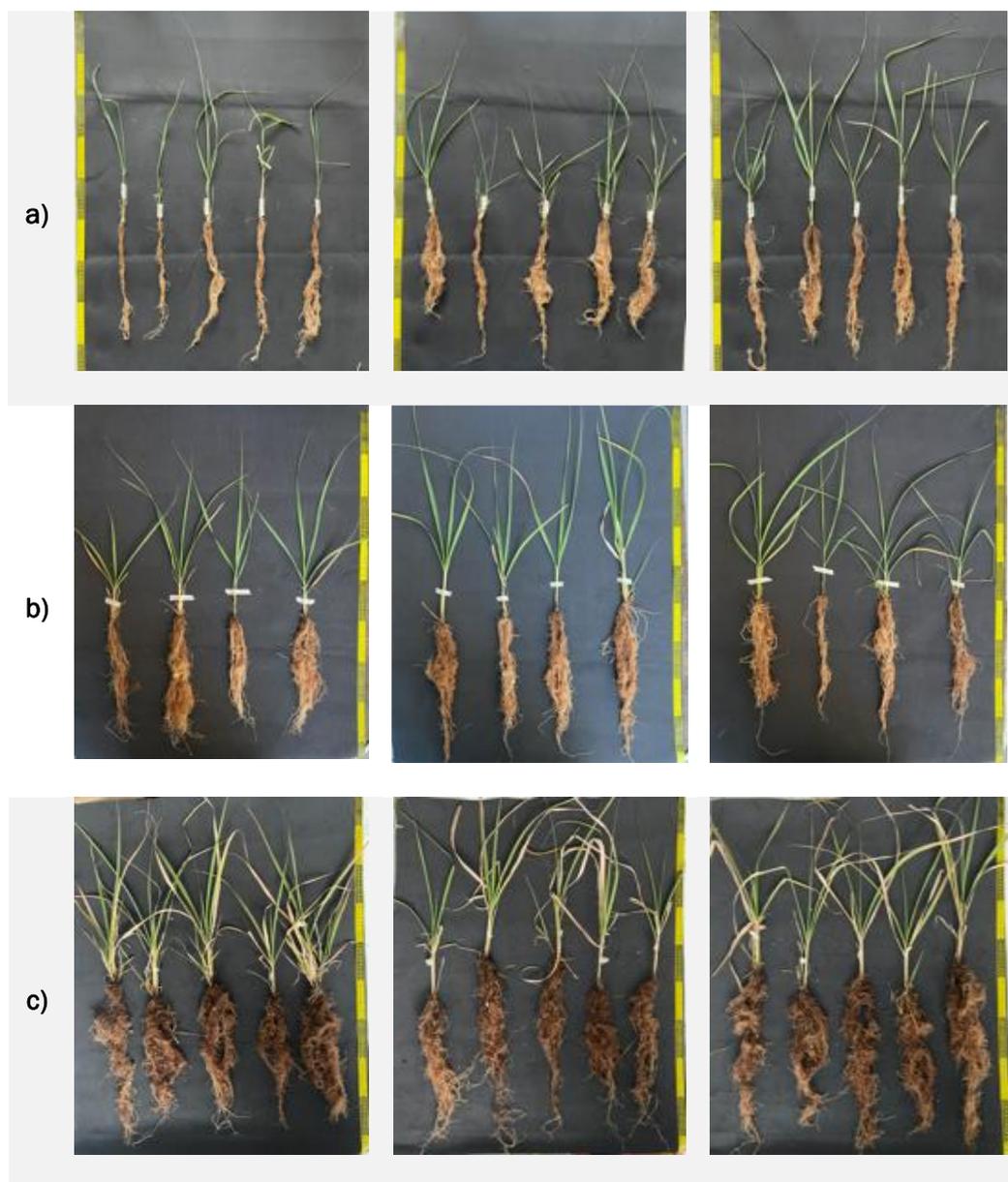


Figura 19. Tratamientos de plantas de caña de azúcar de la variedad CP72-2086 inoculadas con *M. robertsii*. a) plantas Inoculadas con *M. robertsii* a los 30 ddi, b) plantas Inoculadas con *M. robertsii* a los 60 ddi, c) plantas Inoculadas con *M. robertsii* a los 90 ddi (Tratamiento 1: Plantas sin inocular; Tratamiento 2: Plantas inoculadas con *M. robertsii* directamente al sustrato; Tratamiento 3: Plantas inoculadas con *M. robertsii* por aspersión).

8.3 Determinación de clorofila A y B en plantas de caña de azúcar inoculadas con *M. robertsii*

Se realizó la cuantificación de clorofila A y B en plantas de caña de azúcar a los 90 ddi, para determinar el efecto que tiene *M. robertsii* HPI-017 sobre los pigmentos fotosintéticos. Se observó que un aumento considerable de la clorofila A en el Tratamiento 2 (19.44 ± 1.28) y Tratamiento 3 (18.86 ± 2.08) en comparación con el Tratamiento 1 (13.54 ± 1.24), obteniéndose diferencias estadísticamente significativas. Mientras que, para las clorofilas B, se observó una disminución de su valor en presencia de *M. Robertsii* HPI-017. No obstante, el contenido de clorofilas B es mayor en los Tratamientos 2 (5.34 ± 0.53) y Tratamiento 3 (5.30 ± 0.54) en comparación con plantas de caña de azúcar que no fueron inoculadas con *M. robertsii* (Figura 20).

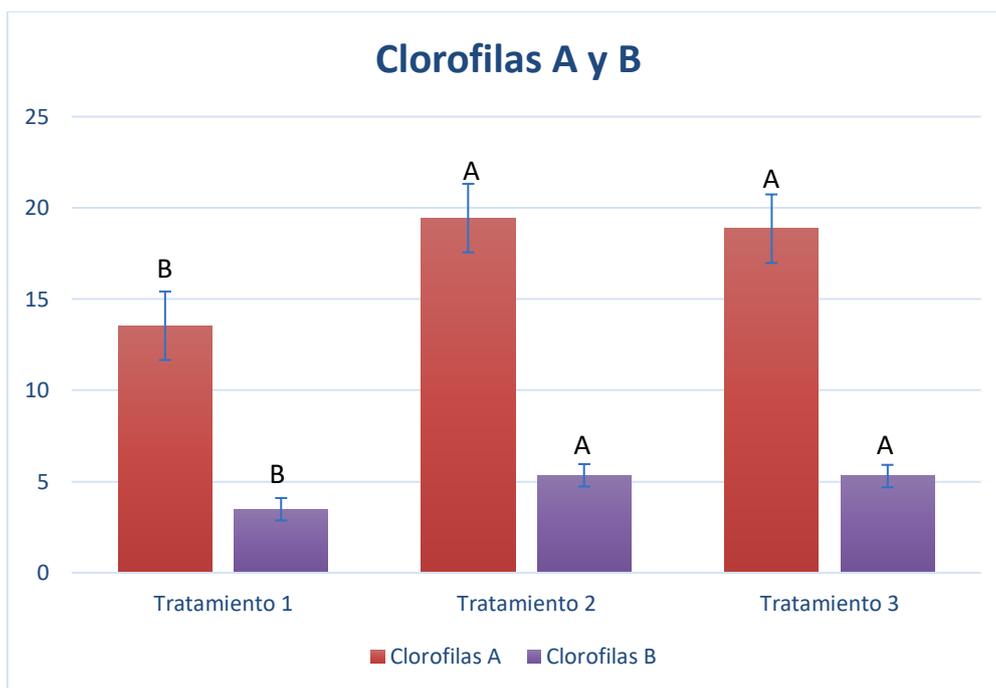


Figura 20. Contenido de Clorofila A y B en plantas de caña de azúcar inoculadas con *M. robertsii* a los 90 ddi (Tratamiento 1: Plantas sin inocular; Tratamiento 2: Plantas inoculadas con *M. robertsii* directamente al sustrato; Tratamiento 3: Plantas inoculadas con *M. robertsii* por aspersión). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas, Tukey ($P < 0.05$).

El aumento en el contenido de clorofila A y B obtenido concuerda con los resultados anteriores obtenidos con el aumento en su biomasa vegetal, por lo tanto, esto se

relaciona con la obtención de plantas de caña de azúcar más grandes al inocularse con *M. robertsii* HPI-017 en comparación con las plantas que no fueron tratadas con este hongo. Los resultados obtenidos concuerdan con los de González- Pérez et al. (2022), también obtuvieron un aumento en el contenido de clorofilas (A y B) en plantas de Arabidopsis, maíz y tomate inoculadas con *M. robertsii*. Adicionalmente se ha descrito que el uso de microorganismos benéficos aumenta considerablemente el contenido de clorofila generando así un aumento en la tasa de crecimiento, tolerancia a la salinidad, sequía y a bajas temperaturas, así como en los niveles de clorofila y tasa fotosintética (Redman et al. 2011; Khan 2013).

9. CONCLUSIONES

- ⇒ *M. robertsii* coloniza de manera endófitas las plantas de caña de azúcar variedad CP72-2086.

- ⇒ *M. robertsii* colonizó el 90 % de las raíces de las plantas de caña de azúcar (rizosfera).

- ⇒ *M. robertsii* colonizó brotes de caña de azúcar, es decir, en algunas secciones de hojas y tallos.

- ⇒ *M. robertsii* aplicado como inóculo; ya sea directamente al sustrato (Tratamiento 2) o por medio de aspersión (Tratamiento 3) en plantas de caña de azúcar demostró mayor eficacia en la producción de biomasa de raíces y brotes.

- ⇒ El contenido de clorofila (A y B) en plantas de caña de azúcar inoculadas con *M. robertsii* fue mayor en comparación con plantas no tratadas con este hongo.

10. PERSPECTIVAS

El presente proyecto abre las posibilidades de generar nuevas investigaciones en las cuales se continúe evaluando a los hongos entomopatógenos en diferentes cultivos de interés agronómico, planteando las siguientes perspectivas.

- ⇒ Modificación genética de *M. robertsii* fusionado a una proteína verde o roja fluorescente para evaluar en diferentes modelos de estudio si es capaz de penetrar las células corticales de las raíces y brotes.
- ⇒ Evaluar la actividad entomopatógena de *M. robertsii* en plagas comunes que presentan los cultivos más importantes en México.
- ⇒ Identificar y caracterizar a través de técnicas moleculares a *M. robertsii* recuperado del tejido vegetal.
- ⇒ Evaluar la actividad promotora de crecimiento en otros modelos de estudio.
- ⇒ Identificar los metabolitos presentes durante el establecimiento simbiótico hongo-planta.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abello, F. J., & Kelemu, S. (2006). Hongos endófitos: ventajas adaptativas que habitan en el interior de las plantas. *Revista Corpoica-Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 55-57.

Álvarez Silva, M., & Pérez Domínguez, J. F. (2004). Resultados del monitoreo para diagnóstico y control de poblaciones de barrenadores del tallo en caña de azúcar de los municipios: El Grullo–Autlán–el limón en Jalisco. Primer año. . Inifap, 1-23.

Arias Medina, H. O. (2013). Estudio sobre las interacciones entre hongos endófitos y hongos fitopatógenos de *Coffea arabica*. Universidad Nacional Autónoma de México.

Aucatoma , B., Castillo, R., Mendoza, J., & Garces, F. (2015). Factores que afectan la calidad de la caña de azúcar. Centro de Investigación de la Caña de Azúcar del Ecuador - CINCAE, 1-8.

Barrera, G. P., Villamizar, L. F., Espinel, C., Quintero, E. M., Belaich, M. N., Toloza, D. L., . . . Vargas, G. (2017). Identification of *Diatraea spp.* (Lepidoptera: Crambidae) based on cytochrome oxidase II. *PLOS ONE*, 12(9):e0184053, 1-16.

Barroso-Aké, H. J., Cibrián-Tovar, J., Segura-León, O. L., & Azuara-Domínguez, A. (2016). Pre-Courtship Behavior and the Effect of Age on Its Duration in *Diatraea magnifactella* (Lepidoptera: Crambidae) . *Florida Entomologist*, 352-354.

Bautista-Gálvez, A., González-Cortes, N. (2005). Tres dosis de *Metarhizium robertsii* sobre la mosca pinta (*aeneolamia spp.*) en caña de azúcar en la región de los ríos, estado de Tabasco. (ABG) Universidad Tecnológica del Usumacinta, 21(41): 37-40.

Bustamante, J. F. (2015). La caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) para la producción de panela. Caso: Nordeste del departamento de Antioquia. UNAD, 1-70.

Canassa, F., D'Alessandro, C. P., Sousa, S. B., & Demétrio, C. G. (2019|). Fungal isolate and crop cultivar influence the beneficial effects of root inoculation with. Universidad Nacional de Colombia, 1-37.

Cao, Y., Peng, G., He, Z., Wang, Z., Yin, Y., & Xia, Y. (2007). Transformation of *Metarhizium robertsii* with benomyl resistance and green fluorescent protein genes provides a tag for genetically engineered strains. *Springer Science+Business Media B.V.*, 29:907–911.

Castillo Torres , J. L., González Gómez, D. X., & Soto Alarcón, J. M. (2018). Agroindustria de la caña de azúcar: desafíos para el sector agrícola. *Boletín Científico de las Ciencias Económico Administrativas del ICEA*, 10-17.

Castillo Zeno, S. (2006). Uso de *Metarhizium robertsii* para el control biológico del salivazo (*Aeneolamia spp.* y *Prosapia spp.*) en pastizales de *Brachiaria*

decumbens en El Petén, Guatemala. Centro Agrónomo Tropical de investigación y enseñanza, 1-67.

CONADESCUA. (2015). Gobierno de México. Retrieved from Comité Nacional para el Desarrollo Sustentable de la Caña de Azúcar: <https://www.gob.mx/conadesuca/es/articulos/atlas-de-la-agroindustria-de-la-cana-de-azucar-2015?idiom=es>

Cuevas-Molina, J., Trejo-Loyo, A. G., Fonseca-González, A., Lina-García, L. P., Hernández-Velázquez, V. M., & Obregón-Barboza, V. (2015). Modificaciones del Método de cría de *Diatraea magnifactella* (Lepidóptera: Crambidae) en condiciones de laboratorio. *Entomología Mexicana*, 148-154.

Dávila Berumen, F. (2017). Caracterización de aislados del hongo *Metarhizium* provenientes del sur del estado de Guanajuato con potencial de promover el crecimiento vegetal. *Universidad de Guanajuato*, 1-94.

De Groot, P. W., Bader, O., de Boer, A. D., Weig, M., & Chauhanc, N. (2013). Adhesins in Human Fungal Pathogens: Glue with Plenty of Stick. *Journals.ASM.or*, 470-481.

Delegación SADER Nayarit. (21 de agosto de 2018). La caña de azúcar y su importancia para la industria azucarera. Recuperado el 19 de junio de 2020, de Gobierno de México: <https://www.gob.mx/agricultura/nayarit/articulos/la-cana-de-azucar-y-su-importancia-para-la-industria-azucarera?idiom=es>

Deng, Z., & Cao, L. (2016). Fungal endophytes and their interactions with plants in phytoremediation: A review. *Elsevier*, 2-7.

Deng, Z., & Cao, L. (2017). Fungal endophytes and their interactions with plants in phytoremediation: A review. *Elservier*, 1100-1106.

Diatraea magnifactella Dyar, 1911 in GBIF Secretariat. (2019). GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei> accessed via GBIF.org on 2020-04-18.

Diaz Montejo, L. L., & Portocarrero Rivera, E. T. (2020). Manual de producción de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.). *Ciencia y Producción Agropecuaria*, 1-148.

Driver, F., Milner, R. J., & Trueman, J. W. (2000). A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycol. Res.*, 134-150.

Duarte-Almeida, J. M., Vidal Novoa, A. V., Fallarero Linares, A., Lajolo, F. M., & Genovese, M. I. (2006). Antioxidant Activity of Phenolics Compounds from Sugar Cane (*Saccharum officinarum* L.). *Juice. Plant Foods for Human Nutrition*, 61(4), 187-192.

Dutta, P., Kaushik, H., Bhowmick, P., Puzari, K., & Hazarika, G. (2015). *Metarhizium Robertsii* as endophyte has the ability of plant growth enhancement. *International Journal of Current Research*, 14300-14304.

Ecured. (2017). Ecured.cu. Retrieved from https://www.ecured.cu/Ca%C3%B1a_de_az%C3%BAcar

Estévez, A. A. (2008). Cenicaña. Obtenido de Biología de la Caña de azúcar: http://www.cenicana.org/pdf/documentos_no_seridados/libro_el_cultivo_cana/libro_p31-62.pdf

FAO. (2019). El estado mundial de la agricultura y la alimentación. 1-71.

Friesen, M. L., Porter, S. S., Stark, S. C., von Wettberg, E. J., Sachs, J. L., & Martínez-Romero, E. (2011). Microbially Mediated Plant Functional Traits. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 23-46.

Ganley, R. J., Sniezko, R. A., & Newcombe, G. (2008). Endophyte mediated resistance against white pine blister rust in *Pinus monticola*. *Forest Ecology and Management*, 2751-2760.

García, J. E., Posadas, J. B., Peticari, A., & Lecuona, R. E. (2011). *Metarhizium robertsii* (Metschnikoff) Sorokin Promotes Growth and has Endophytic Activity in Tomato Plants. *IDOSI Publications*, 22-27.

Gómez-Lim, M. Á., Magaña, O. D., Fernández, F., & Loske, A. M. (2015). Transformation of Fungi Using Shock Waves. Springer International Publishing Switzerland, 209-219.

Gómez-Merino, F. C., Trejo-Téllez, L. I., Salazar-Ortiz, J., Pérez-Sato, J. A., Senties-Herrera, H. E., Bello-Bell, J. J., & Aguilar-Rivera, N. (2017). La diversificación de la agroindustria azucarera como estrategia para México. *agro productividad*, 7-9.

Gómez-Merino, F., Trejo-Téllez, L., Morales-Ramos, V., Salazar-Ortiz, J., Velasco-Velasco, J., & Senties-Herrera, H. L. (2014). Necesidades de innovación de la caña de azúcar. *Agro productividad*, 22-27.

Gómez, M. (2014). Aislamiento y evaluación antifúngica de hongos endófitos de *Acalypha gaumeri*. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Gonzalez-Perez, E., Ortega-Amaro, A., Bautista, E., Delgado-Sanchez, P., & Jimenez-Bremont, J. F. (2022). The entomopathogenic fungus *Metarhizium robertsii* enhances Arabidopsis, tomato, and maize plant growth. San Luis Potosí, México: Elsevier.

Greenfield, B. P., Lord, A. M., Dudley, E., & Butt, T. M. (2014). Conidia of an insect pathogenic fungus, *Metarhizium robertsii*, fail to adhere to mosquito larval cuticle. *R.Soc. opensci.* 1:140193.

Greenfield, M., Gómez-Jiménez, M. I., Ortiz, V., Vega, F. E., Kramer, M., & Parsa, S. (2016). *Beauveria bassiana* and *Metarhizium robertsii* endophytically colonize. Elsevier, 40-48.

Guzmán-Camposeco, F., Díaz-Vicente, V. M., Magallanes-Cedeño, R., Pinsón-Rincón, E. P., & Pérez-Quintanilla, J. N. (2018). Biocontrol de *Aeneolamia*

postica Walker y *Prosapia simulans* Walker. Universidad Autónoma de Chiapas. Facultad de Ciencias Agrícolas Campus IV, 15-20.

Hartley, S. E., & Gange, A. C. (2008). Impacts of Plant Symbiotic Fungi on Insect Herbivores: Mutualism in a Multitrophic Context. *The Annual Review of Entomology*, 323-42.

Hernández, A. V. (2018). Actividad endófitas de la cepa Y15 de *Bacillus thuringiensis* en caña de azúcar y maíz, y su efecto sobre *Spodoptera frugiperda*. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, UAEM, Cuernavaca, Morelos México.

Hyde, K. D., & Soytong, K. (2008). The fungal endophyte dilemma. *Fungal Diversity*, 163-173.

INFOAGRO. (2021). El cultivo de la caña de azúcar. Retrieved from Infoagro.com:

https://www.infoagro.com/documentos/el_cultivo_cana_azucar.asp

Inglis, P. W., Aragão, F. L., Magalhães, B. P., & Valadares-Inglis, M. C. (2000). Biolistic co-transformation of *Metarhizium robertsii* var. *acridum* strain CG423 with green fluorescent protein and resistance to glufosinate ammonium. Elsevier. *FEMS Microbiology Letters* 191, 249-254.

Jimenez-Gasco, M., Luthe, D., & Barbercheck, M. (2020). Systemic Colonization by *Metarhizium robertsii* Enhances Cover Crop Growth. *Journal of Fungi*, 1-16.

Khan AL, Hussain J, Al-Harrasi A, Al-Rawahi A, Lee IJ. 2013. Endophytic fungi: resource for gibberellins and crop abiotic stress resistance. *Crit Rev Biotechnol*. 1-13

Khan, A. L., Hussain, J., Al-Harrasi, A., Al-Rawahi, A., & Lee, I.-J. (2013). Endophytic fungi: resource for gibberellins and crop abiotic stress resistance. *Biotechnol*, 1-13.

Leal Guerra, J. F., Martínez Pérez, E., & Reyes Hernández, J. (marzo de 2015). Manejo integrado de plagas de la caña de azúcar en la zona de abasto del ingenio el mante S.A. de C.V. Recuperado el 23 de Julio de 2020, de <https://www.atamexico.com.mx/wp-content/uploads/2017/11/8.-ENTOMOLOG%C3%8DA.pdf>

Leger, R. S. (2007). *Metarhizium robertsii* as model for studying. Springer, 179-204.

Lemons, A., Clay, K., & Rudgers, J. A. (2005). Connecting plant-microbial interactions above and belowground: a fungal endophyte affects decomposition. *Ecosystem Ecology*, 595-604.

Lezam, R., Molina, J., López, M., Pescador, A., Galindo, E., Ángel, C. A., & Michel, A. C. (2004). Efecto del hongo entomopatógeno *Metarhizium robertsii* sobre el control. avances en investigación agropecuaria.

Lezama-Gutiérrez , R. Alatorre-Rosas , L. F. Bojalil-Jaber , J. Molina-Ochoa , M. Arenas-Vargas , M. González-Ramírez , and O. Rebolledo-Domínguez (2004). Virulence of five entomopathogenic fungi (Hyphomycetes) against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) eggs and neonate larvae.

Liao, X., O'Brien, & R., Fang, W., & Leger, R. J. (2014). The plant beneficial effects of *Metarhizium* species correlate with their association with roots. Springer.

López Bustamante, J. F. (2015). La caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) para la producción de panela. caso: nordeste del departamento de Antioquia. Universidad Nacional Abierta y a Distancia. unad.

Lorito M, Woo S, Harman G and Monte E. 2010. Translational research on Trichoderma: from omics to the field. Annual Review of Phytopathology 48: 395-417

Lorito, M., Woo, S. L., Harman, G. E., & Monte, E. (2010). Translational Research on Trichoderma: From Omics to the field. The Annual Review of Phytopathology, 395-417.

Magaña-Ortiz, D., Coconi-Linares, N., Ortiz-Vázquez, E., Fernández, F., M. Loske, A., & Gómez-Lim, M. A. (2013). A novel and highly efficient method for genetic transformation of fungi employing shock waves. Fungal Genetics and Biology. , 9-16.

Martínez, N. (2010). Manejo integrado de plagas: una solución a la contaminación ambiental. Comunidad y Salud, 8(1),73-82.[fecha de Consulta 19 de abril de 2020]. ISSN: 1690-3293. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=3757/37574024>.

Mauricio Duarte-Almeida, J. N. (2006). Antioxidant Activity of Phenolics Compounds from Sugar Cane (*Saccharum officinarum* L.). Juice. Plant Foods for Human Nutrition, 61(4), 187-192.

Mejía, L. C., Rojas, E. I., Maynard , Z., Van Bael, S., Arnold , E., Hebbar, P., Herre, E. A. (2008). Endophytic fungi as biocontrol agents of Trichoderma cacao pathogens. Biological Control, 4-14.

Mendoza Mora, J. (1992). El barrenador del tallo de maiz, *Diatraea spp.* y su control . INIAP - Estación Experimental Pichilingue.

Metarhizium robertsii (Metschn.) Sorokīn, 1883. (s.f.). in Species 2000 & ITIS Catalogue of Life: 2019, Catalogue of Life.

Moonjely, S., & Bidochka, M. J. (2019). Generalist and specialist *Metarhizium* insect pathogens retain. Elsevier, 209-217.

Moonjely, S., Zhang , X., Fang, W., & Bidochka, M. (2019). *Metarhizium robertsii* ammonium permeases (MepC and Mep2) contribute to rhizoplane colonization and modulates the transfer of insect derived nitrogen to plants. Plos One, 1-20.

- Moreno Resendez, A., Carda Mendoza, V., Reyes Carrillo, J., Vazquez Arroyo, J., & Cano Rios, P. (2018). Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: una alternativa de biofertilización para la agricultura sustentable. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 68-83.
- Nogueira-Lopez, G., Greenwood, D. R., Middleditch, M., Winefield, C., Eaton, C., Steyaert, J. M., & Mendoza-Mendoza, A. (2018). The Apoplastic Secretome of *Trichoderma virens* During Interaction with Maize Roots Shows and Inhibition of Plant Defense and Scavenging Oxidative Stress Secreted Proteins. *frontiers in Plant Science*, 1-23.
- Osborne, L. S., & Landa, Z. (1992). Biological control of whiteflies with entomopathogenic fungi. *The Florida Entomologist*, 456-471.
- Ownley, B., Gwinn, K., & Vega, F. (2009). Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. *International Organization for Biological Control*, 113-128.
- Pattemore, J. A., Hane, J. K., Williams, A. H., Wilson, B. A., Stodart, B. J., & Ash, G. J. (2014). The genome sequence of the biocontrol fungus *Metarhizium robertsii* and comparative genomics of *Metarhizium* species. *BMC Genomics*, 15:660.
- Pérez Rico, E. F., & Martínez Torrez, K. S. (2011). Distribución espacial y ciclo de vida de *Diatraea spp.* en plantaciones de *saccharum officinarum* (Caquetá, Colombia). *Ingenierías & Amazonia*, 122-130.
- Posada, F., & Fernando, V. (2005). Establishment of the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) as an endophyte in cocoa seedlings (*Theobroma cacao*). *The Mycological Society of America Lawrence*, 1195-1200.
- Quintero Durán, R. (1995). Fertilización y nutrición. En: CENICAÑA. El cultivo de la caña en la zona azucarera de Colombia, Cali, CENICAÑA. p.153-177.
- Raghukumar, S. (2017). *Fungi: Characteristics and Classification*. Springer International Publishing, 1-13.
- Ramírez, Miguel Ángel. (2008). Cultivos para la producción sostenible de biocombustibles: Una alternativa para la generación de empleos e ingresos. *Servicio Holandés de Cooperación al Desarrollo SNV*, 2-16.
- Rana, K. R., Kour, D., Sheikh, I., Dhiman, A., Yadav, N., Yadav, A. N., Saxena, K. (2019). Endophytic Fungi: Biodiversity, Ecological Significance, and Potential Industrial Applications. *Springer Nature Switzerland*, 1-62.
- Raya-Díaz, S., Sánchez-Rodríguez, A. R., Segura-Fernández, J. M., del Campillo, M., & Quesada-Moraga, E. (2017). Entomopathogenic fungi-based mechanisms for improved Fe nutrition in sorghum plants grown on calcareous substrates. *PLoS ONE*, 12(10): e0185903.

Redman, R. S., Dunigan, D. D., & Rodríguez, R. J. (2001). Fungal symbiosis from mutualism to parasitism: who controls the outcome, host or invader? *New Phytologist*, 705-716.

Redman, R. S., Kim, Y. O., Woodward, C., Greer, C., Espino, L., Doty, S. L., & Rodríguez, R. J. (2011). Increased Fitness of Rice Plants to Abiotic Stress Via Habitat Adapted Symbiosis: A Strategy for Mitigating Impacts of Climate Change. *PLoS ONE*, 1-10.

Rodríguez del Bosque, L. A., Loredó Pérez, R., Mata, V. H., & Ávila Valdez, J. (2012). Manejo integrado de barrenadores en caña de azúcar en el sur de Tamaulipas . SAGARPA.

Ruiz-Montiel, C., Illescas-Riquelme, C. P., Altamirano Hernández , U., & Wallace Jones , R. (2015). Nuevos Registros de Picudos (Coleoptera: Curculionidae) Afectando Caña de Azúcar (*Saccharum officinarum* L.) en Veracruz, México. *BioOne*, 40(2):427-432.

SAGARPA. (2015). Gobierno de México. Retrieved from Agricultura: <http://www.agricultura.gob.mx/catalogos/sagarpa-2015>

Samson, R. A. (2011). Ecology and general characteristics of indoor fungi. Wageningen Academic Publishers, 101-116.

Sánchez Fernández, R. E., Sánchez-Ortiz, B. L., Sandoval-Espinoza, Y. K., Ulloa-Benítez, Á., Armendáriz-Guillén, B., García Méndez, M. C., & Macías-Rubalcava, M. L. (2013). Hongos Endófitos: Fuente potencial de metabolitos secundarios Bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 132-146.

Sasan, R. K., & Bidochka, M. J. (2012). The insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* (clavicipitaceae) is also an edophyte that stimulates plant root development. *American Journal of Botany*, 99 (1): 101-107.

Sasan, R., & Bidochka, M. (2012). The insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* (Clavicipitaceae) is also an endophyte that stimulates plant root development. *American Journal of Botany*, 101-107.

Schulz, B., Boyle Christine, Draeger , S., Rommert, A.-K., & Krohn, K. (2002). Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. The British Mycological Society United Kingdom.

SIAP. (2020). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. SAGARPA. Avance de siembras y cosechas perennes, riego + temporal, 31 de marzo 2019. http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/AvanceNacionalCultivo.do

Vásquez Condado, J. J. (2017). Efecto del clima en la producción de caña de azúcar en central Progreso. Colombia: Ingenio Central Progreso.

Vega, F. E. (2008). Insect Pathology and fungal endophytes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 277-279.

- Vicentini, S., & Magalhães, B. P. (1996). Infection of the grasshopper *Rhammatocerus schistocercoides* Rehn by the entomopathogenic fungus *Metarhizium flavoviride* Gams & Rozsypal. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 25: 309-314.
- Wang , H.-L., Kim Hwan, S., Siu, H., & Breuil, C. (1999). Transformation of sapstaining fungi with hygromycin B resistance plasmids pAN7-1 and pCB1004. *Mycol. Res*, 103 (1): 77–80.
- Webster, J., & Weber, R. (2007). *Introduction to fungi*. Cambridge University Press, 841.
- Webster, J., & Weber, R. (2007). *Introduction to fungi*. Cambridge University Press.
- Yan, L., Zhu, J., Zhao, X., Shi, J., Jiang, C., & Shao, D. (2019). Beneficial effects of endophytic fungi colonization on plants. Springer Nature.
- Zeng, G., Chen, X., Zhan, X., Zhang, Q., Xu, C., Mi, W., . . . Fang, W. (2017). Genome-wide identification of pathogenicity, conidiation and colony sectorization genes in *Metarhizium robertsii*. 2-81.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 23 de noviembre del 2022.

VOTOS APROBATORIOS DE TESIS

Los integrantes de la Comisión Revisora de la tesis titulada: "**Actividad endófitas y promotora del crecimiento de *Metarhizium robertsii* en caña de azúcar**", que presenta el **C. Roberto Carlos Sotelo Valdez**, del Programa de Posgrado Maestría en Biotecnología, bajo la dirección de la DRA. IRENE DE LA CONCEPCIÓN PEREA ARANGO y codirección del DR. VÍCTOR MANUEL HERNÁNDEZ VELÁZQUEZ, han determinado que el documento reúne los requisitos académicos para su defensa oral en el examen de grado, por lo que emiten su **VOTO APROBATORIO**.

Comisión Revisora de tesis (firma electrónica)

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (directora de tesis, CEIB UAEM)

Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez (codirector de tesis, CEIB UAEM)

Dr. Guadalupe Peña Chora (CIB UAEM)

Dra. Susana Valencia Díaz (CEIB UAEM)

Dr. Edgar Martínez Fernández (CIB UAEM)



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

GUADALUPE PEÑA CHORA | Fecha:2022-11-23 21:10:07 | Firmante

hn6xOx3Q2Jv3fx7T9g2ADcM3Yg0e6WcBqblwrEkFggQV7hBF+bD2yRi0Koze3aaksGo2y5clYF9zBimsUjYX9fT/1QLMZ4fOUNTNTpCZXPriaBgBiXfs9nJNN28JvjEoLAJPST/ERvkPPnsvEBG8bBm/vfrU8KLDW6w6BS50g4MZi5yEqv/hi515lvuK2RIQvVamTypJ8TO2dzhfEDofp8g7/ozAM2kJJdGO+LfHouj/Dvs7byzWeB4jW9n5IV9m/HIP0FbhoPvFCRyQNSd1C1wL1OxKM1OjheQCTUQ5nhR7zGbaRwwomM/RrzJS4nE1/8Ar1r75XYGj2HLftg==

SUSANA VALENCIA DIAZ | Fecha:2022-11-24 07:59:05 | Firmante

eE15T3MGa8UsNSXUeAdS2+RHZEK1mV7Ff6DduclKUOUzE6ikgsb5ARaLctJZxgJQOFFxbkGAKsnVMlpv3Y6oaV6h61ANq3bFCJOLc+pCAVn7vhHlgnWwu++9gdcg6lem7jUsEQi/f2e7XgKBMQfghwpllvSmVXsrOcyBnylgyWklo2kNLj1mS0MWOw2/SXF5Vqa7GW7xUDB6zED9vW2sbF2v/MN31CmB1ndx4vH36lNmtplfP1F2eCDxmVCS5tiHJ05huSqeVC P6yH/rmNyOrGj3sPSHKX5No+17+taU4ATDBpOZgGSz6+YN9XzIS2TiQ8qBMC6BFzRbB9m7ww==

VICTOR MANUEL HERNANDEZ VELAZQUEZ | Fecha:2022-11-24 09:35:22 | Firmante

3Q+nAXylOIHJ2H1BpNs6i4iPaELsFpmpW7j57zZbtWPQaShwJVSznDRQihioUI19NnAGycKNZUP1EgguwepeRjQuOdKoH1z2zMU9qM0ew57U5jPJnrmjhkhKdvw/pyqJ2Z6uPZFj098XDYWnwCF8CsPiyqeJuQ9VpQS040cgYqdG9lkYTz6iXITzT0VR8Y2e+7uCGAx5LCXacNgPhj14LD7GFo4JF/1TPU6f0wOS3tIGHCz2xy4/i+TfrVLaYCGcT28MTAX3h0A0BvJnlCsn6k0px0ZjyWNP3plwa9NL4yX0GUBmCB1FHQPn56uXT+RP+snaUKjlkPMN9ZKPZxA==

EDGAR MARTINEZ FERNANDEZ | Fecha:2022-11-25 21:20:50 | Firmante

Tly/1/2YUogHSwcn5vgoiSniK7AuN34R5L+xwE+bJTDJpbJ3Go3le6WNo3SPQEB/k6+rt4PCmoUjP70JJEYVvit9eZHRcwfthXfUeUOG3djvutCRtBIXnXcJX4blukdxh63P8jv2ZDQrKeoAn/Zhb9dOwkDWOubU47sNAurplwidi5H+pLSDoFwTsYxFPcGn7EPNdrnjHCci3FNc1c8Vc+Z+AmAlqQceseL/UafMyESB0DCSFbXO4TkV1c8Lr1qHKmt+CWzBjzhJ/w9BD0+Jxjvhd3+1Y1zmQCza3X5uiGouXF6K8VRlhu4APfa2WxqRGHZSOx74vKFDkx9RBg==

IRENE DE LA CONCEPCION PEREA ARANGO | Fecha:2022-11-27 20:16:36 | Firmante

Kw2o6YS4jwP3VykKj3Tngdktf2AEs/jd4QffZubuRX6oTpnNd+5BnGn4Gv8a4gakTO0GvtK8EVpvg05JcggZHYqJBfzvlQ5oNjXr3lxjdufBx8JTpOvw4OcmRfHYi8VHkrNNKrczSxoqni2w2+7NXuLeOj+axoo7QuFbU7VkbUm423QWBI882X0LP3hvdJB99b+gFpZ4xqOAKdhkVMxjeyo9LPaVmnbEl46Rueh1Xtvp3fc9OjkQ8gC7O4TpAojX7O+g8mXFSYDgJcjqYwCm7I2HiRqURMSR6dieCqEiCOyjemchESE5c3A1yUkhl+tpwI5Nazpjh3aXwRZIKKsQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



gmCZ61eOT

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/g0UnflQIHRzDUbRz2EMrcd3Z8YiRQf6>

