



**UNIVERSIDAD MICHUACANA DE  
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
AGROPECUARIAS Y FORESTALES**



**Simbiosis micorrízica arbuscular y hongos  
entomopatógenos endófitos en maíz como bioprotectores  
contra el gusano cogollero**

**TESIS**

**Que presenta**

**Ing. Agronomo Cuauhtémoc Hernández Hernández**

**Como requisito para obtener el grado de Maestro en producción  
agropecuaria**

**Director de tesis**

**Dr. Luis López Pérez**

**Co-Director de tesis.**

**Dra. Evangelina Esmeralda Quiñones Aguilar**

**Morelia, Michoacan, Agosto del 2019.**

## **Agradecimientos y deicatoria**

A mis padres Maria del Rosario Hernández Acevedo y J. Isabel Hernandez Cortez, por su apoyo y motivación para continuar adelante. Por la educación que me han dado y por brindarme la oportunidad de estudiar y poder llegar a este logro.

A mis hermanos por su apoyo, consejos, opiniones y ayuda, su amistad y cariño que me ha ayudado a concluir una meta más en mi vida.

A mis asesores que me apoyaron durante el proceso para concluir este trabajo de investigación.

A el Doctor Luis López Pérez por darme la oportunidad y confianza de realizar la maestría bajo su dirección, gracias por sus consejos, asesoría y su disposición en todo momento.

A la doctora Evangelina Esmeralda Quiñones Aguilar, por aceptar ser mi coasesor y recibirme en el CIATEJ. Por el apoyo financiero al trabajo, así como por su participación en el diseño del trabajo, por sus consejos, asesoría, revisiones y aportaciones.

Al Doctor Jhony Navat Vara Enríquez, gracia por su apoyo, ayuda y disposición durante la estancia en CIATEJ, por su tiempo invertido en las revisiones. Gracias por la confianza y paciencia.

Al Doctor Gabriel Enriquez por su apoyo, confianza y disponibilidad y por sus aportaciones al trabajo en especial en la parte estadística.

A la maestra Nuria Gomez Dorantes y al Doctor Philippe Lobit, Gracias por ser parte de mi cuerpo de asesores y por su tiempo invertido en las revisiones asi como sus obsevaciones, comentarios y sugerencias.

Agradezco a mis compañeros de maestría del IIAF Susana, Keyla, Gricelda, Alejandro, Jesus e Ivan por su amistad y compañerismos durante esta etapa de mi vida.

A mis compañeros de laboratorio del CIATEJ por su ayuda y consejos para sacar adelante la parte experimental de este trabajo Jesus Trinidad, Sergio Valerio, Jazmin Ibarra, July y Selene. Gracias por su ayuda para poder cumplir con este trabajo.

A mi compañero Alejandro Huerta por su ayuda, colaboración y aportaciones a este trabajo.

A mi gran amiga Susana Bautista Villegas gracias por la larga amistad que tenemos, gracias por escuchar, comprender y motivar con tu actitud positiva. Gracias por ese gran gran apoyo, ayuda y compañía que me brindaste a lo largo de esta etapa de mi vida.



El trabajo de esta tesis de investigación de maestría formó parte del proyecto intitulado:

## **“Empleo de Hongos Micorrízicos Arbusculares en la Agro-Biotecnología del empleo de plantas”**

Líderes del proyecto: **Dra. Evangelina Esmeralda Quiñones Aguilar**

**Dr. Gabriel Rincón Enríquez**

Igualmente, este trabajo contó con apoyo del proyecto 293362 (CONACyT) del laboratorio nacional PLANTECC.

Líderes del proyecto: **Dr. Gabriel Rincón Enríquez (CIATEJ)** y **Dr. Axel Tiessen Favier (CINVESTAV-IPN)**.

La presente investigación de maestría se desarrolló en el Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y el Laboratorio de Fitopatología de la Unidad de Biotecnología Vegetal del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del estado de Jalisco A. C. bajo la dirección del Dr. Luis López Pérez y la co-dirección de la Dra. Evangelina Esmeralda Quiñones Aguilar como la asesoría del Dr. Gabriel Rincón Enríquez, la Dra. Cecilia Guízar González, el Dr. Jhony Navat Enríquez Vara, el Dr. Philippe Lobit y la M.C. Nuria Gómez-Dorantes.

**De los resultados de esta tesis se han publicado y presentado en foros académicos los siguientes trabajos:**

**Trabajos presentados en foros académicos:**

***V Simposio Nacional de Herramientas de Biotecnología para una Agricultura Sustentable***

Maíz micorrizado efecto en el crecimiento vegetal y herbivoría de gusano cogollero.

Endofitismo de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en maíz.

***Seminario del Programa de Maestría en Producción Agropecuaria 2018***

Interacciones entre maíz y microorganismos endófitos (HMA, *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*) para el control del gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda* Smith)

## ÍNDICE

ÍNDICE.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
ÍNDICE DE CUADROS.....	IX
RESUMEN GENERAL.....	XI
ASBTRACT.....	XIII
<b>1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISIÓN DE LITERATURA.....</b>	<b>4</b>
2.1 El maíz.....	4
2.2 Plagas del maíz.....	4
2.3 El gusano cogollero <i>Spodoptera frugiperda</i> .....	5
2.4 Hongos endófitos.....	5
2.5 Hongos entomopatógenos.....	6
2.5.1 Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos.....	7
2.5.2 Hongos entomopatógenos como endófitos.....	8
2.6 Hongos micorrízicos arbusculares.....	8
2.6.1 Hongos micorrízicos arbusculares e insectos.....	9
2.1.2. Asociaciones de los HMA con otros microorganismos.....	10
2.7 Mecanismos de defensa de las plantas.....	11
2.7.1. Resistencia sistémica inducida (RSI).....	12
2.7.2 Resistencia sistémica adquirida (RSA).....	13
<b>3. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>14</b>

<b>4. OBJETIVOS</b> .....	15
4.1 Objetivo general.....	15
4.2 Objetivos específicos.....	15
<b>5. HIPÓTESIS</b> .....	16
<b>6. RESULTADOS</b> .....	17
6.1 Capítulo 1: Efecto de los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en el crecimiento de maíces criollos y en el desarrollo del gusano cogollero.....	19
6.1.1 Resumen.....	17
6.1.2 Abstract.....	17
6.1.3 Introducción .....	18
6.1.4 Materiales y métodos .....	20
6.1.5 Resultados y discusión .....	28
6.1.6 Conclusión .....	35
6.1.7 Bibliografía .....	36
6.2 Capítulo 2: Evaluación de la patogenicidad de <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Metarhizium anisopliae</i> sobre larvas de gusano cogollero.....	39
6.2.1 Resumen.....	39
6.2.2 Abstract.....	40
6.2.3 Introducción.....	40
6.2.4 Materiales y métodos.....	41
6.2.5 Resultados y discusión.....	47
6.2.6 Conclusión.....	50

6.2.7 Bibliografía.....	51
6.3 Capítulo 3: Evaluación de la capacidad endófito de <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Metarhizium anisopliae</i> sobre plantas de maíz híbrido.....	53
6.3.1 Resumen.....	53
6.3.2 Abstract.....	53
6.3.3 Introducción.....	54
6.3.4 Materiales y métodos.....	55
6.3.5 Resultados y discusión.....	61
6.3.6 Conclusión.....	68
6.3.7 Bibliografía.....	69
6.4 Capítulo 4: Interacciones entre maíz y microorganismos endófitos como promotores de crecimiento vegetativo y bioprotección contra gusano cogollero.....	71
6.4.1 Resumen.....	71
6.4.2 Abstract.....	72
6.4.3 Introducción.....	72
6.4.4 Materiales y métodos.....	74
6.4.5 Resultados y discusión.....	83
6.4.6 Conclusiones.....	107
6.4.7 Bibliografía.....	108
<b>7. DISCUSIÓN GENERAL.....</b>	<b>111</b>
<b>8. CONCLUSIONES GENERALES.....</b>	<b>114</b>

<b>9. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>115</b>
<b>10. BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA.....</b>	<b>117</b>
<b>11. ANEXOS.....</b>	<b>129</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> <i>Spodoptera frugiperda</i> en estado adulto en etapa de reproducción y alimentado con una solución de agua y miel al 15%.....	22
<b>Figura 2.</b> Plantas de maíz criollo después del trasplante e inoculación con HMA .....	24
<b>Figura 3.</b> Infestación con larvas de <i>S. frugiperda</i> de tercer instar en las hojas de plantas de maíz criollo a los 45 días posteriores a la inoculación con hongos micorrízicos arbusculares.....	25
<b>Figura 4.</b> Colonización micorrízica de micelio y vesículas en raíces de maíz criollo a los 52 días después de la inoculación.....	30
<b>Figura 5.</b> Colonización micorrízica de <i>F. mosseae</i> (Fm) y <i>R. intraradices</i> (Ri) en maíz criollo a los 30 días posteriores a la inoculación y previos a la infestación de las larvas (L) de <i>S. frugiperda</i> . Prueba de Tukey 95% (P<0.05). Letras diferentes sobre las barras indican diferencia significativa. Líneas sobre barras indican error estándar, Prueba de Tukey al 95%.....	30
<b>Figura 6.</b> Colonización micorrízica 12 días después de la infestación de larvas (L) de <i>S. frugiperda</i> en plantas de maíz criollo no inoculadas con hongos micorrízicos (sin HMA) e inoculados con <i>F. mosseae</i> (Fm) y <i>R. intraradices</i> (Ri). Prueba de tukey 95% (P<0.05). Letras diferentes sobre las barras indican diferencia significativa. Líneas sobre barras indican error estándar, Prueba de Tukey al 95%.....	31
<b>Figura 7.</b> Peso promedio de larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> después de 12 días de alimentación directa en plantas de maíz criollo inoculadas y no inoculadas con HMA. HMA (Hongo micorrízico arbuscular), RI ( <i>Rizophagus intraradices</i> ), FM ( <i>Funneliformis mosseae</i> ), L (Larva). Letras sobre las barras indican diferencia significativa (P<0.05), Prueba de Tukey al 95%.....	32
<b>Figura 8.</b> Crecimiento de <i>Beauveria bassiana</i> (A) y <i>Metarhizium anisopliae</i> (B) después de 20 días de incubación.....	44
<b>Figura. 9.</b> Larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> de segundo instar inoculadas con hongos entomopatógenos.....	46

<b>Figura 10:</b> Progreso de mortalidad de larvas de gusano cogollero ( <i>Spodoptera frugiperda</i> ), después de la inoculación con <i>Beauveria bassiana</i> (BbQ, ACP, BbP3, SBb, Bb maíz, y BbP2) y <i>Metarhizium anisopliae</i> (PIV, Met Maíz y Mr).....	47
<b>Figura 11:</b> Porcentaje de mortalidad de larvas gusano cogollero a los seis días después de la inoculación con hongos entomopatógenos. Cepas de <i>Beauveria bassiana</i> (ACPBb Maíz, Bb P2, BbQ, Bb p3 y SBb), cepas de <i>Metarhizium anisopliae</i> (Met Maíz, PIV y MR). Letras diferentes sobre barras indican diferencia significativa entre medias (P<0.05). línea sobre barras indican error estándar. Línea sobre las barras indican el error estándar, Prueba de Tukey al 95%.....	48
<b>Figura 12.</b> Siembra de tejido vegetal Hoja (a), Tallo (b) y Raíz(c) de maíz híbrido en medio de cultivo PDA con antibióticos. Siembra realizada a los 15 días posteriores a la inoculación de los hongos entomopatógenos ( <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Metarhizium anisopliae</i> ).....	60
<b>Figura 13.</b> Porcentaje de colonización endófitas de <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Metarhizium anisopliae</i> en hoja de maíz híbrido a los 15 días posteriores a la inoculación al follaje y raíz aplicando 5 y 10 mL respectivamente de suspensión de $1 \times 10^8$ conidios/mL. Testigo (T), cepas de <i>Beauveria bassiana</i> (ACP, Bb Maíz, BbQ, Bb p3 y SBb), cepas de <i>Metarhizium anisopliae</i> (Met Maíz, PIV y MR). Letras diferentes sobre barras indican diferencia significativa entre medias (P<0.05), Prueba de Tukey al 95%.....	62
<b>Figura 14</b> Porcentaje de colonización endófitas de <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Metarhizium anisopliae</i> en tallo de maíz híbrido a los 15 días posteriores a la inoculación foliar y en raíz aplicando 5 y 10 mL respectivamente de suspensión de $1 \times 10^8$ conidios/mL. Testigo (T), cepas de <i>Beauveria bassiana</i> (ACP, Bb Maíz, BbQ, Bb p3 y SBb), cepas de <i>Metarhizium anisopliae</i> (Met Maíz, PIV y MR). Letras diferentes sobre barras indican diferencia significativa entre medias (P<0.05), Prueba de Tukey al 95%.....	63

<b>Figura 15</b> Colonización endófitas de <i>B. bassiana</i> en hoja (A) y <i>M. Anisopliae</i> en tallo (B) de maíz híbrido obtenida a los 15 días posteriores a la inoculación.....	64
<b>Figura 16.</b> Porcentaje de colonización endófitas de <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Metarhizium anisopliae</i> en tallo de maíz híbrido a los 15 días posteriores a la inoculación foliar y en raíz aplicando 5 y 10 mL respectivamente de suspensión de $1 \times 10^8$ conidios/mL. Testigo (T), <i>Beauveria bassiana</i> (ACP, Bb Maíz, BbQ, Bb p3 y SBb), cepas de <i>Metarhizium anisopliae</i> (Met Maíz, PIV y MR). Letras diferentes sobre barras indican diferencia significativa entre medias ( $P < 0.05$ ), Prueba de Tukey al 95%.....	65
<b>Figura 17</b> Porcentaje de colonización endófitas de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> en hoja en maíz híbrido a los 15 días posteriores a la inoculación foliar y en raíz aplicando 5 y 10 mL respectivamente de suspensión de $1 \times 10^8$ conidios/mL. Testigo (T), cepas de <i>Beauveria bassiana</i> (ACP, Bb Maíz, Bb P2, BbQ, Bb p3 y SBb), cepas de <i>Metarhizium anisopliae</i> (Met Maíz, PIV y MR). Letras diferentes sobre barras indican diferencia significativa entre medias ( $P < 0.05$ ), Prueba de Tukey al 95%.....	66
<b>Figura 18</b> (A) Infestación de <i>S. frugiperda</i> en plantas de maíz de 60 días de crecimiento vegetativo inoculadas con Hongos micorrízicos arbusculares y hongos entomopatógenos y (B) Plantas de maíz infestadas con larvas de <i>S. frugiperda</i> y protegidas con una cobertura de Agribon para evitar la migración de las larvas.....	79
<b>Figura 19.</b> Dinámica del crecimiento vegetativo expresado en cm de maíz criollo (C) e híbrido (H) inoculado con hongos micorrízicos arbusculares de las especies de <i>R. intraradices</i> (Ri) y <i>F. mosseae</i> (FM). Con intervalos de medición de 15 y 10 días después del trasplante (DDT), Prueba de Tukey al 95%.....	87
<b>Figura 20</b> Dinámica del crecimiento vegetativo expresado en cm de maíz criollo (C) inoculado con hongos micorrízicos arbusculares de las especies de <i>R. intraradices</i> (Ri), <i>F. mosseae</i> (FM), <i>B. bassiana</i> (Bb) y <i>M. anisopliae</i> (Ma).	

Con intervalos de medición de 15 y 10 días después del trasplante (DDT), Prueba de Tukey al 95%.....	89
<b>Figura 21</b> Dinámica de crecimiento vegetativo (mm) de maíz criollo (C) inoculado con hongos micorrízicos arbusculares de las especies de <i>R. intraradices</i> (Ri), <i>F. mosseae</i> (FM), <i>B. bassiana</i> (Bb) y <i>M. anisopliae</i> (Ma). Con intervalos de medición de 15 y 10 días después del trasplante (DDT), Prueba de Tukey al 95%.....	91
<b>Figura 22.</b> Colonización micorrízica a los 60 días después de la inoculación de <i>F. mosseae</i> (Fm) y <i>R. intraradices</i> (Ri) antes de la infestación e herbivoría de <i>S. frugiperda</i> en maíz criollo (C) e híbrido (H). Letras superiores diferentes indican diferencias estadísticas. Letras diferentes sobre las barras indican diferencia significativa entre medias, Prueba de Tukey al 95%.....	96
<b>Figura 23.</b> Colonización micorrízica a los 70 días después del trasplante (DDT) de <i>F. mosseae</i> (Fm) y <i>R. intraradices</i> (Ri) y la infestación de larvas de <i>S. frugiperda</i> en maíz criollo (C) e híbrido (H). Letras diferentes sobre las barras indican diferencia significativa entre medias ( $P < 0.05$ ), Prueba de Tukey al 95%.....	97
<b>Figura 24.</b> colonización micorrízica a los 70 días después de la inoculación de <i>F. mosseae</i> (Fm) y <i>R. intraradices</i> (Ri) después de infestación e herbivoría de <i>S. frugiperda</i> en maíz criollo (C) e híbrido (H) inoculados con <i>Beauveria bassiana</i> (Bb) y <i>Metarhizium anisopliae</i> (Ma). Letras diferentes indican diferencias estadísticas entre medias, Prueba de Tukey al 95% .....	99
<b>Figura 25.</b> Colonización de las diferentes estructuras de la micorriza en maíz a los 70 días después de la inoculación micelio (a), Vesículas (b), arbusculos (c) y esporas (c).....	100
<b>Figura 26.</b> Número de esporas en 10 gramos de suelo de <i>R. intraradices</i> (Ri) y <i>F. mosseae</i> (Fm) en maíz híbrido (H) y criollo (c) a los 70 días después de la inoculación. Letras superiores diferentes indican diferencias estadísticas entre medias ( $P < 0.05$ ), Prueba de Tukey al 95% .....	104

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Tratamientos evaluados en la herbivoría de <i>S. frugiperda</i> en maíz inoculado con HMA.....	21
<b>Cuadro 2.</b> Variables evaluadas experimento de herbivoría.....	26
<b>Cuadro 3.</b> Detalles del origen de los aislamientos utilizados en las pruebas de patogenicidad de <i>Spodoptera frugiperda</i> .....	42
<b>Cuadro 4.</b> Cuadro de tratamientos de hongos entomopatógenos.....	43
<b>Cuadro 5.</b> Tratamientos para los dos ensayos de endofitismo de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> .....	56
<b>Cuadro 6.</b> Factores niveles y tratamientos de estudio para experimento de herbivoría de <i>S frugiperda</i> .....	75
<b>Cuadro 7.</b> Variables evaluadas del experimento.....	79
<b>Cuadro 8.</b> Promedio obtenido de acuerdo al análisis multifactorial para los cuatro factores de estudio.....	85
<b>Cuadro 9.</b> Medias de altura de planta, diámetro de tallo, peso fresco tallo, peso fresco raíz, peso seco tallo, peso seco raíz y área foliar de plantas de maíz criollo e híbrido inoculadas con hongos micorrízicos arbusculares.....	84
<b>Cuadro 10.</b> Medias de altura de planta, diámetro de tallo, peso fresco tallo, peso fresco raíz, peso seco tallo, peso seco raíz y área foliar de plantas de maíz criollas inoculadas con Hongos micorrízicos y hongos entomopatógenos endófitos.....	88
<b>Cuadro 11.</b> Medias de altura de planta, diámetro de tallo, peso fresco tallo, peso fresco raíz, peso seco tallo, peso seco raíz y área foliar de plantas de maíz híbrido inoculadas con <i>R. intraradices</i> , <i>F. mosseae</i> , <i>B. bassiana</i> y/o <i>M. anisopliae</i> y no inoculadas.....	90
<b>Cuadro 12.</b> Estructuras de las micorrizas de <i>F. mosseae</i> y <i>R. intraradices</i> en plantas de maíz criollo e híbrido a los 70 días posteriores a la inoculación de los HMA y a los 10 días se someterse a herbivoría por larvas de <i>S. frugiperda</i> .....	98

<b>Cuadro 13.</b> Estructuras de la micorriza de <i>F. mosseae</i> (Fm) y <i>R. intraradices</i> (Ri) en plantas de maíz criollo (C) e híbrido (H) inoculadas con hongos entomopatógenos endófitos <i>Beauveria</i> (Bb) y <i>Metarhizium</i> (Ma) a los 70 días posteriores la inoculación de los HMA y a los 10 días se someterse a herbivoría por larvas (L) de <i>S. frugiperda</i> .....	101
<b>Cuadro 14.</b> Desarrollo de <i>S. frugiperda</i> después de someterse a herbivoría en plantas de maíz criollo e híbrido inoculados con Hongos micorrízicos arbusculares y hongos entomopatógenos endófitos.....	105

## **Simbiosis micorrizica arbuscular y hongos entomopat6genos end6fitos en ma3z como bioprotectores contra el gusano cogollero**

**Cuaúhtemoc Hernández Hernández**

### **RESUMEN GENERAL**

EL gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*) es una plaga que causas graves daños a el cultivo del ma3z. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar hongos entomopatogenos endofitos (HEE), así como la interacción de estos con hongos micorr3zicos arbusculares (HMA) en el crecimiento de dos genotipos de ma3z y la bioprotección contra la herbivoría de *Spodoptera frugiperda*. Para esto primero se estableció un experimento en condiciones de invernadero con el objetivo de evaluar el efecto de dos cepas de HMA; *Funneliformis mosseae*, *Rhizophagus intraradices* y sin HMA en el crecimiento de ma3z variedad criolla y el desarrollo de *S. frugiperda*. Plántulas de ma3z criollo se trasplantaron y se inocularon con HMA 80 esporas, 40 días después se infestaron con larvas de *S. frugiperda*, 12 días de la infestación se midieron variables de crecimientos y biocontrol. En los experiementos continuos los HEE fueron evaluados en patogenicidad sobre *S. frugiperda* y en su porcentaje de colonización end6fita en ma3z. Para estas pruebas se trabajó con nueve cepas, seis cepas de *Beauveria bassiana* y tres cepas de *Metarhizium anisopliae*, evaluando las mismas cepas evaluadas en la patogenicidad. Para el endofitismos la inoculación se realizo en plantas de 15 días de crecidas en la parte aérea de la planta con una suspensión de conidios de  $1 \times 10^8$  conidios/ mL, el muestreo final se realizo 15 días después, la presencia del end6fito se confirmo por la siembra de tejido vegetal (hoja, tallo y raíz) en medio de cultivo PDA. Mientras que, para la patogenicidad, las larvas en segundo instar de *S. frugiperda* fueron inoculadas por inmersión con una suspensión de conidios de  $1 \times 10^7$  conidios/ mL. Finalmente se realizó un experimento en invernadero donde se evaluó la interacción de *Rhizophagus intraradices*, *Funneliformis mosseae* y sin HMA, los HEE; Bb ma3z, Met ma3z y sin HEE en el biocontrol de *S. frugiperda* y el crecimiento vegetativo en ma3ces de variedades; criollo e híbridos. Las plantas fueron inoculadas con 150 esporas de HMA al momento del trasplante, 30 días después se inocularon al follaje los HEE en suspensión a una concentración de  $1 \times 10^8$  conidios mL<sup>-1</sup>, y 30 días

después se realizó la infestación con 3 larvas de *S. frugiperda* en tercer instar por planta, dejándolas 8 días en las plantas. A los 68 días posteriores al trasplante se finalizó el experimento, En el primer experimento se observó que las especies de HMA en simbiosis con el maíz criollo pueden tener efectos diferentes en el desarrollo de las larvas, pero no influyen el crecimiento vegetativo. En las pruebas de patogenicidad *M. anisopliae* y *B. bassiana* mostraron ser patogénicos sobre *S. frugiperda* a una concentración de  $1 \times 10^7$  conidios/mL, llegando a causar una mortalidad entre el 42 y el 100%, la cepa Bbp2 de *B. bassiana* fue la más patogénica al causar mortalidad del 100% al sexto día después de la inoculación. Mientras que en las pruebas de endofitismo sobre el maíz híbrido, a los 15 días de la inoculación todas las cepas colonizaron con porcentajes menores al 27%, las cepas que más colonizaron fueron: Bb maíz y Met maíz. Finalmente, en el último experimento a los 68 días después de inoculación de HMA se encontró colonización del 80%, sin embargo, no influyó en el desarrollo de *S. frugiperda* ni en el crecimiento vegetativo de los maíces. Por su parte los HEE no establecieron simbiosis con los maíces por lo que sus efectos en plantas y larvas fueron nulos. Los resultados obtenidos abren la posibilidad de seguir trabajar con estos microorganismos en nuevos proyectos que contribuyan a un biocontrol más eficiente de *S. frugiperda* en estado larval.

**Palabras clave: hongos micorrízicos arbusculares, hongos endofitos, maíces, *Spodoptera frugiperda*.**

Dr. Luis López Pérez  
Dr. Evangelina Quiñones Aguilar  
Ing. Cuauhtémoc Hernández Hernández

lexquilax@yahoo.com.mx  
equinones@ciatej.mx  
cuauhtemoc5-@live.com

## **Mycorrhizal arbuscular symbiosis and entomopathogenic endophytic fungi in maize as bioprotectors against the cogollero worm.**

**Cuauhtémoc Hernández Hernández**

### **ABSTRACT**

The cogollero worm (*Spodoptera frugiperda*) is a pest that causes serious damage to maize crops. The objective of this work was to evaluate endophyte entomopathogenic fungi (EEF), as well as their association with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in growth of two maize genotypes and the bioprotection in the herbivory of *Spodoptera frugiperda*. For this purpose, a greenhouse experiment was first established to evaluate the effect of two strains of AMF; *Funneliformis mosseae*, *Rhizophagus intraradices* and without AMF on the growth of criollo variety maize and the development of *S. frugiperda*. Criollo maize seedlings were transplanted and inoculated with HMA 80 spores, 40 days later they were infested with *S. frugiperda* larvae, 12 days of infestation growth and biocontrol variables were measured. In the continuous experiments the EEF were evaluated in pathogenicity on *S. frugiperda* and in its percentage of endophyte colonization in corn. For these tests we worked with nine strains, six strains of *B. bassiana* and three strains of *M. anisopliae*, evaluating the same strains evaluated in pathogenicity. For endofitism, inoculation was performed on 15-day-old plants in the aerial part of the plant with a conidia suspension of  $1 \times 10^8$  conidia/mL, the final sampling was performed 15 days later, the presence of the endophyte was confirmed by sowing plant tissue (leaf, stem and root) in PDA culture medium. Whereas, for pathogenicity, the second instar larvae of *S. frugiperda* were inoculated by immersion with a conidium suspension of  $1 \times 10^7$  conidia/mL. The larvae of *S. frugiperda* were inoculated by immersion with a conidia suspension of  $1 \times 10^7$  conidia/mL. Finally, a greenhouse experiment was carried out to evaluate the interaction of *Rhizophagus intraradices*, *Funneliformis mosseae* and without HMA, the EEF; Bb corn, Met corn and without EEF in the biocontrol of *S. frugiperda* and vegetative growth in corn varieties; Creole and hybrids. The plants were inoculated with 150 HMA spores at the time of transplant, 30 days later the suspended EEF were inoculated to the foliage at a

concentration of  $1 \times 10^8$  conidia mL<sup>-1</sup>, and 30 days later the infestation was carried out with 3 larvae of *S. frugiperda* in the third instar per plant, leaving them 8 days in the plants. In the first experiment it was observed that AMF species in symbiosis with native corn can have different effects on the development of larvae, but they do not influence vegetative growth. In the pathogenicity tests *M. anisopliae* and *B. bassiana* showed to be pathogenic on *S. frugiperda* at a concentration of  $1 \times 10^7$  conidia/mL, causing a mortality between 42 and 100%, *B. bassiana* strain Bbp2 was the most pathogenic, causing 100% mortality on the sixth day after inoculation. While in the endofitism tests on hybrid corn, 15 days after inoculation all strains colonized with percentages less than 27%, the strains that colonized the most were: Bb corn and Met corn. Finally, in the last experiment 68 days after inoculation of HMA, 80% colonization was found, however, it did not influence the development of *S. frugiperda* nor the vegetative growth of corn. On the other hand, the EEF did not establish symbiosis with the corn so their effects on plants and larvae were null. The results obtained open the possibility to continue working with these microorganisms in new projects that contribute to a more efficient biocontrol of *S. frugiperda* in larval stage.

Dr. Luis López Pérez  
Dr. Evangelina Quiñones Aguilar  
Ing. Cuauhtémoc Hernández Hernández

lexquilax@yahoo.com.mx  
equinones@ciatej.mx  
cuauhtemoc5\_@live.com

## 1. INTRODUCCIÓN GENERAL.

El maíz es una planta gramínea originaria de México. Es el cereal de mayor importancia en el mundo por encima del arroz y el trigo (CATIE, 2008). Por lo que la protección del cultivo contra plagas y enfermedades es una actividad constante para asegurar su productividad. En los últimos años, la incidencia de plagas se ha incrementado considerablemente en el cultivo de maíz disminuyendo su rendimiento (Méndez y Gonzales, 2014). El gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*) es una de las principales plagas. Llega a provocar pérdidas entre el 13% y 60% del rendimiento de la producción, cuando no se realiza un control adecuado (García y Tarango, 2009). Los productos químicos son el principal método de control, son eficientes y baratos, pero con efectos negativos al ambiente, ya que reducen las poblaciones de organismos benéficos, y sus residuos químicos persisten en los alimentos, el aire, el suelo y el agua (Chango, 2012). El control biológico es un método más amigable con el medio ambiente, se basa en el uso de enemigos naturales y microorganismos benéficos que actúan contra diversos organismos fitopatógenos incluyendo a los insectos.

Los hongos micorrízicos arbusculares son microorganismos benéficos para las plantas, su principal función es aportar nutrientes a la planta, también contribuyen al control de enfermedades causadas por hongos y bacterias, proporcionan resistencia a su anfitrión en situaciones de estrés. En los últimos años se han sugerido que algunas especies de hongos micorrízicos pueden participar en el control de plagas, en especial en las especies herbívoras, alterando la composición química de la planta. Por otra parte, están los hongos entomopatógenos; *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* usados principalmente para el control de plagas (Vega, 2018). Estos hongos infectan diferentes ordenes insectiles como el coleóptera, ortóptera, lepidóptera entre otros, la infección se da por contacto entre las esporas y el insecto, después se da la colonización y finalmente el hongo invade el interior del insecto causándole la muerte. La naturaleza de estos dos géneros de hongos entomopatógenos es parasitar insectos, sin embargo, en los últimos años han sido objeto de estudio como endófitos en diferentes plantas (Parsa *et al.*, 2013). La colonización endófito de estos dos géneros trae consigo beneficios positivos

similares a los de las micorrizas. La utilización conjunta de estos dos microorganismos podría tener un efecto positivo en la bio-protección de la planta contra de la herbivoría del gusano cogollero. Aunque no hay trabajos donde se evalúen en asociación por separado han resultado tener efectos benéficos y no benéficos en el desarrollo de los insectos, principalmente las micorrizas parecen tener una interacción indirecta con los insectos herbívoros.

Por lo anterior, en esta investigación se evaluó el efecto individual e interacciones de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y hongos micorrízicos arbusculares sobre larvas del gusano cogollero en el cultivo de maíz. Para realizar los estudios se utilizaron las especies *Rizophagus intraradices* y *Funneliformis mosseae* de hongos micorrízicos las cuales se evaluaron en dos variedades de maíz una criolla y una híbrida. Las especies de hongos endófitos utilizadas fueron los entomopatógenos: *B. bassiana* y *M. anisopliae*.

En el primer experimento se evaluó el efecto de la inoculación de los HMA en maíz criollo como promotores de crecimiento vegetativo y su efecto en la herbivoría de *Spodoptera frugiperda*. Se encontró que la colonización micorrízica tuvo un efecto en la herbivoría del gusano cogollero, éste se afectó y benefició cuando se alimentó de las plantas micorrizadas, los efectos variaron de acuerdo con la especie de HMA con la cual se inoculó la planta. Los hongos entomopatógenos fueron evaluados en dos fases. La primera evaluación fue en su patogenicidad en *S. frugiperda*. Se evaluaron nueve cepas de los géneros de *Beauveria* y *Metarhizium*. En los resultados de mortalidad sobre las larvas, algunas cepas causaron una mortalidad superior al 50%. La segunda evaluación fue en el endofitismo de las mismas cepas en maíz híbrido. Las plantas fueron inoculadas artificialmente en el follaje y raíz con una suspensión de conidios de los hongos entomopatógenos, las pruebas de endofitismo se realizaron a los 15 días después de la inoculación. Para verificar la presencia de los entomopatógenos como endófitos de las plantas inoculadas se cultivó tejido vegetal en medio de cultivo. La presencia de los endófitos se verificó a los 20 días. Las nueve cepas evaluadas mostraron ser endófitas para el maíz, de

las cuales se seleccionó una especie de cada género, aquellas que presentaron la colonización más alta con el objeto de evaluar su endofitismo en otra variedad vegetal asociada con hongos micorrízicos arbusculares.

En el último experimento se evaluó la simbiosis de *B. bassiana*, *M. anisopliae*. y hongos micorrízicos arbusculares en dos genotipos de maíz como bio-protectores de la herbivoría de *Spodoptera frugiperda*. Se diseñó un experimento multifactorial en el cual se utilizaron dos variedades de maíz. Dos especies de hongos entomopatógenos, dos especies de hongos micorrízicos y larvas de *Spodoptera frugiperda*. Los parámetros evaluados fueron la promoción de crecimiento de las plantas, la colonización de los microorganismos y el efecto de estos en el desarrollo de las larvas de *S. frugiperda*. Los resultados mostraron que los hongos entomopatógenos no se establecieron como endófitos en ninguna de las dos variedades de maíz, por lo que su efecto como promotores de crecimiento y su impacto en el desarrollo de las larvas no se pudo comprobar. Los hongos micorrízicos si establecieron la simbiosis con las dos variedades de maíz con más del 70% de colonización, aunque sus efectos como promotores de crecimiento, así como en el desarrollo de los insectos fueron nulos esto a los 72 días posteriores a la inoculación. Se comprobó que los hongos micorrízicos tiene afinidad para colonizar las plantas de maíz en porcentajes altos, pero no se encontró efecto promotor en el crecimiento de las especies evaluadas, no se encontró efecto directo o indirecto sobre el desarrollo de larvas de *S. frugiperda*. Se observó que los hongos entomopatógenos solo son capaces de establecer endofitismo en condiciones controladas.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. El maíz

El maíz pertenece al género *Zea* de la familia Gramineae, es un cultivo de gran importancia económica. Es usado principalmente como alimento en humanos y animales, en todo el mundo (Campos, 1966; Casmuz *et al.*, 2010). El maíz posee diversos usos y es el único cereal que se utiliza como alimento en las distintas etapas de desarrollo del cultivo. Las mazorcas tiernas de maíz dulce, son un manjar que se consume de diferentes formas. Las mazorcas verdes de maíz blanco son preparadas asadas, hervidas, o consumidas en el estado de pasta blanda. El grano se emplea para elaborar diversos productos comestibles (Rodríguez, 2013). En México es el cultivo que más se produce, en el año 2017 se registró una producción de 27, 67624, 480.90 toneladas de maíz de grano en una superficie sembrada de 7, 540,942.12 hectáreas (SIAP, 2019).

### 2.2 Plagas del maíz

La producción de maíz es afectada por varios factores abióticos y bióticos que provocan pérdidas en el rendimiento del grano. Uno de los factores bióticos son las plagas que se presentan y atacan a las plantas en cada ciclo de producción (Caballero, 2009). A pesar de que el maíz es un cultivo que es tolerable para algunos artrópodos, en especial insectos que son considerados plagas primarias y secundarias, que disminuyen la producción o calidad, dependiendo de la incidencia (Méndez y Gonzales, 2014). Entre las especies más perjudiciales se encuentran el gusano elotero (*Helicoverpa zea*), mosca de los estigmas (*Euxesta stigmatia*) y el gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* Trips, *Caliothrips phaseoli*, Pulgón del cogollo, *Rhopalosiphum maidis*, Chinchas apestosas, *Nezara viridula* (García *et al.*, 2012). De todas las plagas que se destacan en el cultivo del maíz la de mayor importancia es el gusano cogollero. Especie que cada año produce grandes pérdidas en los cultivos agrícolas (Méndez y Gonzales, 2014).

### **2.3 El gusano cogollero *Spodoptera frugiperda***

Este gusano pertenece al orden Lepidoptera, corresponde al estado larval de una palomilla. Se le considera una de las principales plagas en las zonas de producción de maíz (Zenner *et al.*, 2007; Casmuz *et al.*, 2010). Las larvas en ataques tempranos causan la muerte de plántulas o retraso en el desarrollo de la planta. La incidencia de la plaga depende de la época de producción, variedad y el ecosistema (Caballero, 2009; García y Tarango, 2009). Las larvas tienen seis estadios, en los dos primeros estadios se alimentan de la epidermis de las hojas, a partir del tercero se alimentan de toda la lámina foliar haciendo perforaciones irregulares para posteriormente trasladarse al cogollo.

En los últimos estadios, las larvas consumen cerca del 80% de su biomasa total. También a partir del tercer instar tienen tendencias canibalísticas por lo que solo hay una larva por cogollo (Casmuz *et al.*, 2010). Después de seis estadios larvales, las larvas caen al suelo para iniciar su etapa de pupa y llegar a la etapa adulta. Los adultos son palomillas de color gris oscuro que miden de 20 a 25 mm y tienen una mancha blanca en el extremo de las alas traseras. Las hembras ponen de 100 a 150 huevecillos en forma agregada cubiertos de pelusa, normalmente son depositados en el envés de las hojas. Las larvas emergen de los huevos casi al mismo tiempo, su tasa de mortalidad es en extremo elevada debido a factores como lluvia, depredadores y parásitos (Ortega, 1997).

### **2.4. Hongos endófitos**

El término endófito hace referencia a aquellos microorganismos que se encuentran dentro de una planta de acuerdo a su etimología griega endo = dentro y phyton = planta. Anteriormente se les consideraba endófito a todos aquellos organismos que tuvieran la capacidad de colonizar los tejidos internos de la planta en sus diferentes partes raíz, hojas y tallos. Los endófitos se caracterizan por su capacidad de no causar daño alguno visible, por tanto, la planta hospedante no muestra síntomas de enfermedad. Sin embargo, hay endófitos en donde la planta bajo condiciones de estrés considera al endófito como un agente patógeno. Este comportamiento de los

endófitos se conoce como el endófito continuo (Feller y Alencar, 2013). Existen endófitos de naturaleza benéfica para una especie vegetal que resultan perjudiciales para otras especies y viceversa (Giménez *et al.*, 2014). Por ejemplo, Katan (1971) reportó la presencia de endófitos como *Fusarium oxisporum* y *Fusarium lycopersici* en plantas arvenses, y en planas de jitomate se comportan como fitopatógenos. Por otra parte, Baron y Hilton (1996), reportaron a *Fusarium moniliforme* como endófito en maíz.

Los endófitos tienen la capacidad de ayudar a las plantas en resistir a factores bióticos y abióticos (Chávez, 2007). La producción de exoenzimas y/o metabolitos secundarios por el endófito activan los mecanismos de defensa de la planta. La activación del mecanismo de defensa conduce a la producción de moléculas de naturaleza bioquímica y al reforzamiento de la pared celular, confiriendo mayor resistencia y protección en contra enemigos naturales. La planta proporciona al endófito protección y nutrientes como resultado de la asociación (Sánchez 2013; Giménez *et al.*, 2014; Wężowicz *et al.*, 2017).

## **2.5. Hongos entomopatógenos**

En años recientes, el uso de los hongos entomopatógenos como agentes de bio-control ha venido cobrando gran importancia (Ruiz *et al.*, 2009). Existen 2000 especies de microorganismos entomopatógenos, 750 pertenecen al reino fungi (Téllez *et al.*, 2009; Garza *et al.*, 2011). Dentro del grupo de los hongos entomopatógenos los géneros de *Paecilomyces*, *Lecanicillium*, *Aschersonia*, *Beauveria* y *Metarhizium* son los más utilizados en experimentos de laboratorio y de campo con resultados satisfactorios (Ruiz *et al.*, 2009). Los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* tienen la capacidad de infectar a varias especies de insectos de las órdenes Ortóptera, Lepidóptera y Coleóptera (Garza *et al.*, 2011). En respuesta los insectos han desarrollado diferentes sistemas de defensa. Barreras físicas como grosor de la cutícula, defensas celulares u hormonales que tienen efecto en la esclerotización, la producción de sustancias antifúngicas y la síntesis de nutrientes (Téllez *et al.*, 2009).

En respuesta los hongos entomopatógenos han desarrollado diferentes estrategias defensivas e inmunosupresoras para lograr evadir los sistemas de defensa de los insectos. Como la producción de toxinas y los cambios estructurales en su pared celular adquiriendo mayor virulencia y resistencia (Ortiz y Keyhanit, 2013).

### **2.5.1. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos**

El proceso comienza con la adhesión de la espora a la cutícula mediante el reconocimiento de receptores específicos de naturaleza glucoproteica en el insecto. La espora pre-germinada se pone en contacto con la epicutícula, en donde germina por completo formando un apresorio. Con el apresorio comienza la fase de penetración (Barrelli *et al.*, 2015).

La penetración se realiza por combinación de mecanismos físicos y químicos. El mecanismo físico consiste en la presión ejercida por una estructura fúngica llamada haustorio, deformando la cutícula, pasando por áreas esclerosadas y membranosas de la cutícula. El mecanismo químico consiste en la acción enzimática principalmente de actividad hidrolítica como proteasas, quitinasas y lipasas (Barrelli *et al.*, 2015), además de ácidos orgánicos como el ácido oxálico. La acción enzimática degrada el tejido facilitando la entrada del hongo hasta llegar al hemocele. Una vez dentro del insecto, el hongo se ramifica formando diferentes estructuras en las diferentes cavidades del huésped. Durante la colonización producen toxinas que ayudan a evadir el sistema inmunológico del insecto, lo que facilita la invasión del hongo a todos los tejidos. Durante el proceso de colonización el insecto infectado experimenta pérdida de sensibilidad, falta de coordinación, letargo, inapetencia, melanización y parálisis. Los entomopatógenos adquieren los nutrientes del hemocele hasta agotarse provocando la muerte del insecto (Malpartida *et al.*, 2013). Muerto el insecto en estado momificado las hifas del hongo emergen al exterior, comienza a producir esporas y comienza de nuevo el ciclo (Barrelli *et al.*, 2015).

### **2.5.2. Hongos entomopatógenos como endófitos**

En los últimos años se ha descubierto que todas las plantas hasta el momento estudiadas presentan colonización de diferentes microorganismos endófitos (Dibut *et al.*, 2004). Entre estos microorganismos se han detectado algunos hongos entomopatógenos como endófitos como *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. El endofitismo de los hongos entomopatógenos se ha documentado en los últimos años. *Beauveria bassiana* ha logrado establecer relación endófito en maíz y al mismo tiempo aumenta la tasa de mortalidad de larvas de barrenador europeo (Stefan *et al.*, 2015). Clifton *et al.*, (2018) comprobaron el endofitismo de *Beauveria* y *Metarhizium* en soja en tallo y hojas. Estos dos géneros se han documentado como endófitos en diferentes especies vegetales como café, chile, jitomate, uva, haba, etc. (Basmisile *et al.*, 2018). El tejido vegetal colonizado depende del tipo de hongo. El género *Beauveria* tiene preferencia por la colonización en el follaje, mientras que *Metarhizium* se asocia más en el sistema radicular (Basmisile *et al.*, 2018; Clifton *et al.*, 2018).

### **2.6. Hongos micorrízicos arbusculares**

Los hongos micorrízicos arbusculares pertenecen al Phylum Glomeromycota y se caracterizan por establecer una relación simbiótica mutualista con el 90 % de las familias de plantas vasculares, y con el 85% de las especies de interés agronómico (Berruti *et al.*, 2016). La micorriza puede generarse a partir de propágulos presentes en el suelo, como esporas, restos de raíces micorrizadas y/o micorrizas de plantas vecinas. La colonización comienza con la germinación de esporas con humedad y temperaturas adecuadas y/o el crecimiento de hifas presentes en los propágulos. Al contacto con la raíz se forma un haustorio por donde penetra y entra la hifa hacia los tejidos del córtex en donde comienza a desarrollarse de forma intercelular e intracelular. Dentro de la raíz se forman dos tipos de estructuras arbusculares y vesículas. El arbusculo formado mediante ramificaciones dicotómicas de las hifas, en estas estructuras sucede el intercambio de nutrientes entre el hongo y planta. Las vesículas son estructuras de reserva en donde se almacenan lípidos

(Fernández *et al.*, 2004,). El micelio se desarrolla en el interior y exterior de la raíz, formando una red que sirve para buscar y transportar nutrientes y agua a la planta (Fernández *et al.*, 2004; Gómez *et al.*, 2007).

En la simbiosis una de las funciones de la micorriza es la de aportar nutrientes minerales a la planta como Nitrógeno, Potasio, Calcio, Magnesio, Silicio, Cobre, Zinc, Boro, Hierro y principalmente Fósforo (Barrier, 2009). Otros beneficios de la micorriza son conferir a la planta mayor resistencia o tolerancia ante condiciones de estrés biótico y abiótico mejorando el estado nutricional de la planta. Modifica la producción de exudados de la raíz, aumentando la población de microorganismos benéficos (Reyes *et al.*, 2016). Mejora las propiedades físicas del suelo y las defensas contra diversos patógenos vegetales, activando los mecanismos de defensa (Barrier, 2009). La función de la planta en la simbiosis es aportar fuentes energéticas carbonadas para el metabolismo del hongo, necesario para completar su ciclo de vida (Gómez *et al.*, 2007)

### **2.6.1. Hongos micorrízicos arbusculares e insectos**

La simbiosis por HMA pueden beneficiar a las plantas ante la herbivoría estimulando el crecimiento vegetativo compensatorio después de la herbivoría, y los herbívoros a su vez son capaces de estimular el desarrollo de la simbiosis planta - hongo. Por otro lado, la herbivoría de los insectos puede afectar la colonización radicular por los HMA. Ghering *et al.* (1997) y Gange *et al.* (2002), observaron que la colonización micorrízica en plantas se veía afectada en un 50 y 40 % después de la herbivoría causada por insectos foliares con respecto a plantas que no sufrieron herbivoría. Wamberg *et al.* (2003) observaron también en plantas de *Pisum sativum* sometidas a herbivoría que después de un incremento inicial observado a los 25 días, la colonización disminuye en un 26% después de 36 días, en comparación con plantas que no sufrieron herbivoría (Gange, 2009). Se ha propuesto la hipótesis de la estimulación por los herbívoros de la colonización, en algunos casos se ha observado un grado alto de herbivoría y una alta colonización, sin embargo existen casos donde un grado alto la herbivoría disminuye la producción y/o distribución de

asimilados por las plantas, llegando a un punto tal que pocos HMA sobreviven (Gange, 2009; Gehring y Bennett, 2009), un grado bajo de herbivoría promueve una respuesta compensatoria en el desarrollo vegetativo y una mayor tasa fotosintética, lo que incrementa la disponibilidad de asimilados para el crecimiento del HMA.

Por otro lado, las micorrizas pueden estimular las respuestas compensatorias de la planta ante la herbivoría. Por ejemplo, Kula y Wilson (2014), encontraron que la simbiosis micorrízica estimuló el rebrote de la planta después de la defoliación. Algunas especies de plantas micotróficas mostraron una sobrecompensación en respuesta a herbivoría cuando eran micorrizadas.

### **2.6.2. Asociaciones de los HMA con otros microorganismos**

Las plantas, en su ambiente natural, interactúan con varios microorganismos, entre los cuales se encuentran diferentes tipos de hongos, bacterias, levaduras, algas e invertebrados. Existe entre estos todos estos organismos una red compleja de interacciones y algunos de ellos se pueden comportar como patógenos, parásitos o mutualistas (Wężowicz et al., 2017).

Varios hongos y bacterias pueden asociarse con las micorrizas para formar asociaciones benéficas para su huésped. Sobre la interacción entre micorrizas y bacterias, por ejemplo, Panneerselvam y Thamizhiniyan (2011) reportaron que la aplicación de *Glomus fasciculatum* y *Azospirillum* sp. en plantas de *Vigna radiata* aumentó la longitud de la raíz y número de hojas, mientras que en cebollas la aplicación conjunta de *Glomus mosseae* y *A. brasilense* incrementó el rendimiento de los bulbos y su tamaño. Wahid et al. (2016), citado por Bhopale et al. (2014), reportaron que la inoculación de HMA y bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) como *Bacillus*, *Coccus* y *Streptococcus* promueven el crecimiento vegetal de plantas de maíz bajo condiciones de suelos calcáreo donde se encuentran deficiencias de nutrientes, principalmente fósforo. Jaizme et al. (2005) reportaron que la aplicación de un consorcio de *Bacillus* spp. en plantas de papaya micorrizadas con *Glomus mosseae* potencializa los efectos promotores de

crecimiento del hongo, además de reducir la presencia del nematodo *Meloidogyne*, en las raíces.

En el caso de hongos, Santos et al. (2018) estudiaron el pasto *Chrysopogon zizanioides*, que presenta una colonización natural por unos hongos endófitos septados oscuros, y evaluaron el efecto de esta colonización sobre la micorrización obtenida después de inocular *Rhizophagus clarum*, *Gigaspora albida*, *Claroideoglossum etunicatum*, *Acaulospora morrowiae*: de acuerdo a sus resultados la presencia endófito tiene un impacto positivo sobre la colonización micorrízica sobre todo con *Claroideoglossum etunicatum*.

A pesar de estos ejemplos de interacciones benéficas, no se puede en general predecir el comportamiento de las asociaciones o interacciones entre los microorganismos involucrados, las cuales pueden tener un efecto sinérgico, antagónico o nulo (Jaime, 2005).

## **2.7. Mecanismos de defensa de las plantas**

Las plantas están expuestas a una gran variedad de microorganismos y herbívoros como: insectos herbívoros, ácaros, nematodos, vertebrados, hongos, bacterias y virus (Dick *et al.*, 2002). Las plantas responden a estos ataques produciendo compuestos que reducen o inhiben el ataque o disminuyen el daño causado. La respuesta puede ser local, cuando se produce sólo en el órgano atacado, o sistémica cuando se difunde al resto de la planta principalmente (Heil y Bostock, 2002).

Muchos cambios químicos ocurren en una planta después de la infección y algunos de ellos se han asociado con la expresión de mecanismos de defensa (García y Pérez, 2003). Un mecanismo de defensa puede ser el fortalecimiento de la pared celular, sin embargo, los principales mecanismos de resistencia consisten en la biosíntesis de metabolitos secundarios como inhibidores de enzimas líticas y antioxidantes (Sepúlveda, 2004).

La respuesta de defensa puede iniciarse por un reconocimiento gen-gen cuando un patógeno con un gen dominante de virulencia es reconocido por una planta con un gen dominante de resistencia. En el caso de interacciones incompatibles el hospedero es resistente, pero en el caso de una interacción compatible no hay reconocimiento gen-gen y, si el patógeno es virulento, el hospedero es susceptible. Las respuestas de resistencia gen-gen, son mediadas por hormonas como ácido salicílico, ácido jasmónico y etileno (Gómez *et al.*, 2007).

Existen dos mecanismos de defensa conocidos: el sistema de defensa adquirido y el sistema de defensa inducido. Ambos sistemas están regidos por el ácido salicílico, etileno y jasmonatos (Gary *et al.*, 2004).

### **2.7.1. Resistencia sistémica inducida (RSI)**

La resistencia inducida es un estado fisiológico en el que, frente a estímulos ambientales específicos, las defensas innatas de la planta se potencian para enfrentar ataques. Este estado mejorado de resistencia es efectivo contra una amplia gama de patógenos y parásitos, incluyendo hongos, bacterias, virus, nematodos, plantas parasitarias e incluso insectos herbívoros (Gary *et al.*, 2004; Devendra *et al.*, 2007). Las interacciones incompatibles con virus, bacterias u hongos provocan un conjunto de respuestas localizadas alrededor de las células huésped infectadas. Estas respuestas incluyen: 1) un estallido oxidativo que conduce a la muerte celular, lo cual impide al invasor el acceso a nutrientes y agua, 2) cambios en la composición de la pared celular que inhiben la penetración por el patógeno y 3) la síntesis de compuestos antimicrobianos tales como proteínas y fitoalexinas. Las fitoalexinas son características de la respuesta local mientras que las proteínas actúan a nivel local y sistemático (Heil y Bodtrock, 2002).

### **2.7.2. Resistencia sistémica adquirida (RSA)**

Si la planta sobrevive a un ataque por patógenos u organismos invasores, las plantas pueden protegerse contra ataques posteriores de ellos. De esta manera, un primer patógeno infectante o algún daño pueden inmunizar a la planta contra infecciones posteriores por patógenos homólogos, aun cuando la planta no porte los genes determinantes de la resistencia específica (Conrath, 2006).

La resistencia sistémica adquirida (RSA) se caracteriza por una activación de un amplio espectro de la defensa del huésped, no sólo localmente en el sitio inicial del ataque del patógeno, sino también sistemáticamente, en tejidos no afectados por el patógeno. La inducción de resistencia sistémica en el sitio de la infección implica la producción de una señal primaria sistémica que es translocada a otras partes de la planta, donde induce mecanismos de defensa. El tiempo necesario para establecer RSA varía de horas hasta semanas y, dependiendo de la planta y del patógeno, la duración de RSA se puede extender por períodos largos. (Conrath, 2006).

Los mecanismos inducidos por la RSA incluyen la respuesta hipersensible que conduce a la muerte celular rápida, la inducción de un número de compuestos de bajo peso molecular con actividad antimicrobiana llamados fitoalexinas, la producción en la pared celular de barreras estructurales como la lignina, o químicas como la acumulación de hidroxiprolina, enzimas hidrolíticas, enzimas de la vía fenilpropanoide inhibidores de proteinasas, así como péptidos antimicrobianos y proteínas (Schneider *et al.*, 1996).

### 3. JUSTIFICACIÓN

El daño causado por el herbívoro *Spodoptera frugiperda* en su estado larval en maíz, genera grandes pérdidas económicas a los pequeños y grandes productores cada ciclo productivo, principalmente cuando no se ejerce algún tipo de control.

Para la producción agrícola de maíz el control químico es uno de los principales métodos de control para disminuir las poblaciones de *Spodoptera frugiperda*. Sin embargo, los usos de estos productos de síntesis química con el tiempo generan resistencia en los insectos, por lo que es necesario aumentar las dosis y reducir los intervalos de aplicación, aumentando los gastos de producción. Además, los agroquímicos tienen efectos en el medio ambiente y la salud de los consumidores. El uso de agentes biológicos como los hongos entomopatógenos como endófitos y hongos micorrízicos puede ser una alternativa para el control de *S. frugiperda*. Cada uno de estos microorganismos influye de diferente manera en las plantas, dando como resultado diferentes beneficios para la planta. La utilización de estos microorganismos conjuntamente puede formar una asociación que potencialicen las defensas de las plantas en contra de *Spodoptera frugiperda*. Estos microorganismos además de aportar beneficios a las plantas, se encuentran en diferentes suelos y agroecosistemas. En algunos casos, la producción masiva de los agentes de control biológico y hongos micorrízicos arbusculares son económicamente viables. Por estas razones en el presente trabajo se evaluaron nueve diferentes cepas de hongos entomopatógenos con potencial endófito y dos cepas de hongos micorrízicos arbusculares como una alternativa del manejo de las poblaciones de *Spodoptera frugiperda*, realizando diferentes evaluaciones en laboratorio e invernadero.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo General**

Evaluar la capacidad endófitica de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* por separado y en asociación con hongos micorrízicos arbusculares en dos genotipos de maíz como bioprotectores contra la herbivoría de *Spodoptera frugiperda*.

### **4.2. Objetivos específicos**

- Determinar el nivel de colonización endófitica de los hongos entomopatógenos y la colonización de los hongos micorrízicos arbusculares sobre maíces criollos y mejorados bajo invernadero.
- Determinar la compatibilidad de los hongos entomopatógenos endófitos y los hongos micorrízicos arbusculares en maíces criollos y mejorados bajo invernadero.
- Evaluar la promoción de crecimiento en maíces criollos y mejorados por los hongos entomopatógenos endófitos y hongos micorrízicos arbusculares bajo invernadero.
- Evaluar el efecto de los hongos micorrízicos arbusculares y hongos entomopatógenos endófitos sobre el desarrollo del gusano cogollero en maíz criollo y mejorado bajo invernadero.

## **5. HIPÓTESIS**

La asociación en las plantas de maíz de los hongos micorrízicos arbusculares y los hongos entomopatógenos endófitos promoverán el crecimiento y bioprotección contra el gusano cogollero.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Capítulo 1: Efecto de los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en el crecimiento de maíces criollos y en el desarrollo del gusano cogollero

#### 6.1.1 Resumen.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la inoculación con hongos micorrízicos arbusculares (HMA); *Rhizophagus intraradices*, *Funneliformis mosseae* y un control sin HMA en plantas de maíz criollo, sobre el desarrollo del gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*) y la promoción del crecimiento vegetativo. Se realizó un experimento en condiciones de invernadero. Plántulas de maíz se trasplantaron en un sustrato estéril que contenía arena, suelo y agrolita (6:3:1 v/v), al trasplante se inocularon con 80 esporas de los HMA. A los 40 días después del trasplante, se colocaron tres larvas de gusano cogollero en tercer instar por planta. Las larvas se dejaron alimentar por 12 días. Se registró el peso al inicio y a; final de las larvas. En las plantas de maíz se evaluó el crecimiento de la planta y la colonización micorrízica. Los datos obtenidos se analizaron mediante el análisis de varianza y comparación de medias de acuerdo a la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ). Se encontró que no hubo diferencia significativa en la altura y diámetro de la planta entre plantas inoculadas y no inoculadas con los HMA, porcentajes de colonización micorrízica del 50% en ambas especies de HMA. La especie de HMA influyó en la herbivoría de las larvas; en maíces inoculados con *R. intraradices* las larvas aumentaron su peso y larvas alimentadas con plantas colonizadas con *Funneliformis mosseae* presentaron menor peso, ambas en relación a larvas alimentadas con maíces sin HMA. Estos resultados muestran que la especie de hongo de HMA que micorriza la planta afecta la herbivoría y el crecimiento de las especies de HMA.

#### 6.1.2. Abstract

The objective of this work was to evaluate the effect of inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF); *Rhizophagus intraradices*, *Funneliformis mosseae* and an

AMF-free control in native corn plants, on the development of the cogollero worm (*Spodoptera frugiperda*) and the promotion of vegetative growth. An experiment was carried out under greenhouse conditions. Corn seedlings were transplanted in a sterile substrate containing sand, soil and agrolite (6:3:1 v/v), at transplant they were inoculated with 80 spores of the AMF. 40 days after the transplant, three worm larvae were placed in third instar per plant. The larvae were left to feed for 12 days. The weight was recorded at the beginning and end of the larvae. In corn plants, plant growth and mycorrhizal colonization were evaluated. The data obtained were analyzed by analysis of variance and comparison of means according to Tukey's test ( $P \leq 0.05$ ). It was found that there was no significant difference in plant height and diameter between plants inoculated and not inoculated with AMF, mycorrhizal colonization percentages of 50% in both AMF species. The AMF species influenced the herbivory of larvae; in maize inoculated with *R. intraradices* the larvae increased their weight and larvae fed with plants colonized with *Funneliformis mosseae* presented lower weight, both in relation to larvae fed with maize without AMF. These results show that the species of AMF fungus that mycorrhizes the plant affects the herbivory and growth of AMF species.

### **6.1.3. Introducción**

El maíz es una planta gramínea originaria del continente Americano. Es uno de los cereales de mayor importancia en todo el mundo (Fernández *et al.*, 2003). En la actualidad a pesar de la disponibilidad de mejores prácticas agronómicas para la protección de cultivos. En maíz se estiman pérdidas promedio del 31 % a nivel mundial debido a plagas y enfermedades (Valdez *et al.*, 2009). Las pérdidas por plagas en México pueden llegar hasta el 60% de la producción.

En los últimos años, la incidencia de insectos se ha incrementado considerablemente, una de las plagas de mayor importancia económica es el gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*) (Méndez y González, 2014). Es una plaga polífaga que puede alimentarse de 28 especies vegetales de importancia agrícola como maíz, sorgo, algodón, arroz entre otras (Zenner *et al.*, 2007). Sin embargo,

tiene preferencia alimenticia por las gramíneas. En estado larval *S. frugiperda* se alimentan de las hojas, cogollos, espigas, estigmas y granos (Cazmuz *et al.*, 2009).

El control químico es un método económico que comúnmente se utiliza para el control de esta plaga, desafortunadamente tiene efectos negativos como la reducción de especies benéficas, la presencia de residuos en alimentos, el aire, el suelo y el agua, además de que los insectos han adquirido resistencia (Lizarazo *et al.*, 2008; Chango, 2012); por lo que es necesario implementar alternativas que sean menos agresivas para el ambiente y el hombre (García y Tarango, 2009). El uso de microorganismos benéficos para el control biológico ha adquirido gran importancia en los últimos años, como una alternativa para reducir el uso de productos químicos (Bandii, 2006). Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA), son microorganismos benéficos de gran importancia para el desarrollo de las plantas. Participan en el suministro de nutrientes (Barrier, 2009), además proporcionan tolerancia a la planta ante condiciones de estrés y promover la microfauna de la rizósfera (Reyes *et al.*, 2016). Los beneficios que proporcionan los HMA a la planta favorecen un mayor crecimiento vegetativo para la planta. Por ejemplo, Yooyongwech *et al.* (2017) observaron que plantas micorrizadas tuvieron un mayor crecimiento bajo condiciones de estrés hídrico. Por otra parte, Wu *et al.* (2005) reportaron que la inoculación de *Glomus mosseae* y *Glomus intraradices* combinados con bacterias fijadoras de nitrógeno, promovieron un mayor crecimiento de plántulas en maíz, principalmente por una mayor solubilidad y absorción de nutrientes.

Las plantas colonizadas por HMA pueden mitigar los daños por insectos herbívoros (Wamberg *et al.*, 2003; Kula y Wilson, 2014). La reducción de la herbivoría por los insectos es debido a que las plantas activan varios genes cuando son colonizadas por los HMA (Vannette y Hunter, 2009). Por ejemplo, la producción del jasmonato en tejidos, activando los mecanismos de defensa de la planta incrementando la tolerancia y/o resistencia a un grupo importante de organismos plaga. El ácido jasmónico es producido por la planta y da como resultado un incremento de la producción de compuestos de resistencia, como el ácido salicílico y etileno así la colonización micorrízica favorece la respuesta de la planta ante la herbivoría de

insectos (Gange *et al.*, 2002, Wamberg *et al.*, 2003). En algunos cultivos se ha visto que la simbiosis micorrízica puede disminuir la herbivoría, como observaron Wamberg *et al.* (2003) en plantas de *Pisium sativum* donde la simbiosis micorrízica disminuyó la herbivoría de áfidos. Otro beneficio de la simbiosis es la recuperación de la planta como lo observaron Kula y Wilson (2014) en pastos, donde el incremento en brotes vegetativos fue mayor para los pastos que estaban en simbiosis micorrízica. En el presente trabajo se buscó comprobar el efecto de la inoculación de hongos micorrízicos arbusculares en el crecimiento vegetativo y la bio-protección en plantas de maíz criollo afectadas por *Spodoptera frugiperda*.

#### **6.1.4. Materiales y métodos**

El experimento se desarrolló en el centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco AC. (CIATEJ), en condiciones de invernadero. El experimento se estableció durante el periodo invernal, donde las condiciones de temperatura promedio fueron de 26 °C durante el día y de 15 °C por la noche.

#### **Diseño experimental**

Se utilizó maíz criollo como especie vegetal. Mientras que los microorganismos utilizados fueron dos especies de hongos micorrízicos arbusculares multiplicadas por el CIATEJ unidad Zapopan; *Funneliformis mosseae*, esta especie se obtuvo por medio de macetas trampa de sorgo y la cual fue originalmente aislada de la rizósfera de *Agave cupreata* del estado de Michoacán, y *Rhizophagus intraradices* propagada en macetas trampa con sorgo a partir del producto comercial elaborado por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Por su parte las larvas utilizadas para la evaluación fueron de *S. frugiperda* en tercer instar. Proporcionadas por el Laboratorio de Entomología del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IIAF)

Se diseñó un experimento factorial. Los factores de estudio fueron los HMA con tres niveles; *Rhizophagus intraradices*, *Funneliformis mosseae* y sin HMA otro factor fueron las larvas de *Spodoptera frugiperda* con dos niveles; con larva y sin larva. El experimento se compuso de cuatro tratamientos, combinando cada hongo micorrízico con las larvas de *S. frugiperda* en las plantas de maíz (Tabla 1).

**Cuadro 1.** Tratamientos evaluados en la herbivoría de *S. frugiperda* en maíz inoculado con HMA.

<b>Factor HMA</b>	<b>Factor larva</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Clave</b>
<i>Rhizophagus intraradices</i>	Con larva	1	Ri+L
<i>Funneliformis mosseae</i>	Con larva	2	Fm+L
Sin HMA	Con larva	3	Sin HMA+L
	Sin larva	4	Sin HMA

Cada tratamiento se compuso de 10 repeticiones, teniendo un total de 40 unidades experimentales. La unidad experimental consistió en una planta de maíz plantada en una bolsa de plástico de tres kilogramos llena con sustrato. Para los tratamientos Ri + L y Fm + L se establecieron cinco unidades experimentales adicionales para cada uno. Las unidades experimentales adicionales se utilizaron para realizar un conteo del porcentaje de colonización previo a la infestación de *S. frugiperda*.

## **Material biológico**

### **Cría de gusano cogollero**

Se estableció un pie de cría de *S. frugiperda* en un cuarto de incubación, con condiciones controladas de temperatura a 25°C y una humedad relativa de 60%, parámetros que favorecieron el desarrollo adecuado *S. frugiperda*. El pie de cría se estableció a partir de 15 parejas de adultos. De las parejas se obtuvo una colonia,

esta se mantuvo de acuerdo a las necesidades para su desarrollo de cada etapa de su ciclo de vida. Para su alimentación se preparó una dieta artificial la cual también fue proporcionada por el Laboratorio de Entomología del IIAF, la dieta usada fue una mezcla balanceada de nutrientes (Anexo 1) requeridos por *Spodoptera frugiperda* para su desarrollo. La dieta solo se uso en la etapa de larva.

### **Manejo por etapas de desarrollo**

El manejo del insecto se dio por etapas, para lo cual las larvas eran sacadas del cuarto de incubación y realizar el manejo correspondiente en laboratorio. Al término de las pruebas, las larvas se regresaban al cuarto de incubación.

**Adultos:** Machos y hembras se colocaron dentro de bolsas de papel color café para su reproducción, en una relación de 1:1. Las hembras ovopositaban sobre las paredes de la bolsa. Cada día se cambiaban los adultos de bolsa y se recolectaban los huevos de la bolsa anterior, por aproximadamente 10 días el tiempo que duraban en reproducción. Durante el traspaso de bolsa, dentro de la bolsa nueva se colocaba un algodón humedecido con una solución de agua y miel al 15 % como alimento (Figura. 1).



**Figura 1.** *Spodoptera frugiperda* en estado adulto en etapa de reproducción y alimentado con una solución de agua y miel al 15%.

**Huevos:** Para obtenerlos se cortaban tiras de la bolsa de papel donde se encontraban pegados, las tiras con los huevos se depositaban en la parte superior de un frasco de 0.5 L sujetos a la tapa.

**Larvas:** eclosionaban tres días después de la ovoposición, para su alimentación se preparó una dieta artificial (Anexo 1). El alimento se cambió cada tercer día hasta que las larvas alcanzaron la etapa de pupa. Durante los primeros tres estadios larvales permanecieron juntas en el mismo frasco, y a partir del cuarto se individualizaron en vasos de una onza con tapa por su hábito caníbal.

**Pupas:** En la etapa de pupa se determinó el sexo identificando estructuras morfológicas, esta actividad se realizó con un estereoscopio electrónico. Identificado el sexo, las larvas se depositaban en contenedores de plástico de 0.5 L cubiertas con papel absorbente hasta la emergencia del adulto.

### **Hongos micorrízicos arbusculares.**

Las especies de hongos micorrízicos arbusculares se obtuvieron de un cultivo de macetas trampa asociados a sorgo y las cuales fueron proporcionadas por la sueloteca del CIATEJ unidad Zapopan, para realizar la inoculación con los hongos micorrízicos arbusculares fue necesario conocer la concentración de esporas por gramo de sustrato. Para ello se realizó la extracción y se hizo un conteo de esporas de HMA. El conteo se determinó a partir de tres muestras de 10 gramos de sustrato para cada especie de hongos micorrízicos. Para la extracción de esporas se utilizó el método de tamizado y decantado húmedo de Gerdemann y Nicolson (1963), combinado con la técnica de flotación en sacarosa de Walker (1997), (Anexo 3). Para realizar el conteo de esporas, estas fueron contadas por observación en un estereoscopio óptico electrónico. Para estimar la concentración media de esporas por gramo se sacó un promedio de las muestras observadas.

### **Material vegetal.**

Se utilizó un cultivar de maíz criollo, de la región de Epitacio Huerta Michoacán. Para producir las plántulas las semillas se desinfectaron con etanol 70% por 3 min en hipoclorito de sodio al 5% por 5 min, después se pusieron a germinar en papel absorbente humedecido con agua estéril con la técnica de tacos de germinación. Los tacos de germinación fueron llevados a cámara de incubación a 25 °C, donde permanecieron seis días hasta que se formó el coleoptilo.

### **Trasplante e inoculación de los HMA.**

Para el trasplante se utilizó como sustrato una mezcla de suelo arena y agrolita en una proporción de 6:3:1, el cual fue previamente esterilizado durante seis horas a 120°C y 15 PSI. El sustrato se depositó en bolsas de tres kg, dentro de las cuales se trasplantaron las plántulas. La inoculación se realizó con aproximadamente 80 esporas de HMA para cada planta, depositando el inóculo alrededor de la zona radicular de la planta de maíz (Figura. 2).



**Figura 2.** Plantas de maíz criollo después del trasplante e inoculación con HMA

Durante el desarrollo del experimento las plantas se regaron cada tercer día. La fertilización se aplicó a la tercera semana y hasta el final del experimento. Se aplicó nitrógeno en forma de urea a razón de 0.065 g por planta semanalmente, diluidos en 300 mL de agua de riego.

### **Infestación con *Spodoptera frugiperda***

A los 40 días después del trasplante, se realizó la infestación con larvas de *S. frugiperda* en tercer instar. Esta se realizó colocando tres larvas en las hojas más próximas al cogollo de la planta (Figura. 3), previo a la infestación las larvas se dejaron de alimentar un día antes para promover la herbivoría inmediata. Después de la infestación las plantas se cubrieron con una tela semitransparente sintética de color blanco, para evitar que las larvas se cambiaran de planta.



**Figura 3.** Infestación con larvas de *S. frugiperda* de tercer instar en las hojas de plantas de maíz criollo a los 40 días posteriores a la inoculación con hongos micorrízicos arbusculares.

## Variables evaluadas

**Cuadro 2. Variables evaluadas, experimento de herbivoría.**

<b>Variable</b>	<b>Método</b>	<b>Época</b>
Altura de planta	Medido con flexómetro	15, 30 y 40 días después del trasplante
Diámetro de tallo	Medido con flexómetro	15, 30 y 40 días después del trasplante
Colonización micorrízica	Técnica de Philips y Hayman	30 y 52 días después del trasplante
Diámetro de cápsula cefálica	Por software Imagen J	52 días después del trasplante
Peso de larva	Medido con balanza de precisión	52 días después del trasplante

## Crecimiento vegetal

La altura de planta y diámetro del tallo se midió cada 15 días, a partir de la segunda semana después del trasplante y hasta los 40 días después del trasplante. La altura fue medida con un flexómetro midiendo desde el cuello de la planta hasta la zona apical de la planta, mientras que para el diámetro de tallo se utilizó un vernier electrónico. La medición se realizó en el segundo entrenudo ubicado sobre el cuello de la planta.

## Variables microbiológicas

### Colonización micorrízica

La colonización micorrízica se determinó a los 30 y 52 días después del trasplante mediante la observación de raíces teñidas en microscopio óptico electrónico, donde se observaron las diferentes estructuras de los hongos micorrízicos. La tinción de

raíces se realizó usando la metodología propuesta por Philips y Hayman (1970) (Anexo 2) con algunas variaciones en los tiempos que duraron las raíces en los diferentes reactivos y la concentración del colorante azul de Tripano.

### **Porcentaje de colonización micorrizica**

El porcentaje de colonización se estimó a partir de 90 segmentos de raíces de 1 cm de largo por cada unidad experimental, a partir del conteo de pedazos colonizados se estimó el porcentaje de colonización utilizando la siguiente fórmula.

$$\% \text{ de colonización} = \frac{((100)(SCO))}{TSO}$$

### **Donde**

**SCO**= Segmentos colonizados observados

**TSO**= Total de segmentos observados

### **Variable de bioprotección**

Después de 12 días alimentándose directamente de la planta, los insectos fueron recolectados y rotulados individualmente. Se depositaron en vasos de una onza y fueron llevados a laboratorio, donde se les midieron parámetro de desarrollo. El desarrollo de las larvas se midió de dos maneras, una mediante el peso final que obtuvieron las larvas después de los 12 días de herbivoría, el peso final es un indicador de que cuanto alimento consumió en comparación con las demás larvas. El peso fue tomado de cada insecto en cada unidad experimental. El peso se determinó con una balanza electronica de precisión OHAUS PA 323.

El otro parámetro tomado como indicador de desarrollo fue la determinación del estadio de las larvas. Para determinar el estadio larval del insecto se midió el ancho

de la cápsula cefálica. Esto se realizó por medio de fotos de las larvas sobre una hoja milimétrica, las fotos fueron analizadas con el programa Imagen J el cual mostró una medición del ancho de la cápsula cefálica.

### **Análisis estadístico**

Para determinar si existían diferencias estadísticamente entre tratamientos se realizó un ANOVA simple. Para identificar las diferencias entre éstos se realizó una comparación de medias con Tukey ( $P \leq 0.05$ ) utilizando el Software StatGraphics Centurión XV®.

### **6.1.5. Resultados y discusión**

#### **Altura y diámetro de tallo**

La simbiosis micorrízica de *F. mosseae* y *R. intraradices* no tuvo efecto en el crecimiento vegetativo de las plantas de maíz. Durante las cuatro mediciones realizadas de la altura de la planta y del diámetro de tallo, las plantas que no se inocularon con los HMA y las inoculadas con los HMA tuvieron el mismo crecimiento. La altura a los 35 días después del trasplante en promedio fue de 21.14 cm para todas las unidades experimentales. El diámetro de tallo tuvo un promedio de 4.33 mm.

La ausencia de efectos de los HMA sobre el crecimiento de la planta puede explicarse por diferentes razones. Por un lado, los efectos de la colonización como el aporte de nutrientes y la tolerancia a estrés, entre otros, varían entre diferentes especies vegetales y dentro de la misma especie vegetal, en función de la especie de HMA (Sosa *et al.*, 2005). En maíz, se reportan resultados contradictorios. A diferencia de este trabajo, Echeverría *et al.* (2013), al inocular *Glomus cubense* (22 mg.kg<sup>-1</sup>) y un consorcio del CINVESTAV Irapuato compuesto en su mayoría *Glomus* spp. (44 mg.kg<sup>-1</sup>) en un cultivar de maíz híbrido (1851W.Nk.), observaron un efecto significativo sobre el crecimiento vegetativo. Al comparar cinco especies de HMA inoculadas en un cultivar de maíz híbrido (30S31), por Moreira *et al.* (2017) encontraron que sólo una de ellas, *Claroideoglossum etunicatum*, promovió el

crecimiento vegetativo, aun cuando las cinco especies alcanzaron porcentajes de colonización superiores al 25 %.

La promoción de crecimiento vegetativo por la simbiosis micorrízica puede verse afectada por factores como la temperatura de acuerdo con Xiaoying *et al.* (2014) observaron que las bajas temperaturas no afectan la colonización, pero si la promoción de crecimiento de las plantas inoculadas con HMA. En sus ensayos realizados en maíz en encontraron que la colonización de casi 30% de HMA bajo condiciones de bajo temperatura no promovieron el crecimiento vegetativo, mientras que a temperatura ambiente la colonización por HMA si promovió el crecimiento en las plantas. La falta de nutrientes en el suelo y/o sustrato pudo ser otra limitante para la promoción de crecimiento vegetativo. El suministro de nutrientes que la planta recibe por parte de la simbiosis con el HMA es una de las razones por las que las plantas crecen más respecto a otras plantas (Ferrol *et al.*, 2004; Berruti *et al.*, 2016).

Una simbiosis efectiva entre HMA y planta puede ser modulada por otros factores como el tiempo, debido a que el tiempo de colonización dependerá de la especie vegetal y del HMA, de factores edáficos propios del suelo donde se desarrolla la planta, las diferentes especies de micorrizas se desarrollan de diferente manera dependiendo de las características físico-químicas del suelo (Pérez *et al.*, 2015).

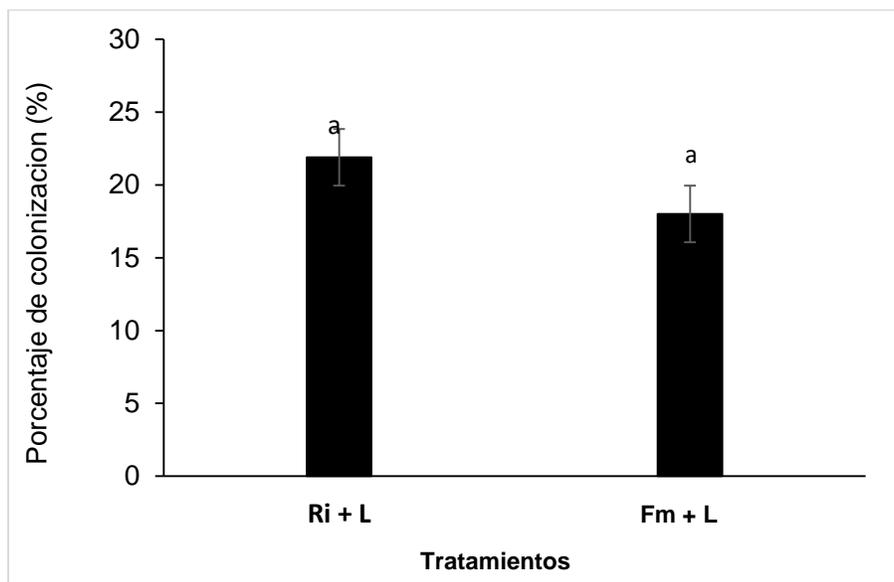
### **Colonización micorrízica**

Las dos especies de HMA utilizadas establecieron una simbiosis con las plantas de maíz, encontrándose las diferentes estructuras de los hongos micorrízicos principalmente micelio y arbusculos (Figura 4). El porcentaje de colonización del muestreo previo a la infestación con *S. frugiperda* fue próximo al 20% para ambas especies de micorrizas (Figura 5). A los 52 días después de la inoculación y de la infestación de *S. frugiperda* el porcentaje de colonización aumentó al 45% para la especie *F. mosseae* y 49% para la especie *R. intraradices* siendo estadísticamente

iguales (Figura 6). El porcentaje de colonización aumentó casi un 30 % para las dos especies durante el tiempo en el que permanecieron las larvas en la planta alimentándose de ella, posiblemente el aumento de colonización fue inducido a causa de la herbivoría por *S. frugiperda*. Kula *et al.*, (2014) observaron que la colonización micorrizica en pastos aumentaba después de la herbivoría de saltamontes, además de que la recuperación de la planta era mas rapida. Posiblemente esto se por la movilización de carbono hacia las partes no dañadas en respuesta a la herbivoría (Orians *et al.*, 2017).

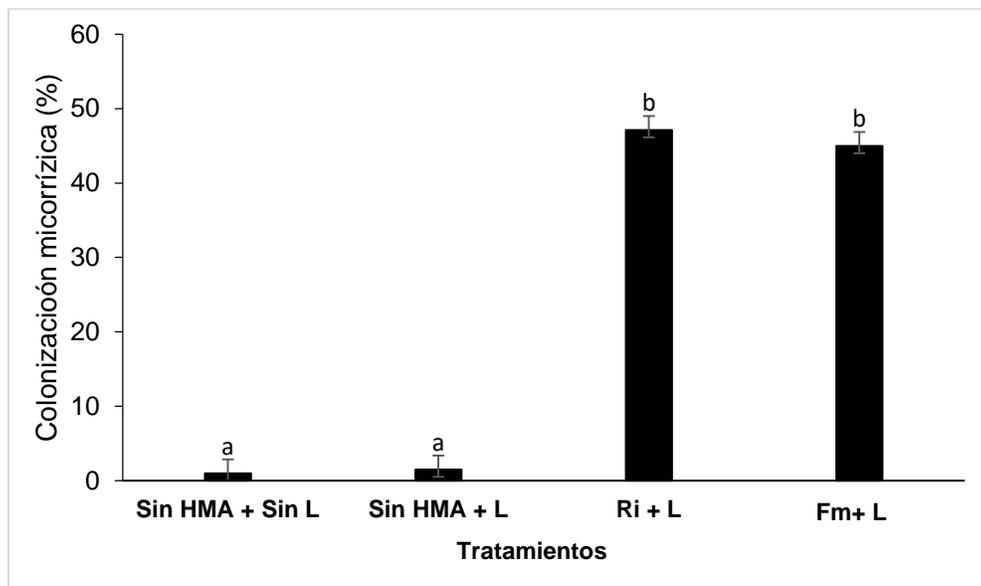


**Figura 4.** Colonización micorrízica de micelio y vesículas en raíces de maíz criollo a los 52 días después de la inoculación.



**Figura 5.** Colonización micorrízica de *F. mosseae* (Fm) y *R. intraradices* (Ri) en maíz criollo a los 30 días posteriores a la inoculación y previos a la infestación de las larvas (L) de *S. frugiperda*. Prueba de Tukey 95% ( $P < 0.05$ ). Letras diferentes

sobre las barras indican diferencia significativa. Líneas sobre barras indican error estándar, Prueba de Tukey al 95%.

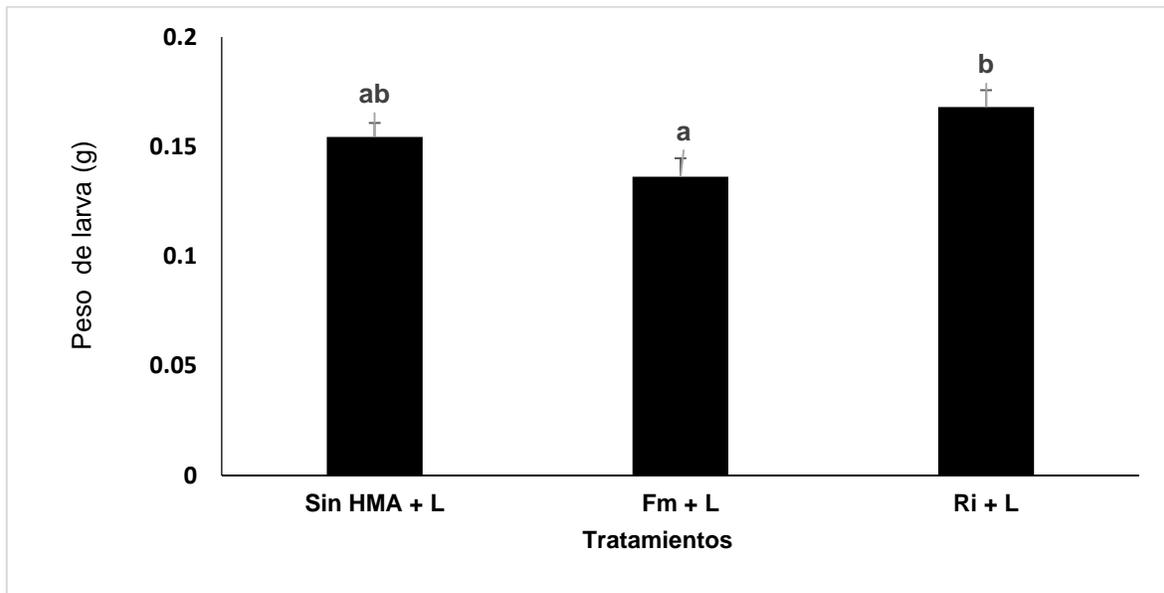


**Figura 6.** Colonización micorrízica 12 días después de la infestación de larvas (L) de *S. frugiperda* en plantas de maíz criollo no inoculadas con hongos micorrízicos (sin HMA) e inoculados con *F. mosseae* (Fm) y *R. intraradices* (Ri). Prueba de Tukey 95% ( $P < 0.05$ ). Letras diferentes sobre las barras indican diferencia significativa. Líneas sobre barras indican error estándar.

### Efecto de la micorrización sobre el insecto.

La micorrización de las plantas tuvo un efecto en el desarrollo del insecto, específicamente en la ganancia de peso, después de 12 días de alimentación de los insectos. De acuerdo con el análisis estadístico hubo diferencia significativa entre el tratamiento inoculado con *R. intraradices* y el inoculado con *F. mosseae*. Las larvas que se alimentaron de las plantas colonizadas con *R. intraradices* obtuvieron una mayor ganancia de peso 0.168 g, en comparación con las que se alimentaron con las plantas colonizadas con *F. mosseae*. La diferencia de peso entre estos tratamientos fue de 0.031 g. por su parte las larvas de las plantas no

inoculadas no mostraron diferencias respecto a las larvas de las plantas inoculadas (Figura. 7).



**Figura 7.** Peso promedio de larvas de *Spodoptera frugiperda* después de 12 días de alimentación directa en plantas de maíz criollo inoculadas y no inoculadas con HMA. HMA (Hongo micorrízico arbuscular), RI (*Rhizophagus intraradices*), FM (*Funneliformis mosseae*), L (Larva). Letras sobre las barras indican diferencia significativa ( $P < 0.05$ ), Prueba de Tukey al 95%.

Los HMA en su interacción con las plantas pueden llegar a interactuar de forma indirecta con los insectos provocando diferentes efectos en ellos. Se ha observado que la simbiosis de los HMA puede llegar a influir en el desarrollo de los insectos en dos formas una negativa y una positiva (Gehring y Bennett, 2009; Gangué, 2007; Bernaola *et al.*, 2018). Ambos tipos de efectos son a consecuencia de los cambios químicos que la micorriza induce en la planta activando sus mecanismos de defensa lo que conduce a la producción de metabolitos secundarios o bien por los beneficios nutrimentales que proporciona a la planta. También se debe considerar que los efectos en los insectos, dependen de las especies involucradas (insecto, planta y HMA) (Gehring y Bennett, 2009; Rasmussen *et al.*, 2017).

En este experimento se observaron los dos efectos (positivo y negativo) en el desarrollo de *S. frugiperda* en respuesta a la herbivoría al maíz inoculado con los

HMA. Ya que *S. frugiperda* en su estado larval gana peso al alimentarse de las plantas de maíz inoculadas con *R. intraradices*, mientras que las larvas que se alimentaron de las plantas inoculadas con *F. mosseae* se desarrollaron menos.

La ganancia de peso de las larvas indica que estas mantuvieron una herbivoría más severa sobre las plantas, este comportamiento posiblemente se deba a consecuencia de la simbiosis ya que es probable que el buen estado nutricional de la planta fuera más apetecible para las larvas, y en consecuencia las larvas obtuvieron un mejor desarrollo en cuanto a la ganancia de peso. Otros efectos observados en otros insectos han sido una mayor supervivencia, mayor fertilidad como respuesta a la herbivoría de plantas en simbiosis con los HMA (Rasmussen *et al.*, 2017).

Contrario a la ganancia de peso está la pérdida de peso de las larvas que se alimentaron de las plantas inoculadas con *F. mosseae*. Posiblemente la pérdida de peso de las larvas de *S. frugiperda* se puede atribuir a la producción de metabolitos secundario inducidos como consecuencia de la simbiosis micorrízica. Es probable que la exposición de las larvas a ciertos compuestos secundarios disminuyera su apetito. Por hábitos alimenticios se ha observado que los insectos masticadores son los más afectados en comparación con los de aparato bucal chupador, ya que se exponen más a los metabolitos producidos por la planta que aquellos insectos chupadores (Bennett *et al.*, 2009). Además de la pérdida de peso que se observó en este experimento se han observado otros efectos en diferentes insectos con diferentes especies de HMA, como aumento en la depredación o parasitismo a causa de una mayor producción de compuestos volátiles por la planta que atraen a los enemigos naturales de las plagas, menor fecundidad, menor ganancia de peso, menor supervivencia y menor desarrollo (Guerrero *et al.*, 2004).

Gangue (2007), propone que las variaciones en el desarrollo de los insectos cuando estos se alimentan de plantas con HMA pueden deberse a que la colonización micorrízica modifica factores en la planta como la nutrición y la composición química. Estos cambios pueden repercutir directamente en el desarrollo de los insectos. Por su parte Rasmussen *et al.* (2017), proponen que las variaciones de

los efectos en los insectos alimentados con plantas colonizadas por micorrizas dependen de la genética de cada uno, razón por la cual se presentan diferentes respuestas y efectos entre las plantas e insectos.

### **Ancho de la cápsula cefálica**

En el tamaño de la cápsula cefálica de las larvas en los tres tratamientos evaluados fue en promedio de 2.42 mm. Se utilizó una escala generada por Villa y Catalán (2004) para determinar el instar de *S. frugiperda* (Anexo 4) dependiendo del diámetro de la cápsula cefálica de una larva es posible determinar su instar. Al momento de recoger las larvas de las plantas la mayoría de ellas se encontraban en los últimos instares comprendidos entre el cuatro y cinco de acuerdo a la escala de Villa y Catalan. En el cuarto instar, la cavidad cefálica de *S. frugiperda* mide  $2.02\text{mm} \pm 0.28\text{mm}$  y en el quinto instar mide  $2.77\text{mm} \pm 0.30\text{mm}$ . las larvas de las plantas que no fueron inoculadas con los HMA estaban en cuarto instar con un promedio de 2.3 mm de cápsula cefálica. Mientras que las larvas de los tratamientos Ri+L y Fm+L se encontraron en el instar cinco con promedios de 2.56 mm y 2.42 mm respectivamente.

Las diferencias en el ancho de la cápsula cefálica sugieren que las larvas que se alimentan de las plantas inoculadas con los HMA completan en menor tiempo la etapa de larva. El desarrollo de las larvas fue posiblemente mayor por el efecto de la simbiosis micorrízica. Es posible que *R. intraradices* mejorada la condición nutricional de la planta haciéndola más apetecible y aprovechable para las larvas, conduciéndolas a mejorar su desarrollo. Por otro lado, las larvas que se alimentaron de las plantas inoculados con *F. mosseae* También se encontraban en quinto instar pro como ya se vio anteriormente obtuvieron una menor ganancia de peso. Existe una posibilidad de que estas larvas se expusieran a metabolitos secundarios que afectaran directamente en su ingesta alimenticia y en respuesta estos pudieron acelerar su ciclo larval para poder completar su ciclo de vida.

### **6.1.6. Conclusiones**

La simbiosis de los HMA en maíz criollo no promovió el crecimiento vegetativo de las plantas al menos hasta los 40 días posteriores a la inoculación. También se pudo observar un incremento de la colonización micorrízica del 30 % entre los 30 días y 52 días posteriores a la inoculación, este aumento de colonización no se vio afectado por la herbivoría de *S. frugiperda* ya que la infestación se realizó a los 40 días posteriores a la inoculación de los HMA. Por su parte la simbiosis de los HMA con el maíz mostró tener un efecto en el desarrollo de las larvas de *S. frugiperda*. La cepa de *F. mosseae* tuvo una tendencia a disminuir la ganancia en peso y a acelerar su ciclo de desarrollo, caso contrario *Rhizophagus intraradices* parece beneficiar la ganancia de peso de los insectos y también acelera su ciclo de desarrollo.

## Bibliografía

- Pérez, A. Rojas, J y Montes V. 2011. Hongos formadores de micorrizas arbusculares: una alternativa biológica para la sostenibilidad de los agroecosistemas de praderas en el caribe colombiano. *Revista Colombiana de ciencia animal*. Vol 3(2), pp 366-385.
- Bennett, E. Bever, J y Bowers, M. 2009. Arbuscular mycorrhizal fungal species suppress inducible plant responses and alter defensive strategies following herbivory. *Oecologia*. Vol 160 (4), pp 771-779.
- Barrier, S. 2009. El uso de hongos micorrizicos arbusculares como una alternativa para la agricultura. *Bióloga*, escuela de Biología, Facultad de ciencias, universidad industrial de Santander, Colombia
- Berruti, A. Lumina, E. Balestrini, R y Bianciotto, V. 2016. Arbuscular Mycorrhizal Fungi as Natural Biofertilizers: Let's Benefit from Past Successes. *Front Microbiol*. Vol 6 (1), pp1559.
- Cazmuz, A. Juarez, M. Murua, M. Prieto, S. Medina, S. Willink, E y Gastamiza, E. 2010. Revisión de los hospederos del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Rev. Soc. Entomol. Argent.* 69 (3), pp 209-231
- Chango, L. 2012. Control de gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*) en el cultivo de maíz (*Zea mays*). Tesis de licenciatura. Universidad técnica de Ambato, Anbato, Ecuador.
- Echevarría M, A., Olalde, V., & Fernández, K., Serrato, R. (2013). Diferencias en la respuesta del maíz (*Zea mays* L.) a la inoculación con *Glomus cubense* (Y. Rodr. & Dalpé) y con un conglomerado de especies de hongos micorrizicos arbusculares (HMA). *Cultivos Tropicales*, 34 (2), pp 12-15.
- Fernández, R; Morales, L; Gálvez A. 2003. Importancia de los maíces nativos de México en la dieta nacional. Una revisión indispensable. *Rev. Fitotec. Mex*, Vol 36 (1), pp 275 – 283.
- Ferrol, N y Gianinazzi, V. 2004. Learn more about arbuscular mycorrhizal fungi.
- Gange, A. Bower, E y Broun, V. 2002. Differential effects of insect herbivory on arbuscular mycorrhizal colonization. *I* Vol 131 (1), pp 103–112.

- Gange A. 2007. Insect-mycorrhizal interactions: patterns, processes, and consequences, pp. 124–143.
- Gehring, C y Bennett, A. 2009. Mycorrhizal fungal–plant–insect interactions: the importance of a community approach. *Environ. Entomol.* 38(1), pp 93-102.
- Guerrieri, E. Lingua, G. Digilio, M. Massa, N y Berta, G. 2004. Do interactions between plant roots and the rhizosphere affect parasitoid behaviour?. *Ecology*. Vol 29(1), pp 753–756
- Kula, M y Wilson, G. 2014. Effects of mycorrhizal symbiosis on tallgrass prairie plant–herbivore interactions. *Ecology Letters*. Vol 8(1), pp 61–69.
- Lizarazo, K; Mendoza, C y Carrero, S. 2008. Efecto de extractos vegetales de *Polygonum hydropiperoides*, *Solanum nigrum* y *Calliandra pittieri* sobre el gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*). *Agronomía Colombiana*. Vol 26(3), pp 427-434.
- Méndez, A y González, Y. 2014. Plagas asociadas al cultivo del maíz (*Zea mays* L.) en un área del estado Aragua, Venezuela. *Fitosanidad*. Vol 18(1), pp 175-179.
- Moreira F; Moreira F; Siqueira J; Henrique R; Barbosa H y Carbone M. 2017. Arbuscular mycorrhizal fungi and colonization stimulant in cotton and maize. *Ciencia Rural*, Santa Maria. Vol 47(6).
- Nájera, M. García, M. Crocker, R. Hernández, V y Rodríguez, L. 2005. Virulencia de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, nativos del occidente de México, contra larvas de tercer estadio de *Phytophaga crinita* (coleóptera: melolonthidae) bajo condiciones de laboratorio. *Fitosanidad*. Vol 9 (1), pp 1-8.
- Orions, C. Gómez, S y Korpita T. 2017. Does mycorrhizal status alter herbivore-induced changes in whole-plant resource partitioning. *AOB plants*, Vol 10 (1), pp
- Reyes, A; Quiñones, E; Enríquez, G y López, L. 2016. Micorrización en *Capsicum annum* para la promoción de crecimiento y bioprotección contra *Phytophthora capsici*. *Revista mexicana de ciencias agrícolas* Vol, 7 (4), pp 857-870.
- Vannette, R y Hunter, M. 2009. Mycorrhizal fungi as mediators of defence against insect pests in agricultural systems. *Agricultural and Forest Entomology*. Vol 11(4), pp 351-358

- Villa, M y Catalán, V.2004. Determinación de estadios larvales de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) para la construcción de un modelo de predicción. *Entomológica Mexicana*. Vol 43 (3), pp. 307-312.
- Xiaoying C., Fengbin S., Fulai L., Chunjie T., Shengqun L., Hongwen X., y Xiancan Z. 2014. Effect of different arbuscular mycorrhizal fungi on growth and physiology of maize at ambient and low temperature regimes. *The Scientific World Journal*.
- Yooyongwech, S. Chan-um, S. Tisarum, R. Therawitaya, C. Samphumphung, T. Aumtong, S. kingkaew, J y Phisalaphong M. 2017. Article Influence of Different Encapsulation Types of Arbuscular Mycorrhizal Fungi on Physiological Adaptation and Growth Promotion of Maize (*Zea mays* L.) Subjected to Water Deficit. *ot Bot Horti Agrobo*. Vol 47(1), pp 213-220
- Wu, S. Cao, Z. Li, Z. Cheung, K.y Wong, M. 2005. Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: a greenhouse trial. Vol 125, pp 155-166
- Wamberg, C. Christensen, S. Takobsen, I. 2003. Interaction between foliar-feeding insects, mycorrhizal fungi, and rhizosphere protozoa on pea plants. *Pedobiologia*. Vol 47(1), pp 281–287.

## **6.2. Capítulo 2: Evaluación de la patogenicidad de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre larvas de gusano cogollero**

### **6.2.1. Resumen**

El gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*) es una plaga que afecta principalmente a el cultivo de maíz y provoca grandes pérdidas en la producción. En la búsqueda de alternativas para controlar esta plaga se realizó un experimento unifactorial donde se evaluó la patogenicidad de dos hongos entomopatógenos; seis cepas de *Beauveria bassiana*, tres de *Metarhizium anisopliae*; y un testigo (sin tratar) ante *Spodoptera frugiperda*, de cada tratamiento se hicieron 4 repeticiones con seis larvas cada una, donde se registró la mortalidad de las larvas. El experimento se realizó en condiciones controladas (T 25°C y HR de 60%). Larvas de gusano cogollero en segundo instar se inocularon por inmersión en una solución  $1 \times 10^7$  conidios/mL de la cepa correspondiente, las larvas testigo se sumergieron en Tween al 0.05%. Posteriormente se individualizaron en cavidades de cajas plásticas, donde se les colocó dieta artificial. Después de 24 h se comenzó el registró de mortalidad hasta el día seis después de la inoculación. Los datos obtenidos se analizaron con el análisis de varianza (Anova) y la comparación de medias Tukey ( $p \leq 0.05$ ), Los resultados mostraron que a los seis días después de la inoculación todas las cepas de hongos entomopatógenos causaron la mortalidad de larvas, las cepas de *Beauveria bassiana* provocaron la mortalidad del 58% de las larvas, las cepas *Metarhizium anisopliae* tuvieron un 51% en mortalidad, la cepa BbP2 de *Beauveria bassiana* fue la más patogénica al causar el 100% de mortalidad. Estos resultados demuestran la capacidad de *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* en el biocontrol del gusano cogollero en condiciones controladas.

### 6.2.2. Abstract

Headworm (*Spodoptera frugiperda*) is a pest that mainly affects maize cultivation and causes large production losses. In the search for alternatives to control this plague, a unifactorial experiment was carried out to evaluate the pathogenicity of two entomopathogenic fungi; six strains of *Beauveria bassiana*, three of *Metarhizium anisopliae*; and one control (untreated) against *Spodoptera frugiperda*. For each treatment, 4 repetitions were made with six larvae each, where the mortality of the larvae was recorded. The experiment was carried out under controlled conditions (T 25°C and 60% RH). The second instar worm larvae were inoculated by immersion in a  $1 \times 10^7$  conidia/mL solution of the corresponding strain, the control larvae in Tween at 0.05%. Later they were individualized in plastic box cavities, where they were placed on an artificial diet. After 24 hours, mortality was recorded until the sixth day after inoculation. The obtained data were analyzed with the analysis of variance (Anova) and the comparison of means Tukey ( $p \leq 0.05$ ). The results showed that six days after inoculation all strains of entomopathogenic fungi caused larval mortality, *Beauveria bassiana* strains caused 58% mortality of larvae, *Metarhizium anisopliae* strains had 51% mortality, *Beauveria bassiana* strain BbP2 was the most pathogenic causing 100% mortality. These results demonstrate the ability of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* to biocontrol the headworm under controlled conditions.

### 6.2.3. Introducción

Una plaga de gran importancia económica en el cultivo de maíz es *Spodoptera frugiperda* (Zenner, 2017). Es conocido como gusano cogollero por su alimentación del cogollo del maíz, y puede infestar a la planta en cualquier etapa fenológica (Camuz, 2010). Esta plaga puede llegar a provocar pérdidas en el rendimiento de hasta del 60%. Esta plaga además de alimentarse de maíz lo puede hacer de más de 186 especies vegetales (Helberg, 2009).

El uso de productos químicos para su control es una práctica común, en ocasiones sin resultados por la presencia de altas poblaciones de insectos (Zenner, 2017) y/o por la resistencia a los insecticidas (Lizarazo, 2008). En la actualidad se usan métodos de control alternos al químico como el trapeo masivo con feromonas (Vilaseca *et al.*, 2008), el uso de la tecnología de los maíces transgénicos con la incorporación de las toxinas de *Bacillus thuringiensis* (Zenner, 2017). Además, los agentes de control biológico como los hongos entomopatógenos han adquirido gran importancia en el control microbiano de insectos plaga en diferentes cultivos agrícolas (Pelliza *et al.*, 2017).

Se han descrito 750 especies de hongos entomopatógenos (Téllez, 2009). Los géneros de *Paecilomyces*, *Lecanicillium*, *Aschersonia*, *Beauveria* y *Metarhizium* son los más utilizados en experimentos de laboratorio y de campo con resultados satisfactorios (Ruiz *et al.*, 2009). Los géneros de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* han sido usados exitosamente en varias especies de insectos, en parte por su fácil producción masiva y aplicación (Garza *et al.*, 2011; Acevedo, 2014). En larvas de *S. frugiperda* se han probado los hongos entomopatógenos, sin embargo, se han observado variaciones en la efectividad de los hongos. Estas variaciones se deben a las cepas utilizadas en los estudios, por lo cual, en el presente trabajo se evaluó la patogenicidad de aislamientos de diferente origen de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre larvas de *S. frugiperda*.

#### **6.2.4. Materiales y métodos**

El experimento se desarrolló en el laboratorio de Biotecnología Vegetal del CIATEJ unidad Zapopan, en condiciones controladas de humedad y temperatura (60% y 25°C).

Para el desarrollo del experimento se utilizaron larvas de gusano cogollero en segundo instar y dos géneros de hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*.

#### **Material biológico**

Las cepas de hongos entomopatógenos utilizadas en este experimento se obtuvieron del cepario de hongos entomopatógenos de la Unidad de Biotecnología Vegetal del CIATEJ (Cuadro 1). Por su parte las larvas de *Spodoptera frugiperda* fueron obtenidas del pie de creía que se estableció en el laboratorio de biotecnología vegetal del CIATEJ Zapopan.

**Cuadro 3.** Detalles del origen de los aislamientos utilizados en las pruebas de patogenicidad de *Spodoptera frugiperda*.

Código tesis	Código cepario	Especie	Origen	Plantas asociadas	Localidad
PIV	BV-HE-01	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Aislado de una larva de <i>Phyllophaga vetula</i>	Maíz	Cantabria, Zacapu, Michoacán
Met maíz	BV-HE-02	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Aislado de suelo de por el método de insecto trampa utilizando una <i>Galleria mellonella</i>	Maíz	Bosque de la primavera, Zapopan, Jalisco
Mr	BV-HE-03	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Aislado de <i>Phyllophaga anxia</i> , cepa de referencia de ARSEF 2134		Southern Canada, Canada
BbP3	BV-HE-05	<i>Beauveria bassiana</i>	Aislado de suelo de por el método de insecto trampa utilizando una <i>Galleria mellonella</i>	Agave	Zitzio, Michoacán
ACP	BV-HE-06	<i>Beauveria bassiana</i>	Aislado de suelo de por el método de insecto trampa utilizando una <i>Galleria mellonella</i>	Agave	Amatitan, Jalisco
BbS	BV-HE-07	<i>Beauveria bassiana</i>	Aislado de suelo de por el método de insecto trampa utilizando una <i>Galleria mellonella</i>	Salvia	Bosque de la primavera, Zapopan, Jalisco
Bb maíz	BV-HE-08	<i>Beauveria bassiana</i>	Aislado de suelo de por el método de insecto trampa utilizando una <i>Galleria mellonella</i>	maiz	Bosque de la primavera, Zapopan, Jalisco
BbP2	BV-HE-09	<i>Beauveria bassiana</i>	Aislado de suelo de por el método de insecto trampa	Agave	Zitzio, Michoacán

			utilizando una <i>Galleria mellonella</i>		
<b>BbQ</b>	BV-HE-10	<i>Beauveria bassiana</i>	Aislado de suelo de por el método de insecto trampa utilizando una <i>Galleria mellonella</i>	Quercus	Bosque de la primavera, Zapopan, Jalisco

### Diseño experimental

El experimento unifactorial compuesto por 10 tratamientos, tres tratamientos para el género de *Metarhizium anisopliae* y seis para el género de *Beauveria bassiana* (cuadro 3). Cada tratamiento se repitió cuatro veces. Cada repetición se formó por 6 larvas de *Spodoptera*. La unidad experimental fueron las larvas de segundo instar.

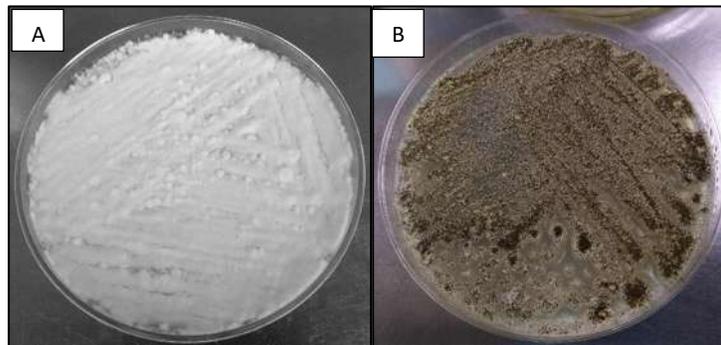
**Cuadro 4.** Cuadro de tratamientos de hongos entomopatógenos.

Especie de hongo entomopatógeno	Clave de la cepa	Tratamiento
Sin Hongo	Tween 0.05% (testigo)	1
<i>Metarhizium anisopliae</i>	MR	2
	PIV	3
	Met. maíz	4
<i>Beauveria bassiana</i>	Bb maíz	5
	ACP	6
	Bb P2	7
	Bb Q	8
	SBb	9
	Bb P3	10

## Propagación de hongos entomopatógenos

Los hongos se propagaron en cajas Petri con medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) ( $39 \text{ gL}^{-1}$ ) enriquecido con levadura ( $2 \text{ gL}^{-1}$ ), utilizando 15 cajas por tratamiento.

La siembra se realizó dentro de campana de flujo laminar a partir de una cepa purificada. Las cepas fueron sembradas por medio de la técnica de estria, rayando toda la superficie de las cajas con un asa para siembra de microorganismos. Después de la siembra las cajas fueron llevadas a incubadora a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Dentro de la incubadora las cajas permanecieron por 20 días, tiempo suficiente para el crecimiento de conidios (Figura. 8).



**Figura 8.** Crecimiento de *Beauveria bassiana* (A) y *Metarhizium anisopliae* (B) después de 20 días de incubación.

## Preparación de inóculos

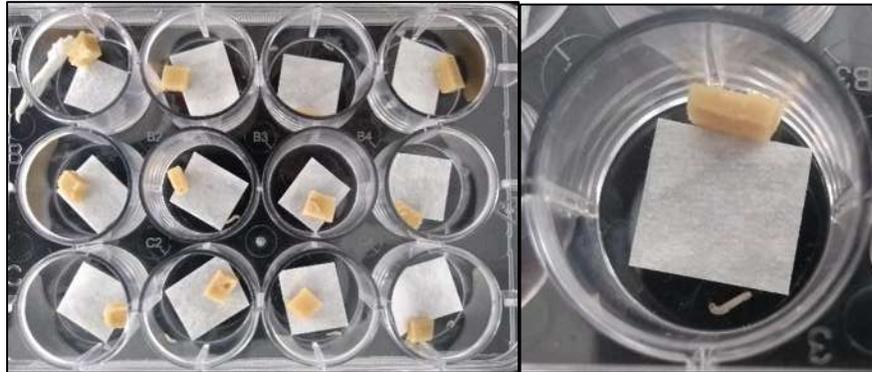
Las suspensiones de conidios de *Beauveria* y *Metarhizium* se prepararon dentro de una campana de flujo laminar. Los conidios se retiraron de las cajas Petri, raspando sobre la superficie de la caja con un bisturí. Los conidios se depositaron en tubos de fondo cónico Falcon de 50 mL con 30 mL de Tween 80 al 0.05%, colocando en cada tubo una cepa diferente de los hongos. Después los tubos se agitaron en Vortex por 5 minutos para separar los conidios y homogeneizar la suspensión.

Después se filtraron con gasa a otros tubos, obteniendo diferentes suspensiones de conidios.

De cada filtrado se tomaron 10  $\mu\text{L}$  y se depositaron en un tubo de fondo cónico de un mL con 990  $\mu\text{L}$  de Tween 80 al 0.05%, obteniendo una suspensión de  $1 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$  de conidios. El conteo de conidios se realizó a partir de suspensión de  $1 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$  de conidios en cámara de Neubauer. Para realizar el conteo se depositaron 10  $\mu\text{L}$  en cada rejilla de la cámara de Neubauer, se contaron los conidios de 5 cinco cuadrados de .20 mm ubicados en el cuadro central de la cámara. Al conocer la concentración de conidios que se obtuvo por cada tubo, correspondiente cada uno a una cepa. Se procedió a ajustar las suspensiones de conidios a una concentración de  $1 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ .

### **Inoculación en larvas**

La inoculación se realizó en larvas de segundo instar, usando un método de inmersión. Las larvas fueron sumergidas en 20 mL de suspensión de conidios de  $1 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$  dentro de vasos estériles de 1 onza por 10 segundos. A las larvas se les retiró el exceso de la suspensión de inóculo con papel toalla de manos estéril. Posterior a esto fueron individualizadas en una cavidad de una caja de plástico de 12 cavidades (Figura. 9) pasando las larvas con pinzas. Dentro de cada cavidad se colocó una pieza de papel filtro humedecido con 100  $\mu\text{L}$  de agua destilada estéril. Durante los siguientes 10 días siguientes a la inoculación las larvas permanecieron en una cámara de incubación a 25°C. Durante el transcurso del experimento se alimentaba y limpiaba el espacio de la larva. La alimentación se realizaba mediante una porción de dieta artificial (Anexo 1).



**Figura. 9.** Larvas de *Spodoptera frugiperda* de segundo instar inoculadas con hongos entomopatógenos.

## Mediciones

### Mortalidad

A partir del día siguiente a la inoculación se realizó la observación y conteo de larvas muertas. Para comprobar que la larva estuviera muerta se presionaba con un objeto punzante sobre la larva, si no se movía estaba muerta. Las observaciones se realizaron por 10 días hasta que las larvas pasaron a su etapa de pupa. La mortalidad por hongos entomopatógenos solo se consideró en aquellas larvas inoculadas que presentaron los síntomas característicos de los hongos entomopatógenos, como la pérdida de apetito y movilidad, así como la presencia de conidios sobre el cuerpo momificado.

Para determinar el porcentaje de mortalidad se utilizó la siguiente fórmula.

$$\% \text{ de mortalidad} = \frac{((100)(LM))}{TL}$$

**Donde**

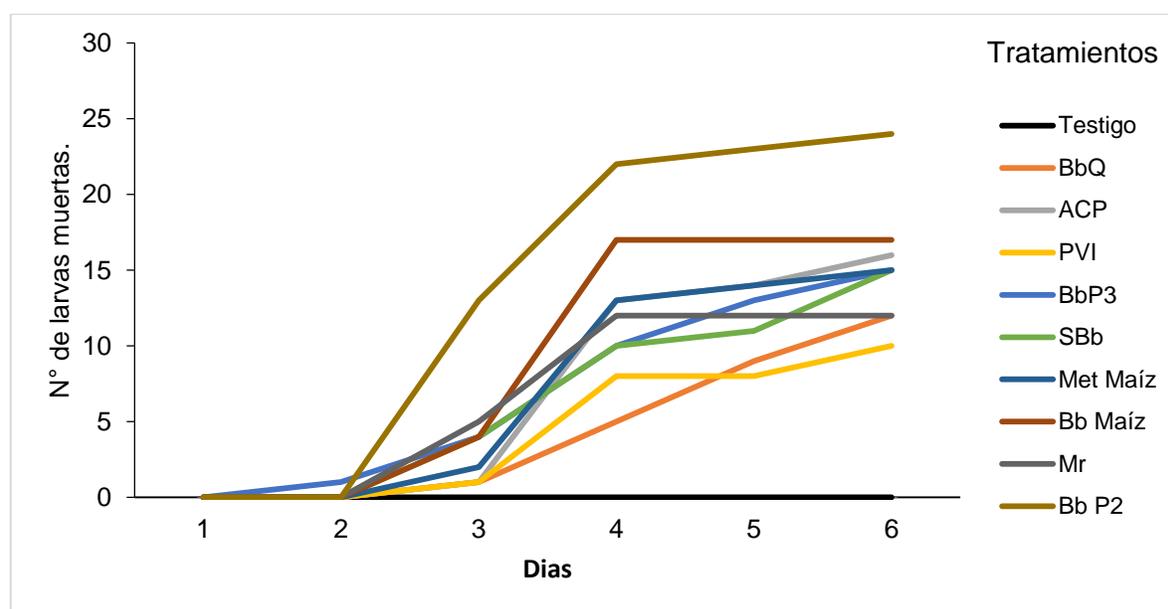
**LM=** Larvas muertas

TL= Total de larvas por repetición.

## 6.2.5. Resultados y discusión

### Progreso de mortalidad

La presencia de larvas muertas se observó a partir del día después de la inoculación para la cepa BbP3 del género de *Beauveria bassiana* (Figura. 10). El resto de las cepas comenzaron a causar mortalidad en las larvas a partir del día tres posterior a la inoculación, para el día seis posterior a la inoculación solo la cepa de BbP2 causó mortalidad en las 24 larvas inoculadas.

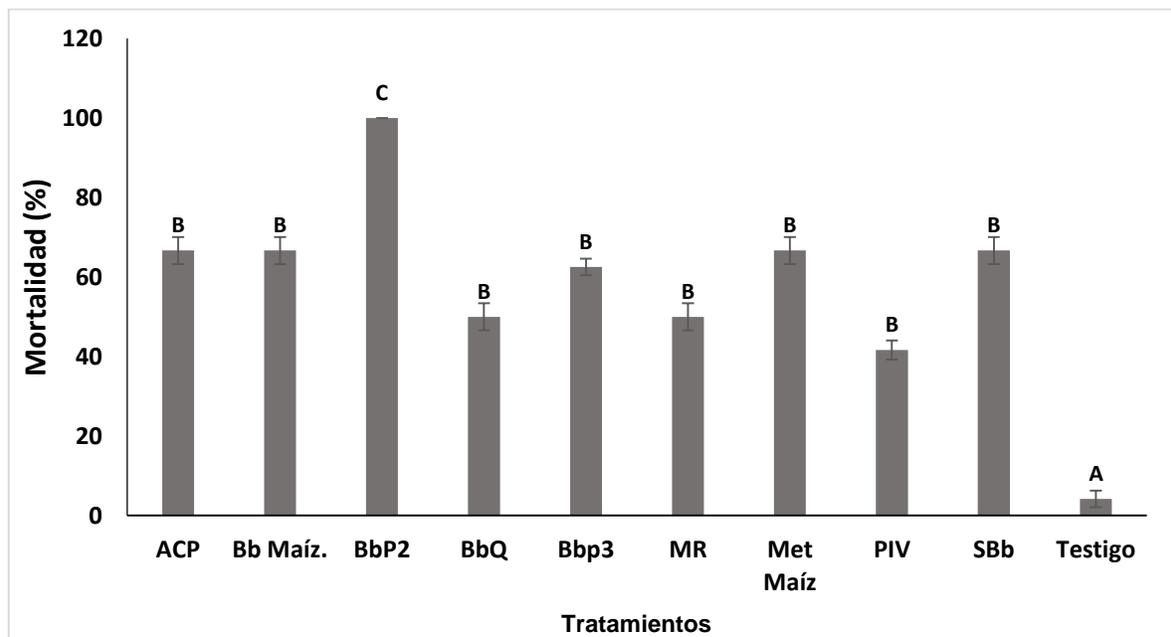


**Figura 10:** Progreso de mortalidad de larvas de gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*), después de la inoculación con *Beauveria bassiana* (BbQ, ACP, BbP3, SBb, Bb maíz, y BbP2) y *Metarhizium anisopliae* (PIV, Met Maíz y Mr).

Las nueve cepas de hongos entomopatógenos causaron patogenicidad en las larvas de *Spodoptera frugiperda*. Algunas cepas con una virulencia mayor que otras

(Figura 11). A partir del segundo día de la inoculación, algunas larvas empezaron a mostrar falta de movilidad, así como pérdida de apetito. La mortalidad en las larvas comenzó a presentarse al tercer día después de la inoculación en porcentajes menores del 20 %, a excepción de la cepa BbP3 que presentó mortalidad a partir del día dos posterior a la inoculación.

La evaluación de mortalidad se realizó hasta el día 6 posterior a la inoculación, ya que en este momento fue el día en que la cepa de *Beauveria bassiana* BbP2 alcanzó el 100% de mortalidad siendo más patogénica sobre *Spodoptera frugiperda* que el resto de las cepas ya que presentaron de manera general un porcentaje de mortalidad comprendido entre el 50 y 70 % (Figura. 11).



**Figura 11:** Porcentaje de mortalidad de larvas gusano cogollero a los seis días después de la inoculación con hongos entomopatógenos. Cepas de *Beauveria bassiana* (ACP, Bb Maíz, Bb P2, BbQ, Bb p3 y SBb), cepas de *Metarhizium anisopliae* (Met Maíz, PIV y MR). Letras diferentes sobre barras indican diferencia significativa entre medias ( $P < 0.05$ ). Línea sobre barras indican error estándar. Línea sobre las barras indican el error estándar, Prueba de Tukey al 95%.

El análisis de varianza mostró diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos. Las cepas de ACP, Bb Maíz, BbQ, Bb p3 y SBb de *Beauveria bassiana* tuvieron en

promedio 58 % de mortalidad. De acuerdo a la prueba de Tukey, no existió diferencia significativa entre estos. El tratamiento estadísticamente diferente respecto a ACP, Bb Maíz, BbQ, Bb p3 y SBb fue el BbP2 perteneciente a *Beauveria bassiana* con un porcentaje del 100% de mortalidad.

La patogenicidad de *Beauveria bassiana* ya se ha aportado en otros trabajos con lepidópteros y con diferentes concentraciones de conidios. García *et al.* (2011) encontraron una mortalidad del 96.6% con *Beauveria bassiana* en *Spodoptera frugiperda* a los tres días post-infección, con una concentración de  $1 \times 10^9$  conidios/mL de la cepa Bb42, aislada de *Spodoptera frugiperda* en campo. Malpartida *et al.* (2013), reportaron una mortalidad en *Dione juno* del 60% al quinto día después de la inoculación con *Beauveria bassiana* de una cepa comercial a una concentración de  $1 \times 10^7$  mL<sup>-1</sup> conidios/mL. En el presente trabajo, se encontró que con una concentración de  $1 \times 10^7$  conidios/mL una mortalidad del 100 % a los seis días después de inocular las larvas del segundo instar de *Spodoptera frugiperda*

Las cepas de *Metarhizium* Met Maíz, PIV y MR causaron un rango de mortalidad comprendido entre el 41.66 a 62.5%. La cepa Met maíz aislada de suelo presentó la mortalidad más alta, pero no estadísticamente diferente respecto a PIV y MR. En otros trabajos realizados se ha reportado una mayor mortalidad por *Metarhizium anisopliae*, por ejemplo, García *et al.* (2011), encontraron que la cepa Ma91 de *Metarhizium anisopliae* aislada de *S. frugiperda* provocó una mortalidad del 78.6%. Amaro *et al.* (2017) reportan el 72.5 % de mortalidad con una especie nativa de *M. anisopliae* a las 72 horas posteriores a la inoculación. Este resultado es similar al que se obtuvo con la cepa Met Maíz del experimento realizado.

Los resultados obtenidos indican que las cepas de hongos entomopatógenos tienen un efecto patogénico en larvas de gusano cogollero de segundo instar. Si bien algunas cepas resultaron ser mejores que otras en cuanto a su patogenicidad y por ende en mortalidad entre los individuos evaluados. Se desconocen el motivo de la variación de mortalidad por cepas. Es probable que los mecanismos de defensa del insecto sean un factor a considerar. La muda es un mecanismo que sirve para eliminar agentes patógenos que se encuentran sobre la superficie del insecto

(García *et al.*, 2011). Además la cutícula representa una barrera física y química ante hongos entomopatógenos ya que está compuesta por grasas, ceras, lipoproteínas, quitina y diversas proteínas estructurales que proporcionan rigidez. La presencia de ácidos grasos de cadena corta y lípidos que inhiben la germinación de las esporas de los hongos (Téllez *et al.*, 2009).

Srisukchayakul *et al.* (2005) sugieren otros factores como el grado de asociación entre hongo e insecto. Ellos sugieren que la asociación depende del tipo de insecto huésped. Dependiendo de la especie depende el nivel de susceptibilidad y/o agresividad del hongo entomopatógeno. El origen de la cepa es otro factor a considerar, se ha observado que el origen del aislamiento repercute directamente en la virulencia sobre los insectos (Srisukchayakul *et al.*, 2005).

#### **6.2.6. Conclusión**

Las cepas evaluadas de los dos géneros de hongos entomopatógenos mostraron ser patogénicas para el gusano cogollero en segundo instar. De las nueve cepas evaluadas solo BbP2 de *Beauveria bassiana* fue la más patogénica. Esta cepa alcanzó el 100% de mortalidad a los seis días de la inoculación. El resto de las cepas no superaron el 65% de mortalidad con la inoculación a una concentración de  $1 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$  conidios/mL. Para las cepas de *Metarhizium* la Met maíz fue la que causó mayor porcentaje de mortalidad cercano al 72.5%.

## Bibliografía

- Amaro, L. Parraguirre, C. Romero, O, Rivera, J y Sánchez, P. 2017. Evaluación de mortalidad de gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda* L.) con el uso de *Metarhizium anisopliae* in vitro.
- Cazmuz, A. Juárez, M. Murua, M. Prieto, S. Medina, S. Willink, E y Gastamiza, E. 2010. Revisión de los hospederos del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Rev. Soc. Entomol. Argent. Vol 69 (3), pp 209-231
- García, C; Gonzáles, M y Bautista, N. 2011. Patogenicidad de aislamientos de hongos entomopatógenos contra *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) y *Epilachna varivestis* (Coleoptera: Coccinellidae). Revista Colombiana de Entomología 37 (2).
- Garza, P; Konigsberg, M; Saucedo, G; Loera, O. 2011. Perfiles diferenciales de *Beauveria bassiana* (bals.-criv.) Vuill. En respuesta al co2 producción de conidios y amilasas. Agrociencia.
- Helberg, M y Ingeborg, Z. 2009. Evaluación de dietas medicas para la cria en laboratorii de *Spodoptera frugiperda* (J.E Smitth) (Lepidoptera noctoidae). U:D:C:A: Vol, 12(1), pp 79-90.
- Lizarazo, K; Mendoza, C y Carrero, S. 2008. Efecto de extractos vegetales de *Polygonum hydropiperoides*, *Solanum nigrum* y *Calliandra pittieri* sobre el gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*). Agronomía Colombiana. Vol 26 (3), pp 427-434.
- Malpartida, J; Narrea, M y Dale W. 2013. Patogenicidad de *beauveria bassiana* (bals) vuill., sobre el gusano defoliador del maracuyá *dione junno* (cramer) (lepidoptera: nymphalidae) en laboratorio. Ecología Aplicada, 12(2). Departamento Académico de Biología, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima – Perú.
- Pelizza, S. Mariottini, Y. Russo, L. Vianna, F. Scorsetti, A y Lange, C. 2017. *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) Introduced as an endophyte in corn Plants and Its effects on consumption, reproductive capacity, and food

preference of *Dichroplus maculipennis* (Orthoptera: Acrididae: Melanoplinae).  
Journal of insect science. Vol. 17(2), pp 1-6.

Ruiz, E; Rosado, A; Chan, W; Cristóbal, J y Munguía, R. 2009. Patogenicidad de *Beauveria bassiana* (bals.) Vuillemin sobre estados inmaduros de mosquita blanca (*Bemisia tabaci genn.*). Fito sanidad, 13: 89-93.

Téllez, A; Cruz, G; Mercado, Y; Asaff, A; Arana, A. 2009. Mecanismo de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. Revista mexicana de micología.

Zenner, I; Arevalo, H y Mejia R. 2007. El gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) y algunas plantas transgénicas. Revista colombiana de ciencias hortícolas - Vol. 1 - No.1 - pp. 103-113.

### **6.3. Capítulo 3: Evaluación de la capacidad endófito de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre plantas de maíz híbrido**

#### **6.3.1 Resumen**

El objetivo del presente trabajo fue, evaluar la interacción endófito de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en el maíz híbrido DK-2052. El experimento se desarrolló en laboratorio, llevando a cabo dos ensayos con variaciones en la metodología. Se evaluaron seis cepas de *Beauveria bassiana* y tres de *Metarhizium anisopliae*. Se utilizaron plantas de maíz del híbrido DK-2052, las semillas de maíz fueron previamente desinfectadas y germinadas para luego ser trasplantadas en bolsas y charolas con .5 kg de sustrato estéril compuesto de suelo y arena. A los 15 días del trasplante, se realizó la inoculación al follaje y raíz con una suspensión de conidios de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* a una concentración  $1 \times 10^8$  conidios/mL. Después de la inoculación las plantas se cubrieron con bolsas de plástico y se llevaron a una cámara de crecimiento aclimatada con 25°C . A los 15 días posteriores a la inoculación, se realizó un muestreo de tejido vegetal (tallo, hoja y raíz). Pedazos de tejido vegetal desinfectados fueron colocados en cajas Petri con medio de cultivo PDA con antibióticos para comprobar la presencia de los endófitos. Los datos obtenidos se analizaron mediante el análisis de varianza (Anova) y comparación de medias de acuerdo a la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ). Se encontró presencia de ambos hongos endófitos sólo en la parte aérea de tallo y hoja de la planta, con porcentajes de colonización inferiores al 27%. *Beauveria bassiana* fue el hongo que más porcentaje de colonización alcanzó respecto a *Metarhizium anisopliae*.

#### **6.3.2. Abstract**

The objective of the present work was to evaluate the endophyte interaction of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in the hybrid maize DK-2052. The experiment was developed in the laboratory, carrying out two tests with variations in the methodology. Six strains of *Beauveria bassiana*

and three strains of *Metarhizium anisopliae* were evaluated. We used DK-2052 hybrid corn plants, the corn seeds were previously disinfected and germinated and then transplanted into bags and trays with .5 kg of sterile substrate composed of soil and sand. 15 days after transplant, inoculation to foliage and root was performed with a suspension of conidia of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* at a concentration of  $1 \times 10^8$  conidia/mL. After inoculation the plants were covered with plastic bags and taken to an acclimated growth chamber at 25°C. Within 15 days of inoculation, plant tissue (stem, leaf and root) was sampled. Disinfected pieces of plant tissue were placed in Petri boxes with antibiotic PDA culture medium to check for the presence of endophytes. The data obtained were analyzed by analysis of variance (Anova) and comparison of means according to Tukey's test ( $P \leq 0.05$ ). Both endophytic fungi were found only in the aerial part of the stem and leaf of the plant with a colonization range of 2 to 27% of colonization. *Beauveria bassiana* was the fungus that reached the highest percentage of colonization with respect to *Metarhizium anisopliae*. The Bb Q strain of *B. bassiana* was the most colonized, reaching 27% in leaf and 24% in stem on the other hand the strain of *M. Anisopliae* Met corn was able to colonize in leaf 17% and 7% in stem.

### **6.3.3. Introducción**

Los endófitos están presentes en la mayoría de especies vegetales, hasta el momento en todas las especies vegetales estudiadas se ha reportado por lo menos un endófito y en algunas son altamente diversos (Yan *et al.*, 2015; Vega, 2018). La asociación entre plantas y endófitos da como resultado beneficios mutuos (Van *et al.*, 2015; Méndez, 2019). En las plantas los beneficios que obtienen por la asociación con un endófito es la resistencia a estrés por factores bióticos y abióticos, protección contra enfermedades y/o plagas y promoción de crecimiento (Kusari *et al.*, 2012; Arias, 2013; Vega, 2018). Los endófitos obtienen de la planta protección y nutrientes necesarios para completar una parte o todo su ciclo de vida (Gamboa, 2006). Las formas en que los endófitos penetran en la planta son diferentes, puede ser por estomas, por heridas o daños mecánicos, por vectores como insectos o en

las partes de crecimiento de la zona radicular. La infección de endófitos se ha logrado mediante diferentes técnicas de inoculación como aspersión en hoja, inmersión de raíz, inmersión de semilla, inyección de tallo e inoculación de suelo (Russo, 2015).

Los hongos endófitos (HE) son de los más estudiados sobre todo en pastos tropicales, encontrando gran diversidad de estos en una sola especie vegetal. En maíz, se han aislado diferentes HE. Fisher *et al.* (2015) reportaron 23 especies de hongos endófitos mientras que Araujo *et al.* (2000), obtuvieron 53 aislamientos en su mayoría de ascomicetos. *Metarhizium* y *Beauveria* son dos géneros de hongos entomopatógenos, usados principalmente en control biológico de plagas y que en los últimos años se ha estudiado su potencial como endófitos (Felber y Alancar, 2013). Se han encontrado en interacción endófitas en cultivos como chile, frijol, café (Bamisile *et al.*, 2018). El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de nueve cepas de hongos entomopatógenos de los géneros de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* como endófitos en un cultivar de maíz híbrido DK2052.

#### **6.3.4. Materiales y métodos**

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Biotecnología Vegetal del CIATEJ unidad Zapopan. Se evaluaron nueve cepas de hongos entomopatógenos (Tabla 1). Seis de *Beauveria bassiana* y tres de *Metarhizium anisopliae* en plantas de maíz híbrido DK-2052. Esta especie de ciclo vegetativo intermedio, con una media de crecimiento de 2.5 m, con 70 días a floración y 170 a cosecha. Con tolerancia a acame y pudrición de tallo.

Este experimento contó con dos ensayos los cuales fueron sometidos a diferentes métodos y condiciones para determinar que metodología más apropiada para establecer una relación endófitas de los hongos entomopatógenos con la planta.

## Diseño experimental

### Experimento 1

El diseño experimental fue completamente al azar, con 10 tratamientos (Cuadro 4) cada uno formados por cinco unidades experimentales. La unidad experimental fue una planta de maíz cultivada en bolsa color negro de que característica ½ kg de capacidad.

### Experimento 2

El diseño experimental fue completamente al azar, con nueve tratamientos cada uno formados por tres unidades experimentales. La unidad experimental se compuso de una planta de maíz cultivada en una charola de unicel color blanco de ½ kg de capacidad.

**Cuadro 5.** Tratamientos para los dos ensayos de endofitismo de *B. bassiana* y *M. anisopliae*.

Especie de hongo entomopatógeno	Clave de la cepa	Tratamiento
Sin Hongo	Tween 0.05% (testigo)	1
<i>Metarhizium</i>	MR	2
	PIV	3
	Met. maíz	4
<i>Beauveria bassiana</i>	Bb maíz	5
	ACP	6
	Bb P2	7
	Bb Q	8
	SBb	9
	Bb P3	10

## **Metodología.**

### **Producción masiva de hongos entomopatógenos.**

El método de producción de conidios fue el mismo que se describió en el capítulo 2.

### **Germinación de semillas.**

#### **Experimento 1**

Las plantas se obtuvieron por germinación de semillas, usando la misma metodología descrita en el capítulo 1.

#### **Experimento 2**

Las semillas previo a la germinación fueron desinfectadas: primero se agitaron en Tween al 0.05% durante 4 minutos, seguido de 5 minutos en agitación en etanol al 70%, luego de 20 minutos en hipoclorito de sodio al 5% y finalmente tres enjuagues con agua destilada estéril. Las semillas se germinaron en papel absorbente estéril mediante la técnica de tacos, a una temperatura de 25°C durante 6 días.

### **Esterilización de sustrato.**

El método de esterilización del sustrato fue el mismo método que se describe en el capítulo 1. El método de esterilización fue el mismo para los dos experimentos. El sustrato utilizado fue una mezcla de suelo y arena fina en una proporción de 1:1.

## **Trasplante.**

### **Experimento 1.**

El trasplante se realizó una vez que se desarrolló el coleoptilo. Se realizó en invernadero en bolsas de plástico negras de ½ kg con sustrato de arena fina y suelo 1:1 estéril húmedo. Las plantas se conservaron en invernadero hasta alcanzar la etapa fenológica V1. Durante su etapa de invernadero las plantas se regaron cada tercer día aplicando en promedio 50 mL de agua destilada, de acuerdo al requerimiento hídrico de la planta.

### **Experimento 2.**

El trasplante se realizó dentro de una campana de flujo, para prevenir la contaminación por otros microorganismos presentes en el ambiente. Las plantas fueron trasplantadas a charolas de unicel de ½ kg con sustrato estéril húmedo. Después del trasplante las plantas se taparon con una bolsa plástica transparente y se llevaron a cámara de crecimiento. Las plantas permanecieron durante 15 días hasta alcanzar la etapa fenológica V1 en la cámara a 25°C. Los riegos durante este tiempo se realizaron con agua destilada estéril.

### **Preparación de la suspensión de inóculos.**

La preparación de la suspensión de conidios fue realizada de acuerdo a la metodología que se describe en el capítulo 2, ajustando las 9 suspensiones de conidios de hongos entomopatógenos de cada cepa utilizada a una concentración de  $1 \times 10^8$  conidios/mL.

### **Inoculación.**

La inoculación en las plantas se realizó a los 15 días después del trasplante, en la etapa fenológica V1. La inoculación con *Beauveria bassiana* se realizó al follaje,

asperjando completamente toda la superficie vegetal con un atomizador. Aplicando 5 mL de suspensión por planta. La inoculación con *Metarhizium anisopliae* se realizó al sistema radicular. Se aplicaron 10 mL de suspensión de esporas/conidios distribuidos en 3 orificios alrededor del cuello de la planta (base del tallo). El tratamiento testigo fue inoculado con una solución de Tween al 0.05%, aplicado al follaje y sistema radicular.

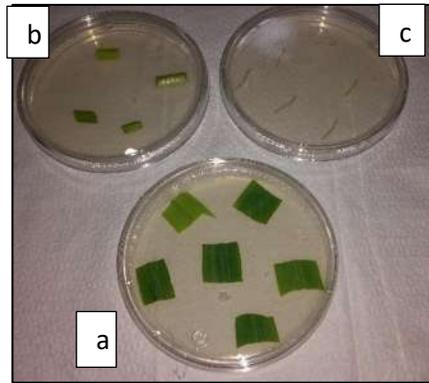
Después de la inoculación las plantas fueron tapadas individualmente con una bolsa de plástico transparente. Para conservar la humedad relativa alta y favorecer la supervivencia de los conidios. Después fueron llevadas a cámara de crecimiento a 25°C, por un periodo de 15 días. Durante esta etapa de crecimiento los riegos se realizaron cada tercer día con 30 ml de agua destilada estéril.

#### **Medio de cultivo para tejido vegetal.**

Se utilizó PDA (39 gL<sup>-1</sup>) como medio de cultivo enriquecido con levadura (2 gL<sup>-1</sup>). Se agregó 1 mL de un stock de antibióticos compuesto de Estreptomicina (200 mgL<sup>-1</sup>) penicilina (50 mgL<sup>-1</sup>) y Gentamicina (50 mgL<sup>-1</sup>) para prevenir la contaminación por bacterias.

#### **Siembra de tejido vegetal**

El tejido vegetal se sembró en cajas Petri con medio de cultivo PDA (Figura. 12), se realizó la siembra de diferentes partes vegetativas de las plantas de maíz como hojas tallo y raíz. En cada caja se colocaron 6 pedazos de tejido de un cm (Figura. 12). Por cada unidad experimental se sembraron 9 cajas Petri, tres por cada una de las partes de tejido sembrado.



**Figura 12.** Siembra de tejido vegetal Hoja (a), Tallo (b) y Raíz(c) de maíz híbrido en medio de cultivo PDA con antibióticos. Siembra realizada a los 15 días posteriores a la inoculación de los hongos entomopatógenos (*Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*).

La siembra se realizó en campana de flujo laminar para evitar contaminación. Antes de la siembra el tejido vegetativo fue desinfectado con etanol al 70% durante 2 min, en hipoclorito de sodio al 3% por cinco minutos y tres lavados con agua destilada estéril, finalmente se pusieron a secar por media hora.

Al final de la siembra las cajas fueron llevadas a cámara de incubación a 25°C por 20 días.

### **Variables analizadas.**

#### **Porcentaje de colonización endófito (%)**

Se midió 15 días después de la siembra del tejido vegetativo de la planta en medio de cultivo PDA. En las cajas Petri se buscó por observación visual la presencia de micelio y/o conidios de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. Para comprobar que la presencia fuera positiva se realizó la observación de estructuras fúngicas en microscopio. El porcentaje de colonización se tomó por cada parte de tejido vegetativo empleado (hoja, tallo y raíz). Usando la siguiente fórmula para determinar el porcentaje de colonización.

$$C = \frac{PC}{TPO} * 100$$

Donde

**C** = colonización endófitas

**PC**= Pedazos colonizados

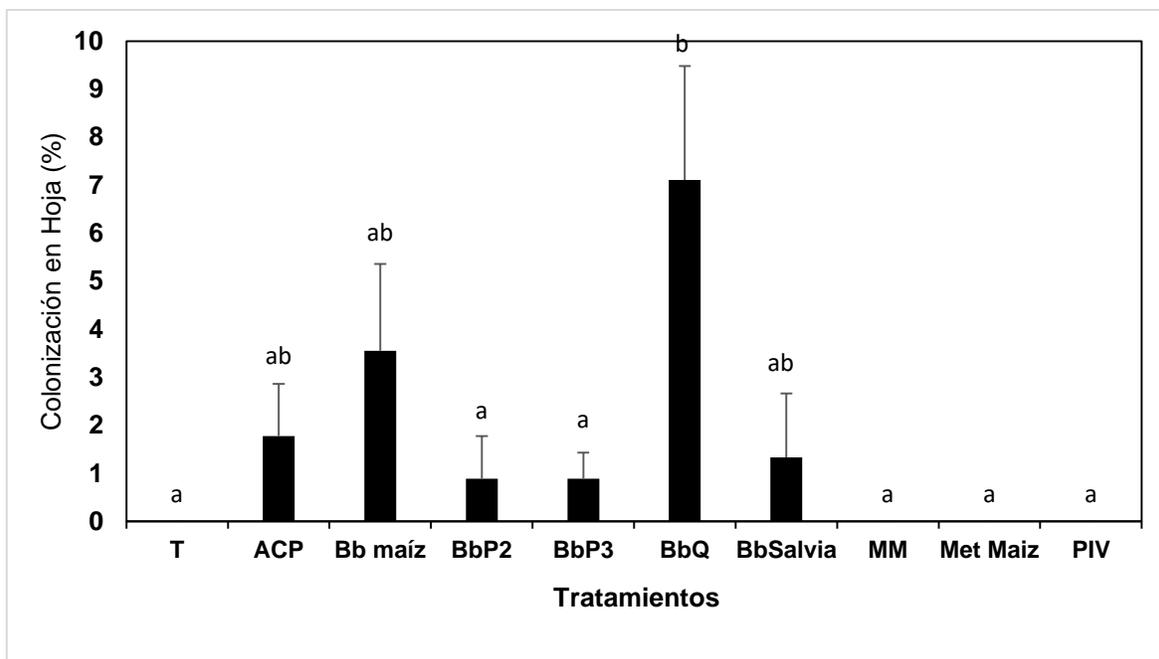
**TFO**= total de pedazos observados

### **6.3.5. Resultados y discusión**

#### **Experimento 1.**

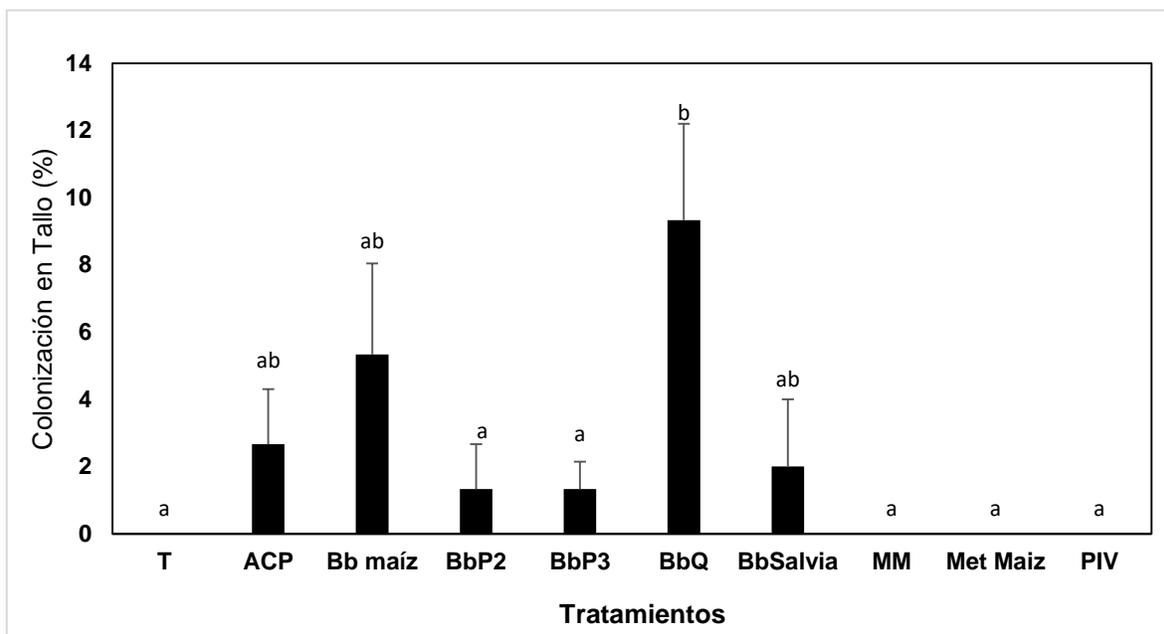
##### **Colonización endófitas en Hoja y tallo.**

De los dos géneros de hongos evaluados solo las seis cepas de *Beauveria bassiana* establecieron una relación endófitas en hoja (Figura. 13) y tallo (Figura. 14). Los porcentajes de colonización obtenidos a los 15 días después de la inoculación con los entomopatógenos, en general fueron bajos. La mayoría de los porcentajes fueron inferiores al 4% de colonización en tallo y hoja. Los porcentajes de colonización más altos se obtuvieron en los tratamientos de BbQ y Bb maíz en los tejidos de tallo y hoja. No hubo colonización en raíz para los géneros de hongos entomopatógenos.



**Figura 13.** Porcentaje de colonización endófitas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en hoja de maíz híbrido a los 15 días posteriores a la inoculación al follaje y raíz aplicando 5 y 10 mL respectivamente de suspensión de  $1 \times 10^8$  conidios/mL. Testigo (T), cepas de *Beauveria bassiana* (ACP, Bb Maíz, BbQ, Bb p3 y SBb), cepas de *Metarhizium anisopliae* (Met Maíz, PIV y MR). Letras diferentes sobre barras indican diferencia significativa entre medias ( $P < 0.05$ ), Prueba de Tukey al 95%.

La colonización en hoja presentó porcentajes de colonización inferiores a 8%. La cepa BbQ fue la única diferente estadísticamente respecto a las cepas de *Beauveria* Bb P2 y Bb P3 con un porcentaje de colonización de 7.1% en tejido vegetal de hojas. El resto de los tratamientos del género de *B. bassiana* el porcentaje de colonización se mantuvo entre el 0.8 y 3.5%. Los tratamientos del género de *Metarhizium anisopliae* no presentaron colonización.

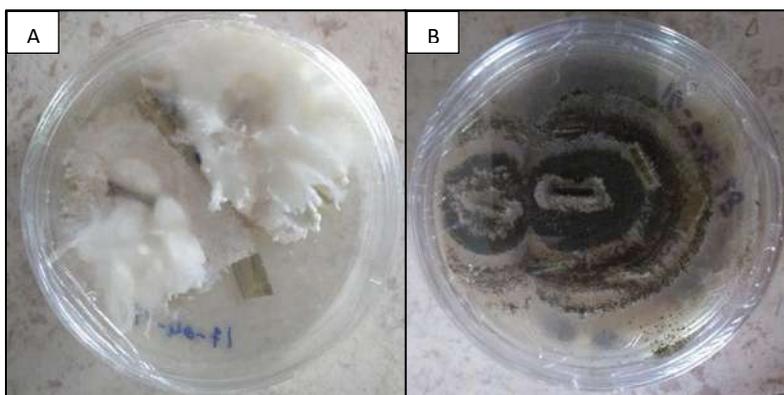


**Figura 14.** Porcentaje de colonización endófitas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en tallo de maíz híbrido a los 15 días posteriores a la inoculación foliar y en raíz aplicando 5 y 10 mL respectivamente de suspensión de  $1 \times 10^8$  conidios/mL. Testigo (T), cepas de *Beauveria bassiana* (ACP, Bb Maíz, BbQ, Bb p3 y SBb), cepas de *Metarhizium anisopliae* (Met Maíz, PIV y MR). Letras diferentes sobre barras indican diferencia significativa entre medias ( $P < 0.05$ ), Prueba de Tukey al 95%.

La colonización en tallo fue similar a la colonización de la hoja. La cepa BbQ obtuvo el mayor porcentaje de colonización en tallo con 9.3% siendo con un 4% de colonización más alto que la cepa de ACP la cual fue la segunda con el porcentaje de colonización más alto, seguida de la Bb maíz. BbQ presentó una diferencia de casi 8% de colonización con las cepas de *Beauveria* BbP2 y BbP3. Mientras que las cepas de *Metarhizium* la colonización fue del 0%.

## Experimento 2.

El endofitismo se presentó en los dos géneros de hongos entomopatógenos evaluados (Figura.15). Los hongos *Beauveria* y *Metarhizium* lograron colonizar tallo (Figura. 16) y hojas (Figura. 17). En la raíz la presencia de endofitismo de los hongos fue nula.

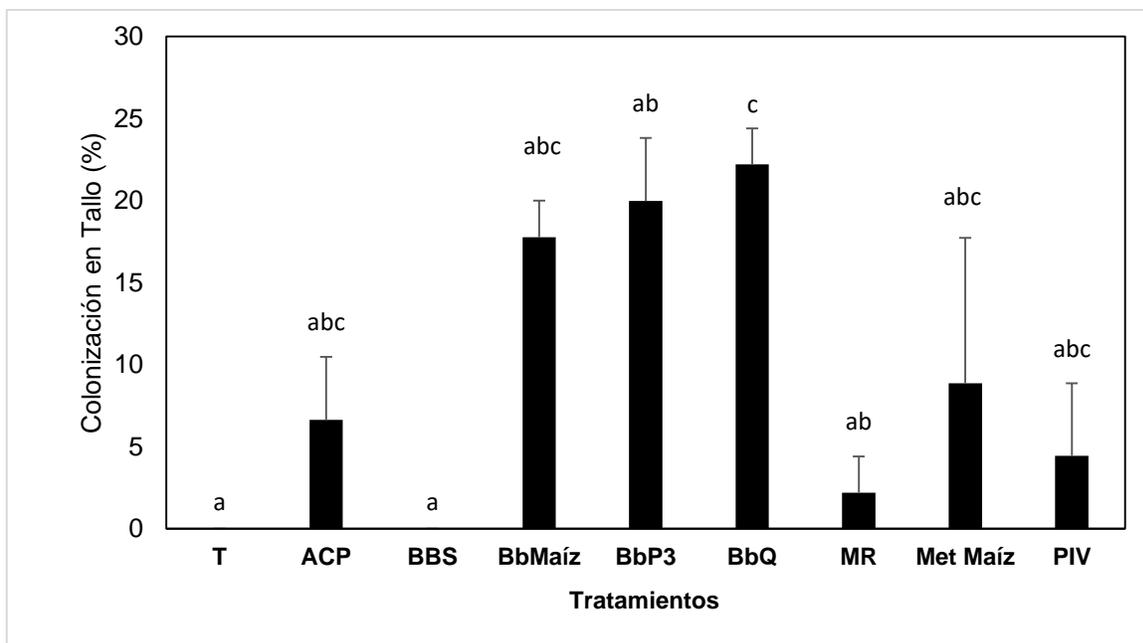


**Figura 15** Colonización endófitica de *B. bassiana* en hoja (A) y *M. Anisopliae* en tallo (B) de maíz híbrido obtenida a los 15 días posteriores a la inoculación.

### Colonización en tallo.

La diferencia de colonización entre tratamientos fue significativa ( $P < 0.05$ ). De los ocho tratamientos que fueron inoculados siete presentaron algún porcentaje de colonización en el tallo. La colonización por *Beauveria* de las cepas Bb maíz, Bbp3 y BbQ fueron las más altas obtenida con un promedio de 19.5 % (Figura. 16). La diferencia de colonización entre estas fue menor del 5%. Mientras que la cepa ACP presentó una diferencia de colonización de casi el 16%

En las cepas de *Metarhizium*, aunque se presentó colonización esta fue baja para las tres cepas evaluadas pertenecientes a este género y las cuales no presentaron diferencias con un promedio de colonización de 3.5%.

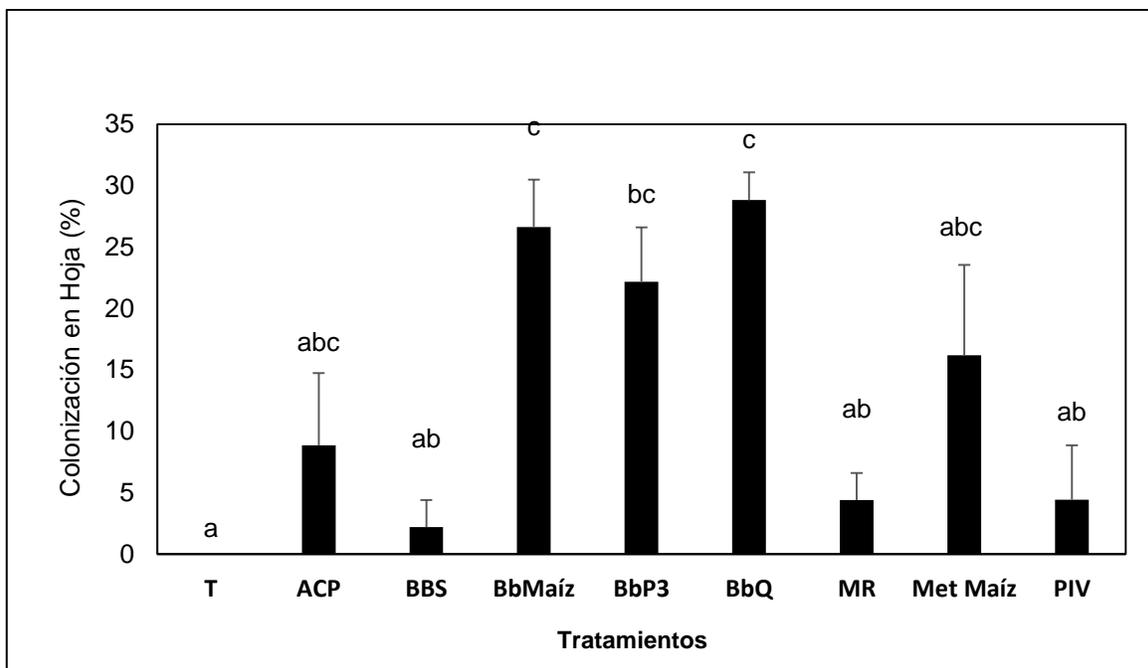


**Figura 16.** Porcentaje de colonización endófitas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en tallo de maíz híbrido a los 15 días posteriores a la inoculación foliar y en raíz aplicando 5 y 10 mL respectivamente de suspensión de  $1 \times 10^8$  conidios/mL. Testigo (T), *Beauveria bassiana* (ACP, Bb Maíz, BbQ, Bb p3 y SBb), cepas de *Metarhizium anisopliae* (Met Maíz, PIV y MR). Letras diferentes sobre barras indican diferencia significativa entre medias ( $P < 0.05$ ), Prueba de Tukey al 95%.

### Colonización endófitas en hoja.

La colonización endófitas de *Beauveria* en las hojas fue en algunas cepas fue de casi del 30%. Las cepas BbQ, Bb maíz y Bp3 fueron las que más colonización hicieron con un rango de colonización entre el 22.16 y 28%. La cepa BbQ fue la que más colonizó con una diferencia de casi 20 % de colonización respecto BBS y ACP.

El género de *Metarhizium* presentó colonización endófitas en las hojas de maíz en menor porcentaje respecto a las cepas de *Beauveria* manteniendo una diferencia de 12 % entre las cepas de los dos géneros que mayor colonización establecieron (Figura.17).



**Figura 17** Porcentaje de colonización endófitas de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en hoja en maíz híbrido a los 15 días posteriores a la inoculación foliar y en raíz aplicando 5 y 10 mL respectivamente de suspensión de  $1 \times 10^8$  conidios/mL. Testigo (T), cepas de *Beauveria bassiana* (ACP, Bb Maíz, Bb P2, BbQ, Bb p3 y SBb), cepas de *Metarhizium anisopliae* (Met Maíz, PIV y MR). Letras diferentes sobre barras indican diferencia significativa entre medias ( $P < 0.05$ ), Prueba de Tukey al 95%.

La colonización endófitas de las nueve cepas de hongos entomopatógenos se logró establecer en los tejidos de hojas, tallos sin embargo no en los tejidos de raíz. Las cepas de los entomopatógenos *Beauveria bassiana* fueron las que presentaron una mayor colonización endófitas en las plantas de maíz en los tejidos correspondientes a tallo y hoja. Por otra parte, las cepas de *Metarhizium anisopliae* presentaron los niveles de colonización más bajos en los dos ensayos realizados.

Los resultados de colonización endófitas por los hongos entomopatógenos del experimento dos fueron mayores en comparación con el experimento uno de manera general tanto para *B. bassiana* y *M. anisopliae*. La diferencia de colonización se atribuye a las diferentes metodologías que se usaron. Además de

que las plantas del experimento dos no se sometieron a estrés por cambios de temperatura, en comparación con las del experimento uno que permanecieron en invernadero en donde la temperatura no era estable. Además, existe la posibilidad de una contaminación de otros endófitos no inoculados artificialmente durante el tiempo que las plantas permanecieron en invernaderos para las plantas del experimento uno. La presencia de otros microorganismos en las plantas establecidos antes de la inoculación de los entomopatógenos hubiese podido competir por nutrientes y espacio limitando la colonización endófito

Otro factor que se debe considerar es el movimiento del hongo endófito ya que algunos son sistémicos y otros permanecen en el mismo lugar de la planta donde se inoculan (Moura y Jaronski, 2016). También es importante el tiempo en el que se realiza el muestreo (Bamisile *et al.*, 2018). A medida que avanza el tiempo la presencia en la planta del hongo endófito puede aumentar o disminuir (Bamisile *et al.*, 2018)

Los géneros de hongos entomopatógenos no fueron los únicos que establecieron colonización endófito. En la mayoría cajas Petri se presentó el crecimiento de otros hongos endófitos y bacterias en los dos ensayos. La presencia de estos hongos y bacterias ajenos a los inoculados comenzaron a crecer a partir de los 10 días posteriores a la siembra el tejido vegetal. Feler y Alencar (2013), señalan que en todas las plantas que se han estudiado en busca de endófitos se ha detectado su presencia, aun cuando estos no han sido inoculados por la acción del hombre.

Los endófitos presentes ajenos a los que se inocularon es probable que se deba a una transmisión por semillas, de acuerdo con Gamboa (2006), algunas especies de endófitos se transmiten por medio de semillas. Otro factor que pudo intervenir en la presencia de otros endófitos pudo ser el tiempo que permanecieron en invernadero las plantas, pudieron estar expuestas a diferentes microorganismos del ambiente. La contaminación de endófitos diferentes es probable que afectara la colonización de las cepas inoculadas, como ya se ha mencionado los endófitos compiten por nutrientes y espacios.

La asociación entre endófito y huésped va a depender del estado y fenología de la planta huésped, de la especie del endófito, la especie del huésped, del órgano que colonice y de la presencia de otros microorganismos endófitos (Feler y Alencar, 2013; Arias, 2013), así como de las condiciones del ambiente en las que se encuentra el huésped y el endófito (Wężowicz *et al.*, 2017)

### **6.3.6. Conclusión.**

La colonización endófito de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en maíz por medio de una inoculación artificial puede llegar a establecerse. Para asegurar porcentajes altos de colonización endófito es necesario que las plantas estén en condiciones favorables de humedad relativa y temperatura, así como en espacios limpios para prevenir contaminación de otros microorganismos que compitan con para los hongos entomopatógenos al momento de colonizar.

## **Bibliografía.**

- Arias, H. 2013. Estudio sobre las interacciones entre hongos endófitos y hongos entomopatógenos de *Coffea arabica*. Tesis de licenciatura. Universidad autónoma de México, México DF.
- Bamisile, B. Kanta, C. Senyo, A y Ravindran K. 2018. Prospects of endophytic fungal entomopathogens as biocontrol and plant growth promoting agents: An insight on how artificial inoculation methods affect endophytic colonization of host plants
- Felber, A y Alencar J. 2013. Fungos endofíticos: potencial como controladores biológicos e estudos em videiras. Uninga. Vol 14(1), pp 13-25
- Fhiser, B. Petrin, O y Lappin, H. 1992. The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize (*Zea mays*). New phytol. Vol 122(1), pp 299-305.
- Gamboa, M. 2006. Hongos endófitos tropicales: conocimiento actual y perspectivas. Universidad nacional de Colombia. Bogotá Colombia.
- Kusari, S. Hertweck, C y Spiteller, C. 2012. Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. Chemistry and Biology. Vol 19 (1), pp 792-798.
- Méndez, J. 2019. *Beauveria* sp., *Metarhizium* sp., y *Trichoderma* sp. Como endófitos y su efecto en el crecimiento de *Sorghum bicolor* y en la población de *Melanaphis sacchari*. Tesis de maestría. Instituto politécnico nacional, Mexico, Mexico DF.
- Moura, M y Jaronski, T. 2016. The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide microbiology and biotechnology. World journalmicrobiology biotechnology. Vol 32(1)
- Russo, M. Pelliza, S. Cabello, M. Stenglein, S y Scorstti, A. 2015. Endophytic colonization of tobacco, corn, wheat, and soybeans by the fungal

entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota, Hypocreales). *Biocontrol science and technology*. Vol 24 (1), pp475-480.

Vega, F. 2008. Insect pathology and fungal endophytes. *Journal of invertebrate pathology*. Vol 98 (1), pp 277-279.

Yan, J. Broughton, S. Yang, A y Gange A. 2015. Do endophytic fungi grow through their hosts systemically?. *Fungal ecology*. Vol 13(1), pp 53-59.

Wężowicz, K. Rozpądek, P y Turnau, K. 2017. Interactions of arbuscular mycorrhizal and endophytic fungi improve seedling survival and growth in post-mining waste. *Mycorrhiza*. Volume 27, 499–511.

## 6.4. Capítulo 4: Interacciones entre maíz y microorganismos endófitos como promotores de crecimiento vegetativo y bioprotección contra gusano cogollero

### 6.4.1. Resumen

El objetivo de este trabajo fue evaluar la interacción de hongos entomopatógenos (HE); *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y sin hongo, tres niveles de hongos micorrízicos arbusculares (HMA); *Funneliformis mosseae* *Rhizophagus intraradices* y sin HMA ante el gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (con y sin *S. frugiperda*) en dos variedades de maíz; criollo e híbrido, en condiciones de invernadero. El diseño experimental fue multifactorial completamente al azar, los factores de estudio fueron los HMA, HE, *S. frugiperda* y El maíz, cada tratamiento se repitió seis veces, las variables analizadas fueron: de crecimiento, biocontrol y microbiológicas además de pruebas de endofitismo para ver la presencia o ausencia de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* dentro de la planta de maíz. Plántulas con 6 días de germinadas se inocularon con 150 esporas de HMA, 30 días de después de la inoculación de HMA (ddi) se inocularon con una suspensión  $1 \times 10^8$  conidios/mL de las cepas de HE, 60 ddi se infestó con tres larvas de *S. frugiperda* en tercer instar, 8 días después se realizó un muestreo destructivo y se recuperaron las larvas. Los datos obtenidos se analizaron mediante el análisis de varianza (Anova) y comparación de medias de acuerdo con la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ). No se encontró evidencia de la presencia de *B. bassiana* y *M. anisopliae* dentro de los tejidos de planta de maíz, por lo que estos no tuvieron efecto en la planta, ni en las larvas del gusano cogollero, se encontró un porcentaje de colonización de *F. mosseae* y *R. intraradices* del 80% después de la infestación con larvas, sin embargo, la colonización no mostró tener efecto en las variables de crecimiento y de biocontrol del *Spodoptera frugiperda* en plantas de maíz. En este trabajo no se encontró efecto de los hongos endófitos y los HMA en promoción de crecimiento y biocontrol del gusano de cogollero en plantas de maíz.

#### 6.4.2. Abstract

The objective of this work was to evaluate the interaction of entomopathogenic fungi (EF); *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and without fungus, three levels of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF); *Funneliformis mosseae* *Rhizophagus intraradices* and without HMA against the cogollero worm *Spodoptera frugiperda* (with and without *S. frugiperda*) in two varieties of maize; Creole and hybrid, in greenhouse conditions. The experimental design was completely multifactorial at random, the factors was AMF, EF, *S. frugiperda* y worm each treatment was repeated six times, the variables analyzed were: growth, biocontrol and microbiological plus endofitism tests to see the presence or absence of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* within the corn plant. Seedlings with 6 days germinated were inoculated with 150 spores of AMF, 30 days after inoculation of AMF (dai) were inoculated with a  $1 \times 10^8$  conidia/mL suspension of the strains of EF, 60 dai was infested with three larvae of *S. frugiperda* in the third instar, 8 days later destructive sampling was performed and the larvae were recovered. The data obtained were analyzed by analysis of variance (Anova) and comparison of means according to Tukey's test ( $P \leq 0.05$ ). There was no evidence of the presence of *B. bassiana* and *M. anisopliae* within the tissues of maize plants, so these had no effect on the plane, nor on the larvae of the cogollero worm, a percentage of colonization of *F. mosseae* and *R. intraradices* of 80% was found after infestation with larvae, however colonization showed no effect on the growth variables and biocontrol of *Spodoptera frugiperda* in maize plants. In this work no effect of endophyte fungi and AMF on growth promotion and headworm biocontrol in corn plants was found

#### 6.4.3. Introducción

A nivel mundial el maíz es uno de los granos de mayor importancia como alimento básico, principalmente por su alto nivel nutricional y económico (Bona *et al.*, 2016). El grano o semilla es el principal producto de consumo, mientras que el tallo se emplea como fuente de alimento para consumo animal. Sin embargo, problemas bióticos como las plagas disminuyen su producción. El gusano cogollero

*Spodoptera frugiperda* es la plaga de mayor importancia que se presenta en los diferentes sistemas de producción de maíz. Llegando a provocar pérdidas en la producción.

En la actualidad una alternativa ecológica que se utiliza para el control del gusano cogollero son los hongos entomopatógenos. Las especies de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, son las más utilizados por su eficiencia patogénica en diferentes órdenes insectiles como la Lepidóptera (Greenfield *et al.*, 2016). Sumado a su patogenicidad sobre los insectos en la actualidad se conoce que estos dos hongos son endófitos y tienen una amplia variedad de plantas hospederas, entre ellas algunas de importancia agrícola. Hasta el momento se han encontrado como endófitos en cultivos como el tomate, maíz, frijol, chile, café, yuca (Jarber, 2015).

Los endófitos como *M. anisopliae* y *B. Bassiana* pueden tener diferentes funciones en las plantas además del control de plagas, ya que como endófitos son capaces de estimular el crecimiento vegetativo (Seong y Kim, 2019). Por ejemplo, López y Espada (2015), reportaron en algodón un aumento de crecimiento vegetativo por efecto de la inoculación de *B. bassiana*. Kabaluk y Ericsson (2007), reportaron un mayor crecimiento vegetativo y una mayor biomasa seca en maíz cuando las semillas fueron tratadas con *B. bassiana*. Sanan y Bidochka (2012), reportaron que la inoculación con *M. robersit* estimulo las plantas de *Vicia faba* a acelerar el desarrollo radicular y a producir más biomasa radicular.

También son capaces de activar los mecanismos de defensas de la planta haciéndolas más resistente (Bamisile *et al.*, 2018), protegiéndolas contra plagas y enfermedades (Greenfield *et al.*, 2016; Seong y Kim 2019). Por medio de la producción de una variedad de productos secundarios, principalmente alcaloides, que se cree que actúan como anti-alimentadores e inhibidores metabólicos de los insectos (San y Heum, 2007).

En maíz su presencia como endófito de *M. Anisopliae* y *B. bassiana* ha tenido un efecto en la disminución del daño producido por barrenadores de lepidópteros *Ostrinia nubilalis* y *Sesamia calamistis* (Jaber 2015; Bamisile *et al.*, 2018) y *Beauveria bassiana* ha reducido el daño por *Helicoverpa zea* en tomate,

*Cosmopolites sordidus* en banano, *Aphis gossypii* en algodón, *Liriomyza huidobrensis* en *Vicia faba* etc., mejorando el desarrollo de las plantas (Jaber 2015; Greenfield *et al.*, 2016)

Los hongos micorrízicos al igual que los hongos endófitos son benéficos para las plantas. Sus funciones que desempeñan en la planta son altamente conocidas. Entre las que destacan el aporte de nutrientes y agua a la planta, protección a factores bióticos como plaga y enfermedades y abióticos, mejora la microfauna del suelo promoviendo la presencia de más microorganismos benéficos (Pérez *et al.*, 2012) y en los últimos años se le atribuyen la protección contra plagas herbívoras, de forma indirecta induciendo en la planta la producción de metabolitos de defensa (Ghering y Bennet, 2009). La presencia de hongos endófitos y hongos micorrízicos es altamente probable en plantas, donde interactúan entre sí en formas complejas que pueden ser importantes para los hongos, insectos y plantas hospedadoras (Omacini *et al.*, 2006). El objetivo de este trabajo fue evaluar la promoción de crecimiento vegetativo por la inoculación de hongos endófitos y micorrízicos en maíz y se efecto en el desarrollo de las larvas de *S. frugiperda*.

#### **6.4.4. Materiales y métodos**

El experimento se desarrolló a nivel de invernadero en las instalaciones del CIATEJ unidad Zapopan, mientras que las actividades de laboratorio se desarrollaron en el área de Biotecnología Vegetal, como material vegetal se utilizaron dos variedades de maíz, el material microbiológico fueron dos especies de hongos micorrízicos (*F. mosseae* y *R. intraradices*) y dos especies de hongos entomopatógenos (*Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*). Para la prueba de herbivoría se utilizaron larvas de tercer instar de *S. frugiperda*.

## Diseño experimental

Se evaluaron cuatro factores, HMA con tres niveles *Glomus mosseae* (Gm), *Rhizophagus intraradices* (Ri) y sin HMA, larvas de *Spodoptera frugiperda* con dos niveles presencia y ausencia, hongos entomopatógenos con tres niveles *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* y sin hongo entomopatógeno, Fenotipo de planta con dos niveles criollo e híbrido (Cuadro 5). Se evaluaron 36 tratamientos realizado diferentes combinaciones entre los cuatro factores de estudio. Por cada tratamiento se establecieron 6 unidades experimentales.

**Cuadro 6.** Factores niveles y tratamientos de estudio para experimento de herbivoría de *S frugiperda*.

Factor variedad	Factor Hongo Micorrízico arbuscular	Factor Hongo entomopatógeno	Factor larva	Tratamiento	Clave
Criolla	<i>Rhizophagus intraradices</i>	<i>B. bassiana</i>	Con larva	1	C+Bb+Ri+L
			Sin larva	2	C+Bb+Ri
		<i>M. anisopliae</i>	Con larva	3	C+Mm+Ri+L
			Sin larva	4	C+Mm+Ri
		Sin Hongo	Con larva	5	C+Ri+L
			Sin larva	6	C+Ri
	<i>Funneliformis mosseae</i>	<i>B. bassiana</i>	Con larva	7	C+Bb+Fm+L
			Sin larva	8	C+Bb+Fm
		<i>M. anisopliae</i>	Con larva	9	C+Mm+Fm+L
			Sin larva	10	C+Mm+Fm
		Sin Hongo	Con larva	11	C+Fm+L
			Sin larva	12	C+Fm
	Sin HMA	<i>B. bassiana</i>	Con larva	13	C+Bb+L
			Sin larva	14	C+Bb
		<i>M. anisopliae</i>	Con larva	15	C+Mm+L
			Sin larva	16	C+Mm
		Sin Hongo	Con larva	17	C+L
			Sin larva	18	C

Híbrida	<i>Rhizophagus intraradices</i>	<i>B. bassiana</i>	Con larva	19	H+Bb+Ri+L
			Sin larva	20	H+Bb+Ri
		<i>M. anisopliae</i>	Con larva	21	H+Mm+Ri+L
			Sin larva	22	H+Mm+Ri
		Sin Hongo	Con larva	23	H+Ri +L
			Sin larva	24	H+Ri
	<i>Funneliformis mosseae</i>	<i>B. bassiana</i>	Con larva	25	H+Bb+Fm+L
			Sin larva	26	H+Bb+Fm
		<i>M. anisopliae</i>	Con larva	27	H+Mm+Fm+L
			Sin larva	28	H+Mm+Fm
		Sin Hongo	Con larva	29	H+Fm+L
			Sin larva	30	H+Fm
	Sin HMA	<i>B. bassiana</i>	Con larva	31	H+Bb+L
			Sin larva	32	H+Bb
		<i>M. anisopliae</i>	Con larva	33	H+Mm+L
			Sin larva	34	H+Mm
		Sin Hongo	Con larva	35	H+L
			Sin larva	36	H

## Material biológico

### Cría de gusano cogollero

Para producir las larvas de *Spodoptera frugiperda* se empleó la metodología descrita anteriormente en el capítulo 1.

### Hongos micorrízicos arbusculares

Los hongos micorrízicos utilizados fueron las especies de *F. mosseae* aislada de rizósfera de agave del Estado de Michoacán y *Rhizophagus intraradices* obtenida de un producto comercial producido por INIFAP. Previo al experimento ambas especies fueron propagadas masivamente en macetas trampa, utilizando como

cultivo trampa sorgo y como sustrato arena esterilizada. De las macetas trampa se obtuvo el inóculo de las especies de HMA evaluados. Al inóculo se le realizó una extracción y conteo de esporas para determinar la cantidad de esporas en 10 g de suelo.

### **Hongos entomopatógenos endófitos**

Se utilizaron las cepas Bb maíz *Beauveria Bassiana* y la Met Maíz *Metarhizium anisopliae*. Las dos cepas fueron seleccionadas en base a los experimentos previos del capítulo 1, donde se evaluó la mortalidad sobre el gusano cogollero y el capítulo 2, donde se evaluó su capacidad endófito en maíz, la producción de conidios se realizó por medio de arroz como se describe en el Anexo 5.

### **Material vegetal**

Se utilizaron dos variedades de maíz, una criolla originaria del municipio de Epitacio Huerta, Michoacán y la variedad híbrida comercial DK-2052. Las plántulas se obtuvieron por germinación de las semillas en tacos de papel estéril húmedo. Los tacos se incubaron a 25 °C hasta la formación de los coleoptilos. Previo a la germinación las semillas fueron desinfectadas. Primero se agitaron en Tween al 0.05% durante 4 minutos, seguido de 5 minutos en agitación en etanol al 70%, luego 20 minutos en hipoclorito de sodio al 5% y finalmente 3 enjuagues con agua destilada estéril.

### **Trasplante e inoculación con los HMA**

Para el trasplante se utilizó como sustrato una mezcla de suelo, arena gruesa, arena fina y agrolita en una proporción de 3:1.5: 1.5:1, el cual fue previamente esterilizado durante 6 horas a 120°C y 15 PSI. El sustrato se depositó en bolsas de tres kg, sobre las cuales se depositaron las plántulas. La inoculación se realizó con 150 esporas de HMA por planta, colocando el inóculo en la zona radicular de la plántula.

Durante el desarrollo del experimento las plantas fueron regadas cada tercer día a capacidad de campo. La fertilización se comenzó a aplicar a la cuarta semana después del trasplante. Se utilizó la solución de nutritiva de Hoagland al 25% (anexo 5). La solución nutritiva se aplicó semanalmente hasta el término del experimento.

### **Inoculación de hongos entomopatógenos**

La inoculación de hongos entomopatógenos se realizó 30 días después de la inoculación de los hongos micorrízicos arbusculares. El proceso de inoculación se realizó por la tarde evitando las altas temperaturas del ambiente. La suspensión de conidios fue aplicada mediante un atomizador sobre la superficie de las hojas por haz y envés. La suspensión de conidios fue a una concentración de  $1 \times 10^8$  mL<sup>-1</sup> conidios/mL. En promedio se aplicaron 8 mL de suspensión de conidios por planta.

### **Infestación de *Spodoptera frugiperda***

Después de 60 días del trasplante se realizó la infestación con larvas de *S. frugiperda*. Pevio a la infestación las larvas fueron pesadas en balanza de precisión, tratando de que todas las larvas utilizadas tuvieran el mismo peso. La infestación se realizó colocando tres larvas de tercer instar por planta, las larvas se depositaron en la parte aérea de la planta en el haz de las hojas cercana al cogollo (Figura. 18 A). Después de la infestación las plantas se cubrieron individualmente con Agribon material compuesto de polipropileno, para evitar el desplazamiento de las larvas a otras plantas (Figura. 18 B). El agribon fue sujetado con rafia que sirvió como tutor para evitar que la planta cargara el peso. Las larvas se dejaron por 10 días en la planta donde siguieron su alimentación y desarrollo.



**Figura 18** (A) Infestación de *S. frugiperda* en plantas de maíz de 60 días de crecimiento vegetativo inoculadas con Hongos micorrízicos arbusculares y hongos entomopatógenos y (B) Plantas de maíz infestadas con larvas de *S. frugiperda* y protegidas con una cobertura de Agribon para evitar la migración de las larvas.

### Variables evaluadas

#### Cuadro 7. Variables evaluadas del experimento.

Variable	Método	Época
Altura de planta	Medido con flexómetro	15, 30,45, 60 y 68 días después del trasplante
Diámetro de tallo	Medido con flexómetro	15, 30,45, 60 y 68 días después del trasplante
Peso fresco de tallo y raíz	Medido con balanza de precisión	60 y 68 días después del trasplante
Volumen de tallo y raíz	Medido con probeta de 100 mL	60 y 68 días después del trasplante
Peso seco de tallo y raíz	Medido con balanza de precisión	60 y 68 días después del trasplante
Área foliar	Medido con el con el medidor de área foliar portátil CI-203	60 y 68 días después del trasplante

Colonización micorrízica	Técnica de Philips y Hayman	60 y 68 días después del trasplante
Diámetro de capsula cefálica	Medido con Vernier	68 días después del trasplante
Peso de larva	Medido con balanza de precisión	68 días después del trasplante

### **Crecimiento vegetal**

La altura de planta y diámetro del tallo se midió cada 15 días, a partir de la segunda semana después del trasplante y hasta los 70 días después del trasplante. La altura fue medida con un flexómetro midiendo desde el cuello de la planta hasta la zona apical de la planta, mientras que para el diámetro de tallo se utilizó un vernier electrónico. La medición se realizó en el segundo entrenudo ubicado sobre el cuello de la planta.

### **Área foliar**

El área foliar se midió en dos ocasiones. Las mediciones se realizaron con el medidor de área foliar portátil CI-203, el cual es un dispositivo en forma de pinza que se ayuda de un láser para realizar medición. La primera de ellas se realizó a los 60 días después del trasplante, previo a la infestación de las larvas. La última medición se realizó 10 días después de la infestación.

### **Peso fresco y volumen de raíz y follaje**

Después de 70 días del trasplante las plantas fueron retiradas del sustrato. Las plantas fueron llevadas al laboratorio de Biotecnología Vegetal donde el follaje de la planta fue separado de las raíces. Las raíces fueron lavadas para posteriormente tomar las medidas del tallo y raíz de volumen ocupado y peso fresco. Antes de medir el peso fresco las raíces se envolvieron con papel absorbente para eliminar el exceso de agua después del lavado.

El peso fresco del follaje y raíz se midió en balanza de precisión. El volumen desplazado se midió en una probeta de un litro. Se aforó a 800 mL después se sumergía la muestra de follaje o raíz y se tomaba el dato del volumen desplazado.

### **Peso seco**

Después de medir el volumen de agua desplazado las muestras se depositaron en bolsas de papel para posteriormente meterse a secar en estufa eléctrica a una temperatura de 60°C, en promedio permanecieron una semana las muestras dentro de la estufa. El peso seco se midió en balanza de precisión pesando la masa seca de cada muestra.

### **Variables de respuesta en los insectos**

#### **Larvas de *Spodoptera frugiperda***

Después de dejar las larvas por 10 días en la planta, las larvas se retiraron de las plantas, su recolección se realizó en botes de 1 onza, cada larva se individualizó. Las larvas fueron llevadas a laboratorio donde se les tomó el dato de peso y ancho de la cápsula cefálica.

#### **Ancho de cápsula cefálica**

El ancho de la cápsula cefálica se midió para determinar el instar correspondiente a cada una de las larvas. La medición se realizó con vernier electrónico, midiendo la cápsula cefálica de las larvas de extremo a extremo.

#### **Peso de pupas de *S. frugiperda*.**

El peso se tomó con la ayuda de balanza de precisión, las larvas pesadas se individualizaron en vasos de plástico de una onza y se mantuvieron en cámara de

crecimiento a 25°C, el tiempo que permanecieron individualizadas se alimentaron con una dieta artificial hasta que alcanzaron la etapa de pupa. Las pupas fueron pesadas en balanza de precisión el mismo día que pasó de larva a pupa.

## **Variables microbiológicas**

### **Colonización micorrízica**

La colonización micorrízica se determinó mediante la observación de raíces teñidas, en microscopio óptico electrónico, donde se observaron las diferentes estructuras de los hongos micorrízicos. La tinción de las raíces se realizó usando la metodología propuesta por Philips y Hayman (1970) como se describe en el Anexo 2.

El porcentaje de colonización se estimó a partir de 90 segmentos de raíces de 1 cm de largo por cada unidad experimental. A partir del conteo de pedazos colonizados se estimó el porcentaje de colonización de las diferentes estructuras micorrízicas (micelio, vesícula y arbuscúlos) utilizando la siguiente fórmula.

$$\% \text{ de colonización} = \frac{((100) (\text{SCO}))}{\text{TSO}}$$

### **Donde**

**SCO**= Segmentos de raíz colonizados observados

**TSO**= Total de segmentos de raíz observados

### **Conteo de esporas**

Para realizar el conteo se utilizaron 10 g de suelo, primero se realizó la extracción de esporas por la técnica de tamizado y decantado en húmedo (German y Nicolson, 1963) en combinación con la técnica en flotación en sacarosa (Walker, 1997). La solución con la suspensión de esporas final de la extracción de esporas se depositó

en una caja Petri cuadriculada. Las esporas se contaron por observación en un estereoscopio VELAB con ayuda de un contador manual.

### **Análisis estadístico**

Para identificar las diferencias estadísticas entre las variables y factores de estudio se realizó un ANOVA multifactorial y simple, para identificar las diferencias entre tratamiento se realizó una comparación de medias con Tukey ( $P \leq 0.05$ ) utilizando el Software StatGraphics Centurión XV®.

#### **6.4.4 Resultados y discusión**

##### **VARIABLES DE CRECIMIENTO**

##### **Peso fresco de tallo y raíz**

En el peso fresco los factores los HMA, HE y las larvas no tuvieron efecto. El factor variedad mostró una diferencia de peso de tallo entre las plantas criollas en comparación con las híbridas. El mayor peso lo obtuvieron las plantas de maíces criollos con 111.68 g, mientras que las plantas de maíz híbrido con 78.03 g, encontrando una diferencia de 33.65 g. Mientras que las interacciones entre factores no influyeron en las diferencias de peso fresco de las plantas.

En el experimento de Elizondo y Boschini (2002), observaron que las variedades criollas presentan mayor ganancia de peso fresco y seco de la parte aérea de la planta con respecto a las variedades híbridas. Esto se debe en gran medida a que las variedades criollas tienen hábitos de crecimientos superiores a los 4 metros mientras que las híbridas por lo general no suelen pasar de los 3 metros.

El peso fresco de la raíz se comportó diferente entre los factores evaluados. Los factores hongo entomopatógenos endófito (HEE) y variedad, mostraron diferencias significativas en peso fresco de las raíces. La inoculación con *B. bassiana* afectó el

desarrollo radicular. La cepa BbQ causó el menor peso fresco con un promedio de 39.22 g. Las plantas que no se inocularon con los HEE, presentaron el mayor peso, lo que indica que tuvieron un mayor desarrollo radicular.

Por su parte el factor variedad, presentó una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ). El mayor peso lo tuvieron las plantas criollas con un promedio de 49.87 g mientras que la variedad híbrida reportó una diferencia de -15.8 g respecto al criollo. El factor HMA y larva no mostraron tener un efecto en esta variable.

### **Volumen de tallo y raíz por factores**

En el volumen desplazado por el tallo fue diferente entre los factores evaluados. El factor HMA mostró diferencias significativas. El mayor valor fue para las plantas que no se inocularon, mientras que el menor fue para las plantas que se inocularon con *R. intraradices* (Tabla 5). El factor variedad mostró una diferencia significativa ( $P < 0.01$ ) El mayor volumen desplazado lo presentaron los tallos de la variedad criolla y el menor fue para la variedad híbrida.

El volumen desplazado por la raíz no se observaron diferencias entre los factores de HMA y presencia larva. Al igual que en el peso fresco de la raíz, el volumen desplazado fue menor para las plantas inoculadas con la cepa *Beauveria bassiana*. Las plantas que no se inocularon con los HEE, presentaron el mayor volumen desplazado.

### **Área foliar antes de infestación y después de la infestación**

En las plantas el área foliar antes de la infestación (AFAI) fue afectado por los factores de HMA y variedad. La mayor área foliar fue para la variedad criolla con una media de 941.6 cm<sup>2</sup> en comparación con la media de 801.43 cm<sup>2</sup> de la variedad híbrida. Las plantas inoculadas con *F. mosseae* presentaron la mayor área foliar mientras que las plantas no inoculadas presentaron la menor (Cuadro 6). El factor hongo entomopatógenos endófito, tuvo un efecto nulo en el área foliar antes de la infestación. El área foliar después de la infestación (AFDI), fue diferente para el factor larva. Las plantas con larva tuvieron una menor área foliar respecto a las plantas sin larva. Se encontró una diferencia de 66.73 cm<sup>2</sup> entre plantas para este

factor. Otro factor que presentó diferencias fue la variedad, las plantas criollas obtuvieron mayor área foliar con una diferencia de 173.92 cm<sup>2</sup> respecto a la variedad híbrida. Mientras que los factores HEE y HMA, no presentaron diferencias.

**Cuadro 8.** Promedio obtenido de acuerdo al análisis multifactorial para los cuatro factores de estudio.

Factores	PFT (g)	PFR (g)	VT (mm <sup>3</sup> )	VR (mm <sup>3</sup> )	AFAI (cm <sup>2</sup> )	AFDI (cm <sup>2</sup> )
<i>R. intraradices</i>	91.8172 (A)	41.1976 (A)	2.82536(A)	41.7071(A)	839.068(A)	1065.02(A)
<i>F. mosseae</i>	93.5031 (A)	41.275 (A)	2.82575(AB)	42.3472(A)	860.719(AB)	1086.89(A)
Sin HMA	99.2608 (A)	43.4599 (A)	2.82577(B)	44.8883(A)	914.769(B)	1089.16(A)
Híbrido	78.0319 (A)	34.0765 (A)	2.27417(A)	35.5463(A)	801.431(A)	993.398(A)
Criollo	111.689 (B)	49.8785 (A)	2.34097(B)	50.4154(B)	941.606(B)	1167.32(B)
<i>M. anisopliae</i>	93.547 (A)	39.2221(A)	2.82577(A)	40.3816(A)	845.702(A)	1061.26(A)
<i>B. bassiana</i>	93.618 (A)	41.5882(AB)	2.82575(A)	42.1144(BA)	878.48(A)	1073.2(A)
Sin HE	97.416 (A)	45.1222(B)	2.82536(A)	46.4466(B)	890.699(A)	1106.62(A)
Con Larva	93.1625 (A)	40.5969 (A)	2.28502(A)	41.6479(A)	862.925(A)	1046.99(A)
Sin Larva	96.5581 (A)	43.3581 (A)	2.33027(A)	44.3139(A)	880.113(A)	1113.72(B)

PFT (peso fresco tallo), PFR (peso seco raíz), VT volumen desplazado por tallo, VR (volumen desplazado por raíz), AFAI (área foliar antes de herbivoría), AFDI (área foliar después de herbivoría). Letras diferentes al final de los números indican diferencia significativa entre medias, Prueba de Tukey al 95%.

#### **Promoción de crecimiento de los HMA en la variedad híbrida y criolla de maíz**

A los 70 días después del trasplante, la inoculación con los HMA no tuvo un efecto en las variables morfológicas de crecimiento vegetativo, diámetro de tallo, área foliar y peso seco de raíz y tallo. Sólo se presentaron diferencias estadísticas en la variable de peso fresco (P=0.0001). Los pesos más altos se obtuvieron en las plantas criollas respecto a las plantas de la variedad híbrida. Sin embargo, en la variedad criolla no hubo diferencia entre las plantas inoculadas y su respectivo testigo. Incluso se observó una tendencia en donde las plantas inoculadas con las

dos especies de HMA, tiene el menor peso en comparación con las plantas que no se inocularon (Cuadro 7). Las plantas criollas e híbridas inoculadas y no inoculadas con los HMA presentaron los resultados similares.

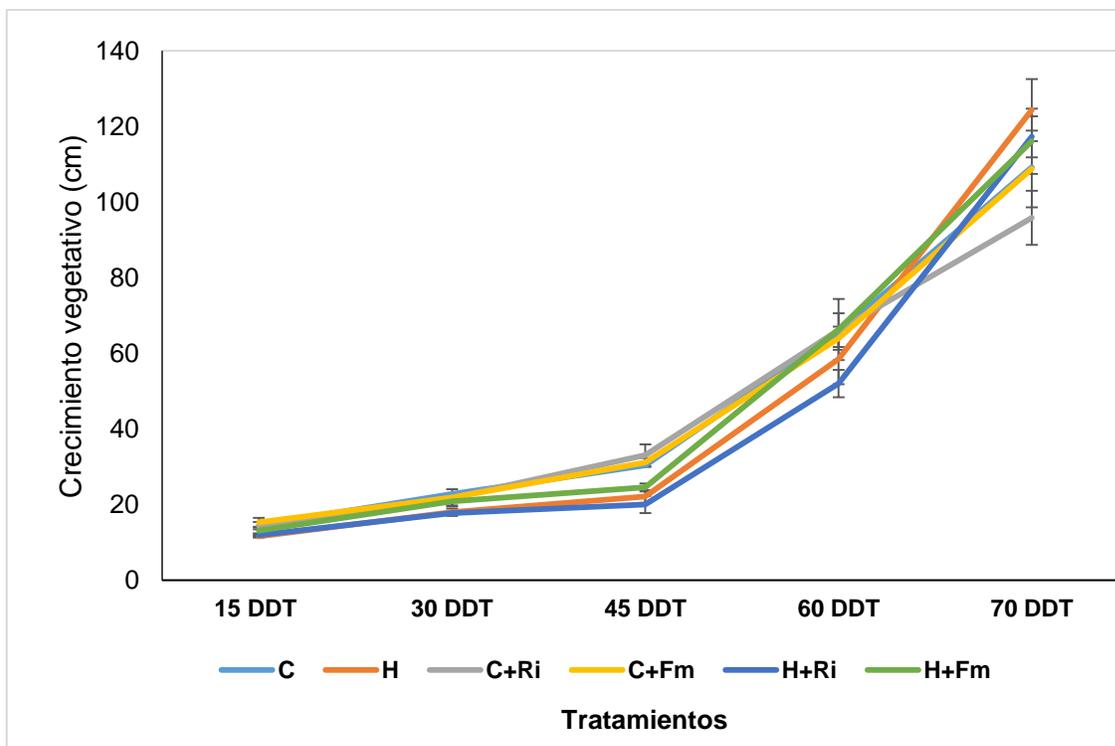
**Cuadro 9.** Medias de altura de planta, diámetro de tallo, peso fresco tallo, peso fresco raíz, peso seco tallo, peso seco raíz y área foliar de plantas de maíz criollo e híbrido inoculadas con hongos micorrízicos arbusculares.

Tratamiento	AP (cm)	DT (mm)	PFT (g)	PFR (g)	PST (g)	PSR (g)	AF (cm <sup>2</sup> )
<b>C</b>	109.27 (a)	12.11 (a)	127.79 (b)	49.95 (a)	18.18 (a)	4.9 (a)	1271.71(a)
<b>H</b>	124.33 (a)	12.15 (a)	83.71 (a)	37.5 (a)	20.32 (a)	3.69 (a)	924.9 (a)
<b>C+Ri</b>	95.83 (a)	12.16 (a)	116.4 (b)	47.03 (a)	17.06 (a)	4.7 (a)	1086.31(a)
<b>C+Fm</b>	108.8 (a)	12.13 (a)	111.5 (b)	53.69 (a)	19.09 (a)	5.5 (a)	1181.96 (a)
<b>H+Ri</b>	117.28 (a)	12.27 (a)	74.38 (a)	46.6 (a)	16.65 (a)	4.3 (a)	101152 (a)
<b>H+Fm</b>	116.11 (a)	12.47 (a)	89.28 (a)	38.02 (a)	19.47 (a)	3.44 (a)	1062.8 (a)

Altura de planta (AP), diámetro de tallo (DT), peso fresco tallo (PFT), peso fresco raíz (PFR), peso seco tallo (PST), peso seco raíz (PSR), área foliar (AF) Maíz criollo (C) Maíz híbrido (H), *R. intraradices* (Ri), *F. mosseae* (Fm). Letras diferentes al final de los números indican diferencia significativa entre medias, Prueba de Tukey al 95%.

### **Dinámica de crecimiento vegetativo de maíz híbrido y criollo inoculado con HMA**

En las mediciones realizadas a lo largo del experimento las plantas mantuvieron un crecimiento vegetativo similar independientemente de la presencia del inóculo de HMA. Durante las mediciones realizadas no hubo diferencias estadísticas. En la figura 19, se puede observar el progreso de crecimiento vegetativo a lo largo del experimento. El promedio de crecimiento de las plantas a los 70 días posteriores a la inoculación fue de 111.92 cm.



**Figura 19.** Dinámica del crecimiento vegetativo expresado en cm de maíz criollo (C) e híbrido (H) inoculado con hongos micorrízicos arbusculares de las especies de *R. intraradices* (Ri) y *F. mosseae* (FM). Con intervalos de medición de 15 y 10 días después del trasplante (DDT), Prueba de Tukey al 95%.

### Promoción de crecimiento vegetativo por hongos entomopatógenos y HMA en maíz criollo

En la inoculación de hongos entomopatógenos y hongos micorrízicos en maíz criollo la respuesta de la planta no se vió favorecida en las variables morfológicas. Las variables de respuesta altura de planta, diámetro de tallo, peso seco de tallo y raíz, así como área foliar no hubo diferencias entre los tratamientos evaluados. El crecimiento vegetativo promedio fue de 110 cm a los 70 días (Figura. 20). Sólo en el peso seco de tallo y raíz se presentaron diferencias significativas. En donde las plantas que no se inocularon con microorganismos fueron las que prestaron el mayor peso fresco en tallo. El menor peso fue para las plantas inoculadas *M. anisopliae* y/o *B. bassiana* con *F. mosseae*. Además, en el resto de los tratamientos

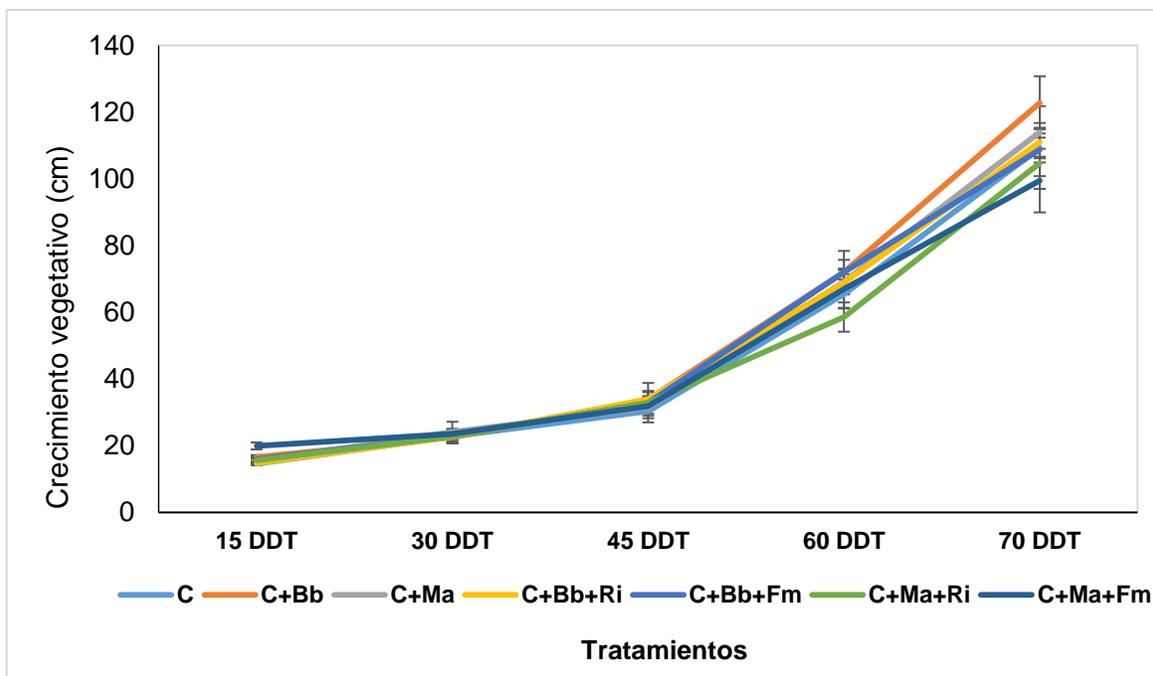
se observó una tendencia de menor peso fresco de las plantas inoculadas respecto a las no inoculadas.

En el peso fresco de raíz la interacción *B. bassiana* y *R. intraradices* presentó el valor más alto con 61.6 g, mientras que la interacción de *Metarhizium* con *F. mosseae* y la de *B. bassiana* con *F. mosseae* presentaron los valores de peso más bajos. En el resto de tratamiento el peso obtenido fue en promedio similar al del tratamiento testigo (Cuadro 8). El área foliar fue similar entre todos los tratamientos.

**Cuadro 10.** Medias de altura de planta, diámetro de tallo, peso fresco tallo, peso fresco raíz, peso seco tallo, peso seco raíz y área foliar de plantas de maíz criollas inoculadas con Hongos micorrízicos y hongos entomopatógenos endófitos.

Tratamiento	AP (cm)	DT (mm)	PFT (g)	PFR (g)	PST (g)	PSR (g)	AF (cm <sup>2</sup> )
<b>C</b>	109.27 (a)	12.11 (a)	127.79 ( c)	49.95 (ab)	18.18 (a)	4.94 (a)	1271.72 (a)
<b>C+Bb</b>	122.8 (a)	11.46 (a)	123.07 (bc)	48.96 (ab)	17.45 (a)	4.09 (a)	1362.18 (a)
<b>C+Ma</b>	114 (a)	11.49 (a)	119.31(abc)	51.24 (ab)	16.49 (a)	5.14 (a)	1236.62 (a)
<b>C+Bb+Ri</b>	111 (a)	12.47 (a)	106.90(abc)	61.60 (c )	17.37 (a)	4.69 (a)	1444.54 (a)
<b>C+Bb+Fm</b>	108.8 (a)	12.08 (a)	102.07 (ab)	41.20 (a)	18.18 (a)	3.22 (a)	1195.34 (a)
<b>C+Ma+Ri</b>	104.7 (a)	11.73 (a)	107.84(abc)	55.67 (ab)	17.48 (a)	5.44 (a)	1145.70 (a)
<b>C+Ma+Fm</b>	99.5 (a)	11.12 (a)	97.160(a)	40.41 (a)	15.00 (a)	3.94 (a)	1039.52 (a)

Altura de planta (AP), diámetro de tallo (DT), peso fresco tallo (PFT), peso fresco raíz (PFR), peso seco tallo (PST), peso seco raíz (PSR) y área foliar (AF) Maíz criollo(C), *R. intraradices* (Ri), *F. mosseae* (Fm), *B. bassiana* (Bb) o *M. anisopliae* (Ma). Letras diferentes al final de los números indican diferencia significativa entre medias, Prueba de Tukey al 95%.



**Figura 20** Dinámica del crecimiento vegetativo expresado en cm de maíz criollo (C) inoculado con hongos micorrízicos arbusculares de las especies de *R. intraradices* (Ri), *F. mosseae* (FM), *B. bassiana* (Bb) y *M. anisopliae* (Ma). Con intervalos de medición de 15 y 10 días después del trasplante (DDT), Prueba de Tukey al 95%.

### Promoción de crecimiento vegetativo por hongos entomopatógenos y HMA en maíz Híbrido

En las plantas de la variedad híbrida no se presentaron diferencias estadísticas en las variables evaluadas (Cuadro 9). A los 70 días después del establecimiento del experimento los resultados que se obtuvieron fueron similares entre los tratamientos evaluados. En los parámetros evaluados los promedios de cada medición a los 70 días fueron: altura final de la planta fue de 122 cm, diámetro de tallo de 12.61 mm, peso fresco de tallo 80.69 g, peso fresco de raíz 30.14 g, peso fresco tallo 17.24 g, peso seco raíz 3.16 g y área foliar 995.13 cm<sup>2</sup>.

En peso fresco de raíz las plantas que no se inocularon obtuvieron el mayor peso y aunque no hay diferencias estadísticas la inoculación de HMA y HE muestra una tendencia a afectar el peso de raíz. Este efecto se puede observar en el parámetro

de peso seco de tallo donde se repite la misma tendencia y donde la inoculación doble presento los valores más bajos.

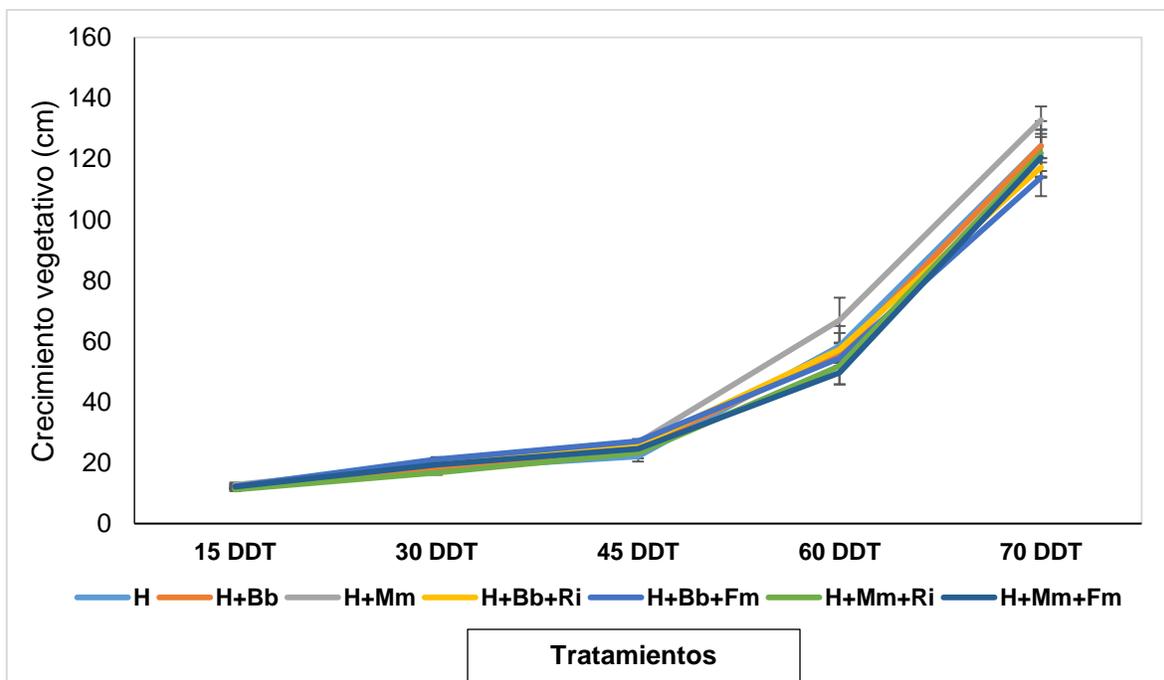
**Cuadro 11.** Medias de altura de planta, diámetro de tallo, peso fresco tallo, peso fresco raíz, peso seco tallo, peso seco raíz y área foliar de plantas de maíz híbrido inoculadas con *R. intraradices*, *F. mosseae*, *B. bassiana* y/o *M. anisopliae* y no inoculadas.

Tratamiento	AP (cm)	DT (mm)	PFT (g)	PFR (g)	PST (g)	PSR (g)	AF (cm <sup>2</sup> )
H	124.33 (a)	12.15 (a)	83.71 (a)	37.508 (a)	19.76 (a)	3.22 (a)	924.904 (a)
H+Bb	124.33 (a)	12.68 (a)	83.98 (a)	34 (a)	17.61 (a)	3.08 (a)	944.66 (a)
H+Mm	132.83 (a)	12.891 (a)	89.09 (a)	33.03 (a)	17.68 (a)	4.27 (a)	1105.09 (a)
H+Bb+Ri	117.33 (a)	12.07 (a)	71.05 (a)	24.37 (a)	16.43 (a)	2.75 (a)	955.298 (a)
H+Bb+Fm	114 (a)	13.12 (a)	81.1 (a)	31.77 (a)	17.29 (a)	3.32 (a)	1005.06 (a)
H+Mm+Ri	121.91 (a)	12.32 (a)	80.16 (a)	24.37 (a)	14.44 (a)	2.96 (a)	1030.13 (a)
H+Mm+Fm	120.58 (a)	13.05 (a)	75.74 (a)	26.42 (a)	17.57 (a)	2.56 (a)	1000.79 (a)

Altura de planta (AP), diámetro de tallo (DT), peso fresco tallo (PFT), peso fresco raíz (PFR), peso seco tallo (PST), peso seco raíz (PSR), área foliar (AF) maíz criollo (C), maíz híbrido (H) *R. intraradices* (Ri), *F. mosseae* (FM), *B. bassiana* (Bb) y *M. anisopliae* (Ma). Letras diferentes al final de los números indican diferencia significativa entre medias, Prueba de Tukey al 95%.

### Dinámica de crecimiento de maíz híbrido con doble inoculación

La inoculación de hongos micorrízicos y los hongos endófitos simple o combinada no mostró un efecto en el crecimiento vegetativo en las plantas de maíz híbrido. Solo las plantas inoculadas con el endófito de *M. anisopliae* presentaron una tendencia a un mayor crecimiento vegetativo, pero sin diferencias estadísticas (Figura. 21).



**Figura 21** Dinámica de crecimiento vegetativo (mm) de maíz criollo (C) inoculado con hongos micorrízicos arbusculares de las especies de *R. intraradices* (Ri), *F. mosseae* (FM), *B. bassiana* (Bb) y *M. anisopliae* (Ma). Con intervalos de medición de 15 y 10 días después del trasplante (DDT), Prueba de Tukey al 95%.

Los resultados muestran que la inoculación con los HMA sola o combinada con los HE, no mostraron tener un efecto en el crecimiento vegetativo en las dos variedades de maíz, al menos a los 70 días posteriores a la inoculación

La inoculación de hongos micorrízicos es conocida por sus diferentes efectos que tienen en las plantas. Uno de los efectos más conocidos de las micorrizas es la ganancia de biomasa que proporciona a su huésped (Suk *et al.*, 2006). La biomasa se ve reflejada en diferentes maneras, como una mayor altura de la planta, mayor diámetro de tallo, mayor área foliar. Originado mayor peso de biomasa del follaje y de raíz, así como una mayor ganancia de masa seca en tallo y raíz (Bona *et al.*, 2016).

Los resultados del experimento demostraron que la inoculación de los HMA no mostró tener un efecto las variables morfológicas en las dos variedades de maíz

que se utilizaron. En otros trabajos realizados se han obtenido resultados satisfactorios en maíz utilizando HMA como promotores de crecimiento. No solo como promotores de crecimiento, también como suministro de nutrientes y mayores rendimientos de la producción.

Por ejemplo, Sabia et al. (2016), desarrollaron su experimento a campo abierto utilizaron una variedad de maíz híbrida (Pioneer). La inoculación se realizó en las semillas utilizando un producto comercial de diferentes especies de *Glomus*. Al final del experimento reportaron que las plantas que se inocularon presentaron mayor altura, peso seco y un mayor rendimiento en comparación con las no inoculadas.

Farías et al. (2018), experimentaron con la inoculación de hongos micorrízicos y *B. bassiana* ( $1.1 \times 10^7$  conidios mL<sup>-1</sup>), *M. anisopliae* ( $1.2 \times 10^7$  conidios mL<sup>-1</sup>), *P. chlamydosporia* (V), *P. lilacinum* ( $0.06 \times 10^7$  conidios mL<sup>-1</sup>), y *T. asperella* ( $1.5 \times 10^7$  conidios mL<sup>-1</sup>) en maíz y caña de azúcar. Sus resultados mostraron que la inoculación de micorrizas sola o combinada con los demás microorganismos no tuvo un efecto en la mayoría de sus variables morfológicas (peso fresco y seco de tallo y raíz). Solo el peso fresco fue mayor en las plantas de maíz que sólo se inocularon con las micorrizas. En la caña de azúcar no hubo diferencias estadísticas.

En el trabajo de Suk et al. (2006), reportaron un aumento de crecimiento vegetativo y peso seco en maíz, cuando se inoculó por HMA (*Glomus sp.* *Glomus sp.* y *Scutellospora sp.*). Adicional a esto observaron que los parámetros evaluados incrementaron cuando la inoculación de HMA se combinaron entre las especies de hongos micorrízicos. Esto fue después de 16 semanas después del trasplante, obteniendo una colonización promedio del 50%.

Andreia y Carrenho, (2017) reportaron que la inoculación con *Cetraspora pellucida* en maíz aumentó el crecimiento vegetativo de un cultivar de maíz después de 90 días posteriores a la emergencia de las plantas. Las plantas que se inocularon presentaron un mayor peso de materia seca en la raíz, sin embargo, este aumento de materia seca no se vio reflejado en el peso seco del follaje.

Raza *et al.* (2012), reportaron un crecimiento positivo en cuatro cultivares híbridos de maíz. La inoculación se realizó a en campo abierto con la especie de *F. mosseae*. El aumento en el crecimiento vegetativo es una consecuencia de la capacidad de los HMA para aportar nutrientes y agua, además de que pueden estimular la producción de hormonas que contribuyen al crecimiento vegetativo.

Posiblemente la simbiosis entre el maíz y la micorriza pudo llegar a actuar como parásito para la planta afectando negativamente su desarrollo, ya que las plantas que no se inocularon con los HMA mostraron una tendencia a crecer más que las que se inocularon y las cuales presentaron porcentajes de colonización cercanos al 80%. Las micorrizas pueden llegar a comportarse como parásitos según Johnson *et al.* (1997) cuando los gastos netos superan los beneficios netos. Así la micorriza puede ser positiva o negativa (parásitos) esto dependerá de la especie de HMA y la especie de planta, además de la densidad de colonización micorrízica. Cuando hay una alta población micorrízica las plantas se ven afectadas principalmente por la competencia de nutrientes (Garrido *et al.*, 2010). En una simbiosis estable la planta destina entre el 10 y 20 % de carbono asimilado a la micorriza (Bona *et al.*, 2016). Es posible que en condiciones de alta población la demanda de nutrientes por parte de la micorriza supere la cantidad de nutrientes que su huésped le puede aportar. Además, posiblemente interfiere en la producción de otras sustancias importantes para la planta que alteran el sistema de defensa de la planta haciéndola más susceptible al ataque de plagas y enfermedades (Garrido *et al.*, 2010).

Garrido *et al.* (2009), demostraron que a medida que aumenta la concentración de inóculo de HMA en plantas de *Datura stramonium* las plantas se ven afectadas en la producción de semillas, área foliar, días a floración y peso seco de raíz. Esto cuando la colonización alcanzó el 35% de colonización, demostrando que a mayor inóculo mayor colonización, pero menor beneficios para la planta.

En la respuesta de las plantas que fueron inoculadas con HMA y HE, las plantas presentaron resultados similares a las plantas inoculadas por HMA, esto debido a que la colonización del endófito no se estableció y por lo cual la planta solo estableció relación simbiótica con los HMA.

La colonización endófitica por los HE está condicionada por factores como la temperatura, humedad relativa, el método de inoculación, la zona de inoculación, la especie de hongo y su concentración, la especie vegetal y su edad (Parsa *et al.*, 2013). Entre los factores que pudieron limitar la colonización de los HE, podemos incluir la temperatura. Las condiciones del invernadero de temperatura y humedad no fueron las óptimas como ya se mencionó se llegaron a registrar durante el día una temperatura mayor a los 50°C. En la mayoría de trabajos realizados con estos dos géneros de hongos entomopatógenos como endófitos las condiciones de manejo son controladas. Utilizando temperaturas entre los 25° y 27°C y en cámaras de crecimiento aisladas, como el de Parsa *et al.* (2013). *Beauveria* y *Metarhizium* son mesófilos y pueden desarrollarse en un rango de temperatura de 10 a 40°C, pero para su germinación de los conidios se requiere una temperatura de 25 a 30°C (Brunner *et al.*, 2018). Además de ello, se presentaron otras especies de hongos endófitos no inoculados que pudieron actuar como competidores con la inoculación artificial realizada. Probablemente los endófitos encontrados se transmitieron a través de las semillas de maíz empleadas. Las gramíneas son el grupo vegetal en el que más se ha reportado la presencia de hongos endófitos, asociados a los géneros *Lolium*, *Festuca* y *Brachiaria* (Abello y Kelemu, 2006). Los endófitos pueden estar presentes en diferentes partes de la planta como hojas, tallo, flores, frutos, raíces y semillas. Las semillas son una de las diferentes en que los HE se transmiten (Sánchez *et al.*, 2013)

Los hongos entomopatógenos endófitos son conocidos por su papel mutualista con las plantas como una estrategia adaptativa para el control de plagas y patógenos, pues estimulan en la planta la absorción de nutrientes del suelo y mejora sus resistencias además de esto en algunas ocasiones tienen la función de promover el crecimiento vegetativo de su huésped (Bamisile *et al.*, 2018). En este experimento al no lograrse la simbiosis no se pudo comprobar su efecto como promotores de crecimiento.

Sin embargo, en otros trabajos han obtenido resultados positivos en la colonización endófitica pero negativa como promotores de crecimiento. Por ejemplo, en el trabajo

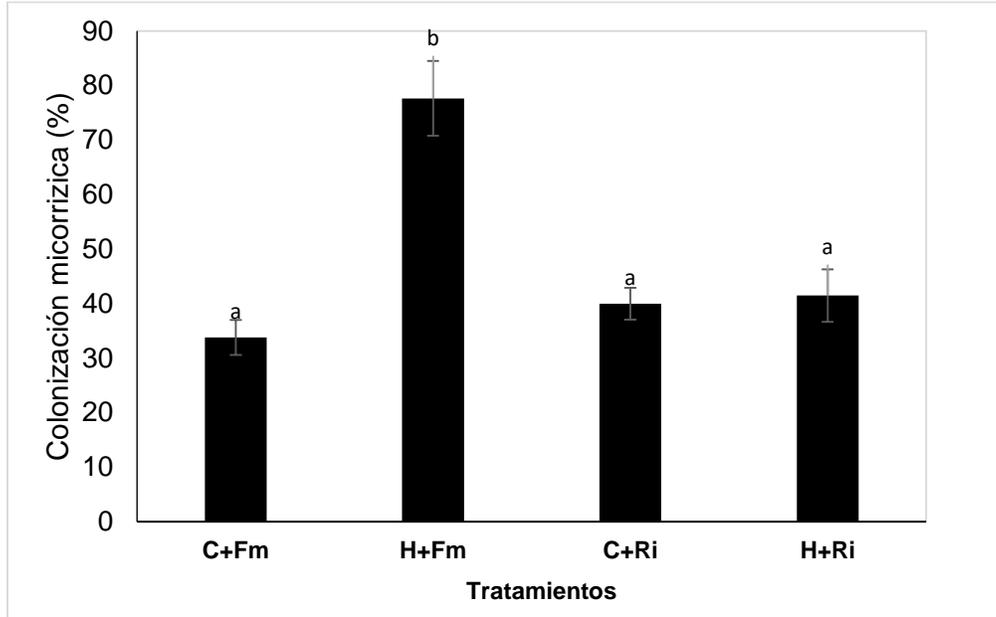
de Parsa *et al.* (2013) obtuvieron colonización endófitica de *Beauveria* y *Metarhizium* en el 80% de las plantas de chile, frijol y maíz. Sin embargo, su efecto fue nulo como promotores de crecimiento. Por otra parte, existen trabajos reportados entre asociaciones de HMA y HE, con beneficios positivos para las plantas como el de Sang y Heum (2007) demostraron que la inoculación de HMA (*Acaulospora longula*, *Glomus mosseae* y *Archeospora leptotricase*) y hongos endófitos (*Glomerella acutata*, *Pestalotiopsis microspora* y *Pestalotiopsis neglecta*) promovieron el crecimiento vegetativo en plantas de *Oenothera odorata*, *Plantago asiatica*, *Isodon japonicus* y *Aster yomena* excepto en plantas de *Trifolium repens* a los cuarenta días posteriores a la inoculación. Además de que en todas las plantas se obtuvo una mayor ganancia en el peso seco.

## **Variables microbiológicas**

### **Colonización micorrízica antes de la infestación de *S. frugiperda*.**

Las dos variedades de maíz presentaron colonización por parte de las dos especies de HMA evaluadas *R. intraradices* y *F. mosseae* lo cual indica que las dos especies tienen afinidad por las raíces de las dos variedades de maíz para establecer una relación simbiótica.

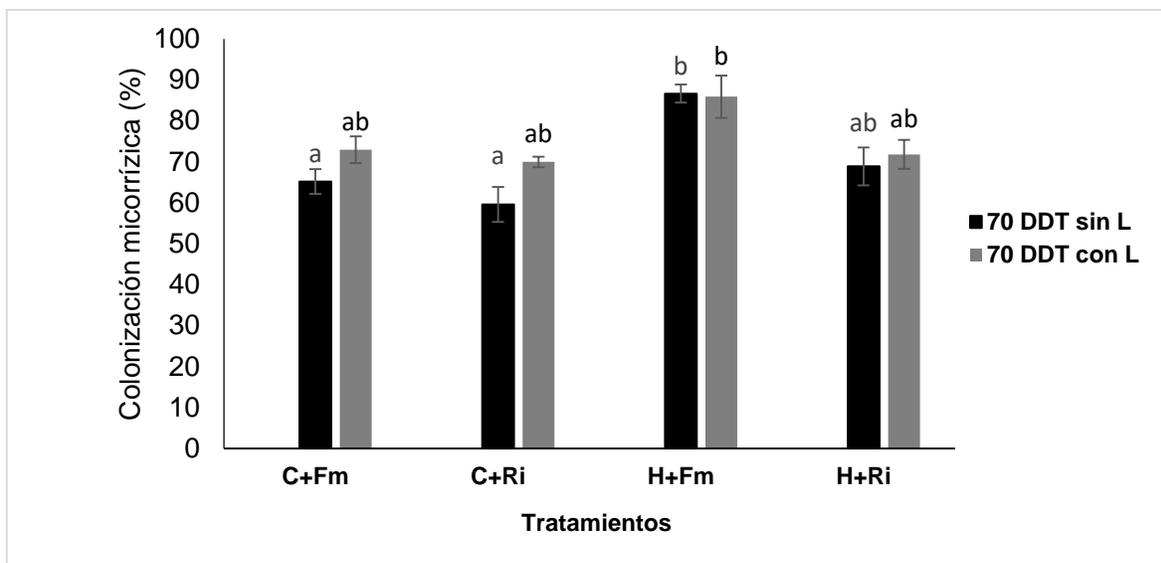
A los 60 días después de la inoculación con los HMA y previo a la infestación de larvas de gusano cogollero se encontraron diferencias de colonización ( $P \leq 0.05$ ). La colonización de *F. mosseae* en la variedad híbrida presentó el porcentaje de colonización más alto, 70% de colonización lo que sugiere que esta especie tiene mayor afinidad por la variedad híbrida. Mientras que en la variedad criolla las dos especies de HMA, mantuvieron la misma tendencia de colonización al igual que la especie de *R. intraradices* inoculada en la variedad híbrida. El promedio de colonización para estos fue del 38% (Figura. 22). La especie de *R. intraradices* se adaptó a la variedad híbrida en menor tiempo alcanzando el 76% de colonización a los 60 días, mostrando una diferencia de casi un 30% con las otras especies en la variedad criolla.



**Figura 22.** Colonización micorrízica a los 60 días después de la inoculación de *F. mosseae* (Fm) y *R. intraradices* (Ri) antes de la infestación e herbivoría de *S. frugiperda* en maíz criollo (C) e híbrido (H). Letras superiores diferentes indican diferencias estadísticas. Letras diferentes sobre las barras indican diferencia significativa entre medias, Prueba de Tukey al 95%.

### **Colonización micorrízica después de la herbivoría en maíz.**

El porcentaje de colonización obtenido a los 70 días después de la inoculación con HMA, en plantas criollas e híbridas de maíz y sometidas a herbivoría por gusano cogollero y no sometidas a herbivoría se muestran en la figura 23.



**Figura 23.** Colonización micorrízica a los 70 días después del trasplante (DDT) de *F. mosseae* (Fm) y *R. intraradices* (Ri) y la infestación de larvas de *S. frugiperda* en maíz criollo (C) e híbrido (H). Letras diferentes sobre las barras indican diferencia significativa entre medias ( $P < 0.05$ ), Prueba de Tukey al 95%.

El porcentaje más alto de colonización se presentó en la variedad híbrida inoculada con la especie de *F. mosseae* con un valor próximo al 90%. La colonización más baja se encontró en la variedad híbrida inoculada con *R. intraradices*.

El porcentaje de colonización fue similar en las dos variedades de maíz cuando no se sometieron a herbivoría a excepción de la especie de *F. mosseae* en maíz híbrido la cual fue la que presentó el mayor porcentaje de colonización próximo al 90%.

La misma tendencia se presentó en las plantas de las dos variedades cuando se sometieron a herbivoría. Sin embargo, se observaron diferencias estadísticas en las entre las plantas sometidas a herbivoría respecto a las no sometidas. En la variedad criolla se observó que la inoculación con *R. intraradices* el porcentaje de colonización aumentó en las plantas que fueron sometidas a herbivoría respecto a las que no se sometieron a herbivoría. Esta misma especie en la variedad híbrida mostró una tendencia al mismo efecto. La cepa de *F. mosseae* en la variedad criolla mostró una tendencia a aumentar el porcentaje de colonización micorrízica cuando

la planta se sometió a la herbivoría por el gusano cogollero. En la variedad híbrida no hay diferencia en el porcentaje de micorrización cuando las plantas se someten o no a la herbivoría de *S. frugiperda*.

En cuanto a las estructuras de manera general el mayor contenido de vesículas se observó en los tratamientos inoculados con especie de *F. mosseae* independientemente de la presencia o ausencia de larvas. Mientras que en la presencia de arbuscúlos sólo la inoculación de *F. mosseae* + Larva fue el mayor estadísticamente (Cuadro 10).

**Cuadro 12.** Estructuras de las micorrizas de *F. mosseae* y *R. intraradices* en plantas de maíz criollo e híbrido a los 70 días posteriores a la inoculación de los HMA y a los 10 días se someterse a herbivoría por larvas de *S. frugiperda*.

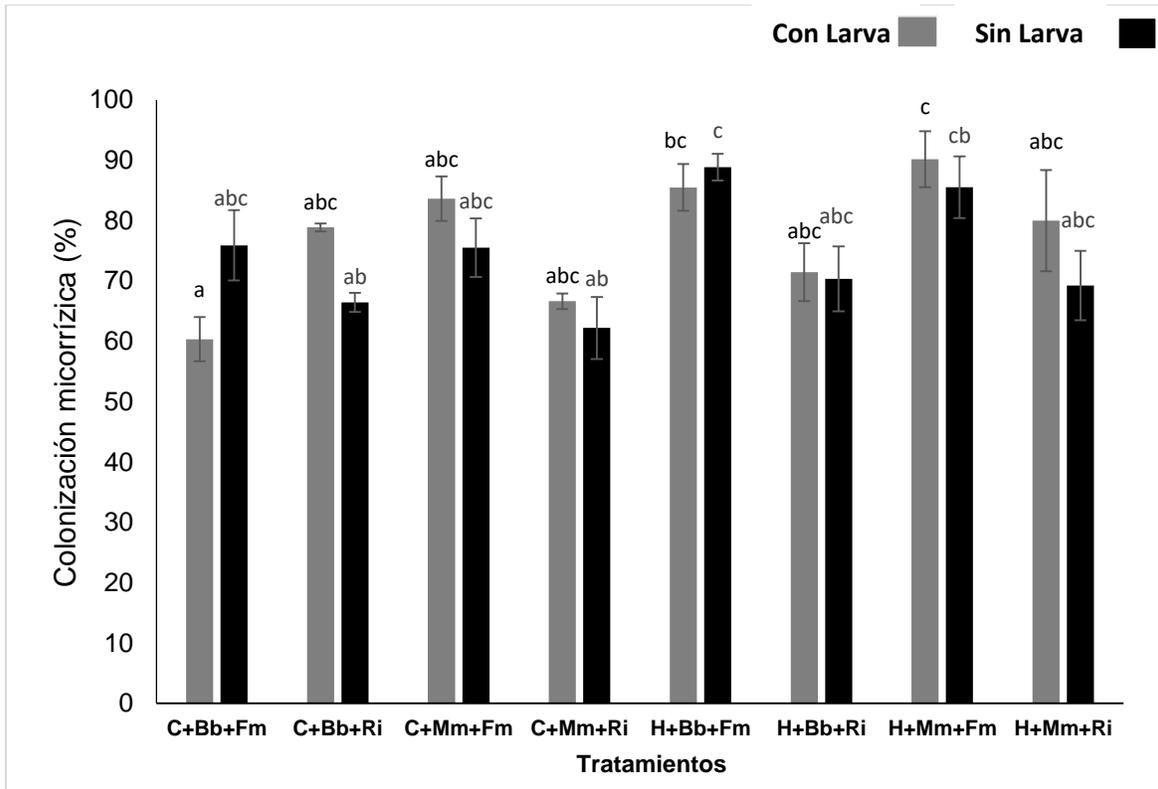
Tratamiento	Micelio	Vesícula	Arbuscúlos
C+Ri	59.62 (a)	6.66 (a)	1.11 (a)
C+Fm	65.18 (a)	20.18 (ab)	4.07 (ab)
H+Ri	68.88 (ab)	5.18 (a)	5.92 (ab)
H+Fm	86.66 (b)	30.33 (abc)	8.51 (ab)
C+Ri+L	69.99 (ab)	8.51 (a)	5.18 (ab)
C+Fm+L	72.95 (ab)	36.66 (bc)	4.07 (ab)
H+Ri+L	71.82 (ab)	5.92 (a)	5.55 (ab)
H+Fm+L	85.92 (b)	48.14 (c)	26.66 (b)

Maíz criollo (C), Maíz híbrido (h), Larva de *S. frugiperda* (L), *M. anisopliae* (Mm) *B. bassiana* (Bb) *F. mosseae* (Fm) *R. intraradices* (Ri). Letras diferentes al final de los números (a, b y c) indican diferencia significativa entre medias, Prueba de Tukey al 95%.

### **Colonización micorrízica después de la herbivoría en maíz inoculado con HE.**

En las plantas donde se realizó la inoculación dual con los HMA y 30 días después la inoculación con los hongos entomopatógenos, la colonización encontrada a los 70 días en plantas sometidas y no sometidas a herbivoría, fue de un rango entre el 60 y 90%. *F. mosseae* asociada a *B. bassiana* tanto en la variedad híbrida como criolla mostró una tendencia a colonizar más cuando es sometida a herbivoría. Para

el resto de combinaciones entre los HMA, hongos entomopatógenos y variedad se mostró un efecto contrario. La colonización muestra una tendencia a disminuir en las plantas sometidas a herbivoría respecto a las no sometidas. Esto a los 10 días después de la infestación con las larvas de *Spodoptera frugiperda* (Figura 24).

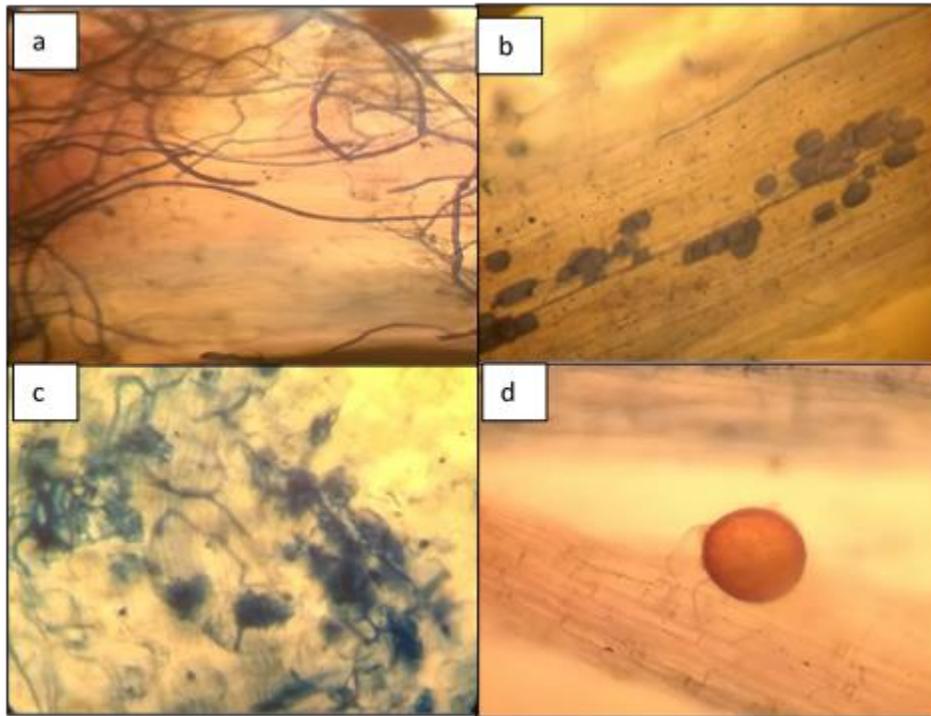


**Figura 24.** Colonización micorrízica a los 70 días después de la inoculación de *F. mosseae* (Fm) y *R. intraradices* (Ri) después de infestación e herbivoría de *S. frugiperda* en maíz criollo (C) e híbrido (H) inoculados con *Beauveria bassiana* (Bb) y *Metarhizium anisopliae* (Ma). Letras diferentes indican diferencias estadísticas entre medias, Prueba de Tukey al 95%.

El mayor porcentaje de colonización se presentó con la especie de *F. mosseae* en las plantas híbridas asociados con los hongos entomopatógenos tanto en plantas con larva y sin larva.

Las plantas inoculadas con HMA y HEE, fueron colonizadas por las diferentes estructuras de los HMA (Figura 25). El micelio fue la estructura más abundante

encontrándose porcentajes de colonización comprendidos en un rango de 60 y 90 %.



**Figura 25.** Colonización de las diferentes estructuras de la micorriza en maíz a los 70 días después de la inoculación micelio (a), Vesículas (b), arbusculos (c) y esporas (c).

Las vesículas fueron las segundas estructuras encontradas en mayor abundancia. La colonización de vesículas no superó el 65 % de colonización. La presencia de vesículas fue más alta en las plantas que fueron inoculadas con *F. mosseae* tanto en las plantas híbridas como criollas. La presencia o ausencia de larvas y la inoculación de hongos entomopatógenos no marcaron una diferencia en cuanto el porcentaje de colonización de vesículas (Cuadro 11).

**Cuadro 13.** Estructuras de la micorriza de *F. mosseae* (Fm) y *R. intraradices* (Ri) en plantas de maíz criollo (C) e híbrido (H) inoculadas con hongos entomopatógenos endófitos *Beauveria* (Bb) y *Metarhizium* (Ma) a los 70 días posteriores la inoculación de los HMA y a los 10 días se someterse a herbivoría por larvas (L) de *S. frugiperda*.

Tratamiento	Micelio	Vesículas	Arbúsculos
C+Bb+Fm	60.36 (a)	13.33 (ab)	7.4 (ab)
C+Bb+Fm+L	75.92 (abc)	26.66 (ab)	3.33 (a)
C+Bb+Ri	78.88 (abc)	15.92 (ab)	18.51 (ab)
C+Bb+Ri+L	66.47 (abc)	1.85 (a)	1.11 (a)
C+Mm+Fm	83.66 (abc)	37.03 (ab)	13.10 (ab)
C+Mm+Fm+L	75.55 (abc)	23.33 (ab)	1.11 (a)
C+Mm+Ri	66.66 (abc)	4.85 (ab)	1.85 (a)
C+Mm+Ri+L	62.22 (ab)	0.74 (a)	0.37 (a)
H+Bb+Fm	85.52 (bc)	38.51 (ab)	5.55 (a)
H+Bb+Fm+L	88.88 (c)	51.66 (ab)	18.51 (ab)
H+Bb+Ri	71.48 (abc)	5.18 (ab)	0.37 (a)
H+Bb+Ri+L	70.36 (abc)	9.99 (ab)	10.73 (ab)
H+Mm+Fm	90.18 (c)	64.07 (b)	25.73 (b)
H+Mm+ Fm+L	85.55 (bc)	45.36 (ab)	18.51 (ab)
H+Mm+Ri	79.99 (abc)	41.85 (ab)	9.6 (ab)
H+Mm+Ri+L	69.25 (abc)	1.11 (a)	2.22 (a)

Maíz criollo (C), maíz híbrido (h), Larva (L), *M. anisopliae* (Mm) *B. bassiana* (Bb) *F. mosseae* (Fm) *R. intraradices* (Ri). Letras diferentes al final de los números (a, b y c) indican diferencia significativa entre medias, Prueba de Tukey al 95%.

La presencia de arbúsculos en las raíces fue en menor medida respecto a las estructuras de micelio y vesículas. La colonización más alta de arbúsculos se encontró en plantas híbridas inoculadas con *F. mosseae* y con *M. anisopliae* siendo esta la colonización. La colonización más alta de arbúsculos obtenida a los 70 días fue del 25.7%. La tendencia de colonización por parte de los arbúsculos fue similar a la de vesículas. La mayoría de arbúsculos se encontró en la variedad híbridas y criollas inoculadas con la especie de *F. mosseae*. La especie de *R. intraradices* tanto en la variedad a híbrida como criolla reporta la menor cantidad de estas estructuras al menos hasta los 70 días posteriores a la inoculación con los HMA.

La presencia o ausencia de larvas, así como la inoculación con hongos entomopatógenos no mostró tener un efecto sobre el aumento o decremento de arbusculos durante la simbiosis micorrízica en plantas para las dos variedades.

Gange *et al.* (2002) proponen que la colonización micorrízica en algunas ocasiones aumenta cuando su huésped es atacado por herbívoros. Esto fue comprobado por Tawaraya *et al.* (2012), en un experimento realizado en soja donde encontraron que la colonización aumento en las plantas que fueron sometidas a herbivoría. Las plantas de soja fueron inoculadas con *Gigaspora margarita* e infectadas a los 35 DDT con larvas de *Spodoptera litura*. Durante el experimento realizaron varios muestreos de colonización, a los 40 y 60 DDT la colonización fue igual entre plantas sometidas y no sometidas a herbivoría. A los 77 DDT las plantas que sufrieron la herbivoría presentaron casi un 15% más alto de colonización respecto a las que no la sufrieron.

Este mismo efecto fue observado por Kula *et al.* (2005), en pastos inoculados con HMA y los cuales se sometieron a herbivoría de saltamontes. Posterior a la infestación las plantas micorrizadas mostraron una sobrecompensación en el crecimiento vegetal.

Por su parte Gange *et al.* (2002), observaron que las plantas de *Plantago lanceolata* son tolerables a la defoliación por herbívoros, pero la colonización disminuye, además de que los HMA promovieron el crecimiento vegetativo, pero sólo cuando las plantas no sufrieron herbivoría.

El aumento en la colonización en las plantas, se cree que es debido al aumento en los niveles de carbono en la raíz y a un incremento o cambios en los exudados de la raíz. Los cuales pueden influir en una mayor adquisición de nutrientes disponibles para la planta (Wamberg *et al.*, 2003; Gehring y Bennett, 2009)

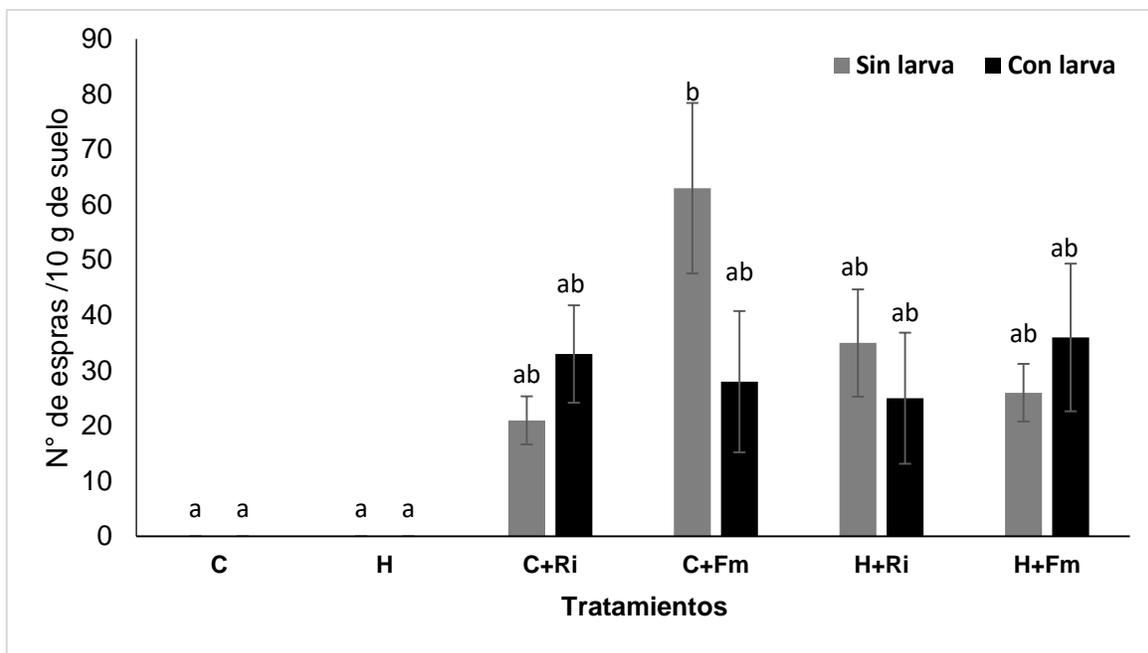
Por otro lado, la disminución de colonización micorrízica en las plantas sometidas a herbivoría se piensa que es principalmente a la falta de nutrientes en forma de carbono para la micorriza (Gehring y Bennett, 2009). Otros factores considerados que pueden influir en una reducción en la colonización son los largos periodos a la

herbivoría. Wamberg et al. (2003), reportaron un aumento de colonización micorrízica a los 10 días después de la herbivoría sin embargo a los 16 días el efecto fue contrario. Otros factores a considerar son las poblaciones altas de insectos causantes de la herbivoría a mayor población mayor será el daño y mayor desgaste energético para la planta. Estos factores pueden llegar a tener un efecto mayor cuando la planta se encuentra en condiciones de estrés (Gange, 2007).

La colonización micorrízica bajo condiciones de herbivoría puede variar de acuerdo a las condiciones bajo las cuales se encuentren la planta y de las interacciones con los herbívoros. Dependiendo del grado de asociación y de sus relaciones con su entorno dependerá el su desarrollo y supervivencia.

### **Número de esporas de hongos micorrízicos**

Las dos especies de micorrizas usadas lograron llegar a la producción de esporas a los 70 días después de la inoculación. La mejor para producir esporas fue la de *F. mosseae* inoculada en maíz de origen criollo cuando no se sometió a herbivoría (Figura. 26). En las plantas que se sometieron a herbivoría el número de esporas fue menor. Esta misma especie en la variedad hibrida produjo la misma cantidad de esporas en plantas sometidas y no sometidas a herbivoría. Las esporas producidas por *R intraradices* fue similar entre las dos variedades de maíz bajo condiciones de herbivoría y en condiciones de no herbivoría. La baja densidad de esporas tal vez se deba a al corto periodo de tiempo que duró el experimento.



**Figura 26.** Número de esporas en 10 gramos de suelo de *R. intraradices* (Ri) y *F. mosseae* (Fm) en maíz híbrido (H) y criollo (c) a los 70 días después de la inoculación. Letras superiores diferentes indican diferencias estadísticas entre medias ( $P < 0.05$ ), Prueba de Tukey al 95%..

### Variables en las larvas

El desarrollo larval de *Spodoptera frugiperda* fue uniforme entre los tratamientos evaluados, sin importar la presencia del HMA, el diámetro de la cápsula cefálica fue en promedio de 2.18 mm. La diferencia estadística solo se encontró entre los dos tratamientos inoculados con *B. bassiana* y *F. mosseae* de los dos tipos de maíces (Cuadro 12), donde el ancho de la cápsula cefálica fue menor para las larvas que se alimentaron de las plantas inoculadas con *B. bassiana* y *F. mosseae* en la variedad criolla. El peso de las larvas fue bajo para las larvas de la variedad criolla mientras que el peso más alto fue para las larvas de variedad híbrida. En la determinación del estadio larval de acuerdo a la escala propuesta por Villa y Catalán (2004), solo las larvas de tres tratamientos se encontraron en instar cinco, las

híbridas inoculadas con *R. intraradices* y las de la variedad criolla inoculadas con *R. intraradices* inoculada individualmente y en combinación con *M. anisopliae*.

**Cuadro 14.** Desarrollo de *S. frugiperda* después de someterse a herbivoría en plantas de maíz criollo e híbrido inoculados con Hongos micorrízicos arbusculares y hongos entomopatógenos endófitos.

Tratamiento	Cápsula cefálica (mm)	Instar	Peso de larva (g)	Peso de pupa (g)
<b>C+L</b>	2.0917ab	4°	0.067ab	0.23138a
<b>C+Mm+L</b>	1.9620ab	4°	0.104ab	0.24934a
<b>C+Bb+Fm+L</b>	1.7980a	4°	0.061ab	0.23580a
<b>C+Mm+Fm+L</b>	2.1050ab	4°	0.079ab	0.25268a
<b>C+Bb+L</b>	2.1550ab	4°	0.066ab	0.27636a
<b>C+Bb+Ri+L</b>	2.1600ab	4°	0.091ab	0.26538a
<b>C+Fm+L</b>	2.1967ab	4°	0.059 <sup>a</sup>	0.23317a
<b>C+Ri+L</b>	2.3200ab	5°	0.091ab	0.23435a
<b>C+Mm+Ri+L</b>	2.3883ab	5°	0.104ab	0.24854a
<b>H+L</b>	2.1283ab	4°	0.077ab	0.23068a
<b>H+Bb+Ri+L</b>	2.1683ab	4°	0.096ab	0.25060a
<b>H+Fm+L</b>	2.2100ab	4°	0.102ab	0.23160a
<b>H+Mm+L</b>	2.2117ab	4°	0.116ab	0.25937a
<b>H+Mm+Fm+L</b>	2.2833ab	4°	0.114ab	0.24968a
<b>H+Ri+L</b>	2.5500ab	5°	0.147b	0.28214a
<b>H+Mm+Ri+L</b>	2.0280ab	4°	0.116ab	0.24580a
<b>H+Bb+L</b>	2.0317ab	4°	0.066ab	0.27490a
<b>H+Bb+Fm+L</b>	2.1117b	4°	0.102ab	0.24623a

Maíz criollo (C), Maíz híbrido (H), Larva de *Spodoptera frugiperda* (L), *M. anisopliae* (Mm) *B. bassiana* (Bb) *F. mosseae* (Fm) *R. intraradices* (Ri). Letras diferentes al final de los números (a y c) indican diferencia significativa entre medias, Prueba de Tukey al 95%.

En el peso de larva, solo dos tratamientos fueron estadísticamente diferentes entre ellos el C+Fm+L con respecto al H+Ri+L, para el resto de los tratamientos estadísticamente no fueron diferentes. En la variable de peso de pupas todos los tratamientos presentaron el mismo peso con un promedio de 0.24 g.

En varios trabajos que documentan los efectos benéficos de los hongos micorrízicos arbusculares sobre los herbívoros. Los efectos sobre los herbívoros pueden ser positivos o negativos, dependiendo las condiciones bajo las cuales se da la interacción planta-micorriza-herbívoro. Entre los efectos beneficios se encuentra una mayor fertilidad, mayor tasa de crecimiento, mayor pupación y mayor supervivencia en larvas de *Spodoptera litura* alimentadas con plantas de soja micorrizadas (Tawaraya *et al.*, 2012). Por otra parte, se han reportado casos donde el herbívoro se ve afectado indirectamente por la colonización micorrízica. Depredadores y/o parasitoides son atraídos por medio de volátiles producidos por las plantas. Además, en otros casos los insectos herbívoros se ven afectados directamente. Se han presentado casos donde la fecundidad, el desarrollo y la supervivencia se han visto afectados (Gehring y Bennett, 2009)

La interacción entre hongos micorrízicos arbusculares y hongos entomopatógenos endófitos sobre los insectos aún no han sido estudiados a profundidad. Uno de los trabajos donde se reporta la interacción entre HMA y HE es el de Shrivastava *et al.* (2015), en este trabajo plantas de tomate fueron inoculadas con *R. intraradices* + *B. bassiana* e infestadas con larvas de *Spodoptera exigua* durante 10 días. Las larvas que se alimentaron de plantas con la colonización dual del HMA y HE presentaron menor peso que plantas sin HMA y HE. Este trabajo demuestra que las inoculaciones duales de HMA y HE tiene efecto negativo en el desarrollo de los herbívoros y podrían utilizarse en el manejo integrado de plagas.

El efecto de las combinaciones de hongos entomopatógenos endófitos y HMA, se han estudiado por separado. Los resultados no siempre son positivos. Por ejemplo Gangue *et al.* (2002), encontraron que plantas de *Senecio jacobaea* inoculadas con HMA e infestadas con larvas de palomilla, las larvas no fueron afectadas al momento de la herbivoría, además de que las plantas inoculadas crecieron menos respecto a las no inoculadas. Por otra parte Wamberg *et al.* (2003), obtuvieron resultados similares en plantas *Pisum sativum* inoculadas con *Glomus intraradices* y sometidas a herbivoría por *Sitona lineatus*. Después de 10 semanas de herbivoría

de plantas inoculadas y no inoculadas, no se encontró diferencia en el desarrollo de *Sitona lineatus*.

#### **6.4.5. Conclusiones**

Las dos especies de hongos micorrízicos arbusculares inoculados establecieron la simbiosis micorrízica con el maíz criollo e híbrido. Los porcentajes de colonización fueron de 80% en promedio a los 70 días. Durante la simbiosis, los HMA lograron formar las diferentes estructuras fúngicas como vesículas y arbusculos. La especie de *F. mosseae* fue la que mejor se asoció con las plantas mostrando tendencias a producir más vesículas y esporas. Sin embargo, la colonización micorrízica no promovió el crecimiento vegetativo en las plantas de maíz, pero mostro tener un efecto compensatorio en el área foliar ante la herbivoría. Mientras que en las larvas sus efectos en el desarrollo fueron nulos.

La colonización de los hongos entomopatógenos como endófito no se pudo comprobar por el método utilizado para corroborar su presencia en las plantas de los maíces, lo que sugiere que la colonización endófito de las dos especies de hongos entomopatógenos endófitos no se estableció en las plantas de maíz, razón por la cual no se realizaron análisis estadísticos para las variables correspondientes a los endófitos. La colonización de los entomopatógenos posiblemente no se dio debido a las condiciones ambientales bajo las cuales se desarrollaron las plantas las cuales no son las optimas para los hongos entomopatógenos. Al no colonizar las plantas sus efectos de los hongos entomopatógenos como endófitos no se pudieron observar las variables de crecimiento vegetativo y desarrollo de las larvas de *S. frugiperda*.

## Bibliografía

- Abello, J. Kelemu, S. 2006. Hongos endófitos: ventajas adaptativas que habitan en el interior de las plantas. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. Vol 7(2), pp 55-57.
- Andreia, K y Carrenho, R. 2017. Growth and mycorrhizal colonization of maize plants treated with aqueous extracts from nonmycorrhizal weeds. *Pesq agropec. Bras.* Vol 52 (11), pp 1042-1049.
- Bona, E. Scarafomi, A. Marsano, F. Boatti, L. Copetta, A. Massa, N. Gamalero, E. Agostino, G. Cesaro, P. Cavelatto, M y Berta, G. (2016). Arbuscular mycorrhizal symbiosis affects the grain proteome of *Zea mays*: a field study. *Sci. Rep.* Vol 6 (1), pp 1-12.
- Brunner, C. Reyes, M, Moonjely, S y Bidochka, M. 2018. A review on the genus *Metarhizium* as an entomopathogenic microbial biocontrol agent with emphasis on its use and utility in Mexico. *Biocontrol science and technology*. Vol 29(1), pp 83–102.
- Bamisile, B. Kanta, C. Senyo, A y Ravindran K. 2018. Prospects of endophytic fungal entomopathogens as biocontrol and plant growth promoting agents: An insight on how artificial inoculation methods affect endophytic colonization of host plants.
- Elizondo, J y Boschini, C. Producción de forraje de con maíz criollo y maíz híbrido. *Agronomía mesoamérica*. Vol 13 (1), pp 13-17.
- Farias, C. Carvalho, R. resende, F y Azevedo, L. 2018. Consortium of five fungal isolates conditioning root growth and arbuscular mycorrhiza in soybean, corn, and sugarcane.
- Gange, A. Bower, E. KBrown, V. 2002. Differential effects of insect herbivory on arbuscular mycorrhizal colonization. *Oecologia*. Vol 131 (1), pp 103–112.
- Garrido, E. Bennet, A. Fornoni, S y Strauss, S. 2010. The dark side of the mycorrhiza. *Plant Signal Behav.* Vol 5(8), pp 1019–1021.
- Garrido, E. Bennet, A. Fornoni, S y Strauss, S. 2009. Variation in arbuscular mycorrhizal fungi colonization modifies the expression of tolerance to above-ground defoliation. *Journal of Ecology*. Vol 98 (1), pp 43–49.
- Greenfield, M. Gómez, M. Ortiz, V. Vega, F. Kramer, M y Parsa, S. 2016. *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* endophytically colonize cassava roots following soil drench inoculation. *Biological control*. Vol 95 (1), pp 40-48.

- Gehring, C y Bennett. 2009. Mycorrhizal Fungal–Plant–Insect Interactions: The Importance of a Community Approach. *Environmental Entomology*, Volume 38 (1), pp 93–102.
- Jaber, L. 2015. Grapevine leaf tissue colonization by the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* s.l. and its effect against downy mildew. *BioControl*. Vol 60, (1), pp 103–112.
- Johnson, N. Graham, J y Smit, F. 1997. Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism-parasitism continuum. *New Phytol*. Vol 135 (1), pp 575-585.
- Kabaluk, J y Ericsson. 2007. *Metarhizium anisopliae* seed treatment increases yield of field corn when applied for wireworm control. *Agron J*. Vol 99 (1), pp. 1377 – 1381.
- Kula, M y Wilson, G. 2005. Effects of mycorrhizal symbiosis on tallgrass prairie plant–herbivore interactions. *Ecology Letters*. Vol 8 (1), pp 61–69.
- Omacini, M. Eggers, T. Bonkowski, A. Gange, A y Jones, T. 2006. Leaf endophytes affect mycorrhizal status and growth of co-infected and neighbouring plants. *Functional ecology*. Vol 20 (1), pp 226-232.
- Parsa, S. Ortiz, V y Vega, F. 2013. Establishing fungal entomopathogens as endophytes: towards endophytic biological control. *Journal of Visualized Experiments*. Vol 34 (1), pp 1-5.
- Pérez, Y. Álvarez, J. Mendoza, J. Pat, J. Gomez, R y Cuevas, L. 2012. Diversidad de hongos micorrízicos arbusculares en maíz con cultivo de cobertura y biofertilizantes en Chiapas, México. *Gayana botánica*. Vol 69 (1), pp 46-56.
- Sánchez, R. Sánchez, B. Sandoval, Y. Álvaro, E. Benítez, B. Guillen. M y Méndez, M. 2013. Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *Ciencias Químico-Biológicas*. Vol 16(2), pp132-146.
- Sasan, R y Bidochka, M. 2012. The insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* (clavicipitaceae) is also an endophyte that stimulates plant root development. *American journal of botany*. Vol 99(1), pp 101-107.
- Shrivastava, G; Dee, M; Ownley, B; Vu, A; Köllner, T; Auge, R; toler, H y Chen, F. 2015. Colonization by arbuscular mycorrhizal and endophytic fungi enhanced terpene production in tomato plants and their defense against a herbivorous insect. Springer Science.

- San, H y Heum, A. 2007. Effects of mycorrhizal and endophytic fungi on plant community: a microcosm study. *Mycobiology*. Vol 35(4), pp 186-190.
- Sabia, E. Claps, S. Moreno, G. Bruno, A. Sape, L y Aleandri, R. Inoculación de campo de micorrizas arbusculares en maíz (*Zea Mays* L.) en insumos bajos: estudio preliminar sobre aspectos cuantitativos y cualitativos.
- Seong, Y y Kim, Y. 2019. Tobacco growth promotion by the rntomopathogenic fungus, *Isaria javanica* pf185. *Mycobiology*. Vol 47 (1), pp 126-136.
- Wamberg, C. Christensen, S. Takobsen, I. 2003. Interaction between foliar-feeding insects, mycorrhizal fungi, and rhizosphere protozoa on pea plants. *Pedobiologia*. Vol 47 (1), pp 281–287.
- Suk, H. Lee, J y Heum, A. 2006. Effects of interspecific interactions of arbuscular mycorrhizal fungi on growth of soybean and corn. *Journal micobiology*. Vol 34(1), pp 34-37.

## 7. DISCUSIÓN GENERAL

En el primer capítulo se comprobó que el maíz criollo es altamente susceptible a la micorrización, a la colonización de *R. intraradices* y *F. mosseae*, pero contrario a lo que se ha reportado en otros trabajos como el de Andreia y Carencho, (2017). La simbiosis no necesariamente implica una promoción de crecimiento vegetativo. Sin embargo, las dos especies de HMA son capaces de influir en forma indirecta en el desarrollo de *Spodoptera frugiperda* en estado larval después de la herbivoría, en las plantas micorrizadas se pueden observar dos efectos diferentes en las larvas.

Por un lado, la simbiosis micorrízica de *F. mosseae* afectó el desarrollo de *Spodoptera* disminuyendo la ganancia de peso y por el otro lado *R. intraradices* mejora la ganancia de peso después de la herbivoría en maíz, lo que es negativo para la planta ya que posiblemente el ataque por herbivoría es más severo. Gange *et al.*, (2002); Gehring y Bennett (2009), mencionan que la interacción entre hongos micorrízicos e insectos por medio de las plantas, puede ser perjudicial para los insectos (menor desarrollo) y/o en caso contrario los insectos pueden beneficiarse de la interacción (mayor desarrollo).

En el segundo capítulo tuvo como objetivo la evaluación de la patogenicidad de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en larvas de *Spodoptera frugiperda* en segundo instar. La evaluación se realizó con tres cepas de *M. anisopliae* y seis de *Beauveria bassiana* obtenidas del cepario de biotecnología vegetal del CIATEJ unidad Zapopan. En la prueba de patogenicidad realizada se usó una suspensión de conidios a una concentración de  $1 \times 10^7$  conidios/mL, la inoculación de las larvas se realizó por inmersión de las larvas en la solución de conidios. De los resultados obtenidos las nueve cepas evaluadas fueron patogénicas para *S. frugiperda*. La cepa BbP2 de *Beauveria bassiana* fue la que causó la mayor mortalidad teniendo una diferencia del más del 50 % con la cepa que causó la mortalidad más baja. De manera general las cepas de *Beauveria bassiana* causaron una tasa de mortalidad entre el 50 y 100%. Por su parte las cepas de *Metarhizium anisopliae* causaron una mortalidad promedio del 58% siendo la cepa Met maíz la que alcanzó la mortalidad más alta con el 72.5%. Posiblemente

la afinidad de la cepa Met maíz por *S. frugiperda* se deba al origen de la cepa, ya que esta fue aislada de suelo asociado al cultivo de maíz. El origen de la especie del hongo entomopatógeno influye en su patogenicidad sobre los insectos, de él dependerá la virulencia que tendrá sobre los insectos (Srisukchayakul *et al.*, 2005). Por ejemplo, Garcia *et al.* (2011) encontraron que una cepa de *B. bassiana* aislada en campo de *S. frugiperda* era altamente virulenta sobre *S. frugiperda* en ensayo a nivel laboratorio. Otro factor que influye en la patogenicidad del hongo es especie de insecto que infecta ya que dependiendo del tipo de insecto la patogenicidad de los hongos también va a variar.

En el tercer capítulo se evaluaron los hongos entomopatógenos como posibles endófitos en maíz híbrido por medio de una inoculación artificial al follaje a una concentración de  $1 \times 10^8$  conidios/mL. Las cepas Bb maíz de *Beauveria bassiana* y Met maíz de *Metarhizium anisopliae* fueron las que se utilizaron. Los resultados obtenidos demuestran que tanto *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* tienen la capacidad de establecer una colonización como endófitos en maíz híbrido. Se sabe que *B. bassiana* y *M. anisopliae* entran a la planta por mecanismos similares a cuando lo hacen en los insectos, aunque se desconoce si la planta contribuye en el proceso de colonización (Méndez, 2019).

De las cepas evaluadas las correspondientes a *Beauveria bassiana* fueron las que mayor colonización presentaron en especial la cepa de BbMaiz la cual llegó a alcanzar hasta el 27 % de colonización en las hojas de maíz y de 22.2% en el tallo. Mientras que las cepas de *M. anisopliae* colonizaron en porcentajes más bajos, la cepa de Met maíz colonizó 16% en hoja y 10% en tallo. Esto indica que ambos hongos entomopatógenos tienen más afinidad a colonizar las partes donde se realiza la inoculación, aunque la presencia en el tallo indicaría un movimiento sistémico. Se sabe que algunos endófitos pueden ser sistémicos o estables en la planta (Sánchez, 2009). La colonización fue mayor en las hojas quizás porque fue el lugar donde se realizó la inoculación. Así hay una diferencia entre los dos géneros en el porcentaje de colonización. *Beauveria bassiana* se asocia más a la

colonización foliar mientras que *Beauveria bassiana* se asocia más a la inoculación en la raíz (Bamisille et al., 2018).

En el último experimento se estudió la respuesta de las plantas de maíces criollo e híbrido a la inoculación con hongos micorrízicos arbusculares y hongos entomopatógenos endófitos. En las plantas de maíz criollo e híbrido inoculadas con *B. bassiana* y *M. anisopliae*, y con los HMA no se encontró una colonización de los primeros en hoja, tallo y raíz. Una posible explicación es que las condiciones ambientales no fueron las adecuadas para que se diera la colonización en los trabajos revisados donde se han hecho pruebas de hongos entomopatógenos como endófitos incluido el de esta investigación en el capítulo 3, han sido bajo condiciones controladas de humedad y temperatura (60% de HR y 25°C). Al no colonizar, sus efectos en el desarrollo de la planta y las larvas de *S. frugiperda* no se pudieron observar. Sin embargo, se sabe que son capaces de inducir los mecanismos de defensa de la planta, afectando indirectamente el desarrollo de los insectos (Méndez, 2019). Además, son capaces de promover el crecimiento vegetativo (Bamisille et al., 2018). Contrario a los hongos entomopatógenos endófitos, los hongos micorrízicos si colonizaron las plantas. *F. mosseae* en maíz híbrido fue la que mayor colonización alcanzó antes y después de la infestación de *S. frugiperda*. La colonización por hongos micorrízicos se presentó en las plantas de maíz, pero no influyeron en el desarrollo de las larvas y crecimiento del maíz.

## 8. CONCLUSIONES GENERALES.

El maíz criollo es altamente susceptible a la colonización micorrízica de *F. mosseae* y *R. intraradices* a los 52 días.

*Funneliformis mosseae* en simbiosis con maíz criollo afecta el desarrollo de *S. frugiperda* en su estadio larval, aparentemente las larvas se alimentan menos de las plantas micorrizadas, fomentando la bioprotección de la planta de maíz. Mientras que *Rhizophagus intraradices* en simbiosis con maíz criollo favorece el desarrollo de *S. frugiperda* en estado de larva.

Las cepas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* son patogénicos en larvas de *Spodoptera frugiperda*. Sobre todo, la cepa BbP2 de *Beauveria bassiana* la cual es altamente patogénica.

La colonización endófitica de los hongos entomopatógenos es posible en maíz híbrido de la variedad DK-2052 bajo condiciones controladas de humedad y temperatura. Mientras que a nivel de invernadero la colonización endófitica no se establece posiblemente por las variaciones climáticas.

*Funneliformis mosseae* y *Rhizophagus intraradices* tienen gran afinidad para establecer simbiosis con maíz criollo e híbrido, sin embargo, la simbiosis no promovió el crecimiento vegetativo en plantas de maíz criollo e híbrido DK-2052.

La infestación de *Spodoptera frugiperda* no afecta el desarrollo de la colonización micorrízica en las plantas de maíz criollo e híbrido.

La inoculación de HMA y hongos entomopatógenos en maíz criollo e híbrido no afectan el desarrollo de *S. frugiperda* después de someterse a la herbivoría por 8 días de plantas inoculadas.

## 9. RECOMENDACIONES

Este trabajo aporta información que permite sugerir a los hongos micorrízicos arbusculares y entomopatógenos como potencial solución para la bioprotección de plantas de maíz afectadas por la herbivoría de *Spodoptera frugiperda*.

Se recomienda nuevos estudios para la especie de *F. mosseae*. Que, aunque no promovió el crecimiento vegetativo en plantas de maíz bajo nuestras condiciones, tuvo un efecto negativo en el desarrollo de las larvas de *S. frugiperda*.

En futuro trabajos esta especie *F. mosseae* puede trabajar con esta especie en la bioprotección de *S. frugiperda*. Probando las infestaciones de *S. frugiperda* en diferentes tiempos en las plantas de maíz micorrizadas con *F. mosseae*. Utilizando la alimentación de las larvas directa y en forma in vitro en laboratorio con material vegetal de las plantas micorrizadas.

También se pueden probar ambas especies de HMA y/o consorcios en diferentes variedades de maíz evaluándose como promotoras de crecimiento, así como en la bioprotección en contra de *S. frugiperda*.

En cuanto a los hongos entomopatógenos se comprobó su mortalidad sobre *Spodoptera frugiperda*, así como su capacidad de establecerse como endófitos en maíz bajo condiciones controladas de humedad y temperatura.

Se propone seguir trabajando con las cepas utilizadas en este trabajo, probando diferentes concentraciones de inoculación en las plantas de maíz para la colonización endófitas, y en las larvas de *S. frugiperda* para la patogenicidad. Probando diferentes métodos de inoculación artificial que permitan establecer una colonización principalmente en las plantas como endófitos.

Al igual que los HMA se propone probar los hongos entomopatógenos en diferentes variedades de maíz, en busca de variedades que sean más afines a la colonización endófitas.

A nivel de campo se pueden implementar la combinación de HMA y hongos entomopatógenos como parte de un manejo integrado de plagas no solo en maíz, en diferentes cultivos de interés económico.

## 9. BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA

- Abelló, J. Kelemu, S. 2006. Hongos endófitos: ventajas adaptativas que habitan en el interior de las plantas. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. Vol 7(2), pp 55-57.
- Arias, H. 2013. Estudio sobre las interacciones entre hongos endófitos y hongos entomopatógenos de *Coffea arabica*. Tesis de licenciatura. Universidad autónoma de México.
- Andreia, K y Carrenho, R. 2017. Growth and mycorrhizal colonization of maize plants treated with aqueous extracts from nonmycorrhizal weeds. *Pesq agropec. Bras.* Vol 52 (11), pp 1042-1049.
- Amaro, L. Parraguirre, C. Romero, O, Rivera, J y Sanchez, P. 2017. Evaluación de mortalidad de gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda* L.) con el uso de *Metarhizium anisopliae* in vitro. *Manejo de agrosistemas*. Vol 13 (1), pp 1-6.
- Bennett, E. Bever, J y Bowers, M. 2009. Arbuscular mycorrhizal fungal species suppress inducible plant responses and alter defensive strategies following herbivory. *Oecologia*. Vol 160 (4), pp 771-779.
- Barrier, S. 2009. El uso de hongos micorrizicos arbusculares como una alternativa para la agricultura. Universidad industrial de Santander, Colombia. Vol 7 (1), pp 124-127.
- Bamisile, B. Kanta, C. Senyo, A y Ravindran K. 2018. Prospects of endophytic fungal entomopathogens as biocontrol and plant growth promoting agents: An insight on how artificial inoculation methods affect endophytic colonization of host plants
- Barrelli, L; Moonjely, S; Behie, S y Bidochka, M. 2015. Fungi with multifunctional lifestyles: endophytic insect pathogenic fungi. *Plant mol Biology*. Vol 90 (6), pp 657-664.
- Berruti, A. Lumina, E. Balestrini, R y Bianciotto, V. 2016. Arbuscular Mycorrhizal Fungi as Natural Biofertilizers: Let's Benefit from Past Successes. *Front Microbiol*. Vol 6 (1), pp 1-9.
- Barber, N; Kiers, E, Hazzar R y Adler L. 2013. Dependency of arbuscular mycorrhizal fungi on plant insectinteractions in an agroecosystem. *Plant science*. Vol 4 (1), pp 1- 8.
- Bona, E. Scarafomi, A. Marsano, F. Boatti, L. Copetta, A. Massa, N. Gamalero, E. Agostino, G. Cesaro, P. Cavelatto, M y Berta, G. (2016). Arbuscular

- mycorrhizal symbiosis affects the grain proteome of *Zea mays*: a field study. *Sci. Rep.* Vol 6 (1), pp 1-12.
- Brunner, C. Reyes, M, Moonjely, S y Bidochka, M. 2018. A review on the genus *Metarhizium* as an entomopathogenic microbial biocontrol agent with emphasis on its use and utility in Mexico. *Biocontrol science and technology.* Vol 29 (1), pp 83–102.
- Bhople, B. Mugabo, B. Sopan, B. Kumar, A. Erneste, H. Emmanuel, B. Y Neeraj, Y. 2014. Contribution of Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AM Fungi) and Rhizobium Inoculation on Crop Growth and Chemical Properties of Rhizospheric Soils in High Plants. *Journal of Agriculture and Veterinary Science.* Vol 7, (1), pp 45-55.
- Gange, A y Brown, V. 2002. Actions and interactions of soil invertebrates in affecting the structure of plant communities. *Micorrizhal ecology.* Vol 157 (1), pp 321-344
- Gehring, C y Bennett, A. 2009. Mycorrhizal fungal–plant–insect interactions: the importance of a community approach. *Environ. Entomol.* Vol 38(1), pp 93-102.
- Gehring, C; Cobb, N y Whitham T. 1997. Three-way interactions among ectomycorrhizal mutualists, scale insects, and resistant and susceptible pinyon pines. *American Naturalist.* Vol 149 (1), pp 824–841.
- Guerrieri, E. Lingua, G. Digilio, M. Massa, N y Berta, G. 2004. Do between plant roots and the rhizosphere affect parasitoid behaviour?. *Ecology.* Vol 29(1), pp 753–756.
- Camargo, D y Ávila, E. 2013. Efectos del *Trichoderma* desarrollo de la arveja (*Pisum sativum*). *Ciencia y agricultura.* Vol 11 (1), pp 91-99.
- Caballero, V. 2009. Análisis del rendimiento de maíz (*Zea mays*) en el estado de Querétaro. Tesis de licenciatura. Universidad autónoma Chapingo. Texcoco, Estado de México, México.
- Cano, A. (2011). Interacción de microorganismos benéficos en plantas: Micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. una revisión U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica, 14(2), pp15-31.
- Castillo, M; Aguilar, C y Herrera, R. 2012. Control de insectos-plaga en la agricultura utilizando hongos entomopatogenos: retos y perspectivas. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila.* 4 (8), pp 42-53.

- Clifton, E. Jaronski, S. Coates, B. Hodgson, E y Gassmann, A. 2018. Effects of endophytic entomopathogenic fungi on soybean aphid and identification of *Metarhizium* isolates from agricultural fields. Plos one. Vol, 13(3), pp 1-19
- Cazmuz, A; Juarez, M. Murua, M. Prieto, S. Medina, S. Willink, E y Gastamiza, E. 2010. Revisión de los hospederos del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Rev. Soc. Entomol. Argent. Vol 69 (3), pp 209-231
- Chango, L. 2012. Control de gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*) en el cultivo de maíz (*Zea mays*). Tesis de licenciatura. Universidad técnica de Ambato, Anbato, Ecuador.
- Chávez, N. 2007. Utilización de bacterias y hongos endófitos para el control biológico del nematodo barrenador *Rdopholus similis* thorn.
- Campos J. 1966. Investigaciones Sobre el Control Biológico del "Cogollero" del Maíz, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) y Otros Noctuideos. Dpto. de entomología de la estación experimental agrícola de la molina. Vol 8 (1) , pp 128-131.
- Damián, M; Cruz, A; Ramírez, B; Romero, O; Moreno, S; Reyes, L. 2013. Maíz, alimentación y productividad: modelo tecnológico para productores de temporal de México. Agricultura, sociedad y desarrollo. ASyD. Vol 10(1), pp 157-176.
- Devendra, K; Prakash, A; Johri, B. 2007. Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanism of action. Barkatullah University. 47:289–297.
- Dicke, M; Van, R; Boer, G. 2002. Inducible indirect defence of plants: from mechanisms to ecological functions. Basic Appl. Ecol. Vol 4(1), pp 27–42.
- Dibut, B. Martinez, R. Ortega, M. Rios, Y y Fey, L. 2004. Presencia y uso de microorganismos endófitos en plantas como perspectiva para el mejoramiento de la producción vegetal. Cultivos Tropicales, vol. 25 (2), pp. 13-17.
- Dutta, Devanushi, Puzari, Keshab Chandra, Gogoi, Robin, & Dutta, Pranab. (2014). Endophytes: exploitation as a tool in plant protection. Brazilian Archives of Biology and Technology. Vol 57(5), pp 621-629.
- Elizondo, J y Boschini, C. Producción de forraje de con maíz criollo y maíz híbrido. Agronomía mesoamérica. Vol 13 (1), pp 13-17.
- Echevarría M, A., Olalde, V., & Fernández, K., Serrato, R. (2013). Diferencias en la respuesta del maíz (*Zea mays* L.) a la inoculación con *Glomus cubense* (Y.

- Rodr. & Dalpé) y con un conglomerado de especies de hongos micorrízicos arbusculares (HMA). *Cultivos Tropicales*. Vol 34 (2), pp 12-15.
- Farias, C. Carvalho, R. resende, F y Azevedo, L. 2018. Consortium of five fungal isolates conditioning root growth and arbuscular mycorrhiza in soybean, corn, and sugarcane.
- Fernández, R; Morales, L; Gálvez A. 2003. Importancia de los maíces nativos de México en la dieta nacional. Una revisión indispensable. *Rev. Fitotec. Mex*, Vol 36(1), pp 275 – 283.
- Fernández, F; Rivera, R; Hernández, A; Herrera, R; Fernández, K. 2004. Inoculación de hongos micorrízicos arbusculares y diferentes relaciones suelo: humus de lombriz sobre el crecimiento del cafeto (*Coffea arabica*) Cv. Catuaí bajo la etapa de vivero. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. Vol 11(1), pp 175-184.
- Felber, A y Alencar J. 2013. Fungos endofíticos: potencial como controladores biológicos e estudos em videiras. *Uninga*. Vol 14(1), pp 13-25.
- Ferrol, N y Gianinazzi, V. 2004. Learn more about arbuscular mycorrhizal fungi.
- Fhiser, B. Petrin, O y Lappin, H. 1992. The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize (*Zea mays*). *New phytol*. Vol 122(1), pp 299-305.
- Gámez R. 2010. Estudio transcricional del mecanismo de resistencia sistematica contra patógenos de parte de área inducida por micorrización en tomate (*Solanum lycopersicum*) y frijol (*Phaseolus vulgaris*). *Tesis maestría*. Instituto politécnico nacional, Sinaloa, México.
- Gange, A. Bower, E y Broun, V. 2002. Differential effects of insect herbivory on arbuscular mycorrhizal colonizational. Vol 131 (1), pp 103–112.
- Garrido, E. Bennet, A. Fornoni, S y Strauss, S. 2010. The dark side of the mycorrhiza. *Plant Signal Behav*. Vol, 5(8), pp 1019–1021.
- Garrido, E. Bennet, A. Fornoni, S y Strauss, S. 2009. Variation in arbuscular mycorrhizal fungi colonization modifies the expression of tolerance to above-ground defoliation. *Journal of Ecology*. Vol 98 (1), pp 43–49.
- Gamboa, M. 2006. Hongos endófitos tropicales: conocimiento actual y perspectivas. Universidad nacional de Colombia. Bogotá Colombia.
- García C; Gonzales M; Cortes E. 2012. Uso de enemigos naturales y biorracionales para el control de plagas de maíz. *Ra Ximhai*, 8 (3), 57-70.
- Garcia, C; Gonzales, M y Bautista, N. 2011. Patogenicidad de aislamientos de hongos entomopatógenos contra *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) y *Epilachna varivestis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Revista Colombiana de Entomología* 37 (2).

- González, A. 2008. El maíz planta portentosa. Universidad iberoamericana. Revista de Ciencias Sociales de la Universidad Iberoamericana. 3: 1-17.
- Garza, P; Konigsberg, M; Saucedo, G; Loera, O. 2011. Perfiles diferenciales de *Beauveria bassiana* (bals.-criv.) Vuill. En respuesta al co2 producción de conidios y amilasas. Agrociencia.
- Gary, E; Vallad, M; Robert, M. 2004. Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agricultura. Crop Sci. 44:1920–1934.
- García, R y Pérez, R. 2003. Fitoalexinas: Mecanismo de defensa delas plantas. Universidad autónoma de Chapingo. Revista Chapingo serie ciencias forestales y del ambiente 9(1): 5-10.
- García, G y Tarango, S. 2009. Manejo irracional del gusano cogollero en maíz. Instituto nacional de investigaciones forestales, agrícolas y pecuarias. INIFAP. Folleto técnico. Cd Delicias, Chihuahua, México.
- Gehring, C y Bennett. 2009. Mycorrhizal Fungal–Plant–Insect Interactions: The Importance of a Community Approach. *Environmental Entomology*, Volume 38 (1), pp 93–102.
- Gómez, L; Olade, V; arraiga, R; Contreras, R. 2007. Micorrizas arbusculares. Ciencia ergo sum, Vol. 14-3, Pp.300-306.
- González, I; Infante, D; Martínez, B; Arias, Y; González, N; Miranda, L; Peteira, B. 2012. Induction of chitinases and glucanases in *Trichoderma spp.* strains intended for biological control. Biotecnología Aplicada, 29: 12-16.
- Giménez, C; Cabrera, R; González, A. 2014. Fungal endophytes and their role in plant protection. Current organic chemistry. Current Organic Chemistry, 11: 707-720.
- Greenfield, M. Gómez, M. Ortiz, V. Vega, F. Kramer M y Parsa S. (2016). *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* endophytically colonize cassava roots following soil drench inoculation. Elsevier. Vol 95(1), pp 40-48.
- Hyun, S y Heum, A. 2007. Effects of mycorrhizal and endophytic fungi on plant community: a microcosm study. Mycobiology. Vol 35(4), pp 186-190.
- Hernandez, M. 2011. Aislamiento de hongos entomopatógenos en suelo y sobre gallinas ciegas (*Coleoptera melolonthidae*) en agroecosistemas de maíz. Morelos, Mexico. Scielo, 27 (3), 591-599.

- Heil, M y Bostock, R. 2002. Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. *Annals of botany*. Vol 89(1), pp 503-512.
- Helberg, M y Ingeborg, Z. 2009. Evaluación de dietas medicas para la cria en laboratorio de *Spodoptera frugiperda* (J.E Smith) (Lepidoptera noctuidae). *U:D:C:A: Vol, 12(1)*, pp 79-90.
- Jaizme, M. Rodríguez y Barroso L. 2005. Effect of the combined inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting rhizobacteria on papaya (*Carica papaya* L.) infected with the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Fruits*, 2006, vol. 61 (1), pp 151–162.
- Jarber, L. 2015. Grapevine leaf tissue colonization by the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* s.l. and its effect against downy mildew. *Biocontrol*. Vol 60 (1), pp 103-112.
- Johnson, N. Graham, J y Smit, F. 1997. Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism-parasitism continuum. *New Phytol*. Vol (1), pp 135 575-585.
- Jurado, A. Ramírez, M. Flores, Torres, A y Cuenca, A. 2009. Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. *Revista mexicana de micología*. vol.30 (1).
- Kabaluk, J y Ericsson. 2007. *Metarhizium anisopliae* seed treatment increases yield of field corn when applied for wireworm control. *Agron J*, Vol, 99 (1), pp. 1377 – 1381.
- Keitaro, T. Shinpei, S. Koji, U. Hideki, M. Takashi, N. Tomonobu, T. Tetsuya, M. Satoru, S. Tadao, W y Hironori, Y. 2012. Leaf herbivory por *Spodoptera litura* aumenta la colonización micorrízica arbuscular en raíces de soja, *Soil Science y Plant Nutrition*, 58 (1), pp 445-449.
- Kula, M y Wilson, G. 2014. Effects of mycorrhizal symbiosis on tallgrass prairie plant–herbivore interactions. *Ecology Letters*. 8: 61–69.
- Kusari, S. Hertweck, C y Spiteller, C. 2012. Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. *Chemistry and Biology*. Vol 19(1), pp 792-798.
- Lizarazo, K; Mendoza, C y Carrero, S. 2008. Efecto de extractos vegetales de *Polygonum hydropiperoides*, *Solanum nigrum* y *Calliandra pittieri* sobre el gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*). *Agronomía Colombiana*. Vol 26(3), pp 427-434.

- Malpartida, J; Narrea, M y Dale W. 2013. Patogenicidad de *beauveria bassiana* (bals) vuill., sobre el gusano defoliador del maracuyá *dione juno* (cramer) (lepidoptera: nymphalidae) en laboratorio. *Ecología Aplicada*, 12(2). Departamento Académico de Biología, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima – Perú.
- Méndez, A y González, Y. 2014. Plagas asociadas al cultivo del maíz (*Zea mays* L.) en un área del estado Aragua, Venezuela. *Fitosanidad*. Vol 18(1), pp 175-179.
- Méndez, J. 2019. *Beauveria* sp., *Metarhizium* sp., y *Trichoderma* sp. Como endófitos y su efecto en el crecimiento de *Sorghum bicolor* y en la población de *Melanaphis sacchari*. Tesis de maestría. Instituto politécnico nacional.
- Mora, G. 2008. Efecto de la micorrización con *Glomus intraradices* en la tolerancia al moho blanco causado por *Sclerotinia sclerotiorum* en tres líneas de frijol. Tesis de maestría. Guasave, Sinaloa. IPN.
- Moura, M y Jaronski, T. 2016. The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide microbiology and biotechnology. *World journalmicrobiology biotechnology*. Vol 32(1)
- Moreira F; Moreira F; Siqueira J; Henrique R; Barbosa H y Carbone M. 2017. Arbuscular mycorrhizal fungi and colonization stimulant in cotton and maize. *Ciencia Rural*, Santa Maria. Vol 47(6)
- Monzón A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. *Avances en el Fomento de Productos Fitosanitarios No-Sintéticos. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* 63: 95 - 103.
- Molina N; Lezama R; Lopez M; Pescador, A; Galindo, E; Angel, C y Michel A. 2004. Efecto del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* sobre el control del gusano cogollero del maíz en campo. *Investigación y difusión científica*.
- Mobasser, H y Moradgholi, A. 2012. Mycorrhizal bio-fertilizer applications on yield seed corn varieties in Iran. *Scholars research lybrary*. Vol 3 (2), pp 1109-1116.
- Nájera, M. García, M. Crocker, R. Hernández, V y Rodríguez, L. 2005. Virulencia de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, nativos del occidente de México, contra larvas de tercer estadio de *Phylophaga crinita* (coleóptera: melolonthidae) bajo condiciones de laboratorio. *Fitosanidad*. Vol 9 (1), pp 33-36.

- Russo, M. Pelliza, S. Cabello, M. Stenglein, S y Scorstti, A. 2015. Endophytic colonization of tabacco, corn, wheat, and soybeans by the fungal entomopathogen *Beauveria bassian* (Acomicota, hipocreales). *Biocontrol scienceand technology*. Vol 24 (1), pp 475-480.
- Ortiz, A y Keyhanit, N. 2013. Action on the Surface: Entomopathogenic fungi *versus* the insect Cuticl. University of Florida. Vol 4 (3), pp 357-374.
- Orrico, D; Ulloa, M y Medina, M. 2013. Efecto de los hongos micorrícicos arbusculares y *pseudomonas fluorescens* en el control de *Meloidogyne* spp. en plantas de tomate de árbol (*Solanum betaceum*). *Ciencia*. Vol 15 (1), pp 1-10.
- Ortega, A. 1987. Insectos nocivos para el maíz una guía para su identificación en campo. CIMMYT.
- Omacini, M. Eggers, T. Bonkowskis, A. Gange, A y Jones, T. 2006. Leaf endophytes affect mycorrhizal status and growth of co-infected and neighbouring plantas. *Functional ecology*. Vol 20 (1), pp 226-232.
- Orions, C. Gómez, S y Korpita T. 2017. Does mycorrhizal status alter herbivore-induced changes in whole-plant resource partitioning. *AOB plants*, Vol 10 (1), pp
- Parsa, S. Ortiz, V y Vega, F. 2013. Establishing fungal entomopathogens as endophytes: towards endophytic biological control. *Journal of Visualized Experiments*. pp 1-5.
- Pérez, A. Rojas, J y Montes V. 2011. Hongos formadores de micorrizas arbusculares: una alternativa biológica para la sostenebilidad de los agroecosistemaas de praderas en el caribe colombiano. *Revista Colombiana de ciencia animal*. Vol 3(2), pp 366-385.
- Pérez, Y. Álvarez, J. Mendoza, J. Pat, J. Gomez, R y Cuevas, L. 2012. Diversidad de hongos micorrícicos arbusculares en maíz con cultivo de cobertura y biofertilizantes en Chiapas, México. *Gayana botánica*. Vol 69(1), pp 46-56.
- Pelizza, S. Mariottini, Y. Russo, L. Vianna, F. Scorsetti, A y Lange, C. 2017. *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) Introduced as an endophyte in corn Plants and Its effects on consumption, reproductive capacity, and food preference of *Dichroplus maculipennis* (Orthoptera: Acrididae: Melanoplinae). *Journal of insect science*. Vol. 17(2), pp 1-6.

- Prez, A. Tille, S. Johnson, I. Pascual, D. Ton, J y Camerom, D. 2017. The interactive effects of arbuscular mycorrhiza and plant growth-promoting rhizobacteria synergistically enhance host plant defences against pathogens. Scientific reports.
- Pozo, M. 1999. Inducción de enzimas hidrolíticas en raíces de tomate (*Lycopersicon esculentum*) como respuesta a la formación de micorrizas arbusculares y su control biológico de phytophthora parasítica. Tesis doctorado. Universidad de granada, Granada, España.
- Quintero E. 2010. Análisis proteómico de la resistencia inducida por micorrización al patógeno foliar *Sclerotinia sclerotiorum* en frijol (*Phaseolus vulgaris*). Tesis maestría. CIDIR, Sinaloa México.
- Ramírez y Rodríguez. 2012. Mecanismos de defensa y respuestas de las plantas en la interacción micorrícica: una revisión. Rev. colomb. biotecnol. 14(1), p. 271-284.
- Reyes, A; Quiñones, E; Enríquez, G y López, L. 2016. Micorrización en *Capsicum annum* para la promoción de crecimiento y bioprotección contra *Phytophthora capsici*. Revista mexicana de ciencias agrícolas Vol, 7 (4), pp 857-870.
- Ruiz, E, Rosado, A; Chan, W; Cristóbal, J; Munguía, R. 2009. Patogenicidad de *Beauveria bassiana* (bals.) Vuillemin sobre estados inmaduros de mosquita blanca (*Bemisia tabaci* genn.). Fito sanidad. Vol 13(1), pp 89-93.
- Rodríguez, J. 2013. Comportamiento agronómico de cinco híbridos de maíz (*zea mays* l.) en estado de choclo cultivados a dos distancias de siembra". Universidad de Guayaquil. Tesis de licenciatura. Guayaquil, Ecuador.
- Sánchez, R. 2013. Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas. Vol 16(1), pp 132-146.
- Sánchez, R. Sánchez, B. Sandoval, Y. Álvaro, E. Benítez, B. Guillen. M y Méndez, M. 2013. Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. Ciencias Químico-Biológicas. Vol 16(2), pp 132-146.

- Sabia, E. Claps, S. Moreno, G. Bruno, A. Sape, L y Aleandri, R. Inoculación de campo de micorrizas arbusculares en maíz (*Zea Mays* L.) en insumos bajos: estudio preliminar sobre aspectos cuantitativos y cualitativos.
- Sasan, R y Bidochka, M. 2012. The insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* (clavicipitaceae) is also an endophyte that stimulates plant root development. American journal of botany. Vol 99(1), pp 101-107.
- Santos, J. Santos, F. Lopes, J. Mendonça, J. Francisco S, y Marino, R. (2018). Arbuscular mycorrhizal fungi and dark septate endophytic fungi on the biomass development of vetiver grass. Revista Caatinga. Vol 31(3), pp 602-611.
- Seong, Y y Kim, Y. 2019. Tobacco growth promotion by the entomopathogenic fungus, *Isaria javanica* pf185. Mycobiology.
- Sepúlveda, G. 2004. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. Revista mexicana de fitopatología. Vol 21(3), pp 355-363.
- Suk, H. Lee, J y Heum, A. 2006. Effects of interspecific interactions of arbuscular mycorrhizal fungi on growth of soybean and corn. Journal microbiology. Vol 34(1), pp 34-37.
- Shoresh, M; Harman, G; Mastouri, F. 2010. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. Phytopatho.
- Shrivastava, G; Dee, M; Ownley, B; Vu, A; Köllner, T; Auge, R; toler, H yChen, F. 2015. Colonization by arbuscular mycorrhizal and endophytic fungi enhanced terpene production in tomato plants and their defense against a herbivorous insect. Springer Science.
- Schneider, M; Meuwly, P; Metraux, P. 1996. Systemic Acquired Resistance in plants. Institut de Biologie VCgCtale, UniversitC de Fribourg. Conrath, U. 2006. Systemic Acquired Resistance. Plant Signaling & Behavior.
- Tawaraya, K. Shiozawa, S. Ueda, K. Murayama, H. Nishizawa, T. Toyomasu, T. Murayama, T. Sato, S. Wagatsuma, T y Yasuda H. 2012. Leaf herbivory by *Spodoptera litura* increases arbuscular mycorrhizal colonization in root of soybean. Soil Science y Plant Nutrition, Vol 58 (1), pp 445-449.

- Tellez, A; Cruz, G; Mercado, Y; Asaff, A; Arana, A. 2009. Mecanismo de acción y respuesta en la relación de hongos entopatógenos e insectos. *Revista mexicana de micología*.
- Vannette, R y Hunter, M. 2009. Mycorrhizal fungi as mediators of defence against insect pests in agricultural systems. *Agricultural and Forest Entomology*. Vol 11(4), pp 351-358
- Vega, F. 2008. Insect pathology and fungal endophytes. *Journal of invertebrate pathology*. Vol 98 (1), pp 277-279.
- Villamarin D. 2016. Desarrollo y composición química de las plantas de stevia rebaudiana bertonii inoculadas con *Trichoderma asperellum*. Tesis maestría. CIDIR, Morelos, México.
- Villa y Catalan. 2004. Determinación de estadios larvales de *Spodoptera frugiperda* (j. E. Smith) (Lepidoptera: noctuidae) para la construcción de un modelo de predicción. *Folia Entomol. Mex.* Vol 43(3), pp 307-312.
- CATIE, 2008. Producción ecológica de cultivos anuales básicos: maíz, frijol y calabaza. Chiapas, México.
- Xiaoying C., Fengbin S., Fulai L., Chunjie T., Shengqun L., Hongwen X., y Xiancan Z. 2014. Effect of different arbuscular mycorrhizal fungi on growth and physiology of maize at ambient and low temperature regimes. *The Scientific World Journal*.
- Yan, J. Broughton, S. Yang, A y Gangue A. 2015. Do endophytic fungi grow through their hosts systemically?. *Fungal ecology*. Vol 13(1), pp 53-59.
- Yooyongwech, S. Chan-um, S. Tisarum, R. Therawitaya, C. Samphumphung, T. Aumtong, S. kingkaew, J y Phisalaphong M. 2017. Article Influence of Different Encapsulation Types of Arbuscular Mycorrhizal Fungi on Physiological Adaptation and Growth Promotion of Maize (*Zea mays* L.) Subjected to Water Deficit. *ot Bot Horti Agrobo*, 2019, 47(1):213-220
- Zenner, I; Arevalo, H y Mejia R. 2007. El gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) y algunas plantas transgénicas. *Revista colombiana de ciencias hortícolas* - Vol. 1(1), pp. 103-113.
- Wahid. F, Sharif. M, Steinkellner. S, Khan. M, Marwat, K, y Khan. S. 2016 Inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi and phosphate solubilizing bacteria in the

presence of rock phosphate improves phosphorus uptake and growth of maize. The University of Agriculture Peshawar. Vol 48(2), pp 739-747.

Wamberg, C. Christensen, S y Jakosen. 2003. Interaction between foliar-feeding insects, mycorrhizal fungi, and rhizosphere protozoa on pea plants. *Pedobiología*. Vol 47(3), pp 281-287

Wamberg, C. Christensen, S. Takobsen, I. 2003. Interaction between foliar-feeding insects, mycorrhizal fungi, and rhizosphere protozoa on pea plants. *Pedobiologia*. Vol 47(1), pp 281–287.

Wężowicz, K. Rozpądek, P y Turnau, K. 2017. Interactions of arbuscular mycorrhizal and endophytic fungi improve seedling survival and growth in post-mining waste. *Mycorrhiza*. Volume 27 (1), pp 499-511.

Wu, S. Cao, Z. Li, Z. Cheung, K.y Wong, M. 2005. Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: a greenhouse trial. Vol 125(1), pp155-166.

## 10. ANEXOS

### Anexo 1. Dieta artificial para *S. frugiperda* en etapa de larva.

Dieta de *Spodoptera de frugiperda*, fue una mezcla de harinas y minerales

- Agar papa dextrosa
- Germen de trigo
- Harina de soja
- Azúcar
- Levadura
- Sales de wesson
- Nipagin
- Ácido ascórbico
- Ácido acético
- Colina
- Vitaminas
- Antibióticos

### Preparación

Para un litro de dieta artificial.

Pesar los materiales en balanza de precisión

En un matraz de 2 L se agregan los siguientes materiales

- Agar
- Harina de Soja
- Levadura
- Azúcar
- Germen de trigo.

Mezclar los ingredientes hasta homogenizar la mezcla.

Agregar 940 mL agua destilada al matraz y agitar hasta homogenizar.

Meter a autoclave el matraz a 120 °C y 15 libras de presión por 15 minutos

Sacar de la autoclave el matraz y dejar que la temperatura baje a 50°C y pasar la pasta a un vaso precitado de 1 L, para posteriormente agregar los siguientes materiales

- Nipagin
- Ácido ascórbico
- Sales de Wesson

- Vitaminas
- Antibióticos
- Ácido acético
- Cloruro de colina

Agitar con una batidora de inmersión por 5 minutos y vaciar la pasta a un recipiente de plástico de 1.5 L tapar con papel aluminio y meter a refrigeración a 5 °C hasta su uso.

### **Anexo 2 Extracción de esporas de Hongos micorrízicos (German y Nicolson, 1963; Walker,1997)**

- Pesar la muestra de suelo.
- Colocarlo en un vaso precipitado de 1L, agregar agua de la llave y agitar vigorosamente.
- Dejar reposar de 10 a 15 segundos, pasar en sobrenadante en una serie de tamices ordenados del mayor al menor (125,75 y 40  $\mu\text{m}$ ).
- Recoger el contenido de cada tamiz con agua destilada con una piseta y colocarlo en tubos para centrifuga.
- Agregar a cada tubo agua destilada y centrifugar durante 5 min a 2500rpm.
- Retirar de la centrifuga y quitar el sobrenadante de los tubos. Al precipitado de cada tubo agregar sacarosa al 50% y agitar vigorosamente.
- Meter a centrifugar por 1 min a 1500 rpm.
- Sacra de la centrifuga y recuperar el sobrenadante en el tamiz de 40  $\mu\text{m}$ , enjuagar el tamiz con agua destilada y recuperar las esporas en un tubo. para centrifuga.
- Realizar el conteo de esporas en estereoscopio.

### **Anexo 3 Tinción de raíces (Philips y Hayman, 1970)**

- Lavar raíces con agua de la llave y enjuagar con agua destilada.
- Cortar las raíces en fragmentos de 1 cm con bisturí y depositarlas en un frasco de vidrio.

- Añadir KOH al 10% hasta cubrir totalmente las raíces y poner en baño maría tiempo necesario hasta que al tomar las raíces con una aguja de disección se doblen.
- Decantar el KOH y enjuagar con agua de la llave hasta que salga agua clara.
- Agregar HCl 0.1N a las raíces y dejar actuar de 5 a 10 min.
- Decantar el HCl y agregar azul de tripano al 0.05% a las raíces.
- Calentar en autoclave durante 10 min a 120°C. (14-15 lb/pulg<sup>2</sup> de presión de vapor)
- Si las raíces presentan demasiada tinción decolorar con lactofenol.
- Decantar el azul de tripano y agregar lacto glicerol hasta cubrir las raíces.
- Para verificar si la tinción fue exitosa tomar una muestra y llevar a microscopio para observar.

#### **Adecuación de la técnica de Philips y Hayman (1970) para la tinción de raíces de maíz**

- Lavar raíces con agua de la llave y enjuagar con agua destilada.
- Cortar las raíces en fragmentos de 5cm con bisturí y depositarlas en un frasco de vidrio.
- Añadir KOH al 10% hasta cubrir totalmente las raíces y poner en baño maría por 10 minutos a 93°C.
- Decantar el KOH y enjuagar con agua destilada hasta que salga agua clara.
- Agregar HCl 0.1N a las raíces y poner a baño maría por 7 min a 93°C
- Decantar el HCl y agregar azul de tripano al 0.02% a las raíces y poner a baño maría por 10 min a 93°C.
- Decantar el azul de tripano y agregar lacto glicerol hasta cubrir las raíces.
- Para verificar si la tinción fue exitosa tomar una muestra y llevar a microscopio para observar.

**Anexo 4. Escala de villa ya catalán para estimar el desarrollo por instar de *S. frugiperda*.**

Rango de ancho de capsula cefálica por instar de *Spodoptera frugiperda*.

<b>Instar larval</b>	<b>Ancho capsula cefálica (mm)</b>
1	0.64
2	0.64 – 1.14
3	1.14 – 1.72
4	1.72 – 2.38
5	2.38 >

**Anexo 5 Solución nutritiva de Hoagland en mmol y mg/L**

<b>Macronutrientes</b>		<b>Micronutrientes</b>	
<b>Elemento</b>	<b>mmol/L</b>	<b>Elemento</b>	<b>mg/L</b>
Nitrógeno (N)	15.0	Fierro (Fe)	2.5
Fosforo (P)	1.0	Manganeso (Mn)	0.5
Potasio (K)	6.0	Cobre (Cu)	0.02
Calcio (Ca)	4.0	Zinc (Zn)	0.05
Magnesio (Mg)	2.0	Boro (B)	0.5
Azufre (S)	2.0	Molibdeno (Mo)	0.01

**Anexo 6 Multiplicación de hongos entomopatógenos en arroz**

La inoculación de una matriz de arroz se hace partiendo de un cultivo puro de hongos entomopatógenos propagado en medio de cultivo PDA. Una caja Petri alcanza para realizar la inoculación en promedio de 7 matrices de arroz.

### **Preparación de la matriz**

- Dejar el arroz remojando durante 20 minutos en agua estéril
- Pre-cocer el arroz en excedente de agua estéril durante 5 minutos.
- Filtrar el arroz pre-cocido con un tamis y poner a secar sobre papel absorbente estéril
- Poner 200g de arroz pre-cocido en un matraz erlenmeyer de 500mL.
- Sellar el matraz erlenmeyer herméticamente con papel aluminio y masking tape.
- Poner el matraz con arroz en autoclave a esterilizar por 15 minutos a 120 °C y 15 libras de presión.
- Sacar el matraz de autoclave y dejar reposar por 24 horas para proceder a hacer la inoculación con los hongos entomopatógenos.
- 

### **Inoculación de la matriz**

La inoculación de las matrices debe de realizar en campana de flujo laminar, un mechero y materiales esterilizados.

- Escoger la caja Petri con el cultivo más puro y extraer todo el hongo raspando la caja.
- Disolver el hongo recolectado en agua esterilizada, y mezclar para obtener una solución
- homogénea.
- Disolver el hongo recolectado en agua esterilizada, y mezclar para obtener una solución homogénea.
- Extraer una muestra de la suspensión para contar los conidios en cámara de Neubauer. Se debe buscar un conteo de  $1 \times 10^6$ .



XX CONGRESO INTERNACIONAL

XLV CONGRESO NACIONAL  
de la Sociedad Mexicana de Fitopatología A.C.

XXXV SEMANA DEL PARASITÓLOGO UAAAN



**La Sociedad Mexicana de Fitopatología A.C.**

otorga la siguiente

# CONSTANCIA

a

Cuauhtémoc Hernández-Hernández, Evangelina Esmeralda  
Quiñones-Aguilar, Luis López-Pérez, Gabriel Rincón-  
Enríquez, Jhony Navat Enríquez-Vara

Por su participación con la presentación del cartel:

**EFEECTO DE LOS HONGOS MICORRIZICOS  
ARBUSCULARES SOBRE EL CRECIMIENTO DE LARVAS DE  
*Spodoptera frugiperda*. [Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on  
larval growth of *Spodoptera frugiperda*].**

del 20 al 24 de agosto 2018  
Saltillo, Coahuila, México

Dr. Eduardo R. Garrido Ramírez  
Presidente de la Mesa Directiva 2016-2018





## LA SOCIEDAD MEXICANA DE LA SIMBIOSIS MICORRÍZICA A.C. Y EL CIIDIR-IPN UNIDAD SINALOA

otorgan la presente

# Constancia

A: Evangelina Quiñones-Aguilar, Gabriel Rincón-Enríquez, Alejandro Huerta-Ramírez, Cuauhtémoc Hernández-Hernández, Cecilia Guizar-González, Luis López-Pérez, Jhony N. Enríquez-Vara

por su participación con el CARTEL

Efecto de los hongos micorrizicos arbusculares sobre las principales plagas del maíz

IX Simposio Nacional y VI Reunión Iberoamericana de la Simbiosis Micorrizica  
Mazatlán, Sinaloa, 23 al 27 de septiembre del 2018



SOMESIMI



Dr. Ignacio Edisardo Maldonado  
Organizador



Dra. Sara Lucía Camargo Ricalde  
Presidente



CONACYT  
CONSEJO NACIONAL  
DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo  
Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales  
Programa de Maestría en Producción Agropecuaria

Otorgan la presente

# CONSTANCIA

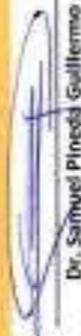
A: Cuauhtémoc Hernández Hernández, Luis López Pérez,  
Evangeline Quiñones Aguilar, Jhony N. Enriquez Vara, Nuria  
Gómez Dorantes y Cristian Marc Philippe Lobit.

Por su presentación titulada:

*Interacciones entre maíz y microorganismos endófitos (FHM-A, Beauveria  
basiana y Metarhizium sp.) para el control del gusano cogollero (Spodoptera  
frugiperda Smith).*

en el "Seminario del Programa de Maestría en Producción Agropecuaria 2018"  
celebrado el día 23 de octubre en el Instituto de Investigaciones Agropecuarias  
y Forestales.

  
Dra. Mirtza Ramírez González  
Coordinadora del Programa de Maestría  
en Producción Agropecuaria

  
Dr. Samuel Pineda Guillermo  
Director del Instituto de Investigaciones  
Agropecuarias y Forestales

  
Dr. Mauricio Perea Peña  
Secretario Académico del Instituto de  
Investigaciones Agropecuarias y Forestales



Otorgan la presente

# CONSTANCIA

Al trabajo de investigación en la modalidad de **PONENCIA**:

## Maíz micorrizado, efecto en el crecimiento vegetal y herbivoría de gusano cogollero

Realizado por:

Cuauhtémoc Hernández Hernández

Evangelina Esmeralda Quiñones Aguilar | Jhony Navat Enriquez Vera | Philippe Lobit  
Nuria Gómez Dorantes | Gabriel Rincón Enriquez | Luis López Pérez

Para el V SIMPOSIO NACIONAL DE HERRAMIENTAS DE BIOTECNOLOGÍA PARA UNA AGRICULTURA SUSTENTABLE.

Realizado los días 3,4 y 5 de Octubre del presente  
en la ciudad de Guadalajara, Jalisco.

Dr. Gabriel Rincón Enriquez  
CIATEJ

Dr. Gustavo Javier Acosta Hernández  
CUCI

Dr. Cirilo Vences Sánchez Hernández  
CUCBA

Dr. Saúl Frutos Velázquez  
COORDINADOR DE LA RED

Año 2018



Otorgan la presente

# CONSTANCIA

Al trabajo de investigación en la modalidad de **CARTEL**:

Endofitismo de *Beauveria bassiana* y  
*Metarhizium anisopliae* en maíz

Realizado por:

Cuauhtémoc Hernández Hernández

Evangelina Esmeralda Quiñones Aguilar | Jhony Navat Enriquez Vara | Philippe Lobit  
Nuria Gómez Dorantes | Gabriel Rincón Enriquez | Luis López Pérez

Para el V SIMPOSIO NACIONAL DE HERRAMIENTAS DE BIOTECNOLOGÍA PARA UNA AGRICULTURA SUSTENTABLE

Realizado los días 3, 4 y 5 de Octubre del presente  
en la ciudad de Guadalajara, Jalisco.

Dr. Gabriel Rincón Enriquez  
CIATEJ

Dr. Gustavo Javier Acevedo Hernández  
CUCEI

Dra. Carla Vanessa Sánchez Hernández  
CUCBA

Dr. Saúl Frère Velázquez  
COORDINADOR DE LA RED

Año 2018