

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el SECIHTI (Secretaría de Ciencias, Humanidades, Tecnología e Innovación).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos de Autor.

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Ciencias de la vida**

**Evaluación de *Metarhizium anisopliae* como agente de
biocontrol ante *Fusarium vanettenii* en sistemas
acuícolas-agrícolas integrados modelo**

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestra en Ciencias

Presenta:

Gabina Yaneth Santiago Sánchez

Ensenada, Baja California, México
2025

Tesis defendida por
Gabina Yaneth Santiago Sánchez

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Gilberto Curlango Rivera
Director de tesis

Dra. Olga Alicia Callejas Negrete

Dr. Benjamín Barón Sevilla



Dr. Edgardo Alfredo Sepúlveda Sánchez Hidalgo
Coordinador del Posgrado en Ciencias de la vida

Dra. Ana Denise Re Araujo
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Gabina Yaneth Santiago Sánchez** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestra en Ciencias en Ciencias de la Vida.

Evaluación de *Metarhizium anisopliae* como agente de biocontrol ante *Fusarium vanettenii* en sistemas acuícolas-agrícolas integrados modelo

Resumen aprobado por:

Dr. Gilberto Curlango Rivera
Director de tesis

La agricultura convencional demanda un 75% del agua disponible a nivel mundial y de acuerdo con la CONAGUA, este mismo patrón se mantiene en México. Como alternativa para el uso eficiente del agua, los sistemas Agrícolas-Acuícolas Integrados (IAA, por sus siglas en inglés), como la acuaponía, producen vegetales y animales para consumo humano, permitiendo la reutilización de nutrientes y agua. En estos sistemas, las plantas no están exentas de enfermedades ocasionadas por patógenos que atacan el sistema radicular de las plantas. El combate a estos patógenos en los sistemas de producción integrados es un área de investigación en desarrollo, dado que los agroquímicos pueden ser de grado letal para los organismos acuáticos. Los agentes biológicos para el control de patógenos (biocontrol) pueden ser una alternativa para reducir los efectos negativos en la fisiología de los peces y las plantas, a diferencia de los tratamientos convencionales con pesticidas. En este trabajo se evaluó el potencial de biocontrol del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* en un sistema IAA modelo. Para ello, se realizaron estudios de interacción de plántulas de chícharo (*Pisum sativum*) con *M. anisopliae* y con efluente de un cultivo de tilapia roja (*Oreochromis mossambicus*) con Biotecnología Biofloc (BFT, por sus siglas en inglés), ante la presencia del fitopatógeno de la raíz *Fusarium vanettenii*. Los resultados indicaron que *M. anisopliae* no afectó el desarrollo temprano de la leguminosa *P. sativum*. Además, mostró capacidad antagónica ante *F. vanettenii*, inhibiendo 15% el crecimiento del fitopatógeno y reduciendo 44% los síntomas de infección en planta. Adicionalmente, se determinó que el efluente acuícola (EA) inhibió el crecimiento de *F. vanettenii* y redujo 60% la infección en planta, mientras que la combinación de *M. anisopliae* y el EA mostraron un 100% de protección, sugiriendo una posible sinergia entre *M. anisopliae* y el EA. Estos hallazgos enfatizan el potencial de utilizar *M. anisopliae* y el EA de sistemas IAA para el biocontrol de enfermedades radiculares.

Palabras clave: *Metarhizium anisopliae*, *Fusarium vanettenii*, *Pisum sativum*, bioflóculo, células del borde de la raíz.

Abstract of the thesis presented by **Gabina Yaneth Santiago Sánchez** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Science the life.

Evaluation of *Metarhizium anisopliae* as a biological control agent against *Fusarium vanettenii* in integrated aquaculture-agriculture model systems

Abstract approved by:

Dr. Gilberto Curlango Rivera
Thesis Director

Conventional agriculture consumes 75% of the available water worldwide, and according to CONAGUA, this water consumption pattern is present in Mexico. Integrated Agriculture-Aquaculture (IAA) systems such as aquaponics produce vegetables and animals for human consumption, recycling nutrients and water. In these systems, plants are not exempt from diseases caused by root pathogens. Control of these pathogens is an evolving area of research, as agrochemicals can be lethal to aquatic organisms. Biological control can be an alternative to conventional pesticide treatments to reduce the adverse effects on fish and plant physiology. This work evaluated the biocontrol potential of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* in model IAA systems. It studied the interaction of pea (*Pisum sativum*) seedlings with *M. anisopliae* and effluent from a culture of red tilapia (*Oreochromis mossambicus*) with Biofloc Technology (BFT), inoculated with the plant pathogen *Fusarium vanettenii*. Results showed that *M. anisopliae* did not affect the early development of the legume *P. sativum*. Also, it showed an antagonistic effect against *F. vanettenii*, inhibiting its growth by 15% and reducing disease symptoms by 44%. In addition, the Aquaculture Effluent (AE) inhibited the growth of *F. vanettenii* and reduced plant infection by 60%. The combination of *M. anisopliae* with AE showed 100% protection, suggesting a synergism. These findings emphasize the potential of *M. anisopliae* and the AE from IAA systems in plant protection.

Keywords: *Metarhizium anisopliae*, *Fusarium vanettenii*, *Pisum sativum*, biofloc, Root Border Cells.

Dedicatoria

En memoria de Daniela Elif Santiago Sánchez, haré que siempre te sientas orgullosa de mí. Cumpliré mis promesas y lograremos todas nuestras metas.

A mi madre Florida Sánchez, gracias por enseñarme a no rendirme, estar en cada decisión de mi vida, apoyarme siempre en mis metas y sueños.

A mí mentor Gilberto Curlango Rivera, por confiar en mí, tenerme paciencia, escucharme y ser mi guía durante estos años.

Agradecimientos

Agradezco especialmente a la Secretaría de Ciencias, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por otorgarme la beca y apoyar mis estudios de maestría durante estos dos años.

Al Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE), al posgrado de Ciencias de la Vida por aceptarme en la maestría y poder seguir formándome en mis estudios de posgrado.

Al Departamento de Microbiología Experimental, División de Biología Experimental y Aplicada y al Departamento de Acuicultura, por prestar sus instalaciones y equipos que permitieron el desarrollo de este trabajo de investigación.

Al Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada (LMNA) de CICESE y al Dr. Diego Delgado por prestarme y capacitarme en el uso del estereomicroscopio.

Al Dr. Gilberto Curlango Rivera gracias por aceptarme como su estudiante, por el tiempo brindado, por toda la paciencia que me tiene, el conocimiento transmitido, por las charlas para motivarme a continuar con mi trabajo y no dejarme rendirme.

A los miembros de mi comité, Dra. Olga Alicia Callejas Negrete, por proporcionarme las cepas de *Metarhizium* utilizadas en este trabajo, por sus observaciones, retroalimentación, comentarios y consejos para mejorar mi trabajo.

Al Dr. Benjamín Barón Sevilla, por proporcionarme el cultivo de tilapias en biofloc para este trabajo, aceptar ser parte de mi comité, ayudarme con mis dudas, la retroalimentación como recomendaciones de este trabajo y siempre hacerme preguntas que me ayudaron a ser mejor investigando.

A la Dra. Beatriz Cordero Esquivel, por recibirme e incluirme como una alumna más en su laboratorio de microalgas, además de prestarme material de su laboratorio para realizar mis análisis, agradezco mucho su amabilidad y apoyo.

A los técnicos M. en C. Gerardo Ulises López Ortega por su apoyo en el laboratorio de microbiología y M. en C. Yanet Guerrero Rentería por su apoyo en la revisión de los peces.

A mis compañeros y amigos, Noé García Jiménez, Marilyn Yahayra Maturano Flores, Marianne Samaniego Mercado, Karla Johana Ramírez Bourgoïn, por su compañerismo en el laboratorio y por ser parte del mismo grupo de trabajo, por las risas y pláticas.

A las alumnas del Servicio Social Andrea Guerrero, Paola Rosas y Yamileth Dozal, agradezco su apoyo en las biometrías mensuales y desmontaje de los experimentos con su ayuda este trabajo se terminó a tiempo.

A mis amigos de maestría de ciencias de la vida Eris, Alexis, Marco, Alejandro, Paola, por todas las clases que tomamos juntos, las charlas y los momentos que convivimos.

A mis amigas del laboratorio de microalgas, Mayra, Evelyn, gracias por todos sus consejos, amistad y todos los momentos compartidos.

A compañero y amigo Diego Alberto, por las pláticas de hongos entomopatógenos, las risas y apoyo.

A todos mis maestros del posgrado de ciencias de la vida y acuicultura, que participaron en mi formación académica, que resolvieron mis dudas, estuvieron presentes y apoyaron durante mi estancia en el posgrado.

A los guardias Rafael y Nancy por su amabilidad y palabras de ánimo cada que llegaba a los laboratorios.

A Arturo Araiza por escucharme, leerme y siempre dar tus francas opiniones, agradezco tu amabilidad.

A mi coneja Bonnie por haber sido la mejor compañera de aventura, en este viaje llamado posgrado.

A todo personal administrativo, por siempre resolver mis dudas, especialmente a Adriana Mejía.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	x
Lista de tablas	xi
Capítulo 1. Introducción y antecedentes.....	1
1.1 Problemática del uso del agua en la agricultura.....	1
1.2 Integración de la acuicultura-agricultura.....	2
1.2.1 Flóculos microbianos.....	2
1.3 Retos en la agro-acuicultura integrada: enfermedades de la raíz	3
1.4 Control biológico	4
1.4.1 Control biológico de enfermedades radiculares fúngicas en sistemas agro-acuícolas.....	5
1.5 <i>Metarhizium</i> como agente de biocontrol	6
1.6 Modelo de estudio <i>Pisum sativum-Fusarium</i>	7
1.6.1 Rizósfera y exudados de la raíz	9
1.6.2 Células del borde de la raíz	9
1.7 Justificación	10
1.8 Hipótesis.....	11
1.9 Objetivos	11
1.9.1 Objetivo general.....	11
1.9.1 Objetivos específicos.....	11
Capítulo 2. Metodología.....	12
2.1 Selección de la especie de <i>Metarhizium</i> como agente de biocontrol	12

2.1.1 Colecta de esporas	12
2.2 Efecto de <i>Metarhizium anisopliae</i> en <i>Pisum sativum</i>	13
2.2.1 Preparación de plántula	13
2.2.2 Efecto de <i>M. anisopliae</i> en planta, 24 horas posinoculación	13
2.2.3 Efecto de <i>M. anisopliae</i> en planta, siete DPI	14
2.3 Efecto de <i>Metarhizium anisopliae</i> en la patogenicidad de <i>Fusarium vanettenii</i>	14
2.3.1 Interacción entre <i>M. anisopliae</i> y <i>F. vanettenii</i>	14
2.3.2 Efecto de <i>Metarhizium</i> en la patogenicidad de <i>F. vanettenii</i> en planta, 13 DPI.....	14
2.4 Efecto del efluente acuícola y <i>Metarhizium anisopliae</i> en la patogenicidad de <i>Fusarium vanettenii</i> en <i>Pisum sativum</i>	15
2.4.1 Efluente acuícola.....	15
2.4.2 Ensayos de interacción del efluente acuícola con <i>M. anisopliae</i> y <i>F. vanettenii</i>	16
2.4.3 Efecto del efluente acuícola y <i>M. anisopliae</i> en la patogenicidad de <i>F. vanettenii</i> en planta, 13 DPI	16
2.4.4 Efecto del efluente acuícola filtrado en la patogenicidad de <i>Fusarium vanettenii</i> en <i>P. sativum</i>	17
2.4.5 Filtración de los efluentes acuícolas	17
2.4.6 Análisis estadístico	18
Capítulo 3. Resultados	19
3.1 Efecto de <i>Metarhizium anisopliae</i> en <i>Pisum sativum</i>	19
3.3.1 Efecto de <i>M. anisopliae</i> en planta, 24 horas posinoculación	19
3.1.2 Efecto de <i>M. anisopliae</i> en planta, siete DPI	20
3.2 Efecto de <i>Metarhizium anisopliae</i> en la patogenicidad de <i>Fusarium vanettenii</i>	20
3.2.1 Efecto de <i>F. vanettenii</i> en planta, 24 h posinoculación	21
3.2.2 Interacción <i>M. anisopliae</i> - <i>F. vanettenii</i>	21
3.2.3 Efecto de <i>M. anisopliae</i> en la patogenicidad de <i>F. vanettenii</i> en planta, 13 DPI.....	23
3.3 Efecto de efluentes acuícolas y <i>Metarhizium anisopliae</i> en la patogenicidad de <i>Fusarium vanettenii</i> en <i>Pisum sativum</i>	26
3.3.1 Efecto del efluente acuícola en planta, 24 h posinoculación.....	26

3.3.2 Efecto del efluente acuícola en planta, cuatro DPI.....	26
3.3.3 Interacción del efluente acuícola con <i>M. anisopliae</i>	27
3.3.4 Interacción del efluente acuícola con <i>F. vanettenii</i>	27
3.3.5 Efecto de los efluentes acuícolas en conjunto con <i>M. anisopliae</i> en la patogenicidad de <i>F. vanettenii</i> en planta	27
3.4 Efecto de efluentes acuícolas filtrados en la patogenicidad de <i>Fusarium vanettenii</i> en <i>Pisum sativum</i>	32
3.4.1 Interacción del efluente acuícola filtrado con <i>F. vanettenii</i>	32
3.4.2 Efecto de los efluentes acuícolas filtrados en la patogenicidad de <i>F. vanettenii</i> en planta ...	33
Capítulo 4. Discusión.....	39
4.1 Efecto de <i>Metarhizium anisopliae</i> en <i>Pisum sativum</i>	39
4.2 Efecto de <i>M. anisopliae</i> en la patogenicidad de <i>Fusarium vanettenii</i>	40
4.3 Efecto de efluentes acuícolas y <i>Metarhizium anisopliae</i> en la patogenicidad de <i>Fusarium vanettenii</i> en <i>Pisum sativum</i>	41
4.4 Efecto de efluentes acuícolas filtrados en la patogenicidad de <i>Fusarium vanettenii</i> en <i>Pisum sativum</i>	43
Capítulo 5. Conclusiones	44
Literatura citada	45
Anexos	51

Lista de figuras

Figura	Página
1. Interacción <i>M. anisopliae</i> - <i>F. vanettenii</i> , seis DPI. a) <i>F. vanettenii</i> , b) Interacción entre <i>F. vanettenii</i> y <i>M. anisopliae</i> , c) <i>M. anisopliae</i> . d) Halo de inhibición entre <i>F. vanettenii</i> (flecha blanca) y <i>M. anisopliae</i> (flecha verde). Escala de barra 100 μ m.....	22
2. Efecto de <i>M. anisopliae</i> en la infección de plántulas de <i>P. sativum</i> por <i>F. vanettenii</i> a 13 DPI. a) Plantas con tratamiento control, b) Plantas inoculadas con <i>M. anisopliae</i> , c) plantas inoculadas con <i>F. vanettenii</i> , d) plantas inoculadas con <i>M. anisopliae</i> + <i>F. vanettenii</i>	24
3. Efecto del EA con <i>M. anisopliae</i> en la infección de <i>P. sativum</i> por <i>F. vanettenii</i> , 13 DPI. a) <i>P. sativum</i> , b) <i>P. sativum</i> con EA, c) <i>P. sativum</i> con <i>M. anisopliae</i> , d) <i>P. sativum</i> con <i>M. anisopliae</i> + EA, e) <i>P. sativum</i> con <i>F. vanettenii</i> , f) <i>P. sativum</i> con <i>M. anisopliae</i> + <i>F. vanettenii</i> , g) <i>P. sativum</i> con EA + <i>F. vanettenii</i> , h) <i>P. sativum</i> con EA + <i>M. anisopliae</i> + <i>F. vanettenii</i> . EA = Efluente Acuícola. DPI = Días Posinoculación.....	29
4. Recuperación del fitopatógeno <i>F. vanettenii</i> a partir de tejido radicular de <i>P. sativum</i> . a) Secciones colectadas de la radícula, b) crecimiento de micelio proveniente de los segmentos de la radícula a cuatro días de incubación, c) cultivo purificado de <i>F. vanettenii</i> aislado de <i>P. sativum</i>	30
5. Efecto de efluentes acuícolas filtrados en <i>F. vanettenii</i> . a) <i>F. vanettenii</i> , b) Efluente acuícola con <i>F. vanettenii</i> , c) Efluente acuícola filtrado con <i>F. vanettenii</i>	33
6. Efecto del EAF en la infección de <i>P. sativum</i> por <i>F. vanettenii</i> , 13 DPI. a) <i>P. sativum</i> , b) <i>P. sativum</i> con EA, c) <i>P. sativum</i> con EAF, d) <i>P. sativum</i> con <i>F. vanettenii</i> , e) <i>P. sativum</i> con EA + <i>F. vanettenii</i> , y f) <i>P. sativum</i> con EAF + <i>F. vanettenii</i> . EA = Efluente Acuícola. EAF = Efluente Acuícola Filtrado. DPI = Días Posinoculación.	34
7. Capacidad antagónica de <i>Metarhizium</i> spp. ante <i>F. vanettenii</i> . a) <i>Metarhizium</i> spp. b) <i>Metarhizium</i> spp. en interacción con <i>F. vanettenii</i> . c) <i>F. vanettenii</i> . a1 y b1) <i>M. brunneum</i> Caro 19; a2 y b2) <i>M. brunneum</i> AT3; a3 y b3) <i>M. brunneum</i> LCP 29-1; a4 y c4) <i>M. robertsii</i> ; a5 y b5) <i>M. anisopliae</i>	51
8. Interacción de <i>Metarhizium</i> spp. ante efluentes acuícolas. a) <i>Metarhizium</i> spp. b) <i>Metarhizium</i> spp. en interacción con el EA. c) <i>Metarhizium</i> spp. en interacción con el EAF. a1, b1 y c1) <i>M. brunneum</i> Caro 19; a2, b2 y c2) <i>M. brunneum</i> AT3; a3, b3 y c3) <i>M. brunneum</i> LCP 29-1; a4, b4 y c4) <i>M. robertsii</i> ; a5, b5 y c5) <i>M. anisopliae</i>	52
9. Gráfico del comportamiento del nitrógeno amoniacal total en el efluente acuícola.....	54
10. Gráfico de comportamiento de los nitritos y nitratos en el efluente acuícola.	54
11. Gráfico de pH registrado en el efluente acuícola.....	55
12. Gráfico de fluctuación de los flóculos.	55
13. Efecto del efluente acuícola sobre el crecimiento radial de <i>M. anisopliae</i> . a) <i>M. anisopliae</i> , b) <i>M. anisopliae</i> con el EA, c) <i>M. anisopliae</i> con el EAF.	56

Lista de tablas

Tabla	Página
1 Escala de severidad de las lesiones necróticas ocasionadas por <i>F. vanettenii</i>	15
2 Parámetros de calidad de agua establecidos en los Efluentes Acuícolas (EA) para los diversos experimentos con planta.	16
3 Efecto de <i>M. anisopliae</i> en el crecimiento radicular, producción y viabilidad de células del borde del ápice de la raíz de plántulas de chícharo (<i>P. sativum</i>) a 24 h posinoculación. ¹	19
4 Efecto de <i>M. anisopliae</i> en el desarrollo biológico de plántulas de chícharo (<i>P. sativum</i>) a siete DPI. ¹	20
5 Efecto de <i>F. vanettenii</i> en el crecimiento radicular, producción y viabilidad de células del borde del ápice de la raíz de plántulas de chícharo (<i>P. sativum</i>) a 24 horas posinoculación. ¹	21
6 Crecimiento radial de <i>M. anisopliae</i> y <i>F. vanettenii</i> en interacción. ¹	22
7 Efecto de <i>M. anisopliae</i> en la severidad de síntomas de pudrición de raíz en <i>P. sativum</i> ocasionadas por <i>F. vanettenii</i>	23
8 Desarrollo biológico de las plántulas de <i>P. sativum</i> en las pruebas de patogenicidad con <i>F. vanettenii</i> y <i>M. anisopliae</i> . ¹	25
9 Efecto del efluente acuícola en planta a 24 horas posinoculación. ¹	26
10 Efecto del efluente acuícola en el crecimiento radicular de plántulas de <i>P. sativum</i> a cuatro DPI. ¹	27
11 Efecto del efluente acuícola y <i>M. anisopliae</i> en la severidad de síntomas de pudrición de raíz en <i>P. sativum</i> ocasionadas por <i>F. vanettenii</i>	28
12 Efecto del efluente acuícola (EA) y <i>M. anisopliae</i> en la presencia de <i>Fusarium vanettenii</i> en <i>P. sativum</i> . ¹	30
13 Desarrollo biológico de plántulas de <i>P. sativum</i> en las pruebas de patogenicidad ante <i>F. vanettenii</i> con el EA y <i>M. anisopliae</i> . ¹	31
14 Efecto de los efluentes acuícolas y efluente acuícola filtrado en <i>F. vanettenii</i> . ¹	33
15 Efecto del EAF en la severidad de síntomas de pudrición de raíz en <i>P. sativum</i> ocasionadas por <i>F. vanettenii</i>	36
16 Efecto del EAF en la presencia de <i>F. vanettenii</i> en plántulas de <i>P. sativum</i> en ensayos de patogenicidad. ¹	36
17 Desarrollo biológico de plántulas de <i>P. sativum</i> en las pruebas de patogenicidad ante <i>F. vanettenii</i> con el Efluente Acuícola Filtrado (EAF). ¹	37

18	Crecimiento radial promedio de los hongos control de <i>Metarhizium</i> y en interacción con el fitopatógeno <i>F. vanettenii</i> . ¹	51
19	Crecimiento radial de <i>F. vanettenii</i> y en interacción con <i>Metarhizium</i> spp. ¹	52
20	Crecimiento radial promedio de los hongos <i>Metarhizium</i> en interacción con los efluentes acuícolas filtrados.....	53
21	Efecto del efluente acuícola y efluente acuícola filtrado en el crecimiento radial de <i>M. anisopliae</i> . ¹	56

Capítulo 1. Introducción y antecedentes

1.1 Problemática del uso del agua en la agricultura

El cambio climático recrudece en la escasez del agua en países que enfrentan sequía y falta de alimentos, por lo que para mitigar sus efectos se propone un enfoque agropecuario con seguridad alimentaria (Goddek & Keesman, 2018). La escasez y disponibilidad del agua es un problema a nivel mundial, que surge por el uso excesivo de este recurso en diversos sectores que utilizan grandes volúmenes de este líquido vital (Pedrozo Acuña, 2022). La extracción de agua dulce genera un nivel de estrés hídrico en el mundo; la Organización de las Naciones Unidas (ONU) plantea metas y proyectos para hacer frente a la escasez de agua y reducir el número de personas que sufren de la falta de este recurso vital. Esta organización prevé que para el 2030 haya un aumento en la eficiencia y sostenibilidad de los sistemas agrícolas para contribuir a la reducción de la demanda de agua y cuidar los ecosistemas (United Nations, 2023).

De acuerdo con los datos hidrográficos obtenidos por la ONU, uno de los sectores en los que se utiliza la mayor cantidad de agua es la agricultura, aproximadamente tres cuartas partes del agua que se extrae cada año se destinan a este sector a escala mundial (ONU-Agua, 2021). Por lo que, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés) busca el desarrollo y la implementación de tecnologías que fomenten el ahorro del agua en los cultivos a nivel mundial (Gillet & Biancalani, 2022; ONU-Agua, 2021). De igual manera, en México, la Comisión Nacional del Agua (CONAGUA) reconoce que la agricultura es el sector de mayor impacto para este recurso. Hasta el año 2024 el 76% de la extracción de agua se designó a este sector. A nivel mundial, México ocupa el séptimo lugar con mayor infraestructura para riego rodado y presurizado por medio de aspersión o goteo (CONAGUA, 2019, 2022b, 2022a, 2024).

Una alternativa para el mejoramiento de la eficiencia en el uso del agua en el sector agrícola es la hidroponía, en donde se cultivan plantas con uso limitado de agua. Esta técnica de cultivo optimiza el uso del agua mediante la utilización de soluciones nutrientes formuladas para lograr mayores rendimientos y dirigidas al sistema radicular de las plantas. Además, se obtiene una producción de plantas más consistente, permitiendo una productividad mayor que en un sistema agrícola convencional, lo cual se refleja en una menor cantidad de agua utilizada (Hanan, 1998; Majid et al., 2021). Otra estrategia que incrementa el aprovechamiento del agua es la integración de la agricultura y la acuicultura, en donde se

le da un doble uso al agua para producir alimentos vegetales y animales (Somerville et al., 2014).

1.2 Integración de la acuicultura-agricultura

Una práctica tecnológica que satisface los requisitos de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) establecidos por la ONU, es integración acuícola-agrícola, práctica popularmente conocida como acuaponía (ONU-Agua, 2021). Los hechos históricos demuestran que la integración de la agricultura y acuicultura se ha ejercido desde civilizaciones antiguas como la china, desde el año 4000-3000 a. C., en donde se cultivaba arroz y peces simultáneamente. La civilización egipcia en el año 3500 a. C, utilizaba las aguas del río Nilo para cultivar plantas y peces, obteniendo cosechas de mayor tamaño y más saludables. Así mismo, las civilizaciones mesoamericanas en los años 1500-1000 a. C, desarrollaron sistemas de cultivo de plantas en balsas flotantes conocidas como chinampas, las cuales se encontraban principalmente en los lagos y lagunas de los valles centrales de México (Baixin & Shujia, 1984; Cartwright, 2014; Mark, 2017).

La acuaponía ofrece la posibilidad de reciclar los efluentes de un sistema acuícola para cultivar plantas, reduciendo el uso de fertilizantes y el uso del agua en la producción de alimentos, lo que reduce el impacto ambiental, en comparación con otros sistemas convencionales que producen alimentos de manera independiente, como la hidroponía o la acuicultura. Además, la producción de plantas puede ser mayor a la agricultura convencional (Watten & Busch, 1984) y comparable a un sistema hidropónico, incluso puede llegar a ser mayor dependiendo de la especie cultivada (Ayipio et al. 2019; Estrada-Pérez et al., 2024).

Un componente de la acuaponía son las comunidades microbianas libres o en flóculos, que contribuyen al funcionamiento y equilibrio de estos sistemas, beneficiando a las plantas y a los organismos acuáticos (Eck et al., 2019).

1.2.1 Flóculos microbianos

Los flóculos microbianos (bioflóculos) son agregaciones de materia orgánica y comunidades microbianas suspendidas en el agua o sedimentables. Los microorganismos presentes en los bioflóculos pueden utilizar la materia orgánica para su crecimiento. Los bioflóculos alojan una gran diversidad de microorganismos entre ellos bacterias autótrofas y heterótrofas, microalgas, hongos, protozoarios, nematodos, oligoquetos y artrópodos como rotíferos entre otros (Hernández-Mancipe et al., 2019).

Los sistemas de cultivo con Tecnología Biofloc (BFT, del inglés “Biofloc Technology”) fomentan el aprovechamiento del agua con un mínimo recambio. El funcionamiento de estos sistemas depende de la adición de una fuente de carbono y nitrógeno en distintas relaciones, lo que permite el desarrollo de las comunidades microbianas principalmente de bacterias heterótrofas, que metabolizan los carbohidratos disponibles y el nitrógeno inorgánico. Los compuestos metabólicos de los organismos cultivados, como el Nitrógeno Amónico Total (NAT, amonio/amoniaco $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3^+$), el alimento no consumido y la materia orgánica producida por los peces, aceleran el crecimiento de estas comunidades bacterianas, que se conglomeran, formando los bioflóculos (De Schryver et al., 2008; Fatimah et al., 2019; Kumar et al., 2021; Monroy-Dosta et al., 2013)

Los bioflóculos son sistemas biológicos de gran utilidad para la biorremediación natural, ya que al degradar y descomponer la materia orgánica ayudan a mantener la calidad del agua. Además de ser una fuente de nutrientes, principalmente de proteínas, que al ser consumidos por organismos acuáticos ayudan a mejorar el crecimiento. No obstante, en la actualidad no se conoce a profundidad el funcionamiento de estas comunidades microbianas, se estima que otro beneficio es que pueden combatir enfermedades infecciosas. Diversos estudios han identificado especies, como bacterias y levaduras de diversos géneros presentes en estas comunidades, entre ellos: *Sphingomonas*, *Microthrix*, *Nitrospira*, *Actinobacter*, *Rhodopseudomonas*, *Micrococcus*, *Nitrosomonas*, *Nitrobacter*, *Cellulomonas*, además algunas especies tienen potencial como agentes de biocontrol como *Pseudomonas* spp. y *Bacillus* spp. (Kumar et al., 2021; Monroy-Dosta et al., 2013).

1.3 Retos en la agro-acuicultura integrada: enfermedades de la raíz

Al igual que en la acuicultura y agricultura convencional, los peces y plantas cultivados en sistemas integrados no están libres de enfermedades, que son uno de los principales desafíos de la acuaponía. Existen diversos factores abióticos que ocasionan estos padecimientos, por ejemplo, el ambiente acuático o de alta humedad característico de estos sistemas, ofrece las condiciones para la reproducción de microorganismos patógenos que ocasionan enfermedades en los cultivos vegetales o acuícolas afectando su crecimiento y rendimiento (Goddek et al., 2019).

Las enfermedades más graves y persistentes en estos sistemas son las ocasionadas en el sistema radicular. Los patógenos asociados a las raíces que están adaptados a las condiciones húmedas producen la enfermedad conocida como pudrición de raíz, que provoca la muerte de la plántula (Goddek et al.,

2019). Los microorganismos fúngicos *Fusarium* y *Rhizoctonia*, así como los oomicetos *Pythium* y *Phytophthora*, son los principales patógenos que forman este complejo que causa la pudrición de la raíz, siendo los oomicetos particularmente importantes, ya que producen zoosporas que pueden diseminarse en el medio líquido (Goddek et al., 2019).

Los tratamientos para estas enfermedades son limitados, porque los agentes químicos convencionales no son aptos para utilizarse en estos sistemas, ya que pueden dañar a las especies acuáticas. Una alternativa a estos tratamientos es el control biológico, que controla las plagas y enfermedades mediante el uso de microorganismos benéficos, sin embargo, su adaptación a los sistemas acuapónicos sigue siendo parte de estudios para determinar su efectividad (Stouvenakers et al., 2019).

1.4 Control biológico

Existen diversos tipos de control de enfermedades en las plantas, tanto físicos como químicos, sin embargo, la legislación agrícola mundial ha cambiado y evolucionado conforme a las necesidades del consumidor y el medio ambiente. Esta evolución implica la búsqueda de nuevas formas de combatir las enfermedades en plantas, como estudiar las interacciones entre el patógeno y el hospedero, y la utilización de agentes de control biológico (Agrios, 2005; Moreno-Velandia et al., 2018). El control biológico es un método de control de plagas, depredadores, parásitos, o patógenos, en el que se utilizan organismos naturales denominados Agentes de Control Biológico (BCA, del inglés Biological Control Agent), los cuales son una alternativa ecológica de controlar las enfermedades ocasionadas por los patógenos. Los BCA se pueden encontrar en el suelo cercano a las plantas, donde se pueden asociar de manera natural a las plantas antes de que los patógenos ataquen, inhiban o destruyan a las plantas (Agrios, 2005; Moreno-Velandia et al., 2018).

Los BCA han demostrado ser efectivos en el combate a enfermedades, sin embargo, una de sus limitantes es su adaptación a diferentes ambientes (Schuman & D'Arcy, 2012). Además, se ha demostrado que comunidades diversas de microorganismos tienen un mayor efecto en la supresión de enfermedades (McKellar & Nelson, 2003). Por ejemplo, la utilización de Extractos Acuáticos de Composta (CWE, del inglés Compost Water Extract), son mezclas de composta incubadas en agua con aireación o sin aireación para generar una comunidad microbiana densa y diversa con efecto de supresión a enfermedades (Sheuerell & Mahaffe, 2002). Los CWE en la agricultura convencional se manejan con gran éxito como una alternativa ecológica para el combate a patógenos foliares o radiculares, por ejemplo, se han estudiado para suprimir

de manera efectiva el hongo *Mycena citricolor* causante del ojo de gallo en hojas de café (Zamora et al., 2017). En otros estudios, se ha demostrado que los microorganismos presentes en estos CWE presentaron un efecto supresor de la enfermedad de la pudrición de la raíz en leguminosas y plantas como pepino (*Cucumis sativa*), maíz (*Zea mays* L.) y algodón (*Gossypium hirsutum* L.) (Curlango-Rivera et al., 2013; Tollefson et al., 2015).

Los BCA no solo son utilizados en la agricultura convencional, se han integrado en sistemas hidropónicos, y se han realizado estudios para integrarlos en los sistemas acuapónicos. Aunque las investigaciones de los BCA en acuaponía son limitados, existen microorganismos que confirman su potencial en estos sistemas (Rivas-García et al., 2020). Por ejemplo, en el control de plagas y enfermedades foliares, un estudio determinó que el uso de microorganismos como *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* disminuyeron la abundancia de insectos como la mosquita blanca en los cultivos de col y lechugas (Ríos Da Silva et al., 2020). Otro estudio demostró que hongos entomopatógenos de las especies *Lecanicillium attenuatum*, *Isaria fumosorosea* y *Trichoderma virens* pueden controlar enfermedades causadas por el mildiú polvoroso (Folorunso et al., 2022).

En los sistemas integrados agro-acuícolas surgen diferentes enfermedades como las que se ocasionan en la raíz y se han evaluado BCA como bacterias del género *Pseudomonas* y *Bacillus* que pueden actuar en defensa de las plantas por medio de la producción de sustancias antifúngicas y antibacterianas que pueden contrarrestar las enfermedades (Goddek et al., 2019).

1.4.1 Control biológico de enfermedades radicales fúngicas en sistemas agro-acuícolas

Sirakov et al. (2016) sugirieron utilizar microorganismos con capacidad para inhibir los patógenos *Pythium ultimum* y *Saprolegnia parasitica*, que atacan a peces y plantas en un sistema acuapónico. Su estudio se enfocó principalmente en aislar microorganismos provenientes del biofiltro, del agua del tanque, de las raíces de tomate, de las escamas y material orgánico secretado por los peces en cultivo. Posteriormente, se evaluaron in vitro 50 aislados bacterianos contra los patógenos *P. ultimum* y *S. parasitica* y se observó que más del 80% de los aislados tuvieron un efecto inhibitorio contra ambos patógenos.

Stouvenakers et al., (2020) evaluaron la enfermedad de la pudrición de raíz en lechuga (*Lactuca sativa*), causada por *Pythium aphanidermatum* y analizaron la diversidad microbiana presente en el sistema acuapónico. El análisis demostró la presencia de microorganismos pertenecientes a las familias

bulkolderiaceae, methylophiacea y pseudomonadaceae presentes en el agua de cultivo, rizósfera, el rizoplano, y endosfera de las plantas. Se observó que estos microorganismos generaban un efecto inhibitorio contra el patógeno, presentando potencial y capacidad antagónica.

Suárez-Cáceres et al., 2021 describieron la dinámica de transmisión de enfermedades ocasionadas por *Phytophthora cactorum* en fresa en sistemas hidropónicos y acuapónicos. Se observó que la severidad de la enfermedad en la fresa en etapa temprana se vio suprimida por la presencia de los microorganismos presentes en el sistema acuapónico, a diferencia del sistema hidropónico. El estudio concluyó que la microbiota radicular y del efluente del sistema acuapónico se correlacionó con el efecto supresor ante *P. cactorum*.

1.5 *Metarhizium* como agente de biocontrol

El género *Metarhizium* comprende especies de hongos entomopatógenos que se han estudiado en muchas partes del mundo (Mayerhofer et al., 2019). Pertenece al orden hypocreales y a la familia clavicipitaceae (Brunner-Mendoza et al., 2019). Su rango hospedero incluye alrededor de 200 especies de insectos pertenecientes a 17 familias. *Metarhizium* es uno de los géneros más estudiados en diversas ramas de la ciencia como ecología, evolución, y biología (Ahmad et al., 2020; Zimmermann, 2007)

Además de su importante papel ecológico como regulador de poblaciones de insectos del suelo, también está involucrado en la salud, crecimiento y productividad de las plantas. De esta manera, tiene diversos estilos de vida como saprófito, patógeno de insectos, y endófito actuando como simbiote. Por su habilidad para colonizar las raíces de las plantas, se ha aislado de diversas especies de plantas, las cuales producen hidratos de carbono que es captado por el hongo. A su vez, el hongo adquiere nitrógeno de los insectos a través del micelio (Moonjely & Bidochka, 2019), translocándolo a las plantas (Stone & Bidochka, 2020). Además, se ha encontrado presente en suelos de ecosistemas acuáticos como los humedales (Tian et al., 2016).

Respecto a la capacidad de *Metarhizium* de asociarse con las raíces de las plantas y promover su crecimiento, Sasan & Bidochka en 2012, evaluaron la asociación de *M. robertsii* con plantas de *Panicum virgatum* y *Phaseolus vulgaris*, en donde determinaron que *M. robertsii* tiene la capacidad de asociarse como un colonizador endofítico, induciendo la producción de vellos radiculares (Sasan & Bidochka, 2012). Asimismo, se ha estudiado su potencial antagonista (antibacteriano y antifúngico) producto de

metabolitos estructurales, como los glucósidos, conocidos por su actividad inhibidora contra bacterias como *Pseudomonas aeruginosa* (Tian et al., 2016) y cepas patógenas de *Fusarium* (Sasan & Bidochka, 2013).

Sasan & Bidochka (2013) evaluaron la capacidad antagónica del hongo *M. robertsii* contra el fitopatógeno *Fusarium solani*. El antagonismo in vitro demostró que *M. robertsii* inhibió el 60% del crecimiento radial de *F. solani*. Además, evaluaron el efecto antagónico en ensayos en planta de *P. vulgaris*, demostrando que las plantas expuestas a *M. robertsii* con *F. solani* no presentaron síntomas graves de la enfermedad de la pudrición de las raíces.

Dávila-Berumen en 2017, aisló cepas del género *Metarhizium* y evaluó la capacidad antagónica de los aislados contra el fitopatógeno *F. oxysporum*. Este estudio demostró que 39 de los 51 aislados generaron una inhibición contra el fitopatógeno. Posteriormente, se seleccionó la cepa de *M. guizhouense*, la cual presentó un mayor porcentaje inhibitorio, y se evaluó en plantas de sorgo y tomate ante el fitopatógeno. Las plantas mostraron una disminución de síntomas de la pudrición de la raíz debido a la presencia de *M. guizhouense*, sugiriendo que los metabolitos extracelulares están relacionados con su actividad antagonista contra el patógeno evaluado.

En 2023, un estudio con *M. guizhouense* estableció que algunas de las fitohormonas liberadas por las plantas como la estrigolactona, sorgolactina, el ácido 3-inolacético y el ácido giberélico, influyen en el crecimiento de las hifas y la colonización de las raíces. Se cree que *Metarhizium* podría detectar las estrigolactonas liberadas por la planta y de esta manera establecer una asociación beneficiando el crecimiento de hifas y la inducción del micelio en la raíz de la planta (Piña-Torres et al., 2023).

1.6 Modelo de estudio *Pisum sativum*-*Fusarium*

El año 2016, fue declarado por la FAO el año internacional de las leguminosas, ya que son parte esencial de la alimentación a nivel mundial desde hace siglos. Las leguminosas se han domesticado a través de millones de años y se cultivan en todo el planeta (FAO, 2016). El chícharo (*Pisum sativum* L.) pertenece a la familia fabaceae o leguminosae, son una de las plantas más abundantes en el mundo, con un alto contenido de proteína (20-30%). Además, se caracterizan por su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, mejorando la calidad del suelo, corto ciclo de vida y bajo consumo de agua. Por su relevancia para el

consumo, las leguminosas más conocidas son el chícharo, frijol, soya, habas, garbanzo y lentejas (D'Ambrosio et al., 2018; FAO, 2016).

A nivel mundial los chicharos se consumen principalmente por sus propiedades nutricionales y son fundamentales en una dieta saludable; se estima que hacia el año 2050 su producción pueda aumentar hasta un 70%. En México en el año 2023 el valor del comercio de esta leguminosa fue de 36.4 millones de dólares y Baja California fue el primer productor, seguido de Guanajuato, Sinaloa, Baja California Sur, Aguascalientes, Sonora y Puebla (Secretaría de economía, 2023).

La demanda de proteínas de origen vegetal ha estimulado la venta del chícharo (*P. sativum*) y la fuente de este producto es la agricultura convencional (Wohor et al., 2022). Sin embargo, el rendimiento productivo de esta actividad puede verse afectada negativamente por la incidencia de la enfermedad de la pudrición de la raíz ocasionada por el hongo patógeno *Fusarium* spp. (Chatterton et al., 2019). Se tiene registro que este hongo puede reducir desde el 15 al 60% de rendimiento en las cosechas, y entre el 80 y 100% cuando no se controla. El uso de control químico y biológico es crucial para mantener los cultivos de chícharo saludables, sin embargo, la resistencia del patógeno a los tratamientos ha evolucionado (Williamson-Benavides et al., 2020).

En el trabajo de Chatterton et al., 2019 evaluaron la distribución y la gravedad de la pudrición de la raíz en plantas de chícharo y lenteja. En el estudio se determinó que patógenos del género *Fusarium*, *Pythium*, y *Rhizoctonia solani* estaban presentes en las regiones de muestreo y ocasionó la enfermedad en los cultivos de chícharo. Además, en las diferentes regiones del muestreo, el patógeno con mayor presencia fue *F. avenaceum* y *F. solani*. Las lesiones de los síntomas de la pudrición de la raíz, fueron de moderados a graves, de 25 a 99% en las plantas de chícharo y del 8 a 34 % en cultivos de lenteja.

En 2021 se realizó un estudio utilizando como método de control biológico rizobacterias promotoras de crecimiento contra el fitopatógeno *F. solani*, causante de la enfermedad de la pudrición de la raíz en plantas de chícharo (*P. sativum*). El estudio demostró que de 41 aislados de bacterias presentes en extraídas de la rizósfera, solo las cepas de *Bacillus halotolerans* y *B. subtilis* tuvieron un efecto antagónico de un 45 a 60 % contra *F. solani*. Además, demostraron que las bacterias disminuyen el tiempo de germinación de semillas de chícharo de un 4 a 35%, promoviendo un incremento en la longitud de los brotes y de la raíz hasta un 78%. Las rizobacterias también redujeron la severidad de la pudrición de la raíz entre un 25 y 89% (Riaz et al., 2021)

Lo anterior implica investigar nuevas estrategias para combatir la enfermedad, así como entender los mecanismos de interacción en planta que se llevan a cabo en la zona rizosférica (Chatterton et al., 2019; Williamson-Benavides et al., 2020; Wohor et al., 2022).

1.6.1 Rizósfera y exudados de la raíz

Lorenz Hiltner es conocido como el primer científico que definió el término “rizósfera” en 1904, como una interfase entre la raíz y el suelo circundante (Hartmann et al., 2008). Esta región abarca aproximadamente de 3-4 mm en la interfase planta-suelo. La extensión de la rizósfera en el suelo depende de la estructura del suelo, de la composición de la microflora y las especies de plantas. El microbioma de la rizósfera puede ayudar a las plantas a enfrentar una variedad de estresores bióticos y abióticos, incluyendo plagas, enfermedades, salinidad y sequías (Hartmann et al., 2008, Liu et al., 2023, Rabelo de Faria et al., 2020).

En la rizósfera se puede presentar el fenómeno conocido como rizodeposición, que se refiere al proceso mediante el cual las raíces liberan exudados (Oliveros-Bastidas et al., 2009). Las diversas interacciones de la microbiota presente en las raíces de las plantas dependen de la composición de los exudados, cuya función puede incrementar la actividad microbiana (Zhang et al., 2019).

Los exudados pueden ser de bajo o alto peso molecular, encontrándose azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, mucílago, proteínas, compuestos volátiles como el CO₂, alcoholes y aldehídos. Estos compuestos químicos son conocidos como compuestos alelopáticos que se encuentran en el tejido vivo y tienen actividad fisiológica. Mediante una comunicación química entre las raíces y las poblaciones microbianas (van Dam & Bouwmeester, 2016), generan una respuesta a las condiciones del medio ambiente (Oliveros-Bastidas et al., 2009). Los exudados de las raíces funcionan como defensa de las plantas contra una variedad de enemigos naturales, incluidos los hongos patógenos, oomicetos, bacterias, virus, nematodos y artrópodos que se alimentan de las raíces (Schuman & D'Arcy, 2012).

1.6.2 Células del borde de la raíz

En el extremo de la raíz de la planta se encuentra el meristemo apical y el ápice de la raíz de la planta, en esta región se encuentran una gran cantidad de células activas, que están involucradas en la división celular y crecimiento de la planta. Estas células se diferencian en células especializadas conocidas como

células del borde de la raíz (del inglés “Root Border Cells”), las cuales tienen una función física-biológica en la rizósfera. Las células del borde se han estudiado en más de 30 especies de plantas, incluyendo cereales y leguminosas, algunas especies tienen la capacidad de producir hasta 10,000 células por ápice. Se reporta que estas células tienen una viabilidad entre un 90 y 100% (Hawes, 1998).

Se ha demostrado que la separación de las células del borde varía durante el desarrollo de la planta. En *P sativum*, se generan entre 3000 y 4000 células. Las células del borde liberan exudados ricos en nutrientes en la región radicular, y ejercen una influencia sobre los niveles y la composición de las poblaciones microbianas en el suelo (Hawes & Lin, 1990). Las células del borde están involucradas en la defensa de las plantas y sus exudados actúan como barrera de defensa contra patógenos de las raíces. Las células del borde funcionan como trampas extracelulares en respuestas a señales de estrés ocasionado por los patógenos, y exportan proteínas antimicrobianas en conjunto con ADN extracelular (Hawes et al., 2016).

1.7 Justificación

El uso del agua en el sector agrícola tiene un gran impacto a nivel mundial, por lo que en la actualidad se buscan estrategias para poder tener una mayor efectividad de uso de este recurso. Los sistemas acuícolas-agrícolas integrados ofrecen una alternativa para incrementar la eficiencia del agua, ya que reducen su consumo y se obtienen dos productos alimenticios (peces y plantas). Sin embargo, estos sistemas no están exentos de enfermedades, principalmente las ocasionadas por organismos que pueden dañar las raíces de las plantas. Las enfermedades se vuelven un problema que no es sencillo de tratar con agroquímicos convencionales, dado que su uso es nocivo para la salud de los organismos acuáticos y pueden ser de grado letal. Una alternativa sostenible para el tratamiento de las enfermedades que afectan los cultivos acuícola-agrícolas integrados es el uso de microorganismos benéficos que se generan en el mismo sistema o emplear agentes de control biológico. Sin embargo, el tratamiento de las enfermedades con estos microorganismos convencionales presenta un desafío, ya que no todos tienen la capacidad de aclimatarse a las condiciones semiacuáticas o acuáticas de estos sistemas.

Metarhizium anisopliae es un hongo entomopatógeno utilizado ampliamente en la agricultura tradicional. Es un agente de biocontrol multipropósito, ya que también se encuentra asociado a las raíces de las plantas, mejorando su desarrollo y protegiéndolas contra patógenos. Además, se ha reportado que esta especie habita de manera natural en ecosistemas semiacuáticos como los humedales. Por lo tanto, en este

trabajo se propuso estudiar el potencial de este hongo como agente de biocontrol en un sistema agrícola-acuícola integrado.

1.8 Hipótesis

Metarhizium anisopliae tiene un impacto positivo en el desarrollo de *Pisum sativum* en condiciones semiacuáticas, actúa como agente protector contra la enfermedad del sistema radicular causada por *Fusarium vanettenii* y en presencia del efluente acuícola de un sistema con bioflóculos tiene la capacidad de contrarrestar la enfermedad de la pudrición de la raíz.

1.9 Objetivos

1.9.1 Objetivo general

Conocer el potencial de *Metarhizium anisopliae* como organismo de control biológico de enfermedades de la raíz del chícharo *Pisum sativum* en sistemas acuícolas-agrícolas integrados.

1.9.1 Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de *Metarhizium anisopliae* en el desarrollo radicular de plántulas de *Pisum sativum*.
2. Evaluar la función de *Metarhizium anisopliae* en la protección del sistema radicular de plántulas de *Pisum sativum* ante el fitopatógeno *Fusarium vanettenii*.
3. Describir la interacción de los efluentes acuícolas con *Metarhizium anisopliae* en la protección de plántulas de *Pisum sativum* ante el patógeno de la raíz *Fusarium vanettenii*.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Selección de la especie de *Metarhizium* como agente de biocontrol

Se evaluaron de manera cualitativa y cuantitativa cinco diferentes cepas del género *Metarhizium* provenientes de un estudio realizado por Piña-Torres (2017). Las cepas fueron proporcionadas por el Laboratorio de Genética Molecular de Hongos de la División de Ciencias Naturales de la Universidad de Guanajuato. La cepa *M. brunneum* Caro 19 fue aislada del insecto *Gerageus senillis* (plaga de maíz), las otras cuatro cepas se aislaron de la rizósfera de plantas colectadas en áreas naturales protegidas del estado de Guanajuato. La cepa *M. brunneum* AT3 se aisló de un bosque de pino-encino; la cepa *M. brunneum* LCP 29-1 se aisló de un bosque de encino y de selvas bajas caducifolias; *M. robertsii* se aisló de un bosque de encino, y *M. anisopliae* de un bosque de encino de clima templado subhúmedo. La selección de la especie del género de *Metarhizium* utilizada en este estudio, se llevó a cabo mediante ensayos de interacción in vitro con el fitopatógeno *Fusarium vanettenii*, en los que se evaluó su capacidad antagónica. Los ensayos de interacción se realizaron en cajas de Petri de 100 x 20 mm con medio Papa Dextrosa Agar (PDA), en donde se inoculó una suspensión de esporas a una concentración de 1×10^6 células/mL (cel/mL) de las distintas cepas de *Metarhizium* y *F. vanettenii*, de acuerdo con el método de Nysanth et al. (2022).

2.1.1 Colecta de esporas

Las cepas de *Metarhizium* se cultivaron en medio mínimo (MM), que contenía por cada litro, 20 g de glucosa, 3 g de KH_2PO_4 , 1.8 g de NH_4NO_3 y 20 mL de concentrado de sales 50X (MgSO_4 al 2.5%, ZnSO_4 al 0.009%, FeSO_4 al 0.005%, MnSO_4 al 0.001% y CuSO_4 al 0.002%). La colecta de esporas se realizó en una solución de tritón (0.01%) para preparar una suspensión de esporas de 1×10^6 cel/mL.

F. vanettenii se cultivó en medio V8 (25 mL de jugo V8, 0.375 g de CaCO_3 , Agar 2.5 g y 125 mL de agua destilada). Se realizó una colección de esporas con agua destilada y posteriormente se realizaron conteos en cámara de Neubauer para la preparación de una suspensión de 1×10^6 cel/mL.

2.2 Efecto de *Metarhizium anisopliae* en *Pisum sativum*

El efecto de *M. anisopliae* se determinó estudiando el desarrollo radicular de plántulas de chícharo (*Pisum sativum* L.), a 24 h y a siete Días Posinoculación (DPI). La radícula se expuso a esporas de *M. anisopliae* y las plántulas se cultivaron en sistemas hidropónicos modelo bajo condiciones de laboratorio a temperatura ambiente, siguiendo los métodos descritos a continuación.

2.2.1 Preparación de plántula

Para los experimentos se utilizaron semillas de chícharo (*P. sativum*) “Little Marvel” (Victory Seed Company, Irving, TX, USA). Se esterilizaron en etanol (96%) e hipoclorito de sodio (5%). Las semillas se colocaron en charolas para germinación con medio de cultivo agar-agua al 1% (p/v) y se incubaron durante 48 horas en oscuridad. Pasado el tiempo de germinación se seleccionaron las plántulas de chícharo sanas con una radícula de 25 mm de longitud (Gunawardena & Hawes, 2002).

2.2.2 Efecto de *M. anisopliae* en planta, 24 horas posinoculación

Para evaluar el efecto de *M. anisopliae* en etapa temprana, se realizó un ensayo in vitro donde se inocularon plántulas de chícharo con 50 μ L de una suspensión de esporas de 1×10^5 cel/mL de *M. anisopliae* durante tres minutos, al término del tiempo las plantas se colocaron en cajas de Petri con agar-agua al 1% con papel filtro. Después de marcar la posición del ápice de la radícula, se resguardaron a temperatura ambiente y en oscuridad por 24 h. Se realizaron un mínimo de tres réplicas con sus respectivos controles negativos (plántulas inoculadas con agua destilada estéril). A las 24 horas posteriores al tratamiento se midió el crecimiento radicular por plántula de chícharo, se colectaron las células del borde del ápice de la raíz en agua destilada estéril para determinar el número de células producidas y su viabilidad mediante tinción con rojo neutro al 1%. Se realizó una tinción negativa con carbón vegetal para el conteo directo de las células del borde en muestras de 10 μ L. Los conteos se realizaron en duplicado utilizando un microscopio óptico Nikon eclipse E200, con magnificación de 100 y 400X.

2.2.3 Efecto de *M. anisopliae* en planta, siete DPI

En los ensayos a siete días se cultivaron las plantas en sistemas hidropónicos modelo bajo condiciones de laboratorio a temperatura ambiente. Se inocularon 200 μL de una suspensión de 1×10^6 cel/mL de *M. anisopliae* por plántula. Se verificó el crecimiento cada 24 horas. Al séptimo día se evaluó el desarrollo biológico midiendo el crecimiento de la raíz principal, número y longitud de las raíces laterales, altura de la planta, peso seco foliar y radicular. Para cuantificar el peso seco de cada parte de la planta se deshidrató a una temperatura de 60 °C por tres días. El experimento se replicó tres veces con su respectivo control negativo, donde, se inoculó la cantidad de 200 μL de agua destilada estéril (Curlango-Rivera et al. 2013).

2.3 Efecto de *Metarhizium anisopliae* en la patogenicidad de *Fusarium vanettenii*

2.3.1 Interacción entre *M. anisopliae* y *F. vanettenii*

Para analizar si había un efecto de *M. anisopliae* sobre *F. vanettenii*, se realizaron ensayos de interacción in vitro donde se inocularon 10 μL de una suspensión de 1×10^6 cel/mL de *M. anisopliae* y *F. vanettenii* en los extremos opuestos de cajas Petri de 60 x 15 mm con medio de cultivo PDA, con una separación de 15 mm del extremo de la caja, los cultivos se incubaron a 28 °C por seis días. Adicionalmente, las especies fúngicas se cultivaron independientemente como control para comparar el crecimiento radial y analizar su crecimiento con un estereomicroscopio Olympus SZX-ILLB2-100 del Laboratorio Nacional de Microscopia Avanzada (LNMA) de CICESE. Al término del ensayo, se hicieron los cálculos para evaluar si existió inhibición entre las especies fúngicas, utilizando la siguiente fórmula (Sasan & Bidochka, 2013).

$$\text{Porcentaje de inhibición} = [(C - T) / C] \times 100 \quad (1)$$

Donde C es el crecimiento radial del control y T representa el crecimiento radial del tratamiento.

2.3.2 Efecto de *Metarhizium* en la patogenicidad de *F. vanettenii* en planta, 13 DPI

El efecto protector de *M. anisopliae* se evaluó mediante pruebas de patogenicidad en plántulas de chícharo *P. sativum*. Para ello, semillas de chícharo se germinaron en las condiciones previamente

descritas. Las plántulas se cultivaron en sistemas hidropónicos modelo bajo condiciones de laboratorio a temperatura ambiente y se mantuvieron irrigadas con agua estéril. Se realizaron inoculaciones con 50 μL de una suspensión de 1×10^6 cel/mL de *M. anisopliae* y posteriormente se inoculó con 1×10^6 cel/mL del patógeno *F. vanettenii*. El experimento se replicó tres veces con su respectivo control negativo en el que se inocularon 50 μL de agua destilada estéril. Se observó la presencia de síntomas de pudrición de raíz a los 13 DPI, con base a una escala de severidad de las lesiones modificada de Gunawardena & Hawes, 2002, en donde se tomó en cuenta la coloración que presentaba la raíz principal de las plántulas en la zona de elongación. El grado de severidad se dividió en cinco niveles de síntomas: 0 = sin síntomas, 1= leve, 2=moderado, 3=fuerte, y 4= severo (tabla 1). Al término del experimento se evaluó el desarrollo biológico de las plántulas siguiendo lo descrito en la sección 2.2.3.

Tabla 1. Escala de severidad de las lesiones necróticas ocasionadas por *F. vanettenii*.

Grado de severidad	Síntoma	Coloración de raíz
0	Sin síntoma	Blanca
1	Leve	Amarilla
2	Moderado	Café claro
3	Fuerte	Café oscuro
4	Severo	Negro

2.4 Efecto del efluente acuícola y *Metarhizium anisopliae* en la patogenicidad de *Fusarium vanettenii* en *Pisum sativum*

2.4.1 Efluente acuícola

Los Efluentes Acuícolas (EA) se obtuvieron de un cultivo de tilapia roja (*Oreochromis mossambicus*) con BFT, el cual que se mantuvo en el laboratorio de peces marinos del Departamento de Acuicultura de CICESE. Los organismos se cultivaron previamente por 8 meses y para este estudio se mantuvieron por 11 meses adicionales. Como fuente de carbono se utilizó melaza y posteriormente azúcar en una relación Carbono y Nitrógeno (C:N) 1:15, para alimentar a los peces se utilizó alimento para camarón al 35% de proteína. La ración diaria fue equivalente al 1.5% de la biomasa de los peces.

Durante la fase experimental se analizó la calidad del agua con pruebas bioquímicas comerciales basadas en colorimetría (API, Freshwater master test kit). Se evaluaron los parámetros de Nitrógeno Amoniacal Total (NAT, amonio/amoniaco $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3^-$), Nitritos (NO_2), Nitratos (NO_3), Potencial de Hidrógeno (pH), Fosfatos (PO_4^-), dureza general GH, carbonatos KH, y volumen de flóculos medidos con cono Imhoff. Además, se realizaron biometrías mensuales para evaluar la talla de los peces, así como su estado de salud. Con el fin de minimizar el efecto nutritivo del EA en planta, para cada experimento se mantuvieron constantes los siguientes parámetros de calidad de agua (tabla 2).

Tabla 2. Parámetros de calidad de agua establecidos en los Efluentes Acuícolas (EA) para los diversos experimentos con planta.

Parámetro	Valores establecidos en el EA
NH_4/NH_3	0 mg/L
NO_2	0 mg/L
NO_3	0 mg/L
PO_4^-	0-10 mg/L
KH	0 a 50 mg/L
GH	100 a 200 mg/L
pH	6.0-7.6
Volumen de bioflóculo	35-45mL/L

2.4.2 Ensayos de interacción del efluente acuícola con *M. anisopliae* y *F. vanettenii*

Para evaluar el efecto de los efluentes acuícolas sobre *M. anisopliae* y *F. vanettenii*, se llevaron a cabo ensayos de interacción in vitro por diez días. Los ensayos se realizaron en cajas de Petri de 35 x 10 mm con 1 mL de medio Martin y 300 μL del efluente acuícola filtrado. Como control negativo, se utilizó medio Martin más 300 μL de agua destilada estéril. Una vez listas las cajas se procedió a inocular con discos de micelio obtenidos con sacabocados de las cepas de *M. anisopliae* o *F. vanettenii* (Martin, 1950).

2.4.3 Efecto del efluente acuícola y *M. anisopliae* en la patogenicidad de *F. vanettenii* en planta, 13 DPI

El efecto de los EA en combinación con *M. anisopliae* sobre las plantas de chícharo se evaluó mediante pruebas de patogenicidad descritas en la sección 3.3.2, con la diferencia de que se agregaron los siguientes

tratamientos: EA, EA + *M. anisopliae*, EA + *F. vanettenii*, y EA + *M. anisopliae* + *F. vanettenii*. Las semillas se germinaron en las condiciones previamente descritas y se cultivaron en sistemas IAA modelo en condiciones de laboratorio a temperatura ambiente, y se mantuvieron irrigadas con agua estéril.

Al finalizar el experimento se evaluó el síntoma de pudrición de raíz y el desarrollo biológico de las plántulas siguiendo lo descrito en la sección 3.3.2 y 2.2.3 respectivamente. Además, para verificar la presencia o ausencia del fitopatógeno en planta se tomó una sección de 5 mm de longitud de la zona donde fueron inoculadas las plantas. La sección de la planta se esterilizó por 10 s en alcohol (96%), 1 minuto en hipoclorito de sodio (1%), posteriormente se hicieron lavados con agua destilada estéril, un lavado en alcohol (70%), y se eliminó el exceso de humedad con papel filtro estéril. El segmento de la planta se incubó en medio PDA durante cuatro días a temperatura ambiente y en obscuridad. Después de presentarse crecimiento de micelio, se realizaron cultivos posteriores de purificación para confirmar la presencia de *Fusarium* mediante el análisis morfológico de las esporas Gunawardena & Hawes, 2002.

2.4.4 Efecto del efluente acuícola filtrado en la patogenicidad de *Fusarium vanettenii* en *P. sativum*

El efecto del Efluente Acuícola Filtrado (EAF) en la protección de plantas se evaluó mediante ensayos de interacción in vitro y pruebas de patogenicidad en plántulas de la leguminosa *P. sativum*.

2.4.5 Filtración de los efluentes acuícolas

Para evaluar si los metabolitos secretados por los microorganismos presentes en el sistema de cultivo acuícola tenían un impacto positivo o negativo en el crecimiento radial de *M. anisopliae* y *F. vanettenii*, se colectó una muestra de agua del cultivo y se filtró con filtros de celulosa de 90 mm con poro de 30 μm (Whatman International Ltd Maidstone England, Cat No: 1113090). Posteriormente se filtró con filtros de fibra de vidrio de 47 mm con poro de 0.696 μm (VWR North American, Cat No: 28333-139), seguido de filtros de membrana PES de 25 mm con poro de 0.20 μm (Whatman UNIFLO™, Cat No: 99142502). Posteriormente se realizaron ensayos de interacción entre el EAF de manera individual con las cepas de *M. anisopliae* y *F. vanettenii* siguiendo la metodología de la sección 2.4.3.

El efecto del EAF en plantas de chícharo se evaluó mediante pruebas de patogenicidad descritas en la sección 3.3.2, con los siguientes tratamientos: control, EA, EAF, *F. vanettenii*, EA + *F. vanettenii*, y EAF + *F. vanettenii*. Las semillas se germinaron en las condiciones previamente descritas y se cultivaron en sistemas IAA modelo en condiciones de laboratorio a temperatura ambiente e irrigadas con agua estéril. Al finalizar el experimento se registraron los síntomas, se verificó la presencia de *F. vanettenii*, y se realizaron mediciones para determinar el desarrollo biológico de la plántula, siguiendo lo descrito en las secciones 2.3.2, 2.2.3.

2.4.6 Análisis estadístico

Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado con un mínimo de tres repeticiones por tratamiento. Se realizaron análisis de normalidad (Shapiro-Wilk) e igualdad de varianzas (Levene) de los datos. Para comparar medias se siguieron las pruebas estadísticas t- Student o análisis de varianza de una vía (Anova) y análisis post hoc con pruebas de Tukey para identificar tratamientos diferentes. En el caso de datos no normales, se realizaron las pruebas no paramétricas de U de Mann-Whitney o Kruskal-Wallis, y Bonferroni para identificar tratamientos diferentes. Para el análisis estadístico se utilizó en el programa SPSS IBM para Windows versión 25.

Capítulo 3. Resultados

Para este estudio se seleccionó a *M. anisopliae* considerando los resultados de su crecimiento en interacción con *F. vanettenii* (Figura 7, Tabla 18), su antagonismo ante *F. vanettenii* (tabla 19), y su desempeño ante el EA (Figura 8, Tabla 20). Estos resultados se resumen en el Anexo A. Además, se tomó en cuenta la procedencia de esta especie la cual es de ambientes subhúmedos y que la literatura señala que esta especie se ha aislado de humedales (Tian et al., 2016).

3.1 Efecto de *Metarhizium anisopliae* en *Pisum sativum*

Los experimentos in vitro para evaluar el efecto del hongo *M. anisopliae* en plantas de *P. sativum*, consistieron en dos experimentos independientes, en los cuales se evaluó su interacción a las 24 h posinoculación y siete DPI.

3.3.1 Efecto de *M. anisopliae* en planta, 24 horas posinoculación

Transcurridas 24 h posinoculación se midió la longitud de la radícula y se determinó el número de células producidas por ápice y la viabilidad celular. Los datos estadísticos indicaron que no existieron diferencias significativas (con un nivel de confianza de 95%), entre los tratamientos, confirmando que *M. anisopliae* no presenta un efecto negativo en la radícula a las 24 horas (Tabla 3).

Tabla 3. Efecto de *M. anisopliae* en el crecimiento radicular, producción y viabilidad de células del borde del ápice de la raíz de plántulas de chícharo (*P. sativum*) a 24 h posinoculación.¹

Tratamientos	Control	<i>M. anisopliae</i>
Longitud radicular (mm) ²	18.5 ± 5.6	18.2 ± 4.8
Nº de células por ápice ²	4647 ± 971	4422 ± 1044
Viabilidad (%) ³	80 ± 15	86 ± 9

¹Los valores representan el promedio ± desviación estándar por tratamiento ²(n=21); ³(n=9).

3.1.2 Efecto de *M. anisopliae* en planta, siete DPI

Para evaluar el desarrollo biológico de las plántulas de chícharo con *M. anisopliae* a los siete DPI, se midió la longitud de la raíz principal, altura de la planta (sistema foliar), longitud total de la planta, número y longitud de las raíces laterales, peso seco del sistema foliar, radicular, y total de la planta. Para las variables analizadas los análisis estadísticos indicaron que no existieron diferencias significativas, (con un nivel de confianza de 95%), confirmando que las plántulas de *P. sativum* no se vieron afectadas en la interacción inicial con el hongo *M. anisopliae* (Tabla 4).

Tabla 4. Efecto de *M. anisopliae* en el desarrollo biológico de plántulas de chícharo (*P. sativum*) a siete DPI.¹

Parámetro	Control	<i>M. anisopliae</i>
Longitud raíz principal (mm)	89 ± 33	86 ± 39
Altura de la planta (mm)	34 ± 16.0	35.2 ± 25.7
Longitud total de la planta (mm)	122.5 ± 38	122 ± 42
Número de raíces laterales	19 ± 5.0	25 ± 5.0
Longitud de raíces laterales (mm)	20 ± 6.0	19 ± 4.0
Peso del sistema radicular (g)	0.018 ± 0.007	0.024 ± 0.017
Peso de sistema foliar (g)	0.130 ± 0.027	0.126 ± 0.036
Peso total de la planta (g)	0.149 ± 0.03	0.150 ± 0.04

¹Los valores representan el promedio ± desviación estándar por tratamiento (n= 9).

3.2 Efecto de *Metarhizium anisopliae* en la patogenicidad de *Fusarium vanettenii*

Para evaluar la capacidad de *M. anisopliae* como agente de biocontrol ante el fitopatógeno *F. vanettenii*, se realizaron tres experimentos in vitro e independientes, en los cuales se evaluó la interacción de *F. vanettenii* con *P. sativum* a 24 h posinoculación, la interacción de *M. anisopliae* con *F. vanettenii*, y la capacidad de protección de *M. anisopliae* mediante ensayos de patogenicidad de *F. vanettenii* en plántulas de *P. sativum*.

3.2.1 Efecto de *F. vanettenii* en planta, 24 h posinoculación

Para evaluar el efecto del hongo *F. vanettenii* en las plántulas de chícharo a 24 h posinoculación, se midió la longitud de la radícula de las plántulas, se determinó el número y viabilidad de células del borde producidas por ápice.

El crecimiento radicular no se vio afectado en la interacción inicial con el hongo *F. vanettenii*. Sin embargo, el número de células del ápice de la raíz fue de 5900 ± 1490 y de 5203 ± 933 para el tratamiento control y *F. vanettenii*, respectivamente, observándose una menor cantidad de células del borde ante la presencia del fitopatógeno en comparación con las muestras del tratamiento control. De igual manera, ante la presencia de *F. vanettenii* se observó una menor viabilidad de las células del borde. El tratamiento control presentó una viabilidad de $79\% \pm 9$, mientras que la viabilidad celular con *Fusarium* disminuyó a $64\% \pm 10$, 15% menor que la del tratamiento control. Los análisis estadísticos para las variables número de células y viabilidad celular indicaron diferencias significativas ($P < 0.05$) (Tabla 5).

Tabla 5. Efecto de *F. vanettenii* en el crecimiento radicular, producción y viabilidad de células del borde del ápice de la raíz de plántulas de chícharo (*P. sativum*) a 24 horas posinoculación.¹

Tratamientos	Control	<i>F. vanettenii</i>
Longitud radicular (mm)	15.5 ± 3.8^a	15.0 ± 4.2^a
N° de células por ápice	5900 ± 1490^a	5203 ± 933^b
Viabilidad (%)	79.0 ± 9^a	64.0 ± 10^b

¹Los valores representan el promedio \pm desviación estándar por tratamiento (n=18). Valores con diferentes superíndices representan diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$).

3.2.2 Interacción *M. anisopliae*-*F. vanettenii*

En los ensayos de interacción in vitro para evaluar la cepa *M. anisopliae* como BCA sobre el fitopatógeno *F. vanettenii* a seis DPI (Figura 1), se observó una reducción en el crecimiento del hongo *F. vanettenii* (Figura 1b), y se presenció un halo inhibitorio (Figura 1d, magnificación 200X). El crecimiento radial de *M. anisopliae* fue de 8.7 ± 0.3 mm, mientras que en interacción con *F. vanettenii* fue de 8.0 ± 0.3 mm, la reducción no presentó diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$). El hongo *F. vanettenii* presentó un crecimiento radial de 27 ± 1 mm, mientras que en interacción con *M. anisopliae* fue de 23 ± 0.5 mm, con

una reducción en su crecimiento del 15%. Los análisis estadísticos indicaron que estas diferencias fueron significativas ($P < 0.05$) (Tabla 6).

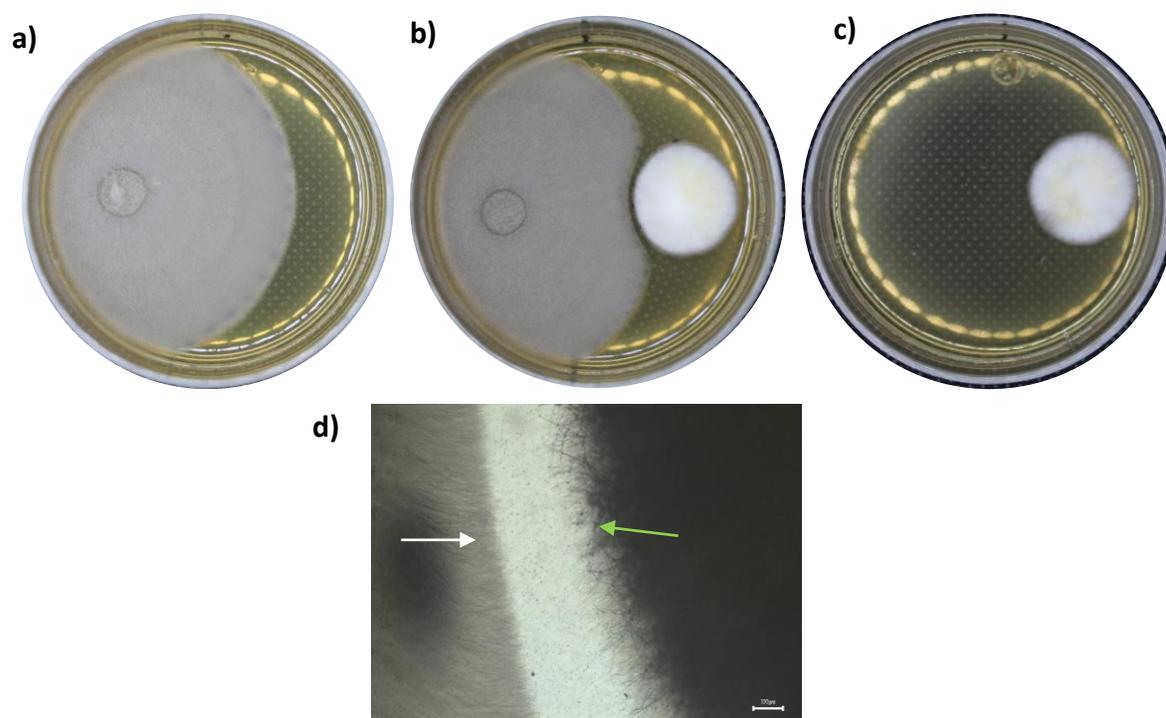


Figura 1. Interacción *M. anisopliae*-*F. vanettenii*, seis DPI. a) *F. vanettenii*, b) Interacción entre *F. vanettenii* y *M. anisopliae*, c) *M. anisopliae*. d) Halo de inhibición entre *F. vanettenii* (flecha blanca) y *M. anisopliae* (flecha verde). Escala de barra 100 μm .

Tabla 6. Crecimiento radial de *M. anisopliae* y *F. vanettenii* en interacción.¹

Tratamiento	Crecimiento radial	Inhibición (%)
	<i>M. anisopliae</i>	
<i>M. anisopliae</i>	8.7 ± 0.3^a	-
<i>M. anisopliae</i> + <i>F. vanettenii</i>	8.0 ± 0.3^a	7.6 ± 3.6
	<i>F. vanettenii</i>	
<i>F. vanettenii</i>	27.0 ± 1^a	-
<i>F. vanettenii</i> + <i>M. anisopliae</i>	23.0 ± 0.5^b	15 ± 3.7

¹Los valores representan el promedio \pm desviación estándar por tratamiento (n=3). Valores con diferentes superíndices representan diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$).

(-) Tratamiento control

3.2.3 Efecto de *M. anisopliae* en la patogenicidad de *F. vanettenii* en planta, 13 DPI

La aparición de síntomas necróticos en las raíces de las plántulas de *P. sativum* cultivadas en los sistemas hidropónicos modelo se evaluaron a los 13 DPI. Las plántulas en el tratamiento control y las inoculadas con *M. anisopliae* no mostraron síntomas de enfermedad (Figura 2 a y b). Todas las plántulas inoculadas con *F. vanettenii* presentaron síntomas de pudrición de la raíz en la zona de elongación desde el tercer DPI, y lesiones secundarias en la raíz principal y raíces laterales a 13 DPI (Figura 2c). El 22% de las plántulas mostraron síntomas moderados, mientras que el 78% síntomas fuertes (Tabla 7). Igualmente, todas las plántulas en el tratamiento *M. anisopliae* + *F. vanettenii* presentaron síntomas necróticos (Figura 2d), sin embargo, se observaron hasta el quinto DPI. Además, las plántulas mostraron una disminución en la severidad de los síntomas a diferencia de las plántulas inoculadas con *F. vanettenii*. El 44% de las plántulas presentaron síntomas leves, el 44% con síntomas moderados y solo el 12% con síntomas fuertes (Tabla 7).

Posteriormente, se evaluaron las plántulas de chícharo para identificar algún efecto en su desarrollo biológico. Para ello se midió la longitud de la raíz principal, la altura foliar de la planta, la longitud total, número de nudos foliares, número y longitud de raíces laterales, así como el peso seco del sistema foliar, radicular, y total de la plántula (Tabla 8).

Tabla 7. Efecto de *M. anisopliae* en la severidad de síntomas de pudrición de raíz en *P. sativum* ocasionadas por *F. vanettenii*.

Tratamientos	Síntomas de pudrición de raíz (%) ¹				Grado de severidad ²
	Sin síntoma	Leve	Moderado	Fuerte	
Control	100	-	-	-	0 ^a
<i>M. anisopliae</i>	100	-	-	-	0 ^a
<i>F. vanettenii</i>	-	-	22	78	2.7 ^b
<i>M. anisopliae</i> + <i>F. vanettenii</i>	-	44	44	12	2.2 ^b

¹Los valores representan el porcentaje de plantas con síntomas de pudrición de raíz por tratamiento (n=9).

²Los valores representan el promedio del grado de severidad por tratamiento (n=9). Valores con diferentes superíndices representan diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$).

(-) = Plantas sin síntomas

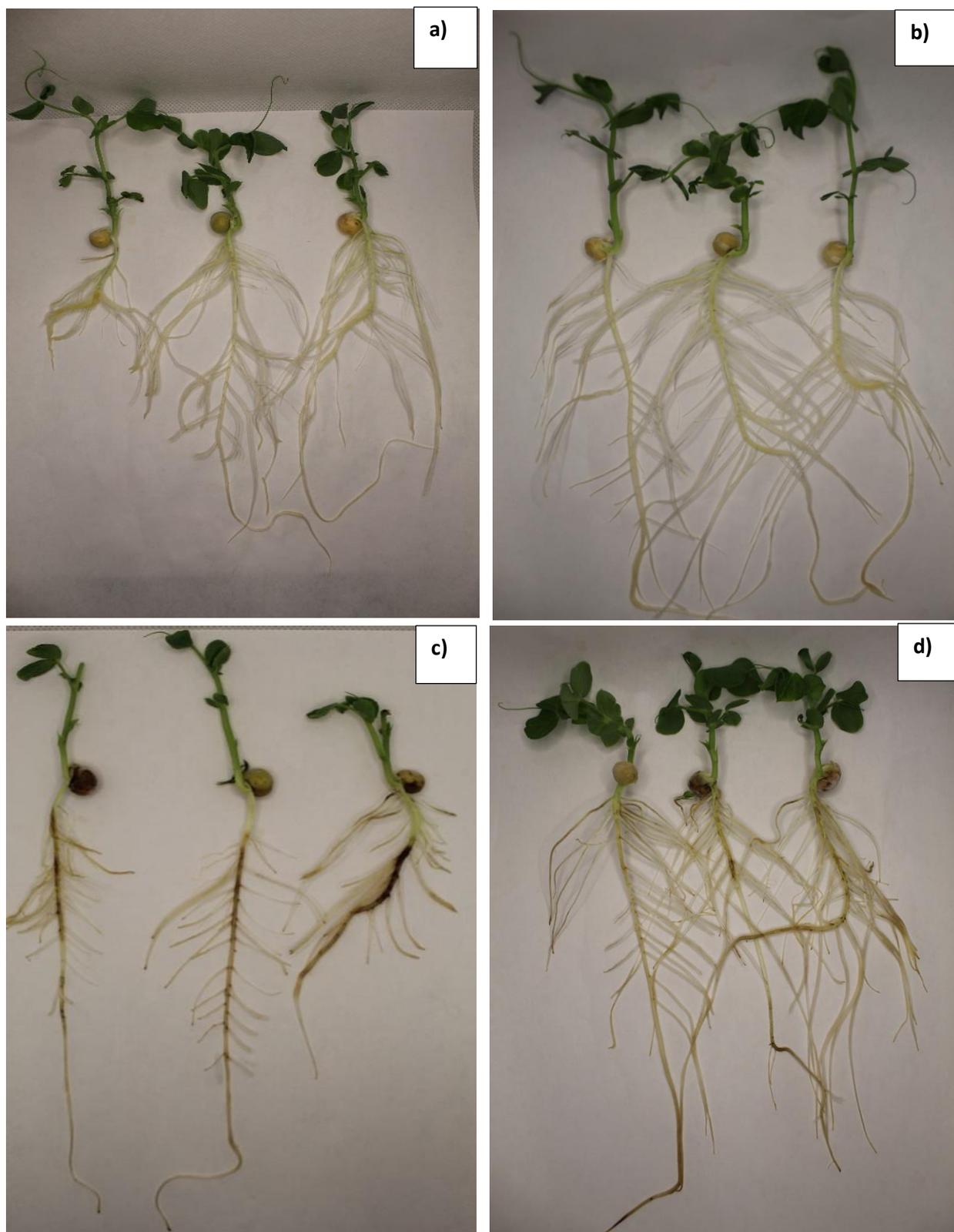


Figura 2. Efecto de *M. anisopliae* en la infección de plántulas de *P. sativum* por *F. vanettenii* a 13 DPI. a) Plantas con tratamiento control, b) Plantas inoculadas con *M. anisopliae*, c) plantas inoculadas con *F. vanettenii*, d) plantas inoculadas con *M. anisopliae* + *F. vanettenii*.

En cuanto a la longitud de la raíz principal, número de raíces laterales y peso seco del sistema radicular, los análisis estadísticos indicaron que no existieron diferencias significativas ($P>0.05$), sin embargo, los menores valores se observaron en las plántulas inoculadas con *F. vanettenii*, así como una recuperación en las plántulas inoculadas en combinación con ambas especies fúngicas. En contraste, el análisis estadístico indicó diferencias significativas en las longitudes de las raíces laterales. Se presentó un crecimiento de 45 ± 8.3 mm para las plántulas del tratamiento control, 46 ± 14.1 mm para el tratamiento con *M. anisopliae*, una reducción a 27 ± 14.7 mm para el tratamiento con *Fusarium*, y una recuperación de la longitud (38 ± 9.3 mm) para el tratamiento *M. anisopliae* + *F. vanettenii*, ($P<0.05$) (Tabla 8).

Los análisis estadísticos indicaron que no existieron diferencias significativas ($P>0.05$) respecto a la altura foliar de las plántulas, el número de nudos, y el peso seco foliar. De igual manera, la longitud total y el peso seco total de la plántula indicaron que no existieron diferencias significativas (con un nivel de confianza del 95%), aunque el tratamiento *F. vanettenii* mostro la menor longitud total (Tabla 8).

Tabla 8. Desarrollo biológico de las plántulas de *P. sativum* en las pruebas de patogenicidad con *F. vanettenii* y *M. anisopliae*.¹

Parámetro	Control	<i>M. anisopliae</i>	<i>F. vanettenii</i>	<i>M. anisopliae</i> + <i>F. vanettenii</i>
Longitud raíz principal (mm)	177 ± 38^a	165 ± 44^a	127 ± 57^a	150 ± 51^a
Altura de la planta (mm)	74 ± 16^a	86 ± 18^a	65 ± 41^a	62 ± 15^a
Longitud total de la planta (mm)	250 ± 47^a	251 ± 46^a	192 ± 68^a	212 ± 51^a
Número de nudos por planta	3 ± 1.5^a	3 ± 0.6^a	2 ± 1^a	3 ± 0.6^a
Número de raíces laterales	36 ± 3.2^a	32 ± 11.1^a	28 ± 13.3^a	30 ± 9.3^a
Longitud de raíces laterales (mm)	45 ± 8.3^{ac}	46 ± 14.1^a	27 ± 14.7^b	38 ± 9.3^c
Peso del sistema radicular (g)	0.052 ± 0.030^a	0.031 ± 0.008^a	0.029 ± 0.017^a	0.040 ± 0.034^a
Peso de sistema foliar (g)	0.094 ± 0.032^a	0.097 ± 0.018^a	0.098 ± 0.041^a	0.079 ± 0.028^a
Peso total de la planta (g)	0.147 ± 0.021^a	0.129 ± 0.022^a	0.130 ± 0.001^a	0.119 ± 0.020^a

¹Los valores representan el promedio \pm desviación estándar por tratamiento (n=9). Valores con diferentes superíndices representan diferencias estadísticas significativas ($P<0.05$).

3.3 Efecto de efluentes acuícolas y *Metarhizium anisopliae* en la patogenicidad de *Fusarium vanettenii* en *Pisum sativum*

Se realizaron experimentos in vitro para evaluar el efecto de los EA en plántulas de *P. sativum*, en donde se determinó: el efecto del EA en las plántulas a las 24 horas posinoculación y a cuatro DPI, el efecto del EA en *M. anisopliae*, el efecto del EA en *F. vanettenii*, y el efecto del EA con *M. anisopliae* en la patogenicidad de *F. vanettenii*. Los parámetros de calidad de agua del cultivo de tilapia roja (*O. mossambicus*) con BFT, de donde se obtuvieron los EA para este estudio, se muestran en el anexo B.

3.3.1 Efecto del efluente acuícola en planta, 24 h posinoculación

Para evaluar si el EA generaba un efecto negativo en el desarrollo inicial de *P. sativum*, se realizó un ensayo a 24 horas posinoculación, donde se midió la longitud de la radícula, y se determinó el número y viabilidad de las células del borde producidas por ápice. El crecimiento de la radícula, número de células del borde y porcentaje de viabilidad no se vieron afectados por el agua potable utilizada para el cultivo acuícola ni por el EA. Los análisis estadísticos indicaron que no existieron diferencias significativas (con un nivel de confianza de 95%) (Tabla 9).

Tabla 9. Efecto del efluente acuícola en planta a 24 horas posinoculación.¹

Tratamientos	Control	Agua potable	Efluente acuícola
Longitud radicular (mm)	17 ± 5	19 ± 5	18 ± 5
N° de células por ápice	4949 ± 1484	5528 ± 1523	5138 ± 1569
Viabilidad (%)	71 ± 18	73 ± 14	75 ± 15

¹Los valores representan el promedio ± desviación estándar por tratamiento (n= 39).

3.3.2 Efecto del efluente acuícola en planta, cuatro DPI

Posteriormente, se analizó el crecimiento de la raíz principal expuestas al EA, y se evaluó el crecimiento a cuatro DPI en sistemas IAA modelo en condiciones de laboratorio. El crecimiento de la radícula a los cuatro DPI no se vio afectada por la presencia del agua potable utilizada para el cultivo acuícola ni por el EA. Los

análisis estadísticos no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos (con un nivel de confianza del 95%) (Tabla 10).

Tabla 10. Efecto del efluente acuícola en el crecimiento radicular de plántulas de *P. sativum* a cuatro DPI.¹

Tratamientos	Control	Agua potable	Efluente acuícola
Longitud radicular (mm)	96 ± 30	107 ± 41	91 ± 28

¹Los valores representan el promedio ± desviación estándar por tratamiento (n= 9).

3.3.3 Interacción del efluente acuícola con *M. anisopliae*

Se realizaron ensayos de interacción in vitro por diez DPI para evaluar el efecto del EA sobre el crecimiento de *M. anisopliae*. En el tratamiento control *M. anisopliae* presentó un crecimiento radial de 10.9 ± 0.7 mm, mientras que en su interacción con los EA creció 1 ± 0.2 mm. Los análisis estadísticos indicaron diferencias significativas ($P < 0.05$). Se observó que el crecimiento del hongo fue mínimo, sin embargo, se presentó crecimiento de micelio aéreo. Los ensayos de interacción (Figura 13) y el resumen de los resultados (Tabla 21) se muestran en el anexo C.

3.3.4 Interacción del efluente acuícola con *F. vanettenii*

Se evaluó el efecto del EA en el crecimiento radial de *F. vanettenii* en ensayos de interacción in vitro por 10 DPI. *F. vanettenii* presentó un crecimiento radial de 20 ± 0.4 mm y en su interacción con los EA creció 3 ± 0 mm. Los análisis estadísticos no indicaron diferencias significativas ($P > 0.05$). Los ensayos de interacción y el resumen de los resultados se muestran en la sección 3.4.1, en la figura 5 y tabla 14, respectivamente.

3.3.5 Efecto de los efluentes acuícolas en conjunto con *M. anisopliae* en la patogenicidad de *F. vanettenii* en planta

Para la evaluación del efecto del EA en la patogenicidad de *F. vanettenii* en las plántulas, en cada experimento el EA se mantuvo con los parámetros de calidad de agua descritos en la sección 2.4.2. Se llevó a cabo un experimento que consistió en ocho tratamientos (Figura 3), donde se evaluó la severidad de la pudrición de raíz y el desarrollo biológico de plántulas de *P. sativum*.

Los síntomas de la pudrición de la raíz se evaluaron de acuerdo con la escala de la tabla 1 de la sección 2.3.2. En comparación con el tratamiento control, las plantas expuestas al EA, *M. anisopliae*, y *M. anisopliae* + EA (Figura 13 a-d), no se vieron afectadas. En el tratamiento con *F. vanettenii*, se observaron síntomas de pudrición de la raíz en todas las plántulas (Figura 3e), en donde el 85% de las plántulas presentaron síntomas fuertes con un grado de severidad promedio de 2.9 (Tabla 11). En el tratamiento *M. anisopliae* + *F. vanettenii*, se observó una disminución de las lesiones ocasionadas por el fitopatógeno (Figura 3f) con el 20% de las plántulas mostrando síntomas fuertes y un grado de severidad promedio de 1.9. El tratamiento EA + *F. vanettenii* presentó una disminución aún mayor de las lesiones (Figura 3g), en donde se observó que el 50% de las plántulas no presentaron síntomas de infección, el 10% presentaron síntomas leves, el 30% síntomas moderados y 10% síntomas fuertes. Además, se observó una reducción a 1 en el grado de severidad promedio, la cual fue estadísticamente significativa respecto al tratamiento *F. vanettenii* (Tabla 11). El 95% de las plantas tratadas con el tratamiento *M. anisopliae* + EA + *F. vanettenii* estuvieron sanas (Figura 3h) y solo el 5% presentaron síntomas leves con un grado de severidad de 0.1. Los análisis estadísticos mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) únicamente respecto a los tratamientos *F. vanettenii* y *M. anisopliae* + *F. vanettenii* (Tabla 11).

Tabla 11. Efecto del efluente acuícola y *M. anisopliae* en la severidad de síntomas de pudrición de raíz en *P. sativum* ocasionadas por *F. vanettenii*.

Tratamientos	Síntomas de pudrición de raíz (%) ¹				Grado de severidad ²
	Sin síntoma	Leve	Moderado	Fuerte	
Control	100	-	-	-	0 ^a
<i>M. anisopliae</i>	100	-	-	-	0 ^a
EA	100	-	-	-	0 ^a
<i>M. anisopliae</i> + EA	100	-	-	-	0 ^a
<i>F. vanettenii</i>	-	-	15	85	2.9 ^b
<i>M. anisopliae</i> + <i>F. vanettenii</i>	15	-	65	20	1.9 ^{bc}
<i>F. vanettenii</i> + EA	50	10	30	10	1 ^{ac}
<i>M. anisopliae</i> + EA + <i>F. vanettenii</i>	95	5	-	-	0.1 ^a

¹Los valores representan el porcentaje de plántulas con síntomas de pudrición de raíz por *F. vanettenii* (n=15).

²Los valores representan el promedio del grado de severidad por tratamiento (n=15). Valores con diferentes superíndices representan diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$).

EA = Efluente Acuícola.

(-) = Plantas sin síntomas.

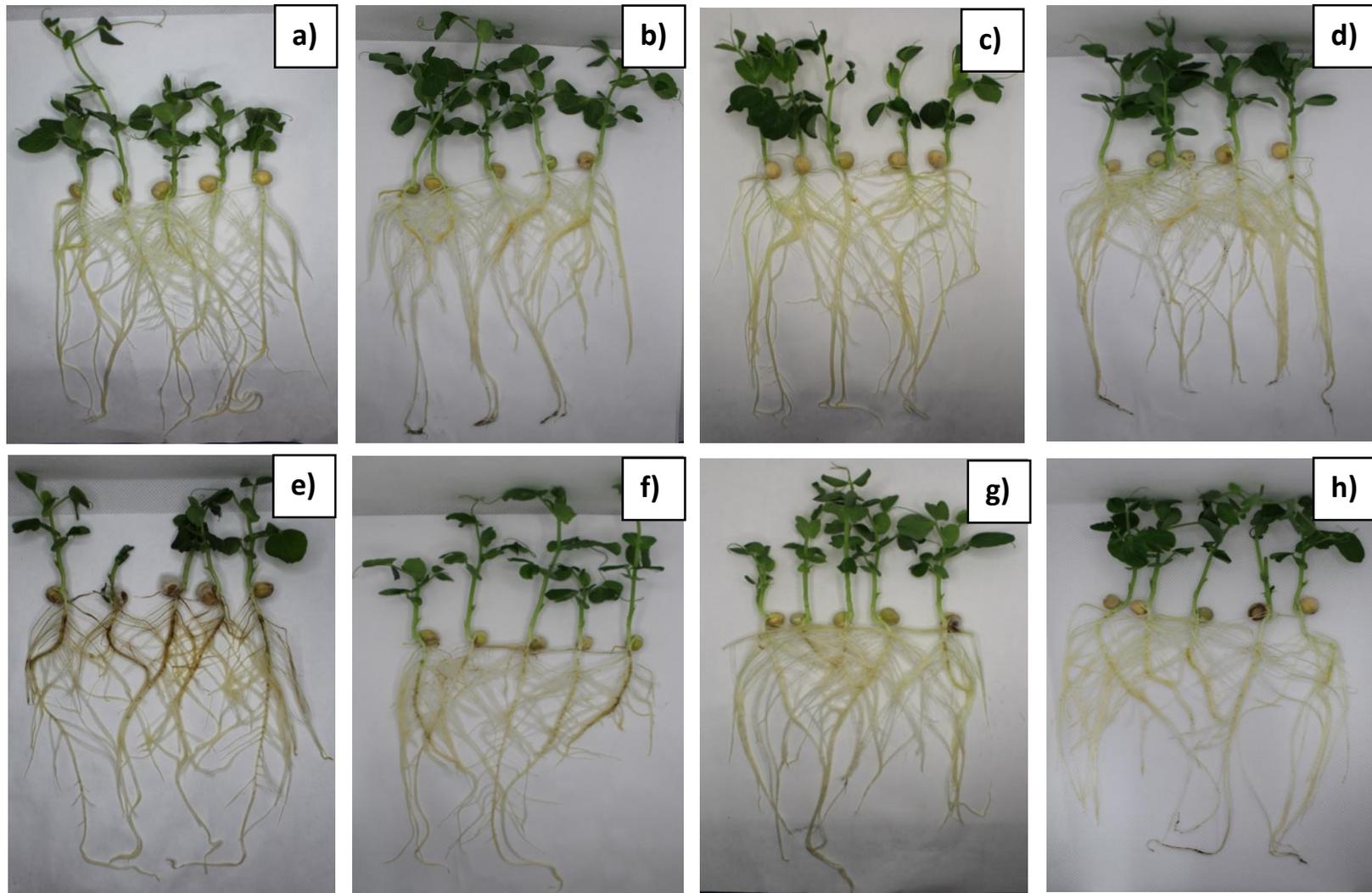


Figura 3. Efecto del EA con *M. anisopliae* en la infección de *P. sativum* por *F. vanettenii*, 13 DPI. a) *P. sativum*, b) *P. sativum* con EA, c) *P. sativum* con *M. anisopliae*, d) *P. sativum* con *M. anisopliae* + EA, e) *P. sativum* con *F. vanettenii*, f) *P. sativum* con *M. anisopliae* + *F. vanettenii*, g) *P. sativum* con EA + *F. vanettenii*, h) *P. sativum* con EA + *M. anisopliae* + *F. vanettenii*. EA = Efluente Acuicola. DPI = Días Posinoculación.

Con la finalidad de verificar la presencia del fitopatógeno en las plántulas inoculadas, se colectó e incubó una sección de la radícula. La figura 4 ilustra el crecimiento del fitopatógeno a partir de secciones de tejido de la radícula de *P. sativum* inoculada con el fitopatógeno *F. vanettenii*, la presencia de micelio fúngico a los cuatro DPI, y el crecimiento del fitopatógeno aislado y purificado de la plántula de *P. sativum* c).

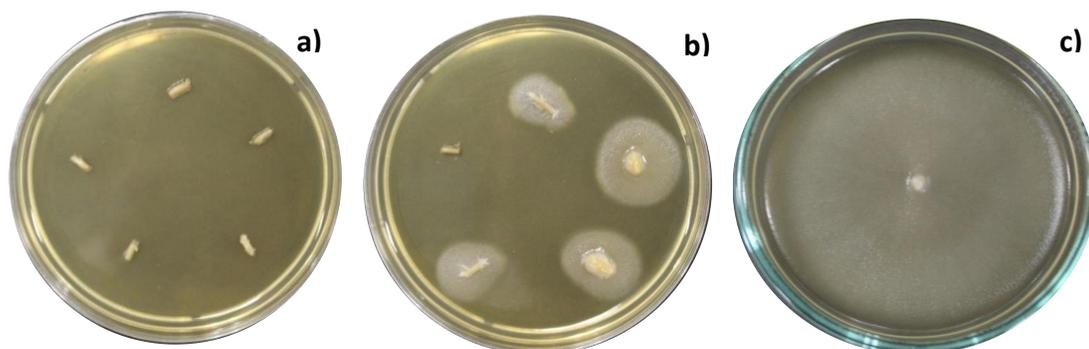


Figura 4. Recuperación del fitopatógeno *F. vanettenii* a partir de tejido radicular de *P. sativum*. a) Secciones colectadas de la radícula, b) crecimiento de micelio proveniente de los segmentos de la radícula a cuatro días de incubación, c) cultivo purificado de *F. vanettenii* aislado de *P. sativum*.

No se presentó crecimiento de *F. vanettenii* en los segmentos de tejido de las plántulas de los tratamientos control, *M. anisopliae*, EA, *M. anisopliae* + EA, o *M. anisopliae* + *F. vanettenii* + EA. Se verificó la presencia de *F. vanettenii* en las plántulas que estuvieron expuestas a los tratamientos *F. vanettenii* (95%), *M. anisopliae* + *F. vanettenii* (55%), y *F. vanettenii* + EA (20%). Los análisis estadísticos mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) (Tabla 12).

Tabla 12. Efecto del efluente acuícola (EA) y *M. anisopliae* en la presencia de *Fusarium vanettenii* en *P. sativum*.¹

Tratamientos	Presencia de <i>F. vanettenii</i> en planta (%)
Control	0 ^a
<i>M. anisopliae</i>	0 ^a
EA	0 ^a
<i>M. anisopliae</i> + EA	0 ^a
<i>F. vanettenii</i>	95 ^b
<i>M. anisopliae</i> + <i>F. vanettenii</i>	55 ^{bc}
<i>F. vanettenii</i> + EA	20 ^{ac}
<i>M. anisopliae</i> + EA + <i>F. vanettenii</i>	0 ^a

¹Los valores representan el porcentaje de plantas de donde se recuperó *F. vanettenii* (n=15). Valores con diferentes superíndices representan diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$).

Tabla 13. Desarrollo biológico de plántulas de *P. sativum* en las pruebas de patogenicidad ante *F. vanettenii* con el EA y *M. anisopliae*.¹

Parámetros	Control	<i>M. anisopliae</i>	EA	<i>F. vanettenii</i>	<i>M. anisopliae</i> +	<i>M. anisopliae</i> +	<i>F. vanettenii</i> +	<i>M. anisopliae</i> + EA + <i>F. vanettenii</i>
					EA	<i>F. vanettenii</i>	EA	
Longitud raíz principal (mm)	173 ± 39 ^a	171 ± 37 ^a	152 ± 44 ^a	176 ± 41 ^a	144 ± 50 ^a	159 ± 39 ^a	156 ± 46 ^a	139 ± 53 ^a
Altura de la planta (mm)	94 ± 21 ^a	83 ± 15 ^a	99 ± 26 ^a	92 ± 24 ^a	96 ± 23 ^a	81 ± 27 ^a	83 ± 26 ^a	95 ± 24 ^a
Longitud total de planta (mm)	268 ± 43 ^a	255 ± 45 ^a	251 ± 45 ^a	268 ± 41 ^a	240 ± 50 ^a	254 ± 40 ^a	250 ± 43 ^a	233 ± 48 ^a
Número de nudos por planta	4 ± 0.5 ^a	4 ± 1.3 ^a	4 ± 0.9 ^a	4 ± 0.4 ^a	4 ± 0.5 ^a	3.5 ± 1 ^a	4 ± 0.6 ^a	4 ± 0.6 ^a
Número de raíces laterales	30 ± 7 ^a	23 ± 9 ^a	27 ± 8 ^a	31 ± 12 ^a	25 ± 8 ^a	25 ± 12 ^a	26 ± 6 ^a	22 ± 6 ^a
Longitud de raíces laterales (mm)	49 ± 38 ^a	54 ± 45 ^a	61 ± 42 ^b	45 ± 34 ^a	69 ± 39 ^c	38 ± 28 ^d	52 ± 38 ^a	66 ± 71 ^{bc}
Peso del sistema radicular (g)	0.105 ± 0.01 ^a	0.101 ± 0.02 ^a	0.106 ± 0.03 ^a	0.094 ± 0.01 ^a	0.116 ± 0.04 ^a	0.090 ± 0.02 ^a	0.098 ± 0.02 ^a	0.115 ± 0.03 ^a
Peso de sistema foliar (g)	0.033 ± 0.01 ^a	0.030 ± 0.00 ^a	0.039 ± 0.01 ^a	0.034 ± 0.00 ^a	0.041 ± 0.01 ^a	0.031 ± 0.02 ^a	0.030 ± 0.01 ^a	0.031 ± 0.00 ^a
Peso total de la planta (g)	0.138 ± 0.02 ^a	0.132 ± 0.02 ^a	0.111 ± 0.06 ^a	0.129 ± 0.02 ^a	0.158 ± 0.03 ^a	0.121 ± 0.02 ^a	0.129 ± 0.02 ^a	0.140 ± 0.04 ^a

¹Los valores representan el promedio ± desviación estándar por tratamiento (n=15). Valores con diferentes superíndices representan diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$). EA = Efluente Acuícola.

Respecto al desarrollo biológico, la longitud de la raíz principal, número de raíces laterales y peso seco del sistema radicular, los análisis estadísticos indicaron que no existieron diferencias significativas ($P>0.05$), sin embargo, el mayor crecimiento de raíces laterales se observó en los tratamientos donde se utilizó el EA (rango de 61 ± 42 mm a 69 ± 39 mm), a excepción del tratamiento *F. vanettenii* + EA (52 ± 38 mm), en donde la longitud de raíces laterales estuvo dentro del rango de los tratamientos control, *M. anisopliae*, y *F. vanettenii* (45 ± 34 mm a 54 ± 45 mm). El tratamiento *M. anisopliae* + *F. vanettenii* presentó el menor crecimiento de raíces laterales. Las longitudes de las raíces laterales presentaron diferencias estadísticas significativas ($P<0.05$) (Tabla 13). Los análisis estadísticos indicaron que no existieron diferencias significativas ($P>0.05$) respecto a la altura foliar de las plántulas, el número de nudos, y el peso seco foliar. De igual manera, la longitud total y el peso seco total de la plántula indicaron que no existieron diferencias significativas (con un nivel de confianza del 95%), aunque el tratamiento *M. anisopliae* + EA + *F. vanettenii* mostró la menor longitud total (Tabla 13).

3.4 Efecto de efluentes acuícolas filtrados en la patogenicidad de *Fusarium vanettenii* en *Pisum sativum*

Los experimentos para evaluar el efecto del EAF en *F. vanettenii* en plántulas de *P. sativum* consistieron en dos ensayos independientes, en donde se determinó la interacción in vitro del EAF con *F. vanettenii* y un ensayo para evaluar el efecto del EAF en la patogenicidad de *F. vanettenii* en plántula.

3.4.1 Interacción del efluente acuícola filtrado con *F. vanettenii*

Los ensayos de interacción in vitro con el fitopatógeno *F. vanettenii* se diseñaron para evaluar el efecto de los metabolitos presentes en el EAF en el crecimiento del hongo. El monitoreo del crecimiento radial se realizó por 10 DPI, la figura 5 presenta el crecimiento del hongo en los diferentes tratamientos. Se observó un efecto positivo del EAF en *F. vanettenii*. El tratamiento *F. vanettenii* presentó un crecimiento radial de 20 ± 0.4 mm, *F. vanettenii* en interacción con el EA creció 3 ± 0 mm, mientras que *F. vanettenii* con el EAF mostró un crecimiento de 30 ± 0.2 mm. Los análisis estadísticos indicaron diferencias significativas ($P>0.05$) entre los tratamientos *F. vanettenii* + EA y *F. vanettenii* + EAF, observando que el EAF promovió un mayor desarrollo de *F. vanettenii* en comparación con los otros tratamientos ($P<0.05$) (Tabla 14). De manera adicional, los resultados para determinar la interacción de los EAF con *M. anisopliae*, se muestran en la figura 13 y tabla 21 (Anexo C).

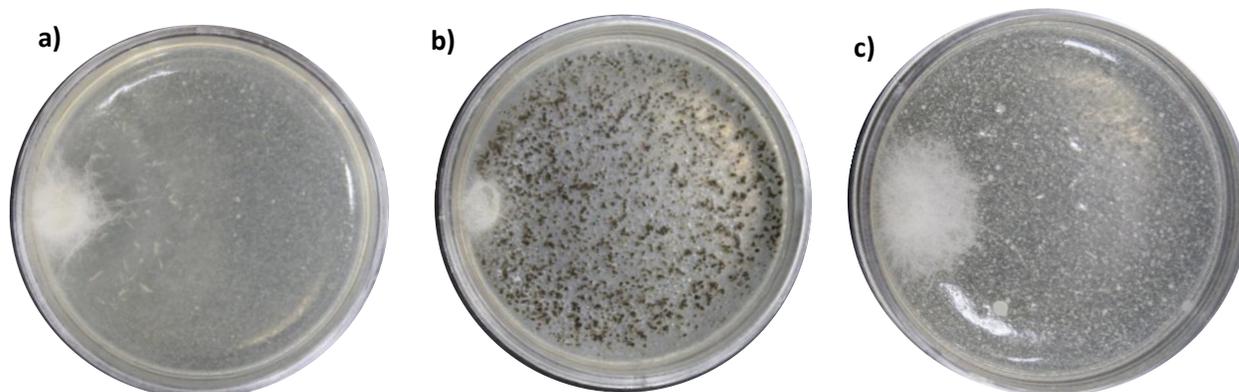


Figura 5. Efecto de efluentes acuícolas filtrados en *F. vanettenii*. a) *F. vanettenii*, b) Efluente acuícola con *F. vanettenii*, c) Efluente acuícola filtrado con *F. vanettenii*.

Tabla 14. Efecto de los efluentes acuícolas y efluente acuícola filtrado en *F. vanettenii*.¹

Tratamiento	<i>F. vanettenii</i>	EA + <i>F. vanettenii</i>	EAF + <i>F. vanettenii</i>
Crecimiento radial (mm)	20 ± 0.4 ^{ab}	3 ± 0 ^a	30 ± 0.2 ^b

¹Los valores representan el promedio ± desviación estándar por tratamiento (n=3). Valores con diferentes superíndices representan diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$).

3.4.2 Efecto de los efluentes acuícolas filtrados en la patogenicidad de *F. vanettenii* en planta

La evaluación del efecto de los EAF en la patogenicidad de *F. vanettenii* en las plántulas de *P. sativum* a 13 DPI, de acuerdo a la escala de la tabla 1 en la sección 2.3.2, indicaron que el tratamiento control, EA y EAF no afectaron a las plántulas (Figura 6a-c). Todas las plántulas bajo el tratamiento *F. vanettenii* (Figura 6d) presentaron síntomas fuertes con un grado de severidad 3. Las plántulas en el tratamiento *F. vanettenii* + EA mostraron una recuperación de la severidad de los síntomas (Figura 6e), donde el 40% no presentó síntomas, el 20% mostró síntomas leves, y el 40% moderados, y una severidad promedio de 1. Las plántulas en el tratamiento EAF + *F. vanettenii* presentaron una mayor severidad en los síntomas (Figura 6f). El 40% presentaron síntomas fuertes y el 60% síntomas severos, con un grado de severidad de 3.6. Los análisis estadísticos mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) como se indica en la tabla 15.



Figura 6. Efecto del EAF en la infección de *P. sativum* por *F. vanettenii*, 13 DPI. a) *P. sativum*, b) *P. sativum* con EA, c) *P. sativum* con EAF, d) *P. sativum* con *F. vanettenii*, e) *P. sativum* con EA + *F. vanettenii*, y f) *P. sativum* con EAF + *F. vanettenii*. EA = Efluente Acuicola. EAF = Efluente Acuicola Filtrado. DPI = Días Posinoculación.

d)

e)

f)

Tabla 15. Efecto del EAF en la severidad de síntomas de pudrición de raíz en *P. sativum* ocasionadas por *F. vanettenii*.

Tratamientos	Síntomas de pudrición de raíz (%) ¹					Grado de severidad ²
	Sin síntoma	Leve	Moderado	Fuerte	Severo	
Control	100	-	-	-	-	0 ^a
EA	100	-	-	-	-	0 ^a
EAF	100	-	-	-	-	0 ^a
<i>F. vanettenii</i>	-	-	-	100	-	3 ^b
<i>F. vanettenii</i> + EA	40	20	40	-	-	1 ^a
EAF + <i>F. vanettenii</i>	-	-	-	40	60	3.6 ^b

¹Los valores representan el porcentaje de plantas de donde se recuperó *F. vanettenii* (n=10). Valores con diferentes superíndices representan diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$).

²Los valores representan el promedio del grado de severidad por tratamiento (n=10).

EA = Efluente Acuícola. EAF = Efluente Acuicola Filtrado. (-) = Plantas sin síntomas.

De los segmentos colectados de las plántulas para verificar la presencia de *F. vanettenii*, no se recuperó al fitopatógeno en el tratamiento control, EA, y EAF. Se recuperó el fitopatógeno en plántulas expuestas a *F. vanettenii* (80%), *F. vanettenii* + EA (60%) y EAF + *F. vanettenii* (40%). Los análisis estadísticos mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) (Tabla 16).

Tabla 16. Efecto del EAF en la presencia de *F. vanettenii* en plántulas de *P. sativum* en ensayos de patogenicidad.¹

Tratamientos	Presencia de <i>F. vanettenii</i> en plantas (%)
Control	0 ^a
EA	0 ^a
EAF	0 ^a
<i>F. vanettenii</i>	80 ^b
<i>F. vanettenii</i> + EA	60 ^b
EAF + <i>F. vanettenii</i>	40 ^b

¹Los valores representan el porcentaje de plantas de donde se recuperó *F. vanettenii* (n=10). Valores con diferentes superíndices representan diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$).

EA = Efluente Acuícola.

EAF = Efluente Acuícola Filtrado.

Tabla 17. Desarrollo biológico de plántulas de *P. sativum* en las pruebas de patogenicidad ante *F. vanettenii* con el Efluente Acuícola Filtrado (EAF).¹

Parámetros	Control	EA	EAF	<i>F. vanettenii</i>	<i>F. vanettenii</i> + EA	<i>F. vanettenii</i> + EAF
Longitud raíz principal (mm)	174 ± 17 ^a	124 ± 37 ^b	152 ± 35 ^a	167 ± 27 ^a	131 ± 36 ^b	129 ± 41 ^a
Altura de la planta (mm)	104 ± 23 ^a	102 ± 25 ^a	101 ± 38 ^a	87 ± 28 ^a	88 ± 33 ^a	86 ± 14 ^a
Longitud total de la planta (mm)	278 ± 19 ^a	212 ± 79 ^a	253 ± 42 ^a	255 ± 44 ^a	223 ± 48 ^a	206 ± 54 ^a
Número de nudos por planta	4 ± 0.6 ^a	4 ± 0.5 ^a	4 ± 0.5 ^a	3 ± 0.8 ^a	3 ± 0.8 ^a	4 ± 0.3 ^a
Número de raíces laterales	30 ± 16 ^a	23 ± 7 ^a	23 ± 8 ^a	30 ± 6 ^a	20 ± 4 ^a	23 ± 7 ^a
Longitud de raíces laterales (mm)	55 ± 39 ^a	65 ± 44 ^b	57 ± 37 ^{ab}	43 ± 28 ^c	64 ± 33 ^b	44 ± 30 ^c
Peso del sistema radicular (g)	0.031 ± 0.011 ^a	0.030 ± 0.008 ^a	0.036 ± 0.032 ^a	0.035 ± 0.024 ^a	0.029 ± 0.007 ^a	0.043 ± 0.033 ^a
Peso de sistema foliar (g)	0.095 ± 0.022 ^a	0.107 ± 0.029 ^a	0.113 ± 0.025 ^a	0.086 ± 0.012 ^a	0.103 ± 0.021 ^a	0.092 ± 0.020 ^a
Peso total de la planta (g)	0.127 ± 0.029 ^a	0.138 ± 0.030 ^a	0.149 ± 0.051 ^a	0.121 ± 0.031 ^a	0.133 ± 0.019 ^a	0.135 ± 0.021 ^a

¹Los valores representan el promedio ± desviación estándar por tratamiento (n=10). Valores con diferentes superíndices representan diferencias estadísticas significativas (P<0.05).

EA = Efluente Acuícola.

En cuanto al desarrollo biológico de *P. sativum*, se encontró que la altura foliar de las plántulas, el número de nudos, el peso seco foliar, la longitud y el peso seco total, el número de raíces laterales y peso seco del sistema radicular no indicaron diferencias estadísticas significativas (con un nivel de confianza del 95%), aunque el tratamiento *F. vanettenii* + EAF mostró la menor longitud total. Sin embargo, en los tratamientos EA y *F. vanettenii* + EA, la longitud de la raíz principal fue menor (124 ± 37 y 131 ± 36 mm, respectivamente) en comparación con los diferentes tratamientos (Tabla 17). Igualmente, las raíces laterales de plántulas expuestas a *F. vanettenii* y a EAF + *F. vanettenii* presentaron una reducción en su longitud (43 ± 28 mm y 44 ± 30 mm, respectivamente), mientras que los tratamientos EA y *F. vanettenii* + EA presentaron el mayor crecimiento de las raíces laterales (65 ± 44 mm y 64 ± 33 mm, respectivamente). Los análisis estadísticos mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) (Tabla 17).

Capítulo 4. Discusión

4.1 Efecto de *Metarhizium anisopliae* en *Pisum sativum*

En la literatura se ha reportado que los hongos del género *Metarhizium* colonizan las raíces de las plantas de forma endofítica. Tal es el caso de *M. robertsii*, que tiene una simbiosis positiva y una asociación con la rizósfera de plantas leguminosas como el frijol (*Phaseolus vulgaris*) (Sasan & Bidochka, 2012), sin embargo, se desconoce cómo se llevan a cabo estas interacciones en la rizósfera.

En este estudio se analizaron las interacciones iniciales entre *M. anisopliae* y la leguminosa *P. sativum*. La longitud de la radícula, el número de células y su viabilidad no se vieron afectadas por la presencia del hongo *M. anisopliae*, indicando que no hubo efecto negativo en el ciclo celular del meristemo apical de la raíz, y, por lo tanto, se considera una interacción inicial planta-hongo positiva.

Se encontró que las plántulas control generaron un promedio de 4647 ± 971 células del borde por ápice, mientras que bajo el tratamiento con *M. anisopliae* se generaron 4422 ± 1044 , las pruebas estadísticas corroboraron que no hubo diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos. Estos datos concuerdan con los reportados por Hamamoto et al., (2006) y Curlango-Rivera et al. (2010), quienes reportaron 4500 células del borde por ápice de *P. sativum* y un rango de 3600-4400 células por ápice, respectivamente.

De acuerdo a Hawes & Lin, 1990, las células del borde de *P. sativum* pueden tener una viabilidad entre un 90 y 100%, no obstante, Curlango-Rivera et al. (2010) reportaron una viabilidad celular de 69-84%. La viabilidad asociada a los tratamientos en este trabajo no presentó diferencias estadísticas significativas. Las células del borde de plántulas del tratamiento control en promedio tuvieron una viabilidad del 80% y ante *M. anisopliae* 86%, lo cual concuerda con reportes previos y respalda que la interacción inicial entre las plantas de *P. sativum* con el hongo *M. anisopliae* no se vio afectada.

El análisis del crecimiento de la radícula a 24 h y el desarrollo biológico de las plántulas a los siete DPI no mostraron diferencias significativas en las variables analizadas, siendo un indicativo que *M. anisopliae* no afecta a *P. sativum* en etapa temprana. El crecimiento de la radícula fue ligeramente mayor (18.5 ± 5.6 y 18.2 ± 4.8 mm, tratamiento control y *M. anisopliae*, respectivamente) en comparación con los reportados por Curlango-Rivera et al 2010 (rango de 13-16 mm). Además, en estudios previos se ha demostrado que

las especies fúngicas *M. robertsii* y *M. guizhouense* son colonizadores de raíces y que promueven su crecimiento (Piña-Torres et al., 2023; Sasan & Bidochka, 2012).

4.2 Efecto de *M. anisopliae* en la patogenicidad de *Fusarium vanettenii*

La presencia del fitopatógeno *F. vanettenii* no afectó el crecimiento radicular de *P. sativum* a las 24 h posinoculación, sin embargo, el número de células del borde y su viabilidad disminuyeron de manera significativa. Las plantas en el tratamiento control generaron un promedio de 5900 ± 1490 células por planta, una cantidad similar a la reportada por Hamamoto et al. (2006); Curlango- Rivera et al. 2010. Sin embargo, en las plantas que fueron inoculadas con *F. vanettenii* se observó una disminución del 12% en el número de células del borde. Las células del borde rodean la punta de la raíz estableciendo una barrera de protección, en la cual atrapan a los microorganismos patógenos formando un conglomerado de células (Gunawardena & Hawes, 2002). La reducción en el número de células pudo ser una consecuencia de este mecanismo de defensa, ya que, al formarse los conglomerados de células, consecuentemente se puede reducir el número de células libres. Sobre la viabilidad celular, se encontró que las plántulas del tratamiento control tuvieron una viabilidad del $79.2\% \pm 9$, menor a la reportada por Hawes & Lin, 1990, pero dentro del rango reportado por Curlango 2010. Ante la presencia de *F. vanettenii* la viabilidad de las células del borde disminuyó en un 15%. Esta reducción en la viabilidad asociada a la presencia de un microorganismo patógeno también fue observada por Gunawardena et al. (2005).

Respecto a la interacción *M. anisopliae*-*F. vanettenii*, se ha reportado que el género *Metarhizium* puede ser antagonista contra patógenos de plantas como *Fusarium solani* inhibiendo su crecimiento hasta en un 60% (Sasan & Bidochka, 2013). De manera similar, en este trabajo se observó un antagonismo entre *M. anisopliae* y *F. vanettenii*, con una inhibición del 15% en el crecimiento radial de *F. vanettenii*. Dávila-Berumen (2017) reportó el antagonismo de 39 aislados de *Metarhizium* ante *F. oxysporum*, en donde se observaron diversos porcentajes de inhibición dependiendo de la velocidad de crecimiento del fitopatógeno (Dávila-Berumen, 2017). En este trabajo, *M. anisopliae* estableció su colonia a las 48 horas posinoculación, mientras que *F. vanettenii* formó su colonia a las 24 horas. Aún con esta desventaja en la tasa de crecimiento, *M. anisopliae* no se vio afectado y tuvo capacidad antagónica ante *F. vanettenii*.

Los hongos entomopatógenos del género *Metarhizium* tienen la capacidad de combatir fitopatógenos en el sistema radicular (Dávila-Berumen, 2017; Moonjely & Bidochka, 2019). En este trabajo se observó una reducción (44%) en la severidad de la enfermedad de la pudrición de la raíz en las plántulas de *P. sativum*,

lo cual se puede atribuir al efecto antagonista (15% de inhibición) sobre el fitopatógeno *F. vanettenii*. Aunque no se presentó una diferencia estadísticamente significativa en el grado de severidad de las lesiones, es relevante la capacidad de *M. anisopliae* como agente de biocontrol.

Dentro de las variables analizadas para estudiar el desarrollo biológico de la plántula, la longitud de raíces laterales fue el único parámetro que presentó diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos. Se pudo observar un menor crecimiento de las raíces laterales con el fitopatógeno *F. vanettenii* (27 ± 14.7 mm); este crecimiento fue mayor (38 ± 9.3 mm) cuando las plántulas fueron expuestas al tratamiento *M. anisopliae* + *F. vanettenii*. Es posible que la presencia de *M. anisopliae* propiciara un mayor crecimiento de las raíces laterales, ya que el tratamiento *M. anisopliae* mostró un crecimiento mayor (46 ± 14.1 mm), similar al tratamiento control (45 ± 8.3 mm). Este efecto positivo en el crecimiento también fue reportado por Dávila-Berumen (2017), quien observó una recuperación en el crecimiento de las raíces laterales en plantas de sorgo y tomate cuando se inoculó *M. guizhouense* ante la presencia de *F. oxysporum*. El peso seco de las plántulas en los diferentes tratamientos no se vio afectado significativamente, lo cual es similar a lo reportado por Dávila-Berumen (2017) en plantas de sorgo que estuvieron expuestas al hongo *M. guizhouense*, ya que no tuvieron diferencias de peso en comparación con las plantas infectadas con el fitopatógeno *F. oxysporum*.

4.3 Efecto de efluentes acuícolas y *Metarhizium anisopliae* en la patogenicidad de *Fusarium vanettenii* en *Pisum sativum*.

El crecimiento de la radícula, la producción de células del borde y su viabilidad no se vio afectada por el EA a las 24 horas posinoculación. Además, el crecimiento de la raíz principal de las plántulas no fue afectado por el EA a cuatro DPI. Lo anterior demostró que el EA no afecta el sistema radicular de las plantas, lo cual concuerda a lo observado con los extractos acuosos de composta en las radículas de *P. sativum* (Curlango-Rivera et al., 2013; Tollefson et al., 2015).

El crecimiento radial de *M. anisopliae* en presencia del EA, se redujo en un 90% ($p < 0.05$). Sin embargo, *M. anisopliae* formó una colonia con crecimiento de micelio aéreo. Algunos factores que podrían influir en el desarrollo de estructuras aéreas son el estrés, competencia por espacio, o cuando el hongo intenta reproducirse (Talbot, 1999; Wösten & Willey, 2000). Es probable que estos factores aunados a la presencia de los microorganismos o los metabolitos del EA, hayan sido la causa del crecimiento de micelio aéreo en *M. anisopliae*. De igual manera, el crecimiento radial de *F. vanettenii* con el EA se vio reducido en un 85%

respecto al tratamiento control, aunque en este caso no se presentaron diferencias estadísticas significativas. Se sugiere realizar análisis estadísticos de mayor precisión para explicar estos resultados. Sin embargo, la reducción del crecimiento es considerable y pudo deberse a la competencia por espacio, a los microorganismos del EA, a los metabolitos contenidos en el EA. Curlango-Rivera et al. (2013) observaron un efecto similar, ya que los extractos acuosos de composta redujeron en un 100% el crecimiento de *F. vanettenii*.

El uso del EA en las plántulas de *P. sativum* tuvo un efecto positivo en el combate al fitopatógeno *F. vanettenii*. Se observó una disminución significativa en el grado de severidad de las lesiones y una prevención de la infección en el 60% de las plantas. En otros estudios se ha documentado el efecto protector de efluentes de sistemas acuapónicos ante patógenos del sistema radicular (Stouvenakers 2020; Sirakov 2016, Suarez 2021). Además, los efectos obtenidos son muy similares a los observados por Curlango-Rivera et al. (2013) con extractos acuosos de composta, ya que los microorganismos del extracto acuoso mostraron una protección $\geq 93\%$ de protección ante *F. vanettenii*.

Con la combinación del EA y *M. anisopliae* las plántulas no mostraron los síntomas de pudrición de la raíz ocasionados por *F. vanettenii*. Esto se puede atribuir a una posible sinergia entre el EA y *M. anisopliae*. Como se discutió anteriormente, *M. anisopliae* presentó una protección en planta ante *F. vanettenii*, lo cual aunado a la protección observada por el EA, sugiere que los microorganismos de ambos tratamientos interactuaron de forma sinérgica y positiva (Ahmad et al., 2022; Piña-Torres et al., 2023; Sasan & Bidochka, 2013). El género *Bacillus*, así como *Pseudomonas*, se han encontrado entre los microorganismos de los bioflóculos de EA (Monroy-Dosta et al., 2013). Se ha registrado que bacterias del género *Bacillus* son capaces de reducir el grado de severidad del daño en las plantas de chícharo expuestas a *F. solani* (Riaz et al., 2021). Aunque en este estudio no se identificaron las comunidades microbianas del EA, existe la posibilidad de que las bacterias del género *Bacillus*, *Pseudomonas* u otros microorganismos hayan estado presente, y que en conjunto con *M. anisopliae* pueden beneficiar a las plántulas de chícharo e influido en las interacciones para combatir la patogenicidad de *F. vanettenii*.

Respecto al desarrollo biológico de *P. sativum* cultivadas con el EA, las raíces laterales crecieron en promedio 61 ± 42 mm y con la interacción del tratamiento *M. anisopliae* + EA ante *F. vanettenii* tuvieron un mayor crecimiento (66 ± 71 mm), lo que indica que además de prevenir lesiones en las plántulas, el EA también estimula el desarrollo de las raíces laterales. Aunque en este estudio no se identificó el factor que promueve un mayor crecimiento de las raíces laterales, se sugiere que las plantas se benefician de la interacción de *M. anisopliae* con el EA. Microorganismos encontrados en EA como el género *Bacillus*

pueden mejorar el crecimiento de las raíces laterales en plantas de *P. sativum* (Riaz, 2021). Estos resultados abren una perspectiva de trabajo para estudios de las interacciones entre los microorganismos del EA y el hongo *M. anisopliae*.

El EA se mantuvo en las condiciones más estables posibles para los experimentos con planta. Debido que las plantas pueden utilizar los compuestos nitrogenados y el fósforo del EA como nutrientes, las concentraciones de nitrógeno amoniacal total (NAT), nitritos NO₂, nitratos NO₃ y fosfatos se mantuvieron a 0 mg/L. El potasio también es un macronutriente utilizado por las plantas, el cual puede influir de manera indirecta a prevenir el desarrollo de una infección (Agrios, 2005), sin embargo, en este trabajo no se cuantificó su contenido en el EA, por lo que su presencia pudo haber influido en los resultados obtenidos.

4.4 Efecto de efluentes acuícolas filtrados en la patogenicidad de *Fusarium vanettenii* en *Pisum sativum*

El EAF no tuvo un efecto negativo en el crecimiento de *F. vanettenii*. Aunque no se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p > 0.05$), el crecimiento de *F. vanettenii* con el EAF fue mayor (30 ± 0.2) que en el tratamiento control (20 ± 0.4), lo cual sugiere que el hongo puede utilizar los metabolitos presentes en el EA para favorecer su crecimiento. Se sugiere realizar análisis estadísticos de mayor precisión para explicar estas diferencias. Curlango-Rivera *et al.* (2013) evaluaron el efecto de los extractos acuosos de composta filtrados y sus resultados fueron similares a los obtenidos en este estudio, ya que los extractos acuosos filtrados no afectaron a *F. vanettenii*. En contraste, no se encontró un efecto positivo del EAF en el crecimiento de *M. anisopliae*, lo cual sugiere que esta especie fúngica no utiliza los metabolitos presentes en el EA y no promueven su crecimiento (Anexo C). Opuesto al EA, el EAF generó una mayor severidad en los síntomas de pudrición de raíz ocasionados por *F. vanettenii* en las plántulas de *P. sativum*, lo cual se pudo observar como una coloración más oscura en todo el sistema radicular. Lo anterior sugiere que *F. vanettenii* puede utilizar los metabolitos presentes en el EA promoviendo su patogenicidad y ocasionando una mayor severidad en los síntomas de pudrición de la raíz de *P. sativum*. Estos resultados respaldan lo observado por Curlango-Rivera *et al.* (2013) con los extractos filtrados de composta.

Capítulo 5. Conclusiones

El hongo *M. anisopliae* no tuvo un impacto negativo en el crecimiento radicular, en la producción ni en la viabilidad de las células del borde de la raíz de *P. sativum*, lo que indica que no afectó el ciclo celular en el meristemo radicular. Estos resultados contribuyen al conocimiento de las interacciones iniciales planta-*Metarhizium*.

En las plantas expuestas a *F. vanettenii*, se observó una disminución del 12% en la producción de células del borde y una reducción del 15% en su viabilidad, esto respalda trabajos previos que indican que las células del borde son afectadas directamente por el fitopatógeno alterando su ciclo celular.

M. anisopliae tiene un efecto antagónico sobre *F. vanettenii*, ya que reduce un 15% su crecimiento radial in vitro. Una respuesta similar se observó en la interacción de *F. vanettenii* con las plantas de chícharo, ya que *M. anisopliae* disminuyó los síntomas de la enfermedad de la pudrición de la raíz en un 44%.

El EA de un cultivo de tilapia roja (*O. mossambicus*) con la Tecnología Biofloc, no afectó el crecimiento radicular, la producción de células del borde y la viabilidad de *P. sativum*, por lo tanto, no tiene un impacto negativo en el ciclo celular de su meristemo radicular. Además, el EA en conjunto con *M. anisopliae* tienen una posible sinergia ante la patogenicidad de *F. vanettenii*, protegiendo en un 100% a las plántulas de *P. sativum*. Por lo anterior, se propone la utilización de efluentes de cultivos acuícolas con bioflóculos como agentes de biocontrol en plantas, así como la integración de *M. anisopliae* para el control de enfermedades radiculares en sistemas integrados acuícolas-agrícolas. Esta estrategia ofrece una alternativa a los extractos acuosos de composta utilizados en la agricultura convencional.

No se recomienda el uso de EAF para el biocontrol de *F. vanettenii*, ya que favorecen su crecimiento y ocasionan una mayor severidad en los síntomas de pudrición de raíz en las plántulas de *P. sativum*.

Por lo que se sugiere en futuras investigaciones indagar sobre los efectos en conjunto de estos microorganismos de los bioflóculos y *Metarhizium* a nivel molecular y celular.

Literatura citada

- Agrios, G. N. (2005). *Plant pathology* (5th ed.). Elsevier Academic Press. <https://shop.elsevier.com/books/plant-pathology/agrios/978-0-08-047378-9>
- Ahmad, I., Jiménez-Gasco, M. del M., Luthe, D. S., Shakeel, S. N., & Barbercheck, M. E. (2020). Endophytic *Metarhizium robertsii* promotes maize growth, suppresses insect growth, and alters plant defense gene expression. *Biological Control*, 144, 104167. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104167>
- Ayipio, E., Wells, D. E., McQuilling, A., & Wilson, A. E. (2019). Comparisons between aquaponic and conventional hydroponic crop yields: A meta-analysis. *Sustainability*, 11(22), 6511. <https://doi.org/10.3390/su11226511>
- Baoxin, X., & Shujia, C. (1984, December). China: 7.000 años de arroz. *Unesco.org*. https://unesdoc.unesco.org/ark:/48223/pf0000061959_spa
- Brunner-Mendoza, C., Reyes-Montes, M. del R., Moonjely, S., Bidochka, M. J., & Toriello, C. (2019). A review on the genus *Metarhizium* as an entomopathogenic microbial biocontrol agent with emphasis on its use and utility in Mexico. *Biocontrol Science and Technology*, 29(1), 83–102. <https://doi.org/10.1080/09583157.2018.1531111>
- Cartwright, M. (2014, June 29). Comida y agricultura mexicana [Aztec food & agriculture] (M. Guzman, Trans.). *World History Encyclopedia*. Recuperado de <https://www.worldhistory.org/trans/es/2-723/comida-y-agricultura-mexica/>
- Chatterton, S., Harding, M. W., Bowness, R., McLaren, D. L., Banniza, S., & Gossen, B. D. (2019). Importance and causal agents of root rot on field pea and lentil on the Canadian prairies, 2014–2017. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 41(1), 98–114. <https://doi.org/10.1080/07060661.2018.1547792>
- Comisión Nacional del Agua (CONAGUA). (2019). *Estadísticas del Agua en México*. https://sinav30.conagua.gob.mx:8080/port_publicaciones.html
- Comisión Nacional del Agua (CONAGUA). (2022a). *Estadísticas del Agua en México 2021*. https://sinav30.conagua.gob.mx:8080/port_publicaciones.html
- Comisión Nacional del Agua (CONAGUA). (2022b). *Numeragua 2022*. www.gob.mx/conagua
- Comisión Nacional del Agua (CONAGUA). (2024). *Estadísticas del Agua en México 2023*. https://sinav30.conagua.gob.mx:8080/port_publicaciones.html
- Curlango-Rivera, G., Pew, T., Van Etten, H. D., Zhongguo, X., Yu, N., & Hawes, M. C. (2013). Measuring root disease suppression in response to a compost water extract. *Phytopathology*, 103(3), 255–260. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-12-0145-R>
- D'Ambrosio, U., Garnatje, T., Gras, A., Parada, M., & Vallés, J. (2018). *Pisum sativum* L. (A. y M. A. Ministerio de Agricultura, Ed.; pp. 164–169). <https://digital.csic.es/handle/10261/197260>
- Dávila-Berumen, F. (2017). Caracterización de aislados del hongo *Metarhizium* provenientes del sur del estado de Guanajuato con potencial de promover el crecimiento vegetal [Tesis de maestría,

Universidad de Guanajuato]. Repositorio Institucional de la Universidad de Guanajuato. <http://repositorio.ugto.mx/handle/20.500.12059/377>

- De Schryver, P., Crab, R., Defoirdt, T., Boon, N., & Verstraete, W. (2008). The basics of bio-flocs technology: The added value for aquaculture. *Aquaculture*, 277(3–4), 125–137. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.02.019>
- Estrada-Pérez, N., Zavala-Leal, I., González-Hermoso, J. P., & Ruiz-Velazco, J. M. J. (2024). Comparing lettuce and cucumber production using hydroponics and aquaponic (tilapia) systems. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 52(3), 459–472. <https://doi.org/10.3856/vol52-issue3-fulltext-3127>
- Eck, M., Sare, A. R., Massart, S., Schmutz, Z., Junge, R., Smits, T. H. M., & Jijakli, M. H. (2019). Exploring bacterial communities in aquaponic systems. *Water (Switzerland)*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/w11020260>
- Food and Agriculture Organization (FAO). (2016). *Legumbres, semillas nutritivas para un futuro sostenible*. FAO. <https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/c0125315-854e-40f5-8a25-8c52af036a13/content>
- Fatimah, N., Pande, G. S. J., Natrah, F. M. I., Meritha, W. W., Widanarni, Sucipto, A., & Ekasari, J. (2019). The role of microbial quorum sensing on the characteristics and functionality of bioflocs in aquaculture systems. *Aquaculture*, 504, 420–426. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.02.022>
- Folorunso, E. A., Bohatá, A., Kavkova, M., Gebauer, R., & Mraz, J. (2022). Potential use of entomopathogenic and mycoparasitic fungi against powdery mildew in aquaponics. *Frontiers in Marine Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.992715>
- Gillet, V., & Biancalani, R. (2022). Guidelines for the calculation of the agriculture water use efficiency for global reporting. FAO. <https://doi.org/10.4060/cb8768en>
- Goddek, S., & Keesman, K. J. (2018). The necessity of desalination technology for designing and sizing multi-loop aquaponics systems. *Desalination*, 428, 76–85. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2017.11.024>
- Goddek, S., Joyce, A., Kotzen, B., & Burnell Editors, G. M. (Eds.). (2019). *Aquaponics food production systems: Combined aquaculture and hydroponic production technologies for the future*. Springer Open. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-15943-6>
- Gunawardena, U., & Hawes, M. C. (2002). Tissue specific localization of root infection by fungal pathogens: Role of root border cells. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15(11). <https://doi.org/10.1094/MPMI.2002.15.11.1128>
- Hamamoto, L., Hawes, M. C., & Rost, T. L. (2006). The production and release of living root cap border cells is a function of root apical meristem type in dicotyledonous angiosperm plants. *Annals of Botany*, 97(5), 917–923. <https://doi.org/10.1093/aob/mcj602>
- Hanan, J. J. (1998). *Greenhouses: Advanced technology for protected horticulture*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780203719824>

- Hartmann, A., Rothballer, M., & Schmid, M. (2008). Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant and Soil*, 312(1–2), 7–14. <https://doi.org/10.1007/s11104-007-9514-z>
- Hawes, M. C., & Lin, H.-J. (1990). Correlation of pectolytic enzyme activity with the programmed release of cells from root caps of pea (*Pisum sativum*). *Plant Physiology*, 94. <https://academic.oup.com/plphys/article/94/4/1855/6086251>
- Hawes, M. C., Brigham, L. A., Wen, F., Woo, H. H., & Zhu, Y. (1998). Function of root border cells in plant health: Pioneers in the rhizosphere. *Annual Review of Phytopathology*, 36, 311–327. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.36.1.311>
- Hawes, M. C., McLain, J., Ramirez-Andreotta, M., Curlango-Rivera, G., Flores-Lara, Y., & Brigham, L. A. (2016). Extracellular trapping of soil contaminants by root border cells: New insights into plant defense. *Agronomy*, 6(1). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/agronomy6010005>
- Hernández Mancipe, L. E., Londoño Velez, J. I., Hernández García, K. A., & Torres Hernández, L. C. (2019). Los sistemas biofloc: una estrategia eficiente en la producción acuícola. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 14(1), 70–99. <https://doi.org/10.21615/cesmvz.14.1.6>
- Kumar, V., Roy, S., Behera, B. K., Swain, H. S., & Das, B. K. (2021). Biofloc microbiome with bioremediation and health benefits. *Frontiers in Microbiology*, 12. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.741164>
- Liu, S., Tao, C., Zhang, L., Wang, Z., Xiong, W., Xiang, D., Sheng, O., Wang, J., Li, R., Shen, Z., Li, C., Shen, Q., & Kowalchuk, G. A. (2023). Plant pathogen resistance is mediated by recruitment of specific rhizosphere fungi. *The ISME Journal*, 17(6), 931–942. <https://doi.org/10.1038/s41396-023-01406-z>
- Majid, M., Khan, J. N., Shah, Q. M. A., Masoodi, K. Z., Afroza, B., & Parvaze, S. (2021). Evaluation of hydroponic systems for the cultivation of lettuce (*Lactuca sativa* L., var. Longifolia) and comparison with protected soil-based cultivation. *Agricultural Water Management*, 245, 106572. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2020.106572>
- Martin, J. P. (1950). Use of acid, rose bengal, and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. *Soil Science*, 3(215–232). https://journals.lww.com/soilsci/fulltext/1950/03000/use_of_acid_rose_bengal_and_streptomycin_in_the.6.aspx
- Mark, J. J. (2017). La agricultura en el antiguo Egipto [*Ancient Egyptian Agriculture*] (R. Castro, Traductor). *World History Encyclopedia*. Recuperado de <https://www.worldhistory.org/trans/es/2-997/la-agricultura-en-el-antiguo-egipto/>
- Mayerhofer, J., Lutz, A., Dennert, F., Rehner, S. A., Kepler, R. M., Widmer, F., & Enkerli, J. (2019). A species-specific multiplexed PCR amplicon assay for distinguishing between *Metarhizium anisopliae*, *M. brunneum*, *M. pingshaense*, and *M. robertsii*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 161, 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.01.002>
- McKellar, M. E., & Nelson, E. B. (2003). Compost-induced suppression of *Pythium* damping-off is mediated by fatty-acid-metabolizing seed-colonizing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(1), 452–460. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.1.452-460.2003>

- Monroy-Dosta, M. del C., de Lara, R. A., Castro-Mejía, J., Castro-Mejía, G., & Coelho-Emerenciano, M. G. (2013). Microbiology community composition and abundance associated to biofloc in tilapia aquaculture. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 48(3), 511–520. <https://doi.org/10.4067/s0718-19572013000300009>
- Moonjely, S., & Bidochka, M. J. (2019). Generalist and specialist *Metarhizium* insect pathogens retain ancestral ability to colonize plant roots. *Fungal Ecology*, 41, 209–217. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2019.06.004>
- Nysanth, N. S., Sivapriya, S. L., Natarajan, C., & Anith, K. N. (2022). Novel in vitro methods for simultaneous screening of two antagonistic bacteria against multiple fungal phytopathogens in a single agar plate. *3 Biotech*, 12(6). <https://doi.org/10.1007/s13205-022-03205-3>
- Moreno-Velandia, C. A., Cotes, A. M., Beltrán-Acosta, C., Bettiol, W., & Elad, Y. (2018). Control biológico de fitopatógenos del suelo. En A. M. Cotes (Ed.), *Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros: Agentes de control biológico* (pp. 143–203). Agrosavia. <https://doi.org/10.21930/agrosavia.investigation.7402537>
- Oliveros-Bastidas, A. de J., Macías, F. A., Carrera Fernández, C., Marín, D., & Molinillo, J. M. G. (2009). Exudados de la raíz y su relevancia actual en las interacciones alelopáticas. *Química Nova*, 32(1). <https://www.scielo.br/j/qn/a/3dP55YM7pzCkFYsWMWczVzD/>
- Pedrozo Acuña, A. (2022). Escasez de agua, disponibilidad y agricultura. *Perspectivas IMTA*, 3(22). <https://doi.org/10.24850/b-imta-perspectivas-2022-22>
- Piña-Torres, I. H. (2017). Caracterización de aislados del hongo *Metarhizium* provenientes del norte del estado de Guanajuato con potencial de promover el crecimiento vegetal [Tesis de maestría, Universidad de Guanajuato]. Repositorio Institucional de la Universidad de Guanajuato. <http://repositorio.ugto.mx/handle/20.500.12059/383>
- Piña-Torres, I. H., Dávila-Berumen, F., González-Hernández, G. A., Torres-Guzmán, J. C., & Padilla-Guerrero, I. E. (2023). Hyphal growth and conidia germination are induced by phytohormones in the root colonizing and plant growth promoting fungus *Metarhizium guizhouense*. *Journal of Fungi*, 9(9), 945. <https://doi.org/10.3390/jof9090945>
- Riaz, R., Khan, A., Khan, W. J., Jabeen, Z., Yasmin, H., Naz, R., Nosheen, A., & Hassan, M. N. (2021). Vegetable associated *Bacillus* spp. suppress the pea (*Pisum sativum* L.) root rot caused by *Fusarium solani*. *Biological Control*, 158, 104610. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104610>
- Ríos Da Silva, R., Vargas-Flores, J., Sánchez-Choy, J., Oliva-Paredes, R., Alarcón-Castillo, T., & Villegas Panduro, P. P. (2020). *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* as compatible and efficient controllers of plague insects in aquaponic crops. *Scientia Agropecuaria*, 11(3), 419–426. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2020.03.14>
- Rivas-García, T., González-Estrada, R. R., Chiquito-Contreras, R. G., Reyes-Pérez, J. J., González-Salas, U., Hernández-Montiel, L. G., & Murillo-Amador, B. (2020). Biocontrol of phytopathogens under aquaponics systems. *Water*, 12(7), 2061. <https://doi.org/10.3390/w12072061>
- Sasan, R. K., & Bidochka, M. J. (2012). The insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* (Clavicipitaceae) is also an endophyte that stimulates plant root development. *American Journal of Botany*, 99(1), 101–107. <https://doi.org/10.3732/ajb.1100136>

- Sasan, R. K., & Bidochka, M. J. (2013). Antagonism of the endophytic insect pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* against the bean plant pathogen *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 35(3), 288–293. <https://doi.org/10.1080/07060661.2013.823114>
- Schuman, G. L., & D'Arcy, C. (2012). *Essential plant pathology* (2nd ed.). The American Phytopathological Society. <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/9780890546710.fm>
- Scheuerell, S., & Mahaffee, W. (2002). Compost tea: Principles and prospects for plant disease control. *Compost Science & Utilization*, 10(4), 313–338. <https://doi.org/10.1080/1065657X.2002.10702095>
- Secretaría de Economía. (2023). *Peas "Peas, Peas" "Pisum Sativum", although they shelled, fresh or chilled: Commercial exchange, international purchases and sales, market and specialization | Data México*. <https://www.economia.gob.mx/datamexico/en/profile/product/peas-peas-peas-pisum-sativum-although-they-shelled-fresh-or-chilled>
- Sirakov, I., Lutz, M., Graber, A., Mathis, A., Staykov, Y., Smits, T. H. M., & Junge, R. (2016). Potential for combined biocontrol activity against fungal fish and plant pathogens by bacterial isolates from a model aquaponic system. *Water*, 8(11), 518. <https://doi.org/10.3390/w8110518>
- Somerville, C., Cohen, M., Pantanella, E., Stankus, A., & Lovatelli, A. (2014). *Small-scale aquaponic food production. Integrated fish and plant farming* (FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper, Vol. 589). FAO. <https://openknowledge.fao.org/items/e4d11efd-d97a-4959-8ae2-8b7d3fd32c5e>
- Stone, L. B. L., & Bidochka, M. J. (2020). The multifunctional lifestyles of *Metarhizium*: Evolution and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104, 9935–9945. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10968-3>
- Stouvenakers, G., Dapprich, P., Massart, S., & Jijakli, M. H. (2019). Plant pathogens and control strategies in aquaponics. En L. Goddek, A. Joyce, B. Kotzen, & G. M. Burnell (Eds.), *Aquaponics food production systems: Combined aquaculture and hydroponic production technologies for the future* (pp. 354–378). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-15943-6_14
- Stouvenakers, G., Massart, S., Depireux, P., & Haïssam Jijakli, M. (2020). Microbial origin of aquaponic water suppressiveness against *Pythium aphanidermatum* lettuce root rot disease. *Microorganisms*, 8(11), 1683. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111683>
- Suárez-Cáceres, G. P., Pérez-Urrestarazu, L., Avilés, M., Borrero, C., Lobillo Eguívar, J. R., & Fernández-Cabanás, V. M. (2021). Susceptibility to water-borne plant diseases of hydroponic vs. aquaponics systems. *Aquaculture*, 544, 737093. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737093>
- Talbot, N. J. (1999). Fungal biology: Coming up for air and sporulation. *Nature*, 398(6725), 295–296. <https://doi.org/10.1038/18575>
- Tian, J. F., Li, P. J., Li, X. X., Sun, P. H., Gao, H., Liu, X. Z., Huang, P., Tang, J. S., & Yao, X. S. (2016). New antibacterial isocoumarin glycosides from a wetland soil derived fungal strain *Metarhizium anisopliae*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 26(5), 1391–1396. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.01.074>
- Tollefson, S. J., Curlango-Rivera, G., Huskey, D. A., Pew, T., Giacomelli, G., & Hawes, M. C. (2015). Altered carbon delivery from roots: Rapid, sustained inhibition of border cell dispersal in response to

- compost water extracts. *Plant and Soil*, 389(1–2), 145–156. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2350-z>
- United Nations. (2021). *Resumen actualizado de 2021 sobre los progresos en el ODS 6: Agua y saneamiento para todos* (Versión: julio de 2021). ONU-Agua. https://www.unwater.org/sites/default/files/app/uploads/2021/12/SDG-6-Summary-Progress-Update-2021_Version-July-2021_SP.pdf
- United Nations. (2023). *Informe de los Objetivos de Desarrollo Sostenible 2023*. <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/water-and-sanitation/>
- van Dam, N. M., & Bouwmeester, H. J. (2016). Metabolomics in the rhizosphere: Tapping into belowground chemical communication. *Trends in Plant Science*, 21(3), 256–265. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.008>
- Watten, B. J., & Busch, R. L. (1984). Tropical production of tilapia (*Sarotherodon aurea*) and tomatoes (*Lycopersicon esculentum*) in a small-scale recirculating water system. *Aquaculture*, 41(3), 271–283. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(84\)90290-4](https://doi.org/10.1016/0044-8486(84)90290-4)
- Williamson-Benavides, B. A., Sharpe, R. M., Nelson, G., Bodah, E. T., Porter, L. D., & Dhingra, A. (2020). Identification of *Fusarium solani* f. sp. *pisi* (Fsp) responsive genes in *Pisum sativum*. *Frontiers in Genetics*, 11, 950. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00950>
- Wohor, O. Z., Rispaill, N., Ojiewo, C. O., & Rubiales, D. (2022). Pea breeding for resistance to rhizospheric pathogens. *Plants*, 11(19), 2664. <https://doi.org/10.3390/plants11192664>
- Wösten, H. A. B., & Willey, J. M. (2000). Surface-active proteins enable microbial aerial hyphae to grow into the air. *Microbiology*, 146(4), 767–773. <https://doi.org/10.1099/00221287-146-4-767>
- Zamora, K., Castro, L., Wang, A., Arauz, L. F., & Uribe, L. (2017). Uso potencial de lixiviados y tés de vermicompost en el control del ojo de gallo del café *Mycena citricolor*. *Agronomía Costarricense*, 41(1), 33–51. <https://doi.org/10.15517/rac.v41i1.29747>
- Zhang, X., Dippold, M. A., Kuzyakov, Y., & Razavi, B. S. (2019). Spatial pattern of enzyme activities depends on root exudate composition. *Soil Biology and Biochemistry*, 133, 83–93. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2019.02.010>
- Zimmermann, G. (2007). Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Science and Technology*, 17(9), 879–920. <https://doi.org/10.1080/09583150701593963>

Anexos

A. Interacción *Metarhizium* spp. - *Fusarium vanettenii*

El ensayo de interacción in vitro evaluó el potencial inhibitorio de cinco especies del género *Metarhizium* (*Metarhizium* spp., *M. brunneum* Caro 19, *M. brunneum* AT3, *M. brunneum* LCP 29-1, *M. robertsii*, *M. anisopliae*) ante el fitopatógeno *F. vanettenii* (Figura 7). Se midió de manera independiente el crecimiento radial de las especies de *Metarhizium*, verificando si se presentaban cambios en su morfología colonial ante la presencia de *F. vanettenii*. Los análisis estadísticos indicaron que las diferencias entre los tratamientos no fueron significativas ($P>0.05$) (Tabla 18). Además, se observó una inhibición en el crecimiento del hongo *F. vanettenii* en su interacción con las cinco especies de *Metarhizium* (Figura 7b). Los análisis estadísticos indicaron que estas diferencias fueron significativas ($P<0.05$) (Tabla 19).

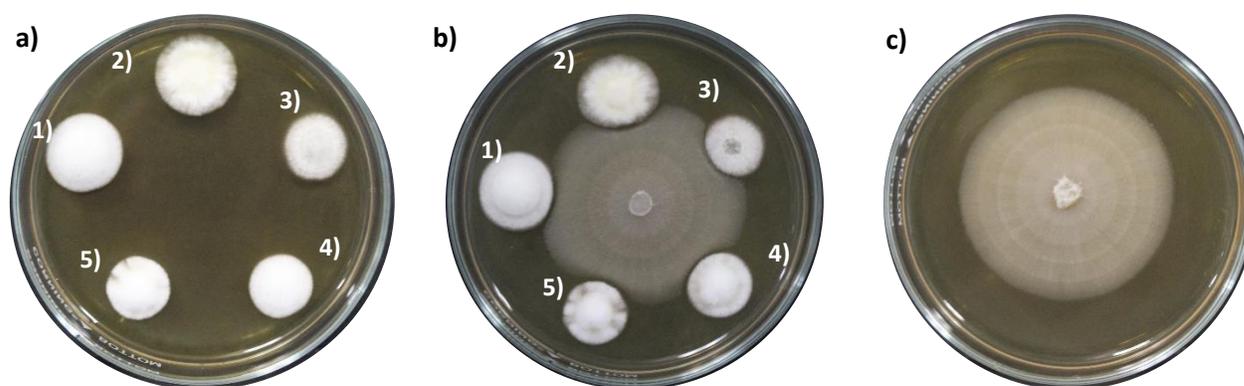


Figura 7. Capacidad antagónica de *Metarhizium* spp. ante *F. vanettenii*. a) *Metarhizium* spp. b) *Metarhizium* spp. en interacción con *F. vanettenii*. c) *F. vanettenii*. a1 y b1) *M. brunneum* Caro 19; a2 y b2) *M. brunneum* AT3; a3 y b3) *M. brunneum* LCP 29-1; a4 y c4) *M. robertsii*; a5 y b5) *M. anisopliae*.

Tabla 18. Crecimiento radial promedio de los hongos control de *Metarhizium* y en interacción con el fitopatógeno *F. vanettenii*.¹

Tratamientos	Crecimiento (mm) <i>Metarhizium</i> spp.	Crecimiento(mm) <i>Metarhizium</i> spp. + <i>F. vanettenii</i>
<i>M. brunneum</i> Caro 19	9.7 ± 1.1	9.4 ± 0.7
<i>M. brunneum</i> AT3	10.6 ± 0.9	10.0 ± 1.1
<i>M. brunneum</i> LCP 29-1	8.1 ± 1.0	7.6 ± 0.7
<i>M. robertsii</i>	8.5 ± 1.1	8.5 ± 1.5
<i>M. anisopliae</i>	8.7 ± 1.5	7.6 ± 0.6

¹Los valores representan el promedio ± desviación estándar por tratamiento (n=4).

Tabla 19. Crecimiento radial de *F. vanettenii* y en interacción con *Metarhizium* spp.¹

Tratamientos	Crecimiento (mm)	Inhibición (%)
<i>F. vanettenii</i>	28.7 ± 1.0 ^a	0
<i>F. vanettenii</i> + <i>M. brunneum</i> Caro 19	23.4 ± 2.6 ^b	18.6
<i>F. vanettenii</i> + <i>M. brunneum</i> AT3	23.7 ± 2.8 ^b	17.4
<i>F. vanettenii</i> + <i>M. brunneum</i> LCP 29-1	25.7 ± 2.0 ^b	10.5
<i>F. vanettenii</i> + <i>M. robertsii</i>	25.5 ± 2.6 ^b	11.1
<i>F. vanettenii</i> + <i>M. anisopliae</i>	25.2 ± 2.2 ^b	12.2

¹Los valores representan el promedio ± desviación estándar por tratamiento (n=4). Valores con diferentes superíndices representan diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$).

Para estudiar el comportamiento de *Metarhizium* spp. ante el efluente acuícola, se realizó un ensayo de interacción in vitro siguiendo la metodología de la sección 2.4.4. El ensayo de interacción se realizó con las cinco cepas de *Metarhizium* y tuvo una duración de nueve DPI (Figura 8). En la interacción con los EA se observó un crecimiento aéreo de las cinco especies de *Metarhizium* evaluadas, siendo más predominante en *M. brunneum* LCP 29-1 y *M. anisopliae* (Figura 8b3 y 8b5, respectivamente); el crecimiento radial no fue evaluado cuantitativamente a causa del crecimiento excesivo de los microorganismos presentes en el EA (figura 8b).

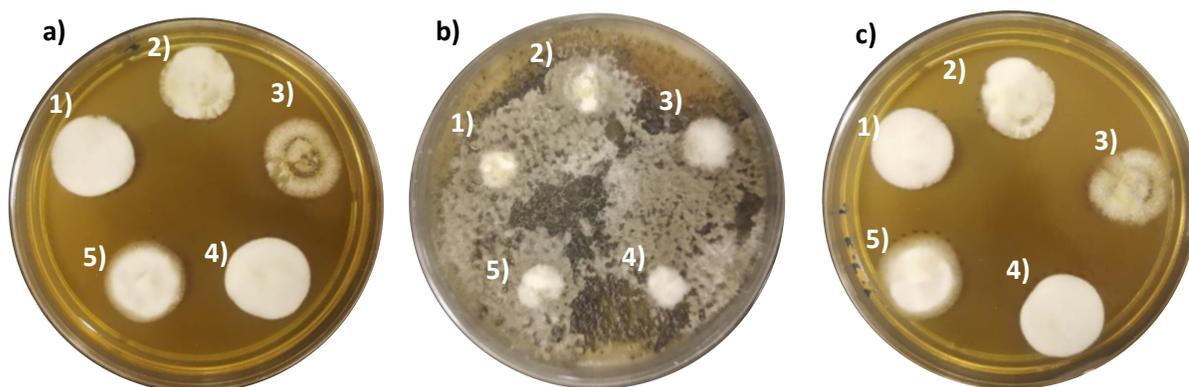


Figura 8. Interacción de *Metarhizium* spp. ante efluentes acuícolas. a) *Metarhizium* spp. b) *Metarhizium* spp. en interacción con el EA. c) *Metarhizium* spp. en interacción con el EAF. a1, b1 y c1) *M. brunneum* Caro 19; a2, b2 y c2) *M. brunneum* AT3; a3, b3 y c3) *M. brunneum* LCP 29-1; a4, b4 y c4) *M. robertsii*; a5, b5 y c5) *M. anisopliae*.

El EAF no tuvo un efecto negativo en el crecimiento de *Metarhizium* spp. Todas las especies de *Metarhizium* mostraron crecimiento aéreo, formando colonias afelpadas en interacción con el EAF. Los análisis estadísticos no presentaron diferencias significativas ($P > 0.05$) (tabla 20).

Tabla 20. Crecimiento radial promedio de los hongos *Metarhizium* en interacción con los efluentes acuícolas filtrados.

Tratamientos	Crecimiento (mm) <i>Metarhizium</i> spp.	Crecimiento (mm) <i>Metarhizium</i> spp. + EAF
<i>M. brunneum</i> Caro 19	11.7 ± 0.5	12 ± 0.5
<i>M. brunneum</i> AT3	11.5 ± 1.0	11.6 ± 0.5
<i>M. brunneum</i> LCP 29-1	11.7 ± 0.5	11.3 ± 1.5
<i>M. robertsii</i>	11.7 ± 0.5	12 ± 1.0
<i>M. anisopliae</i>	13.2 ± 0.9	12.6 ± 0.5

¹Los valores representan el promedio ± desviación estándar por tratamiento (n=3).

Los resultados mostraron que el crecimiento de las cepas de *Metarhizium* no fueron afectadas por la presencia de *F. vanettenii* y además presentaron un antagonismo similar ante el fitopatógeno ($p > 0.05$). Para seleccionar la especie utilizada en este estudio se tomaron en cuenta otras características como las condiciones ambientales del lugar de procedencia de cada especie de *Metarhizium*. *M. robertsii* y *M. anisopliae* (11.1% y 12.2% de inhibición ante *F. vanettenii*, respectivamente) fueron aisladas de un clima templado-subhúmedo, similar a las condiciones climáticas de Ensenada, B.C. Además, se ha reportado que las cepas de *M. anisopliae* se han aislado de humedales (Tian et al., 2016), lo cual podría favorecer su adaptación a las condiciones semiacuáticas de un sistema IAA. Además, se ha reportado que *M. anisopliae* mejoró la tasa de germinación de semillas de sorgo en un 56% (Piña-Torres, 2017). En base a estos antecedentes se seleccionó a *M. anisopliae* para evaluar su potencial como agente de biocontrol en sistemas IAA.

B. Mantenimiento del cultivo de tilapia

El efluente acuícola utilizado en este estudio se colectó de un cultivo de tilapia con bioflóculos. Las tilapias se alimentaron cinco días a la semana con alimento comercial y dos días tuvieron como fuente de alimento únicamente los bioflóculos, para que el cultivo se autorregule y se controlaran los parámetros de calidad de agua. Durante el cuidado de los efluentes acuícolas se registró el Nitrógeno Amoniacal Total (NAT, NH_4/NH_3) en mg/L por un total de 114 días. Su concentración fluctuó de 0 a 4 mg/L la mayor parte del cultivo, sin embargo, se tuvo un registro máximo de 8 mg/L (Figura 9). Los nitritos fluctuaron de 0 a 5 mg/L y los nitratos, estos se mantuvieron de 0 a 10 mg/L, con dos valores extremos de 20 y 40 mg/L (figura 10), estos se analizaron en un total de 91 días durante el tratamiento.

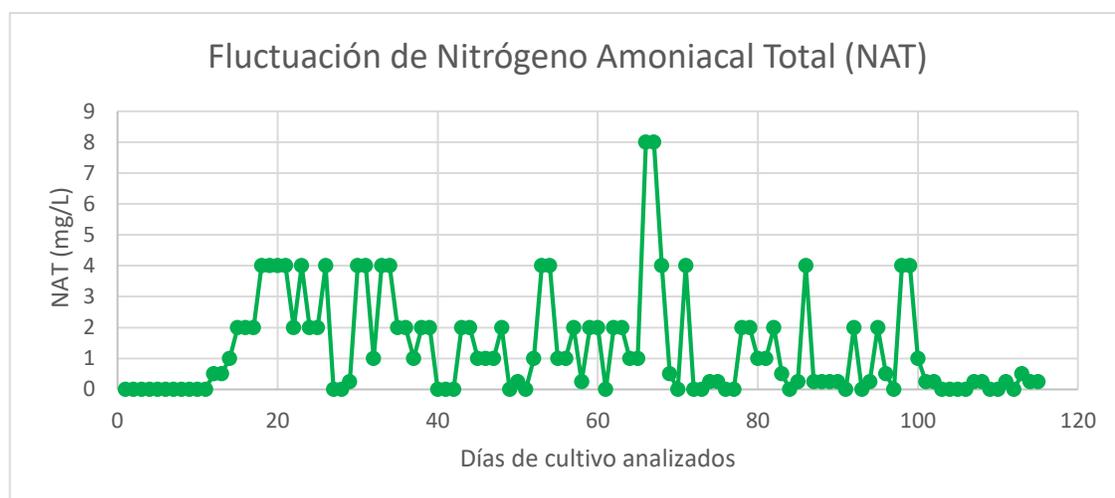


Figura 9. Gráfico del comportamiento del nitrógeno amoniacal total en el efluente acuícola.

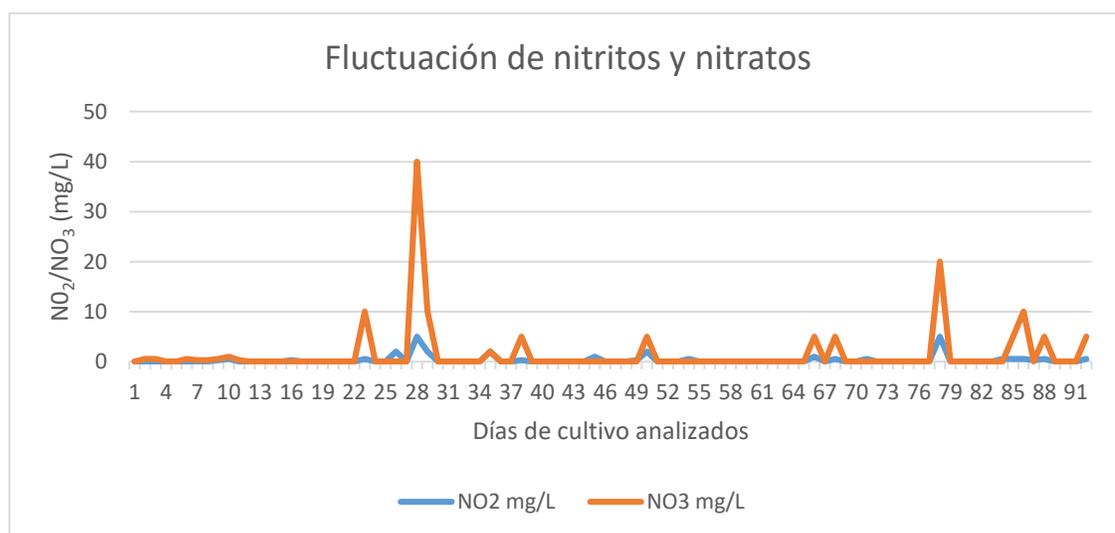


Figura 10. Gráfico de comportamiento de los nitritos y nitratos en el efluente acuícola.

El pH se mantuvo estable la mayor parte del cultivo con un valor de 6, sin embargo, se tuvo registro de un mínimo de 5 y máximo de 7.5 en la escala de pH, los registros fueron en un total de 43 días. Los datos se muestran en la figura 11.

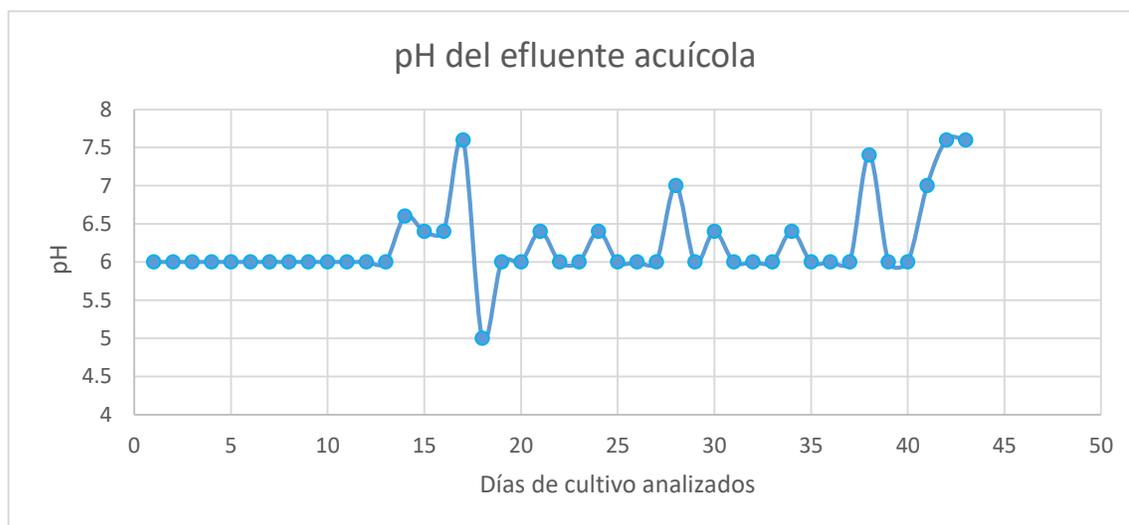


Figura 11. Gráfico de pH registrado en el efluente acuícola.

El volumen de los bioflóculos en el cultivo acuícola fue uno de los parámetros más difícil de controlar. Al inicio del cultivo el agua del cultivo tenía un volumen de bioflóculos 150 mL/L, y posteriormente se estableció en un rango de 20 a 60 mL/L (Figura 12), los datos se registraron por un total de 94 días.



Figura 12. Gráfico de fluctuación de los flóculos.

C. Efecto del efluente acuícola y efluentes acuícolas filtrados en *M. anisopliae*

Se realizaron ensayos in vitro para evaluar el efecto del EA y el EAF sobre el crecimiento de *M. anisopliae*. El experimento se evaluó durante diez días, registrando el crecimiento radial total de *M. anisopliae* figura 13. En el tratamiento control *M. anisopliae* tuvo un crecimiento radial de 10.9 ± 0.7 mm, *M. anisopliae* en interacción con los EA creció 1 ± 0.2 mm, mientras que *M. anisopliae* en presencia de los EAF presentó un crecimiento de 10.8 ± 0.5 mm. El crecimiento con el tratamiento control y en presencia de los EAF fue similar ($P > 0.05$), pero el crecimiento de *M. anisopliae* con el EA se redujo considerablemente en comparación con los otros tratamientos ($P < 0.05$), sin embargo, tuvo un crecimiento de micelio aéreo. Los resultados de crecimiento radial a los 10 DPI se resumen en la tabla 21.

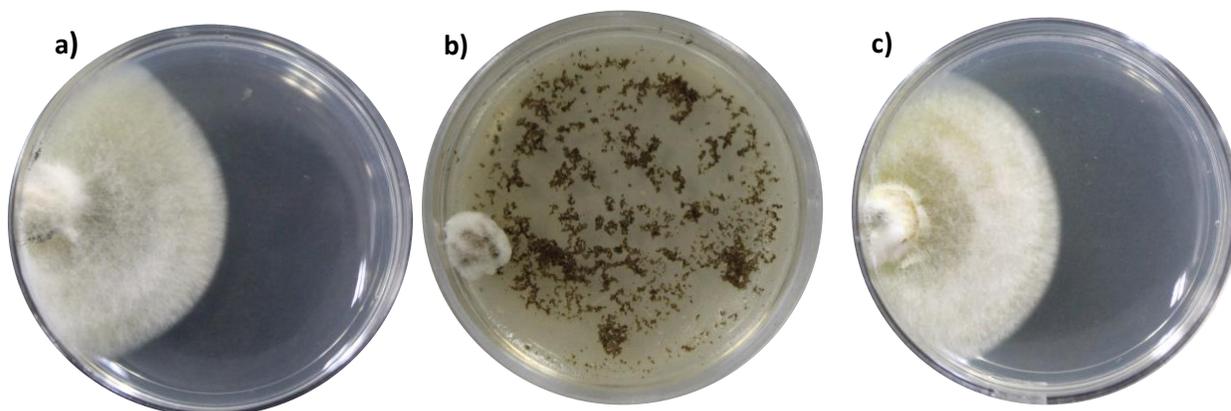


Figura 13. Efecto del efluente acuícola sobre el crecimiento radial de *M. anisopliae*. a) *M. anisopliae*, b) *M. anisopliae* con el EA, c) *M. anisopliae* con el EAF.

Tabla 21. Efecto del efluente acuícola y efluente acuícola filtrado en el crecimiento radial de *M. anisopliae*.¹

Tratamiento	<i>M. anisopliae</i>	EA + <i>M. anisopliae</i>	EAF + <i>M. anisopliae</i>
Crecimiento radial (mm)	10 ± 0.7^a	1 ± 0.2^b	10.8 ± 0.5^a

¹Los valores representan el promedio \pm desviación estándar por tratamiento (n=5).

Valores con diferentes superíndices representan diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$).