



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS LABORATORIO DE BIOQUÍMICA ECOLÓGICA

“Estudio del efecto de los volátiles emitidos por *Beauveria bassiana* en la conducta de oviposición y los patrones de consumo de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) en plantas de *Sorghum bicolor*”

Tesis que para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Presenta:

M.C. Arturo Ramírez Ordorica

Directora de tesis:

D.C. Lourdes I. Macías Rodríguez

Codirector:

Dr. Robert Winkler

Comité sinodal:

D.C. Alfonso Luna Cruz

D.C. Ernesto García Pineda

D.C. Mauro Manuel Martínez Pacheco

Morelia, Michoacán. Noviembre de 2023



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO-BIOLÓGICAS
UMSNH

Agradecimientos

Agradezco al amor y protección infinitos que me han regalado mis padres, Arturo y María Eugenia, así como al ejemplo que siempre han sido en mi vida. Ellos fueron mis primeros maestros y a quienes debo todo lo que soy. Todos los días son mi inspiración para dar lo mejor de mí, así como para perfeccionar todos los aspectos de mi vida. Por ser los mejores padres del mundo y haber dedicado sus vidas a darnos todo para salir adelante y encontrar nuestro propio camino. Porque ellos son y serán siempre la luz que guíe mis decisiones, así como el origen de mi existencia. Mis infinitos agradecimientos.

A mi hermano Alberto, porque además de ser mi amigo y compañero de vida, es un ejemplo de trabajo, perseverancia y valores en mi día a día, y la persona por la que más admiración siento. Mi hermano es un modelo de persona en todos los sentidos de la palabra. Sin su amor, protección e inspiración no hubiera podido llegar a este momento. Él es y ha sido siempre el mejor ejemplo de valores y cariño que se puede transmitir a un hermano. Una luz en mi vida. Gracias hermano mío.

A mi asesora, la Dra Lourdes, que ha sido mi tutora académica a lo largo de estos años de formación como científico. Me siento profundamente agradecido por su guía y por los conocimientos que me ha proporcionado, además de ser un ejemplo de trabajo, profesionalismo, perseverancia, y una mujer de una calidad humana inmensa. Su asesoría y amistad han tocado profundamente mi formación. Mi más profundo respeto y admiración. La impronta de sus enseñanzas y guía siempre estarán conmigo en mi futuro profesional y académico. Gracias Dra Lulú.

A mis amig@s del Laboratorio de Bioquímica Ecológica, a quienes estimo con toda mi alma. Trabajar con ellos a lo largo de los años ha sido una de las mejores experiencias, y por quienes el trabajo de laboratorio se vuelve una enseñanza de vida. Ellos estarán en mi corazón a cualquier parte que me depare la vida. En especial a Sandra, Andrea, Mitzi, Jaime, Oscar, Iván, Alondra, y a todos que han pasado por el laboratorio y con quienes he tenido el privilegio de convivir. A la técnica Perla García por su amistad, las pláticas y los consejos que me ha dado a lo largo de estos años. Muchas Gracias.

A mi novia, Yamilet, mi compañera de aventuras, mi cómplice y amiga. Ella me ha acompañado en los momentos buenos y malos, siendo mi inspiración y refugio, además de ser una mujer de valores y virtudes que me motivan a ser un mejor hombre cada día. Por su infinita paciencia y comprensión. Por todas las risas y los momentos dulces. Por las tardes que me acompañó en la universidad mientras hacía mis experimentos. Con ella está mi pensamiento y corazón. Gracias por estar presente en los momentos decisivos a lo largo de estos años. Gracias.

A mis amig@s de generación de Biología; colegas y profesionistas con los que aún tengo el privilegio de compartir pláticas, momentos, consejos y aventuras. La vida nos permitió coincidir y conocernos para que compartiéramos intereses e inquietudes, y una inmensa hambre de conocer. En especial a Abdieel, Ma. Guadalupe, Angélica, Irene, Aurora, Violeta. Los amigos que hice en mi periodo universitario son muy importantes para mí, y a todos ellos los aprecio con todo mi corazón. Son amistades que durarán toda mi vida. A todos ellos, Gracias.

A todos los amig@s y compañer@s del IIQB, por las pláticas y las experiencias en laboratorios y pasillos, por las ocurrencias, las risas, y las tasas de café. En especial a Donovan, Alejandra, Celeste, Katia, Jared, Alistair, Uber, Tania. A mis profesores y tutores que han dado enseñanzas positivas a lo largo de mi formación y se convirtieron en ejemplo de pasión y profesionalismo. A los consejos y opiniones profesionales de cada uno de los miembros de mi comité, los doctores Mauro, Ernesto y Alfonso. Particularmente, gracias al Dr. Alfonso por su auxilio cuando apenas comenzaba a manejar al cogollero del maíz, siendo nuestro proveedor inicial del insecto, además de escuchar en más de una ocasión mis dudas e inquietudes, y por los buenos consejos. A mi cotutor, Dr. Robert, así como al grupo de trabajo que dirige, el Laboratorio de Bioquímica Instrumental, del CINVESTAV, Irapuato. A mis compañer@s y amig@s del laboratorio de Ecología Química del IIES, UNAM, campus Morelia. Muy en especial a la técnico Yolanda García por ser nuestro enlace para participar de la crianza del gusano cogollero en sus instalaciones, así como para usar también esta población en mis ensayos. Las pláticas y el buen ambiente siempre han estado a la orden del día. Gracias.

A mi alma mater, la UMSNH, por ser mi segundo hogar, y en quien he pasado muchos años de felicidad, alegrías, momentos buenos y también malos. Porque los alumnos y profesores que la integran representan en su conjunto los más altos valores de la sociedad libre, el espíritu universal y humanista. Soy nicolaita de corazón y llevo mi universidad a donde quiera que voy.

Y a mí, por haberme dado la oportunidad de aprender día a día, de mejorar sobre mis errores, de no rendirme cuando hubo momentos en que sentía que no podría avanzar más. Por darme la oportunidad de buscar en mi interior lo mejor y tratar de llevarlo a la práctica, por alimentar siempre el deseo de cumplir mis sueños y para alcanzar muchos más. Por darme la oportunidad de ver lo mejor de mí, por sobre todo lo demás.

En la realización de este trabajo, muchas personas y circunstancias han tenido que coincidir, que de una u otra forma me permitieron llegar a este momento. Mencionar a todos y cada uno me es imposible, así como lo sería el no mencionar a nadie.

Dedicatoria

A mis padres y mi hermano.

K	E	χ	γ	Z	Π	M	Θ	E	Ψ
Γ	N	K	B	Θ	B	N	ζ	Θ	Φ
E	A	Γ	P	Ω	O	X	X	N	Ω
Δ	T	T	Ω	Π	B	ϑ	M	ϑ	Θ
T	Φ	E	Π	P	A	T	γ	Λ	Θ
Ω	Γ	E	B	A	K	X	Z	Ω	X
Δ	X	Π	γ	P	T	Z	Z	Λ	X
Γ	Ω	Ω	Θ	Λ	T	Γ	O	Θ	X
Δ	γ	χ	γ	Z	X	Γ	T	χ	Θ
T	T	N	Ω	γ	M	X	X	Z	P
X	Γ	γ	B	Γ	T	T	Ω	γ	χ
χ	K	Φ	O	γ	N	Γ	Π	M	Λ
γ	Γ	X	γ	K	Ω	M	X	K	Ω
γ	M	O	B	γ	ϑ	ϑ	N	Ω	Ω
Φ	Ω	A	γ	γ	X	Ω	χ	X	Φ
Φ	Γ	Z	γ	Δ	Γ	X	Γ	ϑ	Ω
P	Γ	Z	Π	P	Ω	Z	M	N	K

INDICE

RESUMEN	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUCCIÓN	10
2. ANTECEDENTES	12
2.1. Hongos entomopatógenos	12
2.2. El ciclo infeccioso de los hongos entomopatógenos	14
2.3. Los hongos entomopatógenos y su interacción con las plantas	17
2.4. <i>Beauveria bassiana</i> como agente de biocontrol en insectos.....	20
2.5. Los semioquímicos en la comunicación interespecie.....	22
2.6. La percepción odorífera en insectos y su contexto ecológico	23
2.7. Compuestos orgánicos volátiles (VOCs) emitidos por hongos.....	24
2.8. VOCs emitidos por <i>B. bassiana</i>	27
2.9. Etología en insectos mediada por VOCs fúngicos	30
2.10. Efectos conductuales inducidos por agentes entomopatógenos sobre insectos.....	31
2.11. Modulación de la conducta reproductiva y alimenticia en insectos mediada por VOCs fúngicos	34
2.12. <i>Spodoptera frugiperda</i> (Gusano cogollero del maíz, <i>fall armyworm</i> FAW)	38
2.13. Importancia socioeconómica de <i>S. frugiperda</i>	41
2.14. El uso de agentes de biocontrol contra <i>S. frugiperda</i>	43
2.15. Respuestas fisiológicas y bioquímicas de las plantas a los VOCs.....	45
2.16. El sorgo (<i>Sorghum bicolor</i>) y su importancia económica.	46
3. JUSTIFICACIÓN	50
4. HIPÓTESIS	51
5. OBJETIVOS	52
5.1. Objetivo general	52
5.2. Objetivos particulares.....	52

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	53
7. RESULTADOS	56
Capítulo I. Volatiles released by <i>Beauveria bassiana</i> induce oviposition behaviour in the fall armyworm <i>Spodoptera frugiperda</i> (Lepidoptera: Noctuidae)	57
Capítulo II. Los VOCs emitidos por <i>B. bassiana</i> modifican el comportamiento de consumo de <i>S. frugiperda</i> en plantas de <i>S. bicolor</i> en un sistema <i>in vitro</i>	74
II.1. INTRODUCCIÓN.....	75
II.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	78
II.3. RESULTADOS	87
II.4. DISCUSIÓN.....	100
II.5. CONCLUSIÓN.....	110
II.6. BIBLIOGRAFÍA.....	111
8. DISCUSIÓN GENERAL	121
9. CONCLUSIONES GENERALES	142
10. BIBLIOGRAFÍA	144
11. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA	190

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrategia experimental del proyecto.....	55
Figura 2. Fotografía representativa del sistema de interacción de <i>B. bassiana</i> - <i>S. bicolor</i> mediada por VOCs a los 7 días post siembra.....	81
Figura 3. Fotografías representativas del sistema de herbivoría de <i>S. frugiperda</i> en hojas de <i>S. bicolor</i>	82
Figura 4. Diagrama del dispositivo de olfatometría dual para larvas de <i>S. frugiperda</i> en estadio L2.....	84
Figura 5. Diagrama de flujo de los experimentos para estudiar modificaciones en la conducta de herbivoría y preferencias de elección de <i>S. frugiperda</i> inducidas por los VOCs fúngicos y el 3-metilbutanol.....	86
Figura 6. Parámetros de crecimiento de <i>S. bicolor</i> en respuesta a la exposición de los VOCs fúngicos de los aislados de <i>B. bassiana</i> AI2 y AS5.....	88
Figura 7. Parámetros de consumo de <i>S. frugiperda</i> en follaje de <i>S. bicolor</i> durante la exposición a lo VOCs fúngicos de los aislados de <i>B. bassiana</i> AI2 y AS5.....	90
Figura 8. Parámetros de consumo de <i>S. frugiperda</i> entre distintas hojas del follaje de <i>S. bicolor</i> durante la exposición a lo VOCs fúngicos de los aislados de <i>B. bassiana</i> AI2 y AS5.....	92
Figura 9. Parámetros de consumo de las larvas de <i>S. frugiperda</i> en estadio L2 durante la exposición al 3-metilbutanol en follaje de <i>S. bicolor</i>	94
Figura 10. Parámetros de consumo de las larvas de <i>S. frugiperda</i> en estadio L2 durante la exposición al 3-metilbutanol en diferentes hojas de <i>S. bicolor</i>	95
Figura 11. Ensayos de olfatometría de elección de larvas L2 de <i>S. frugiperda</i> con diferentes fuentes alimenticias y el micelio de <i>B. bassiana</i> AI2.....	97
Figura 12. Ensayos de olfatometría de elección de larvas L2 de <i>S. frugiperda</i> con diferentes fuentes alimenticias y el micelio de <i>B. bassiana</i> AS5.....	97
Figura 13. Ensayos de olfatometría de elección de larvas L2 de <i>S. frugiperda</i> al follaje de <i>S. bicolor</i> pre tratado con los VOCs de <i>B. bassiana</i>	98
Figura 14. Ensayos de olfatometría de elección de larvas L2 de <i>S. frugiperda</i> expuestas a 8 µg de 3-metilbutanol.....	99
Figura 15. Nicho microbiano y semioquímicos.....	125
Figura 16. <i>B. bassiana</i> modifica la conducta reproductiva y de consumo de <i>S. frugiperda</i> por la mediación de los VOCs que emite.....	137

RESUMEN

Los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) son moléculas de bajo peso molecular que se presentan en fase gaseosa a la temperatura ambiente. La función de los VOCs en la naturaleza se relaciona con la “comunicación” intra e interespecies. En este estudio se investigó el efecto de los VOCs emitidos por ocho aislados del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* provenientes de cadáveres de insecto micosados y núcleos de suelo, con distintos grados de virulencia sobre las conductas reproductiva y alimenticia del lepidóptero *Spodoptera frugiperda*. Los aislados provinieron de diferentes comunidades del Estado de Chihuahua, México y su identidad taxonómica se corroboró por criterios morfológicos y moleculares. Los VOCs fúngicos se analizaron por la metodología de SPME-GC-MS. La actividad de los VOCs en adultos y larvas L2 de *S. frugiperda* se determinó mediante el uso de técnicas de olfatometría en jaulas y de elección y la cuantificación de la herbivoría en plantas de sorgo (*Sorghum bicolor*). Los perfiles aromáticos fueron cepa-específicos y se componen mayoritariamente de alcoholes, entre los que destaca la abundancia del alcohol de fusel 3-metilbutanol. Los VOCs de *B. bassiana*, así como el 3-metilbutanol modificaron la conducta de oviposición de los adultos y los patrones de herbivoría en el estadio larvario. Además, la respuesta olfatométrica es fuertemente condicionada por el contexto aromático. Este trabajo muestra evidencia de que los VOCs emitidos por el hongo entomopatógeno modulan los hábitos conductuales que son cruciales para la supervivencia del insecto, como son la reproducción, selección de sitio de oviposición y alimentación. Los resultados obtenidos aportan nueva información sobre el papel que desempeñan los VOCs en las interacciones hongo entomopatógeno-insecto dentro de contextos comunitarios y multitróficos.

Palabras clave: hongos entomopatógenos, *Beauveria bassiana*, compuestos orgánicos volátiles, semioquímicos, *Spodoptera frugiperda*, olfatometría, conducta en insectos.

ABSTRACT

Volatile organic compounds (VOCs) are low molecular weight molecules that occur in the gas phase at room temperature. The role of VOCs in nature is related to intra- and interspecies “communication”. In this study, the effect of VOCs emitted by eight isolates of *B. bassiana* from mycosed insect cadavers and soil cores with different degrees of virulence, on the reproductive and feeding behavior of the lepidopteran pest *Spodoptera frugiperda* was investigated. The isolates came from different communities in the State of Chihuahua, Mexico, and their taxonomic identity was corroborated by morphological and molecular criteria. The fungal VOCs were analyzed by SPME-GC-MS methodology. The activity of VOCs in adults and L2 larvae of *S. frugiperda* was determined by using cage and choice olfactometry techniques and quantifying the herbivory rate on shorgum (*Sorghum bicolor*). The aromatic profiles were strain-specific and mainly composed by alcohols, being the fusel alcohol 3-methylbutanol the most abundant compound. The VOCs from *B. bassiana* and 3-methylbutanol modified the oviposition behavior of adults and larval feeding patterns. Furthermore, the olfactometric response was strongly conditioned by the aromatic context. This study provides evidence that VOCs from the entomopathogenic fungus modulate behavioral habits that are crucial for the survival of insects, such as reproduction, choice of oviposition site, and feeding. These results provide new information on the role of VOCs in fungal entomopathogen-insect interactions in a multitrophic community contexts.

Keywords: fungal entomopathogens, *Beauveria bassiana*, volatile organic compounds, semiochemicals, *Spodoptera frugiperda*, olfactometry, insect behavior.

1. INTRODUCCIÓN

Entre los grupos de organismos más abundantes de la biósfera se encuentran los microbios, de los cuales se ha estimado una biomasa de 70 Gt, superada únicamente por el de las plantas terrestres (Bar-On *et al.*, 2018). Los microbios participan en procesos clave para el sostenimiento de la biósfera, como en los ciclos de reciclaje de bioelementos, dan estructura al suelo y los sedimentos marinos, facilitan la transferencia horizontal de genes entre taxones a lo largo de la historia evolutiva y, actualmente, establecen complejas interacciones entre ellos y otros organismos multicelulares. Estas interacciones son vitales para el funcionamiento de los ecosistemas y son el resultado de una larga historia de coevolución y desarrollo en ambientes con recursos restringidos, dando como resultado que estas relaciones ecosistémicas vayan desde la franca cooperación; como en el caso de los microbios promotores del crecimiento vegetal, hasta la competencia, la depredación, el parasitismo y la patogenicidad (Lang & Benbow, 2013).

En su historia evolutiva, los patógenos no solo debieron desarrollar estrategias para facilitar el proceso de infección, sino además diferentes mecanismos para incrementar sus probabilidades de encontrar un potencial huésped. Por este motivo, diferentes parásitos poseen la capacidad de modificar la conducta de sus huéspedes al hacer uso de señales, entre ellas las señales químicas y que reciben el nombre de semioquímicos (Heil, 2014).

Los hongos entomopatógenos son un grupo de microorganismos especializados en parasitar y consumir a diferentes grupos de artrópodos, entre ellos a los insectos. Las especies pertenecientes al género *Beauveria* son hongos de distribución cosmopolita, parasitan alrededor de ~700 especies de insectos y muchos de sus huéspedes son de importancia comercial como plagas o agentes vectores de enfermedades en humanos y animales (Imoulan *et al.*, 2017). Además, un aspecto interesante de la biología de *B. bassiana* es que se establece como

endófito en plantas. Esta interacción planta-hongo entomopatógeno ha generado mucho interés en los últimos años.

Las interacciones bióticas en la naturaleza se desarrollan dentro de un contexto comunitario y multitrófico, donde los miembros de diferentes taxones intercambian señales de distinta naturaleza, entre ellas diversas moléculas señal conocidas genéricamente como “semioquímicos” (gr. “*semeion*-”: señal) (Dicke & Sabelis, 1988). El estudio de estas señales químicas en el contexto ecosistémico representa uno de los objetivos principales de la ecología química, lo que contribuye a mejorar nuestra comprensión sobre los mecanismos evolutivos detrás de la comunicación en los seres vivos, así como ayuda a generar estrategias para su aplicación en áreas como el biocontrol de plagas agrícolas (Tyc *et al.*, 2017).

Las plantas se benefician de su interacción con los microbios en el suelo al estimular sus mecanismos de resistencia frente al estrés biótico, entre ellos la resistencia a la herbivoría por insectos (Tyc *et al.*, 2017). Si los hongos entomopatógenos estimulan estos mecanismos por mediación de semioquímicos volátiles y el impacto que tienen en su interacción con los insectos herbívoros es un aspecto de interés tanto teórico como aplicado.

El presente trabajo estudia el efecto de los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) producidos por *B. bassiana* sobre la conducta reproductiva y alimenticia en insectos. El insecto modelo usado fue el lepidóptero *Spodoptera frugiperda*, mejor conocido como “cogollero del maíz”, que es un insecto de importancia económica y que además ha cobrado especial relevancia por su rápida expansión como plaga por todo el mundo. Se utilizó como cultivo modelo al sorgo (*Sorghum bicolor*) por su rápido crecimiento *in vitro*, además de su importancia como cultivo alimenticio en México y el mundo.

2. ANTECEDENTES

2.1. Hongos entomopatógenos

Los hongos entomopatógenos constituyen un gremio trófico de microorganismos habitantes del suelo especializados en parasitar y consumir artrópodos de diferentes órdenes; entre ellos insectos. Son considerados entre los microbios parásitos de invertebrados más exitosos de la naturaleza por encontrarse distribuidos en todos los suelos de los ecosistemas terrestres y generalmente se considera que los suelos son su reservorio natural (Bruck, 2010). Hasta la fecha se conocen más de 1,000 especies de hongos entomopatógenos distribuidos en los filos Chytridiomycota, Blastocladiomycota, Entomophthoromycota, Microsporidia, Basidiomycota y Ascomycota. Dentro del orden de los Hypocreales (Ascomycota) se encuentra una gran diversidad de entomopatógenos ampliamente estudiados, junto con otros patógenos de plantas, endófitos, y micoparásitos. Entre los géneros más citados en la literatura y/o usados en formulaciones comerciales se encuentran *Beauveria*, *Isaria*, *Metarhizium*, *Lecanicillium* e *Hirsutella* (Vega et al., 2012; Wang & Wang, 2017).

Se especula que el estilo de vida parasítico de insectos se originó múltiples veces a lo largo de la historia evolutiva entre los diferentes grupos de hongos entomopatógenos, presumiblemente por saltos de huéspedes de diferentes filos, o incluso diferentes reinos. Esto pudo acontecer ya sea por la coexistencia del hongo con sus eventuales huéspedes artrópodos o bien por la cercanía o semejanza con un huésped ancestral (Wang & Wang, 2017). La evidencia fósil sugiere que la diversificación dentro del orden Hypocreales tuvo lugar en el periodo Cretáceo. Esto coincide con la expansión de las angiospermas en el planeta y la diversificación de los insectos dependientes directamente de las plantas con flores. En este orden encontramos muchos taxones con la capacidad de parasitar artrópodos, pero también a plantas y otros hongos, lo que sugiere que la diversificación de las plantas y su biota asociada (entre ellos los insectos fitófagos) impulsó el establecimiento de

nuevas interacciones parasitarias y patogénicas, principalmente con coleópteros, hemípteros y lepidópteros (Sung *et al.*, 2008).

El rango de especificidad entre diferentes hongos entomopatógenos es variable aún dentro de un mismo género. Por ejemplo, diversos aislados de *B. bassiana* infectan una amplia variedad de insectos huéspedes y son reconocidos generalmente como patógenos generalistas (Ortiz-Urquiza & Keyhani, 2016). Por otra parte, *Metarhizium acridum*, se especializa en infectar insectos de la familia Acrididae, por lo que se le ha usado con éxito para el control de langostas y chapulines en México, Australia y el continente africano, lo que contrasta con *M. anisopliae* que tiene un rango amplio de huéspedes (Moon *et al.*, 2017). Estas diferencias están correlacionadas con la variedad de enzimas proteasas, citocromos P450 y metabolitos secundarios secretados por ambos hongos y que suelen ser más diversas para el generalista *M. anisopliae* en comparación con *M. acridum*. A su vez, *M. anisopliae* al iniciar el proceso de infección en langosta y cucaracha utiliza un solo receptor de membrana acoplado a proteína G para el reconocimiento de ambas especies de huésped, sin embargo, *M. acridum* necesita la expresión de diferentes receptores de cutícula para poder infectar a huéspedes distintos (Sree & Joshi, 2015; Gao *et al.*, 2011). Otro ejemplo de hongo patógeno especialista es *M. rileyi* que ataca principalmente a los lepidópteros de las familias Noctuidae, Erebidae y Nymphalidae (Binneck *et al.*, 2019).

Algunos de los ejemplos de infecciones de entomopatógenos más sorprendentes en la naturaleza los encontramos en los hongos que manipulan el comportamiento de sus huéspedes antes de matarlos, esto con el fin de aumentar la dispersión de sus propágulos y completar su ciclo de vida. Por ejemplo, *Massospora cicadina* se especializa en la infección de cicadas (*Magicalcada* spp.) en oleadas regulares sincronizadas con el ciclo de vida y la emergencia del insecto, en periodos de 13 a 17 años. Durante el ciclo infectivo, el hongo prolifera y esporula en el abdomen del huésped sin matarlo, esto conduce a la ruptura y pérdida del último

segmento abdominal del insecto, de tal forma que mientras el huésped se mueve el hongo propaga sus esporas por el ambiente. Otro aspecto interesante de esta especie es el hecho de que los machos infectados responden a los llamados de cortejo de otros machos con un sonido característico producido por el batido de sus alas semejante al producido solo por las hembras receptivas. Esto estimula a los machos sanos a intentar copular con los infectados y de esta forma se incrementa la propagación de la infección de las poblaciones de cicadas (Cooley *et al.*, 2018).

2.2. El ciclo infectivo de los hongos entomopatógenos

El ciclo de vida de los hongos entomopatógenos, en general, comienza con la liberación de las esporas por los esporangios en el micelio que crece sobre los cadáveres de los insectos micosados. Las esporas son arrastradas por las corrientes de aire o agua con mucha facilidad, pues en muchos casos tienen la característica de ser insolubles en agua debido a la presencia de proteínas conocidas como “hidrofobinas” que las recubren. Estos son péptidos de bajo peso molecular (~ 20 kDa) caracterizados por su alta hidrofobicidad y por la presencia de ocho residuos de cisteína conservados, que forman cuatro puentes disulfuro. Esta característica le confiere a la proteína una mayor afinidad por la cutícula hidrofóbica que recubre a los insectos y facilita la adhesión de las esporas al entrar en contacto con un potencial huésped (Bayry *et al.*, 2012). Además de la adhesión provista por la propia hidrofobicidad de las esporas y la cutícula, se han encontrado receptores a componentes específicos en la cutícula, por ejemplo, la adhesina Mad1 de *M. robertsii*. Interesantemente, este hongo produce una segunda adhesina (Mad2) expresada cuando el hongo se expone a exudados de planta (Wang & Leger, 2007, Barelli *et al.*, 2011). Las mutantes $\Delta Mad1$ no solamente muestran reducida su adhesión a la cutícula, sino también disminuye la germinación de las esporas, la producción de blastosporas y en general el fenotipo de virulencia. Sin embargo, el mecanismo de adhesión y el blanco molecular de estas adhesinas sigue sin ser caracterizado (Ortiz-Urquiza & Keyhani, 2013). A diferencia de otros patógenos de

invertebrados que necesitan ser ingeridos por el huésped para poder infectarlo, los hongos entomopatógenos comienzan el proceso de infección desde el exterior del insecto, al penetrar activamente la cutícula. Así, cuando los propágulos se han adherido al cuerpo del huésped, estas esporas germinan y en muchos casos forman un apresorio. Es interesante notar que dicho proceso en *Metarhizium* es promovido por lípidos polares, ácidos grasos de cadena larga, y diversos alcanos metilados y metil o etil esterificados, todos ellos forman parte de los componentes de la cutícula de los insectos (Li & Xia, 2022). Se conocen diferentes genes involucrados en los eventos de señalización durante estas etapas de germinación y reconocimiento del huésped, incluyendo a diferentes componentes de la vía de proteína cinásas activadas por mitógenos (MAPK), y que en *B. bassiana* incluyen a los genes *BbBck1* (MAPKKK), *BbMkk1* (MAPKK), *BbSlt2* y *Hog1* (ambos MAPK) (Ortiz-Urquiza & Keyhani, 2016). Durante este proceso de penetración, el hongo también produce diversas enzimas encargadas de degradar los componentes del exoesqueleto del huésped, entre las que destacan las quitinasas y las proteasas por su sobre-representación en el genoma de diferentes hongos entomopatógenos (Staats *et al.* 2014). En cualquier caso, el hongo penetra los tegumentos del insecto hasta llegar al hemocele y que es el compartimento interno del insecto bañado en la hemolinfa (Li *et al.*, 2020).

Los hongos entomopatógenos comparten con otros hongos patógenos su capacidad de dimorfismo; esta es una característica fundamental durante el proceso de infección (Gauthier, 2015). En el hemocele, el micelio sufre una transición a fase levaduriforme descrita como “cuerpos hifales”, también conocidas como “blastosporas” (Bidochka *et al.*, 1987). Los factores desencadenantes de la transición de levadura a micelio en hongos entomopatógenos no se entienden completamente (Mascarin, *et al.*, 2021). En otros hongos dimórficos, factores como la temperatura, las condiciones anaerobias, el estatus nutricional del medio circundante, o el reconocimiento de moléculas específicas por parte del hongo inducen esta transición (Gauthier, 2015). Una combinación de todos estos factores

junto con el reconocimiento de una señal molecular en la hemolinfa del huésped pueden ser los desencadenantes del paso de micelio a blastospora. La producción *in vitro* de esta fase en *B. bassiana* es favorecida por altas concentraciones de carbohidratos tales como la glucosa. La caracterización transcriptómica de blastosporas crecidas en medio líquido enriquecido con glucosa a concentración del 20% revela la ejecución de un intenso programa celular que incluye procesos como un intenso transporte transmembranal, la activación del metabolismo de los carbohidratos, cambios en la respuesta al estrés oxidativo, y procesos que involucran a la replicación del DNA y transcripción (Mascarín *et al.*, 2021). De manera semejante, en otro estudio transcriptómico que compara la fase filamentosa y levaduriforme inducida *in vitro* de *M. anisopliae* se encontró que los principales procesos fisiológicos asociados con los genes sobre expresados durante la fase de blastosporas son aquellos involucrados en la respuesta al estrés oxidativo, el catabolismo y anabolismo de aminoácidos, en procesos respiratorios, el transporte transmembranal y en la producción de metabolitos secundarios, en comparación con la fase filamentosa en donde los procesos asociados son el crecimiento celular y la reorganización de la pared celular principalmente (Iwanicki *et al.*, 2020). Interesantemente, *B. bassiana* desarrolla una fase levaduriforme al ser crecida en medio agar Macconkey o en SDA suplementado con NaCl, esto llevó a especular a Alves *et al.* (2002) que la concentración de sal y la presión osmótica contribuyen también a la inducción de esta transición dimórfica. Esto es consistente con la observación de que las formulaciones utilizadas para la propagación de blastosporas dan mejores rendimientos al incrementar la presión osmótica del medio líquido, junto con el hecho de que la hemolinfa de los insectos es un medio altamente hiperosmótico (0.7-1.2 MPa) (Mascarín & Jaronski, 2016).

Al proliferar en el insecto, el hongo invade todos los tejidos del huésped, degradándolos y provocándole la muerte. Este proceso va acompañado de la producción de diversos metabolitos secundarios, entre ellos diferentes micotoxinas fúngicas que se especula contribuyen en el proceso y son consideradas factores de

virulencia (Tola *et al.*, 2016). Muchos de estos metabolitos secundarios son péptidos no ribosomales o policétidos, como la bauvericina, bassianolido, oosporeína, bassiatina, tenelina, y diversos bauverólidos producidos por *B. bassiana*; por su parte las especies de *Metarhizium* spp. producen principalmente los hexadepsipéptidos denominados destruxinas (Pedrini, 2022). Muchos de estos compuestos no solamente actúan como micotoxinas, pues además tienen un efecto antimicrobiano. Tal es el caso de la oosporeína, de la que no se observó intervenir en la virulencia sobre *Galleria mellonella* en mutantes de *B. bassiana* afectadas en la biosíntesis de esta dibenzoquinona, pero sí inhibió el crecimiento bacteriano en cadáveres de insectos infectados por el hongo, y en consecuencia disminuyó la competencia del hongo con la microbiota bacteriana en el cadáver, permitiéndole de esta manera la máxima asimilación de nutrientes, seguido de la subsecuente esporulación sobre el cadáver (Fan *et al.*, 2017).

Finalmente, la fase levaduriforme vuelve a sufrir una transición a micelio y germina para penetrar los tegumentos del insecto, dándole a los cadáveres infectados un aspecto blanco y algodonoso característico. Al esporular, el hongo vuelve a generar sus propágulos y el ciclo de infección vuelve a ocurrir.

2.3. Los hongos entomopatógenos y su interacción con las plantas

Los hongos entomopatógenos no se limitan únicamente a establecer relaciones parasíticas con artrópodos, pues tienen además la capacidad de explotar otros nichos tróficos, incluidos el suelo, las raíces o el interior de los tejidos vegetales. Las consecuencias de estas interacciones en las relaciones microbio-planta-insecto han comenzado a ser exploradas recientemente (Shikano, 2017).

En su interacción con los microbios del suelo, las plantas se enfrentan a potenciales agentes fitopatógenos. Las plantas responden de diferentes maneras, y una de ellas es al establecer interacciones benéficas con organismos que puedan ayudarles a defenderse por medio del antagonismo directo (por competencia de nutrientes o espacio, la producción de compuestos antimicrobianos, entre otros)

(Enebe & Babalola, 2019), o bien por la estimulación de los mecanismos de defensa innatos de la planta, en un fenómeno conocido como resistencia sistémica inducida (ISR, por sus siglas en inglés), mediado principalmente por la participación de las hormonas ácido jasmónico y etileno (Pieterse *et al.*, 2012; Pieterse *et al.*, 2014) y de cuya señalización se desencadenan la producción de, por ejemplo, peroxidasas, polifenol oxidasas y lipooxigenasas (Choudhary *et al.*, 2007), la producción de péptidos antimicrobianos conocidos como defensinas (Khan *et al.*, 2019) o la acumulación de fitoalexinas (Pandey *et al.*, 2016; Ahuja *et al.*, 2012).

De esta forma, se han reportado diferentes aislados fúngicos capaces de inducir ISR. En un ensayo de *B. bassiana*, *M. brunneum* y *Trichoderma harzianum* como cepa de referencia se encontró que la inoculación de estos aislados sobre plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum* var. Ram) le conferían resistencia contra el ataque de los fitopatógenos *Botrytis cinerea*, *Leveillula taurica*, *Oidium neolycopersici* y *Xanthomonas euvesicatoria* a los tres días post inoculación. Esta respuesta se acompañó del incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno y la expresión de las proteínas relacionadas a la patogénesis PR1a, PR1b y el factor de respuesta a etileno ERF1 (Gupta *et al.*, 2022).

En un estudio sobre plantas de trigo (*Triticum aestivum*) con *B. bassiana* y *M. brunneum* se observó que durante los primeros 15 días posteriores a la inoculación con estos hongos disminuía la expresión de diferentes genes asociados con la inmunidad vegetal y la síntesis de las hormonas auxinas, citocinas y giberelinas, seguido de un incremento en la expresión de genes asociados con auxinas y giberelinas posterior a los 15 días. Estos eventos se asociaron con el comienzo de un estado de resistencia sistémica, evidenciado por la activación del gen *PR10* y que está correlacionado con la activación de genes asociados a la biosíntesis de jasmonato, auxinas y ácido giberélico (González-Guzmán *et al.*, 2022).

La coinoculación de *B. bassiana* (Balsamo) cepa B2 con las cepas *Pseudomonas fluorescens* Pf1 y AH1 en plantas de arroz induce un incremento en

la actividad de quitinasas y lipooxigenasas durante el ataque del lepidóptero plaga *Cnaphalocrocis medinalis*, así como la acumulación de peroxidasas y polifenoloxidasas durante el ataque del hongo patógeno *Rhizoctonia solani*, el agente causal del tizón de la vaina en el arroz. Lo más atractivo de esta aproximación en el uso de consorcios contra estos agentes dañinos del arroz es su eficacia, comparable incluso a los resultados obtenidos con el uso de la mezcla de los plaguicidas comerciales clorpirifós y carbendazim (Karthiba *et al.*, 2010).

La microbiota del suelo participa activamente en el reciclaje de nutrientes en la biósfera, y los hongos habitantes del suelo son una parte integral en estos ciclos. En particular, los entomopatógenos favorecen el reciclaje de nitrógeno en el suelo al conectar directamente las carcasas de los insectos micosados con las raíces de las plantas por medio de sus hifas. Utilizando a *Galleria mellonella* a la que se le habían incorporado aminoácidos marcados con ^{15}N , Behie *et al.* (2012) demostraron que *Metarhizium robertsii* facilita la incorporación del nitrógeno de los cadáveres del insecto en la biomasa de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) y *Panicum virgatum* en un sistema de microcosmos. Ensayos posteriores demostraron que esta asociación endofítica y la transmisión de nitrógeno se observaba también en al menos cinco especies de *Metarhizium* (*M. robertsii*, *M. brunneum*, *M. guizhouense*, *M. acridium* y *M. flavoviride*) y cuatro especies vegetales (*Phaseolus vulgaris*, *Glycine max*, *Panicum virgatum* y *Triticum aestivum*). La asociación simbiótica de los entomopatógenos con las plantas les ayuda a estos a obtener una fuente de carbono a cambio de proveer a las plantas con el nitrógeno de los cadáveres de los insectos, de donde se estima contribuyen a las plantas con alrededor del 4.7% del total de nitrógeno fijado en todo el ecosistema (Behie *et al.*, 2012; Behie & Bidochka, 2014).

Los entomopatógenos además inducen la adquisición de Fe en medios calcáreos y no calcáreos con varias formas de hierro (ferrihidrita, hematita y goetita) haciendo uso de varios métodos inoculación (recubrimiento de semilla, tratamiento

del suelo o aspersión foliar) en plantas de sorgo (*S. bicolor*). El principal mecanismo para lograr esto es al cambiar el pH del sustrato. De esta forma, *M. brunneum* disminuye la acidez del medio al liberar ácidos orgánicos. Además, se especula que estos hongos liberan sideróforos para aumentar la disponibilidad de hierro del medio circundante (Raya-Díaz *et al.*, 2017). El hierro también es un elemento limitante durante el proceso de patogénesis en el ciclo parasítico. Una pregunta abierta es si los mismos factores de virulencia implicados durante el proceso de infección como patógenos están a su vez relacionados con el proceso de captación de hierro durante su ciclo saprofitico, y si las plantas se benefician de este proceso para adquirir el hierro. Esta misma maquinaria de captación de hierro ambiental posiblemente desempeña funciones determinantes durante el proceso de infección en algunos hongos entomopatógenos, en vista de que las especies ancestrales de éstos eran probablemente endófitos (Wang & Wang, 2017).

Otros elementos que los hongos entomopatógenos ayudan a las plantas a captar del suelo son el fósforo, magnesio y calcio, además de incrementar la retención de agua en la raíz (Dara, 2019). Todos los beneficios anteriores permiten considerar a los hongos entomopatógenos no solamente como eficaces agentes de biocontrol, sino también como hongos promotores del crecimiento vegetal (PGPF, por sus siglas en inglés) (Jaber & Ownley, 2018).

2.4. *Beauveria bassiana* como agente de biocontrol en insectos

El principal interés que han recibido los hongos entomopatógenos es por su uso como agentes de biocontrol contra diferentes plagas de artrópodos. Múltiples casos de éxito se reportan en la literatura sobre el uso de estos microbios en el control de plagas de insectos, lo que motiva la existencia de un mercado con productos con una amplia variedad de formulaciones fúngicas; ya sea en solitario o en consorcios microbianos (Faria & Wraight, 2007).

Beauveria es un género de hongos anamórficos, cosmopolitas, y patógenos facultativos de artrópodos y que habitan principalmente en el suelo. Su taxonomía

ha estado sujeta a diferentes modificaciones a lo largo del tiempo. Rehner *et al.* (2011) enumeran a 12 clados terminales con un soporte adecuado, esto por medio de un análisis filogenético multilocus basado en las secuencias parciales de RPB1, RPB2, TEF y la región nuclear intergénica Bloc. Las especies (clados terminales) que reconoce como válidas son: *B. bassiana*, *B. amorpha*, *B. asiatica*, *B. australis*, *B. brongniartii*, *B. caledonica*, *B. kipukae*, *B. malawiensis*, *B. pseudobassiana*, *B. sungii*, *B. varroae* y *B. vermiconia* (Rehner *et al.*, 2011).

En particular, *Beauveria bassiana* se describió por primera vez en 1835 por Agostino Bassi como el agente causal de la llamada “muscardina blanca”, una enfermedad en insectos sobre la que se tenía especial interés, pues atacaba al gusano de la seda convirtiendo sus cuerpos en masas blanquecinas y endurecidas cubiertas de un polvo blanco, dándole el nombre a la enfermedad. Posteriormente, se clasificó por Jean Beauverie como *Botrytis bassiana*, en honor a Bassi, y eventualmente en 1912 Jean Paul Vuillemin lo renombró *Beauveria bassiana* (Dannon *et al.*, 2020). Este hongo junto con *M. anisopliae* son los agentes más usados en las formulaciones tanto insecticidas como micopesticidas, con presencia en el 33.9% del total de productos (Faria & Wraight, 2007).

Como agente de biocontrol, *B. bassiana* se ha usado contra un gran número de insectos plaga en el mundo, principalmente en países de África, América y Asia. La amplia variedad de huéspedes que coloniza lo convierte en un poderoso agente de biocontrol, con alrededor de 700 especies de insectos potencialmente atacados por este hongo. En general, la producción de *B. bassiana* en grandes volúmenes es económica comparada con la fabricación y almacenaje de pesticidas sintéticos. Aunado a esto, unos pocos propágulos adheridos a la cutícula del insecto son suficientes para infectarlo, y las poblaciones de plagas no generan mecanismos resistencia como en el caso de los pesticidas sintéticos (Dannon *et al.* 2020; Rohrllich *et al.*, 2018).

2.5. Los semioquímicos en la comunicación interespecie

La comunicación es un fenómeno presente en todos los sistemas vivos y es requerido para su funcionamiento en todos sus niveles. La comunicación en biología se define como el intercambio entre señales y respuestas entre emisor y receptor. Los ecosistemas dependen de la comunicación entre sus miembros para el mantenimiento de su organización y estructura, lo que involucra el intercambio de diferentes señales entre sus partes que logra la funcionalidad del sistema. La comunicación se da a diferentes niveles e involucra a distintos subsistemas (Scott-Phillips, 2008; Carazo & Font, 2010).

A las moléculas señal mediadoras de la comunicación química se les conoce con el nombre genérico de “infoquímicos” (Kost, 2008). Estos infoquímicos son clasificados en dos tipos. Cuando son requeridos en la comunicación dentro del propio organismo se les conoce como “hormonas”. Las hormonas se dividen en tres grandes categorías: exócrinas, endócrinas y parácrinas. Por otra parte, a los compuestos señal que se utilizan en la comunicación entre diferentes individuos se les conoce como “semioquímicos”. Estos se subdividen en función de si son usados para la comunicación intra- o inter- específica. En el primer caso, se les conoce con el nombre de “feromonas”, y en el segundo caso se les llama “alelomonas”. También existen diferentes subtipos de ambas categorías en función de los efectos y beneficios de los emisores y receptores (Wehrenfennig *et al.*, 2013; Dicke & Sabelis 1988).

Se cree que las señales químicas surgen por medio de un mecanismo conocido como “ritualización química” (Steiger *et al.*, 2011). Este mecanismo consiste en el paulatino desarrollo de un conjunto de estímulos y respuestas asociadas a la presencia de un compuesto producido por el organismo emisor. En un primer momento, este compuesto es percibido por el receptor e inicia una respuesta totalmente inespecífica que no involucra un aparato de comunicación especializado con un ajuste específico hacia la señal recibida. La presión selectiva

incrementa tanto la especificidad del receptor como su respuesta, además de la calidad de la señal emitida, lo que vuelve más eficiente el canal de comunicación establecido entre ambos miembros y, de esta manera, se crea un sistema de comunicación completamente funcional con el paso de las generaciones (Steiger *et al.*, 2011).

2.6. La percepción odorífera en insectos y su contexto ecológico

Como el resto de los animales, los insectos perciben una gran variedad de señales de su medio, tanto del espectro electromagnético, presión, temperatura y/o vibraciones. Sin embargo, las señales químicas son las de mayor relevancia para que los insectos puedan tener una visión completa de su entorno y puedan completar su ciclo de vida (Fleischer *et al.*, 2018). La quimiopercepción de aromas en los insectos está ubicada en diferentes regiones del cuerpo, pero principalmente en las antenas y los palpos maxilares (Wicher & Miazzi, 2021). Estas, a su vez, poseen estructuras parecidas a cabellos llamadas sensilas y en cuyo interior se localizan de una a cuatro neuronas sensoriales olfativas (en inglés *olfactory sensory neurons*; OSN) (Leal, 2013). En la membrana de estas neuronas se localizan diferentes tipos de proteínas receptoras, entre ellos los receptores a olores (*odorant receptors*, OR) que generalmente requieren de la acción conjunta de una proteína correceptora de olores (*odorant receptor correceptor*, Orco). Se cree que la unión de la molécula odorífera induce la formación de un canal catiónico heterodímérico OR-Orco de tipo no selectivo, permitiendo el paso de cationes Na^+ , Ca^{++} y K^+ (éste último es particularmente abundantes en la hemolinfa que baña el interior de las sensilas) lo que desencadena la despolarización de la membrana. De esta forma se origina un potencial de membrana que es transmitido por el sistema nervioso del insecto (Pask & Ray, 2016). Otro tipo de receptor presente en el sistema nervioso de los insectos son los receptores ionotrópicos (*ionotropic receptors*; IR) que son proteínas pertenecientes a la familia de receptores de glutamato, con estructura de heterotetrámeros. Mientras que los OR se especializan exclusivamente en la

percepción de aromas, los IR están involucrados en la percepción tanto de aromas y sabores, como en la percepción de la temperatura o de la humedad (Wicher & Miazzi, 2021). Las señales generadas de esta forma son transmitidas al lóbulo antenal y de allí a otras regiones de integración y procesamiento de alto nivel en el sistema nervioso central del insecto (Galizia & Sachse, 2010).

Los insectos perciben aromas en concentraciones extremadamente bajas, en el orden de los picogramos por metro cúbico de aire en lapsos de milisegundos para algunos compuestos en específico (Schott *et al.*, 2013). Esto los convierte en organismos altamente sensibles a moléculas aromáticas. De esta forma, los insectos se crean de una visión global de su entorno. Esta capacidad constituye una parte importante en su supervivencia, utilizándola para encontrar fuentes de alimento, sitios de refugio, para la búsqueda de pareja, la evasión de potenciales amenazas y para la selección de sitios de anidamiento. La manera en que el insecto responde a los aromas es el resultado de diferentes factores tanto intrínsecos a su fisiología como al ambiente a su alrededor. Estos factores incluyen el estadio del ciclo de vida, las condiciones nutricionales, el grado de especialización, las experiencias previas (ligadas al aprendizaje asociativo y no asociativo) y el contexto aromático donde se encuentra el insecto al momento de percibir las señales químicas (Conchou *et al.*, 2019; Su *et al.*, 2011; Cook *et al.*, 2020; Swanson *et al.*, 2009). Además, diferentes especies de insectos expresan grupos distintos de OR con diversas afinidades y umbrales de sensibilidad a los aromas del medio. De esta manera, se ha definido como “paisaje aromático” (*odorscape*) al conjunto de compuestos aromáticos (volátiles) y que constituyen el espacio sensorial propio de una especie particular de insecto (Conchou *et al.*, 2019).

2.7. Compuestos orgánicos volátiles (VOCs) emitidos por hongos

Se les llama compuestos orgánicos volátiles (en inglés *volatile organic compounds*, VOCs) a las moléculas de bajo peso molecular (<300 Da) que se encuentran en fase de vapor a temperatura ambiente, y por este motivo son capaces

de difundir con facilidad en el medio gaseoso, arrastrados por las corrientes de aire, o por difusión en medios líquidos como el agua (Ortiz-Castro *et al.*, 2009; Weisskopf *et al.*, 2021). Dentro de esta categoría se encuentran una gran variedad de compuestos pertenecientes a diferentes familias químicas sin un origen biosintético común (alcoholes, cetonas, éteres, ésteres, hidrocarburos lineales o ramificados, compuestos aromáticos, azufrados y derivados del nitrógeno, entre los principales), con diferentes grados de reactividad y vida media. Sin embargo, una característica fisicoquímica que comparten es el tener baja polaridad, esto junto con su peso molecular bajo les permite escapar a fase gaseosa en condiciones normales de presión y temperatura (Ortiz-Castro *et al.*, 2009). Los VOCs son los responsables de impartir las propiedades aromáticas de la gran mayoría de los productos alimenticios, además de ser contaminantes trazas en el medio, o biomarcadores de la perturbación humana ambiental (Pagans *et al.*, 2006). En ecología, a los VOCs se les ha atribuido diferentes propiedades como mediadores de la comunicación intra- e inter- reino, manifestándose en diferentes efectos en los organismos, por ejemplo: como promotores del crecimiento vegetal, moduladores de defensa, propician la adquisición de nutrientes del suelo en plantas, o inducen conductas en animales, por mencionar algunos (Weisskopf *et al.*, 2021).

Diferentes rutas metabólicas en hongos dan origen a los VOCs. Tanto el metabolismo primario como el secundario producen una gran cantidad de intermediarios y productos que son de naturaleza volátil. Las principales rutas implicadas en la producción de VOCs son la ruta del ácido shikímico, que genera compuestos benzenoides y fenilpropanoides, la ruta del ácido mevalónico que sintetiza terpenos, y la ruta de las lipooxigenasas que produce oxilipinas (Weisskopf *et al.*, 2021).

Los hongos sintetizan diversos terpenos. A diferencia de las plantas que cuentan con dos rutas de biosíntesis, los hongos cuentan exclusivamente con la vía del ácido mevalónico para la producción de los precursores isopentenil difosfato

(IPP) y dimetilalil difosfato (DMAPP). Las sucesivas condensaciones de IPP y DMAPP catalizadas por diferentes isoprenil difosfato sintetasas (IPPS) dan origen a isoprenil difosfatos de 10, 15 y 20 carbonos; estos son los precursores de los mono-, sesqui- y diterpenos, respectivamente (Oldfield & Lin, 2012; Schmidt-Dannert, 2014). Los terpenos de los hongos tienen múltiples funciones, entre ellas la señalización intra e inter- celular, forman parte de los componentes de la membrana celular, o actúan como micotoxinas (Schmidt-Dannert, 2014).

Los hongos sintetizan compuestos fenólicos por medio de la ruta del shikimato, que utiliza a la eritrosa-4-fosfato del ciclo de las pentosas fosfato y del ciclo de Calvin, y al fosfoenolpiruvato de la glucólisis para la producción de los aminoácidos aromáticos L-fenilalanina, tirosina y triptófano, en donde se obtiene como un intermediario clave en esta vía al ácido shikímico, del cual recibe su nombre. Algunos VOCs producidos por esta vía son la 2-aminoacetofenona, el metil benzoato, o de forma indirecta el 2-feniletanol derivado de la L-fenilalanina por la vía de Erlich (Tzin *et al.*, 2012; Weisskopf *et al.*, 2021).

La ruta de las lipooxigenasas es la responsable de producir el ácido jasmónico y los volátiles de hoja verde en plantas, así como las oxilipinas de ocho carbonos características de hongos. Esto ocurre debido a la acción de enzimas lipooxigenasas que forman el hidroperóxido del ácido linoleico (C18:2), molécula que posteriormente es escindida por la acción de una peróxido liasa en dos moléculas: el ácido 10-oxodecenónico (C10) y la 1-octen-3-ona (C8), y que gracias a la acción un alcohol oxidoreductasa se reduce para formar el 1-octen-3-ol, un compuesto implicado en el proceso de esporulación (Combet *et al.*, 2006) y cuyo efecto en plantas está relacionado con la inducción de resistencia contra patógenos (Kishimoto *et al.*, 2007). En función de donde se forme el hidroperóxido en el primer paso de la reacción también varía el producto de ocho carbonos final (Combet *et al.*, 2006; Holighaus & Rohlfs, 2019).

Entre los VOCs emitidos por hongos, los alcoholes son la familia química más estudiada. De estos, es de destacar a los conocidos como alcoholes de fusel (*fusel alcohols*) que se producen como resultado de la transaminación de un L-aminoácido, lo que da lugar a la formación de su respectivo alfa-cetoácido, seguido de su descarboxilación y reducción, que da como producto final un alcohol que conserva el grupo lateral del aminoácido original. Así, por ejemplo, la L-fenilalanina se transforma por esta ruta en 2-feniletanol, la L-treonina en 1-butanol, y la L-leucina se convierte en alcohol isoamílico (3-metilbutanol). Esta ruta recibe el nombre de la “vía de Ehrlich” y es especialmente importante en la industria alimenticia por los potentes aromas que estos alcoholes imparten a los alimentos y bebidas, particularmente aquellos obtenidos por procesos fermentativos (Dzialo *et al.*, 2017; Ravasio *et al.*, 2014). Además, se conoce su actividad como compuestos moduladores del crecimiento en hongos (Lorenz *et al.*, 2000).

Finalmente, otra fuente de VOCs son los procesos fermentativos (de donde se originan p. ej. etanol, acetoína), los intermediarios y productos del metabolismo del azufre (dimetil sulfuro, ácido sulfhídrico), entre otros (Weisskopf *et al.*, 2021; Kaddes *et al.* 2019; Schulz & Dickschat, 2007).

2.8. VOCs emitidos por *B. bassiana*

Diferentes reportes de los VOCs producidos por *B. bassiana* y otros entomopatógenos indican que poseen una huella química diversa, compuesta de alcoholes, cetonas, hidrocarburos lineales y ramificados, compuestos aromáticos y terpenos. Sin embargo, la literatura carece de estudios dirigidos a obtener perfiles globales que representen la variación fenotípica y consideren diferencias cepa-específicas, producto de las variaciones hacia la fuente ambiental o de la virulencia dentro de la misma especie.

Lobo *et al.* (2018) caracterizaron los ácidos grasos de cadena corta emitidos por las glándulas de Brindley del insecto vector de la enfermedad de Chagas *Triatoma infestans* infectado con el entomopatógeno *B. bassiana* en comparación

con insectos sin infectar, y se observó que los insectos infectados emitían una mayor cantidad de ácido propiónico de los días 1 a 4 post infección, lo que se correlacionó con el incremento de la expresión de los genes *TiBrnq* (permeasa de aminoácidos de cadena ramificada) y *TiBckdc* (cinasa de deshidrogenasa de cetoácidos de cadena ramificada), ambos presuntamente involucrados en la biosíntesis de ácidos grasos de cadena corta (Lobo *et al.*, 2018).

Mburu *et al.* (2013) caracterizaron los volátiles de las cepas *B. bassiana* ICIPE 276 y 278, dominadas principalmente por el hexanol, 1-pentanol, 3-octanol, y octanol, además de las cetonas 4-nonanona y 2-nonanona. Junto a esto, destacaron la presencia de los monoterpenos alcanfor y borneol, y las lactonas butirolactona y 4,5-dihidro-5-pentil-2-(3H) furanona. Notablemente, se observaron diferencias en la emisión de estos componentes, sin que se encontraran compuestos exclusivos de alguno de los aislados fúngicos. Además, se observaron diferencias en la repelencia inducida sobre la termita *Macrotermes michaelseni* en ensayos de olfatometría dual en Y. Estudios preliminares (Mburu *et al.*, 2009) habían encontrado que estos aislados presentaban diferentes niveles de virulencia contra *M. michaelseni*. De esta manera, los autores concluyen que las diferencias en la virulencia de los aislados de *B. bassiana* hacia el insecto se ven reflejados en los diferentes perfiles de VOCs y niveles de repelencia asociados (Mburu *et al.*, 2013).

Hussain *et al.* (2010a) estudiaron la repelencia inducida sobre las termitas *Coptotermes formosanus* por diferentes aislados de hongos entomopatógenos de las especies *M. anisopliae* (EBCL 02049), *B. bassiana* (EBCL 03005) e *Isaria fumosorosae* (EBCL 03011) en un sistema de elección dual compuesto de dos compartimentos conectados a una fuente de VOCs que consistió del medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA) inoculado. Los análisis de los perfiles de VOCs *B. bassiana* mostraron que estos estaban constituidos principalmente por los monoterpenos 2-tujeno y 2-isopropil-5-metil-3-ciclohexen-1-ona. Es notable que entre los compuestos emitidos se observó una gran diversidad de hidrocarburos

ramificados (2,5,9-trimetildecano, 4,6-dimetildodecano, 2,7,10-trimetildodecano) y un hidrocarburo lineal (el n-tetradecano) (Hussain *et al.*, 2010a).

Hussain *et al.* (2010b) estudiaron las diferencias en los perfiles de *B. bassiana* (EBCL 03005), *M. anisopliae* (EBCL 406) y *M. anisopliae* (EBCL 02049), y encontraron nuevamente perfiles de VOCs enriquecidos con diversos hidrocarburos ramificados (4,7-dimetilundecano, 2,3,7-trimetiloctano, 2,3,5-trimetiloctano, entre otros) y lineales (n-tetradecano y n-hexadecano). Adicionalmente, los perfiles obtenidos se modificaban sustancialmente con las resiembras, esto a su vez se correlacionó con la pérdida gradual de la virulencia de los aislados. De la misma forma, se observaron diferencias específicas entre las cepas *M. anisopliae* EBCL 406 y 02049 (Hussain *et al.*, 2010b).

Crespo *et al.* (2008, 2002) perfilaron el aislado *B. bassiana* GHA crecido en medios definidos suplementados con glucosa o con el alcano n-octacosano, molécula elegida por su afinidad a los hidrocarburos encontrados en las cutículas de los insectos. Se encontró que al crecer el hongo en medio suplementado con glucosa se obtenían perfiles de VOCs enriquecidos con etanol y dos sesquiterpenos cuya identidad no se dilucidó en este trabajo. Por otra parte, al crecer el hongo en medio enriquecido con el n-octacosano los perfiles carecían de alcoholes y terpenos, pero se observó la presencia del n-decano. Esto es el reflejo de la adaptación del hongo al sustrato sobre el que crece, y en particular de la capacidad del hongo para degradar alcanos pues, según los autores, posiblemente esta correlacionado con un fenotipo de virulencia incrementado (Crespo *et al.*, 2008; Crespo *et al.*, 2002).

El origen de los hidrocarburos observados en los perfiles de *B. bassiana* ha sido explicado como el resultado de la capacidad de la maquinaria enzimática del hongo para degradar los componentes de la cutícula del insecto durante las etapas iniciales de penetración. La presencia de estos hidrocarburos sería el resultado de

la degradación por beta oxidación de los hidrocarburos de cadena larga (alcanos, alquenos y derivados metilados) presentes en la cutícula (Ortiz-Urquiza *et al.*, 2013)

Lozano-Soria *et al.* (2020) estudiaron la capacidad de los VOCs emitidos por los aislados de entomopatógeno *B. bassiana* Bb1TS11, Bb203 y *M. robertsii* Mr4TS04, así como el hongo nematófago *Pochonia clamydosporea* Pc123, para repeler al picudo del plátano *Cosmopolites sordidus*. Los perfiles de *B. bassiana* (Bb1TS11 y Bb203) en conjunto mostraron un total de 27 compuestos. Los perfiles reportados en este estudio son relevantes porque muestran una gran variedad de compuestos de ocho carbonos característicos de los perfiles de VOCs fúngicos, como octenos y octadienos (1-octeno, 1,3-octadieno, 2,4-octadieno) y una octanona (3-octanona), y que en general se encuentran poco representados en otros reportes de VOCs emitidos por *B. bassiana*. Destacan además algunos monoterpenos (α - y β -pineno, 2-metil-2-borneno, borneol), y un sesquiterpeno (el gimnomiteno) (Lozano-Soria *et al.*, 2020).

2.9. Etología en insectos mediada por VOCs fúngicos

Los insectos responden a los estímulos ambientales por medio de conductas adaptativas que les confieren la capacidad de enfrentar a las amenazas del medio, tanto bióticas como abióticas. Entre estos factores se incluyen los potenciales microbios patógenos a los que se encuentran expuestos. Diversos grupos de microorganismos atacan a los insectos, tanto virus, bacterias y hongos, por lo que la constante presión de selección ha impulsado en muchas ocasiones al desarrollo de estas conductas observadas a diferentes niveles: por una parte, en las decisiones tomadas por los insectos en individual y, por otra, en aquellos comportamientos grupales de los insectos eusociales (Roy *et al.*, 2006). Estas conductas, a su vez, son mediadas por diferentes señales químicas que comunican tanto de la presencia del agente infeccioso, o bien son emitidas por los insectos como señales de alarma para alertar a sus congéneres de un potencial peligro (Fleischer *et al.*, 2018).

2.10. Efectos conductuales inducidos por agentes entomopatógenos sobre insectos

Entre las conductas mejor estudiadas de insectos hacia hongos entomopatógenos se encuentra la de evasión. Diversos reportes en diferentes grupos de insectos han mostrado su capacidad para reconocer la presencia de estos agentes patógenos y responder en consecuencia alejándose de los mismos. La conducta de evasión es mediada por la percepción de los VOCs emitidos por los entomopatógenos. Hussain *et al.* (2010a) observaron que el comportamiento de repelencia de la termita *C. formosanus* a diferentes aislados de entomopatógenos fúngicos era proporcional a la virulencia de los mismos, un comportamiento además correlacionado con la respuesta electroantenográfica de las obreras a estos mismos compuestos, lo que confirma la participación del estímulo olfativo en la conducta observada (Hussain *et al.*, 2010a). Otro insecto eusocial con conducta evasiva es la termita *Macrotermes michaelsini*, capaz de discriminar entre diferentes aislados de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en función de su virulencia: la respuesta evasiva de los insectos medida como dosis de repelencia media (RD_{50}) mostró una alta correlación con la dosis letal media (LD_{50}) para ambos aislados (*B. bassiana* $R^2=0.99$, *M. anisopliae* $R^2=0.85$) (Mburu *et al.*, 2009).

Además, los insectos tienen conductas higiénicas para eliminar partículas adheridas a su cutícula, una conducta conocida como acicalado (en inglés *grooming behaviour*). El acicalado se da individualmente, del insecto hacia su propio cuerpo (*auto-* o *self grooming*) o bien como un comportamiento social, conocido como acicalado social o de grupo (*allogrooming*) (Zhukovskaya *et al.*, 2013). Interesantemente, en *C. formosanus* se ha encontrado que la frecuencia de acicalado social entre termitas obreras incrementa en grupos expuestos a una suspensión de conidias de *M. anisopliae*. El análisis de los VOCs emitidos por la cutícula de los insectos tratados permitió identificar la presencia del ergosterol, un esterol que es un componente de la pared celular de muchos tipos de hongos. Esto

ayuda a la colonia a incrementar el acicalado social cuando hay individuos infectados por entomopatógenos (Chen *et al.*, 2023). Las hormigas *Lasius neglectus* se defienden de la exposición a las conidias de *M. brunneum* por medio de una estrategia combinada: el acicalado social y la limpieza con ácido fórmico, este último actúa como un inhibidor de la germinación del hongo, y mitiga los daños del entomopatógeno en el nido (Tragust *et al.*, 2013). Otra conducta reportada en insectos es la recolección de componentes antifúngicos para llevarlos a sus nidos. *Formica paralugubris* recolecta la resina producida por *Picea abies* para llevarlas a sus nidos; esta resina ha demostrado poseer actividad antifúngica y antimicrobiana (Christe *et al.*, 2003).

Aunque puede creerse que la repelencia a los VOCs de entomopatógenos sería la regla general, éste no es el caso. Pontieri *et al.* (2014) encontraron que las hormigas *Monomorium pharaonis* tienden a invadir nidos donde se encuentran cadáveres de hormigas infectadas con *M. brunneum*, en ensayos de elección duales. Si bien las hormigas son atraídas por diferentes hongos con el fin de consumirlos (conducta alimenticia denominada “micofagia”), en este caso los autores especulan que esta conducta responde a un mecanismo de “inmunización social”, en donde las hormigas eligen iniciar una nueva colonia en sitios donde se encuentra el hongo con el fin de inducir resistencia en todos los miembros de la colonia y de esta manera volverla resistente a futuros ataques del patógeno (Pontieri *et al.*, 2014).

Otro comportamiento inducido por la exposición y enfrentamiento a hongos entomopatógenos es el conocido como “fiebre conductual” (*behavioural fever*). Esta consiste en una elevación de la temperatura corporal en animales ectotérmicos al incrementar su tiempo de exposición a la radiación solar, o bien al desplazarse a localizaciones más calientes (Boltaña *et al.*, 2013; Clancy *et al.*, 2018). La fiebre conductual es un mecanismo bastante eficaz pues en muchos casos ayuda a frenar el avance de la infección inducida por hongos entomopatógenos, tal y como demostraron Inglis *et al.* (1996) al observar que las ninfas de *Melanoplus*

sanguinipes expuestas a gradientes de calor superiores de 35°C presentaban una disminución en la infección de *B. bassiana*. A su vez, también observaron que los insectos inoculados con el hongo preferían ubicarse en zonas del gradiente con mayor temperatura, esto indica un comportamiento de fiebre conductual en aquellos insectos infectados con el entomopatógeno (Inglis *et al.*, 1996). De manera semejante, Blanford y Thomas (1999) encontraron una reducción considerable de la mortalidad de *Schistocerca gregaria* al ser confrontada a *M. anisopliae var. acridum* atribuido a la fiebre conductual creada en un gradiente con bulbos eléctricos. La mortalidad fue del 43% después de 30 días cuando se permitía la termorregulación en el insecto, en contraste con el grupo a temperatura constante en donde se observó una mortalidad del 100% a los 7 días (Blanford & Thomas, 1999).

Algunos de los ejemplos más impresionantes de modificaciones conductuales inducidas por hongos entomopatógenos son los casos en los que el huésped infectado participa activamente en la propagación del patógeno, lo que implica una alta especialización con su huésped para modificar su conducta. Los hongos de la familia Ophiocordycipitaceae son particularmente conocidos por su habilidad de controlar el comportamiento de los insectos; por ejemplo, la infección *Ophiocordyceps unilateralis* en la hormiga *Camponotus leonardi* modifica la conducta de su huésped para mejorar la dispersión de sus esporas ubicándolo en posiciones altas, haciendo además que muerda la corteza de las plantas justo antes de morir para asegurar el agarre del insecto (Andersen *et al.*, 2009). Ophiocordycipitaceae incluye diversos parásitos de hormigas, termitas y dípteros que producen cuerpos fructíferos emergentes del cuerpo del insecto muerto para liberar esporas y propagarse a nuevos huéspedes, una característica compartida con algunos miembros de las familias Clavicipitaceae y Cordycipitaceae (Vega *et al.*, 2012).

2.11. Modulación de la conducta reproductiva y alimenticia en insectos mediada por VOCs fúngicos

Los hongos, por medio de sus aromas, cambian los patrones de alimentación y de conducta de los insectos que los perciben. Además, muchos insectos tienen la particularidad de ser micófagos, por lo que sus sistemas olfativos son particularmente sensibles a los VOCs fúngicos (Combet *et al.*, 2006; Christiaens *et al.*, 2014).

Los dípteros de la familia Sciaridae habitan ambientes húmedos, y se alimentan de los hongos que viven en las superficies o en el suelo (Harris *et al.*, 1996). Uno de los miembros de esta familia, *Lycoriella ingenua*, es una plaga de los cultivos de champiñones. Este insecto degrada el compost utilizado para el cultivo del hongo, daña las hifas y transmite enfermedades a los cultivos. Se ha observado que las hembras de *L. ingenua* prefieren colonizar el compost sin inocular, y evitan el compost donde el hongo ya está creciendo. Esta respuesta es mediada por la presencia de los VOCs fúngicos 1-hepten-3-ol, 1-octen-3-ol y 3-octanona, que no están presentes en el compost sin inocular. Además, el oxalato de calcio presente en la superficie del micelio del hongo también retrasa y reduce la emergencia de las larvas. Con este comportamiento evasivo el insecto evita la oviposición en un sustrato desfavorable para el desarrollo de su descendencia (Kecskeméti *et al.*, 2020).

Algunos insectos se sienten atraídos a los aromas emitidos por los hongos que crecen sobre sus fuentes de alimento o en los sustratos sobre los que ovipositan, o también por sus hábitos fungívoros. Los VOCs emitidos por *Fomes fomentarius* y *Fomitopsis pinicola* atraen múltiples especies de insectos consumidores de corteza descompuesta (saproxilicos) y fungívoros, por ejemplo, *Anaspis marginicollis*, *A. rufilabris* y *Malthodes fuscus*, estos últimos son atraídos por el 1-octen-3-ol, así como al depredador *Lordithon lunulatus* que actúa como consumidor de los saproxilicos presentes. De esta forma, la cadena trófica local es

estructurada en última instancia por los compuestos aromáticos que atraen a los diferentes miembros de la comunidad, en un ejemplo sorprendente sobre el control ejercido por estos compuestos sobre la estructura de especies en una comunidad de artrópodos (Fäldt *et al.*, 1999).

Cuando las relaciones son mutualistas, hongos e insectos establecen interacciones que involucran la participación de señales para la búsqueda activa de sitios de oviposición donde se encuentre el hongo. La polilla de la manzana (*Cydia pomonella*) es una plaga de gran importancia económica en la producción de manzanas y peras (Kuyulu & Genc, 2019). Este insecto establece una relación mutualista con las levaduras del género *Metschnikowia*, las cuales son esenciales para su supervivencia, pues las larvas de *C. pomonella* se alimentan de las levaduras, promoviendo el desarrollo y reduciendo la mortalidad del insecto, y a su vez las levaduras proliferan a causa de la presencia del insecto que propicia su disseminación en el fruto. Interesantemente, las hembras adultas de la polilla son atraídas a los VOCs emitidos por las levaduras y prefieren ovipositar en manzanas inoculadas con la levadura. Esto implica la participación de los semioquímicos producidos por el hongo mutualista en la localización y selección para la oviposición de *C. pomonella* (Witzgall *et al.* 2012).

Por otra parte, la selección de un sitio adecuado para la oviposición es un evento clave en el ciclo de vida de los insectos. Para poder llevarlo a cabo, el insecto procesa una gran cantidad de información ambiental que le permite evaluar la idoneidad de un sitio. Esta información incluye la ubicación espacial, la cercanía a fuentes de alimento y la presencia de potenciales agentes dañinos, como los entomopatógenos; estos últimos actúan como un factor disuasorio para la oviposición. Por ejemplo, el depredador generalista *Anthocoris nemorum* detecta las esporas de *B. bassiana* en la superficie de las hojas de la ortiga (*Urtica dioica*) y deposita una menor cantidad de huevos en comparación con los controles sin *B.*

bassiana en ensayos de elección. Además, los insectos evitan los cadáveres del áfido *Microlophium carnosum* contaminados con *B. bassiana* (Meyling & Pell, 2006).

Investigaciones recientes han aportado evidencia de que los hongos entomopatógenos alteran la conducta reproductiva de sus huéspedes con el fin de facilitar su propia dispersión en el ambiente. Estas estrategias se dividen en al menos dos tipos: i) por una parte, el patógeno hace al huésped infectado más atractivo a sus conespecíficos sanos por medio de señales visuales o por la huella de VOCs emitidos, o bien, ii) modifica la conducta del huésped infectado por ejemplo al incrementar su frecuencia de cópula o el tiempo que le toma el acto (Hansen & De Fine Licht, 2019).

Un ejemplo de la primera estrategia es la usada por el entomopatógeno *Entomophthora muscae*, que induce sobre los machos sanos la actividad de copular con los cadáveres de hembras de moscas infectadas con este hongo. A través de la utilización de técnicas de CG-MS y electroantenografía acopladas (GC-EAD), se ha demostrado que la emisión del etil octanoato y dos sesquiterpenos no identificados son los responsables de este comportamiento. Además, esto se ha correlacionado con un incremento en la expresión de los genes de la ruta del mevalonato en *E. muscae* en los cadáveres infectados. Sorpresivamente, el principal componente de la hormona sexual en moscas, el (Z)-9-tricosano, disminuye su producción en hembras jóvenes infectadas o no la modifica en hembras maduras, debido en parte al daño infligido por el hongo en los ovarios del insecto. Todo este conjunto de cambios en el perfil aromático de los insectos infectados crea una huella química característica que ayuda a explicar los intentos de cópula de los machos sobre los cadáveres contaminados (Zurek *et al.*, 2002; Naundrup *et al.*, 2022).

Por otra parte, otra estrategia para mejorar su propagación es por medio de la asociación del hongo entomopatógeno con las raíces, desde donde modifica la fisiología de la planta huésped para hacerla más atractiva a sus potenciales

huéspedes herbívoros. De forma análoga, algunos fitopatógenos modifican la fisiología de las plantas para volverlas más atractivas al ataque de herbívoros vectores que facilitan su diseminación entre las plantas sanas (Heil, 2016). En este sentido, también se ha reportado que la inoculación de *Metarhizium brunneum* Met52 en plantas de coliflor (*Brassica oleraceae* var. *capitata*) incrementa la reflectancia de la planta y modifica el perfil hormonal de las plantas inoculadas con el hongo, lo que se observa en el incremento del ácido jasmónico, jasmonil-L-isooleucina y el ácido salicílico. En su conjunto, estas modificaciones vuelven a las plantas más atractivas para las hembras de *Delia radicum*, que ovipositan en mayor cantidad en los cultivos de coliflor con la aplicación de este inóculo fúngico (Cotes *et al.*, 2020).

Todos estos ejemplos de modificaciones en la conducta de los insectos, inducidas por la percepción de compuestos orgánicos volátiles de origen fúngico sugieren que la producción de semioquímicos es un proceso ampliamente presente en la relación entre los insectos y otros organismos en su entorno, y no se limita únicamente a la interacción insecto-planta. Para tener una perspectiva clara de esto, es suficiente examinar algunos grupos de compuestos a los cuales los insectos son especialmente sensibles. Un ejemplo de ello son los alcoholes de fusel, presentes como subproductos metabólicos de diversos grupos de microbios (Dzialo *et al.*, 2017). Los insectos han desarrollado una sensibilidad particular hacia estos compuestos, lo cual se explica como una adaptación a la percepción de señales químicas provenientes de materiales orgánicos en proceso de fermentación o degradación, y que representan una fuente alimenticia para muchos de ellos (Davis *et al.*, 2013; Davis *et al.*, 2012). Por otro lado, los patógenos posiblemente aprovechan estos mismos subproductos para atraer a sus potenciales insectos huéspedes, y facilitar de esta manera su dispersión en el ecosistema. Sin embargo, los detalles y las implicaciones ecológicas de este fenómeno aún no han sido lo suficientemente explorados.

2.12. *Spodoptera frugiperda* (Gusano cogollero del maíz, *fall armyworm* FAW)

Dentro del género *Spodoptera* (Lepidoptera: Noctuidae) se encuentran especies consideradas plagas de gran importancia económica y agrícola. La mayoría de ellas son insectos polívoros (Wu, 2022), pero algunos también se especializan en una (monófagos) o pocas especies vegetales (oligófagos) (Ma, 1976). Es un género complejo desde el punto de vista taxonómico pues dependiendo de los autores, se reconocen alrededor de 31 especies pertenecientes a *Spodoptera*, aunque se ha debatido la existencia de hibridación o de especies crípticas dentro del complejo, por lo que el número de especies formalmente reconocidas probablemente cambiará en el futuro (Kergoat *et al.*, 2021).

La especie con mayor relevancia económica por los daños causados es el gusano cogollero del maíz *S. frugiperda* (conocido en inglés como *fall armyworm*, FAW). Se reconocen dos subespecies del insecto clasificadas en función de sus preferencias alimenticias, denominándose como las subespecies “maíz” y “arroz”, descubiertas por diferencias en la frecuencia de múltiples loci de alozimas y por variaciones en el gen mitocondrial *COI* (Drés & Mallet, 2002; Vélez-Arango *et al.*, 2008). Esta separación también es relevante desde el punto de vista de su manejo en campo puesto que la subespecie “maíz” es más resistente a diferentes agentes de control, como *Bacillus thuringiensis* y a muchos insecticidas sintéticos como el carbaril, metil paration y el metomil (Paredes-Sánchez *et al.*, 2021). Hay evidencia sobre la existencia de barreras pre- y post- cigóticas entre ambas subespecies, lo que ha planteado la posibilidad de que en realidad se trataría de dos especies diferentes en una etapa temprana de divergencia (especies crípticas). De cualquier modo, ambas subespecies comparten rangos de distribución semejantes (Pashley, 1986; Johnson, 1987; Abbas *et al.*, 2022).

El ciclo de vida de *S. frugiperda* se divide en una etapa larvaria con seis estadios diferenciados entre sí por el tamaño y las ornamentaciones corporales de

las larvas, nombrado del L1 al L6. La fase larvaria (oruga) tiene una duración de aproximadamente 25 días que varía en función de factores como la temperatura, la humedad, así como de la disponibilidad y calidad de fuentes alimenticias. En su última fase larvaria, el insecto se entierra en el suelo. Allí, realizará su transición a pupa y permanecerá en esta fase por alrededor de 10 días, después de lo cual emergerá como imago (polilla). En esta etapa permanece por aproximadamente 15 días. El insecto adulto tiene un marcado dimorfismo sexual, observado principalmente por el patrón de pigmentación de las alas, pues los machos poseen patrones vistosos y con un contraste de tonos mayor en comparación a las hembras, las cuales poseen un patrón de coloración más discreto (Ramírez-Cabral & Covarrubias, 2019).

Los principales componentes de la feromona sexual en *S. frugiperda* son el (Z)-9-tetradecenil acetato (Z9-14:OAc) (correspondiente a la fracción mayoritaria), el (Z)-7-dodecenil acetato (Z7-12:OAc), (Z)-11-hexadecenil acetato (Z11-12:OAc), (Z)-9-dodecenil acetato (Z9-12:OAc) y el (E)-7-dodecenil acetato (E7-12:OAc). Es interesante observar la existencia de variaciones regionales en la respuesta de los insectos a los componentes mayoritarios de la feromona. Las poblaciones mexicanas son más sensibles al Z9-14:OAc y Z7-12:OAc, mientras que las poblaciones de *S. frugiperda* en Brasil responden además al E7-12:OAc (Cruz-Esteban *et al.*, 2020). Esto hace necesario optimizar la composición de las feromonas usadas en estrategias de control para diferentes regiones del mundo.

Cada hembra copulada deposita aproximadamente 1,000 huevos a lo largo de su ciclo de vida, con un promedio de 150 huevos por cada puesta (Casmuz *et al.*, 2010). Sin embargo, se ha observado que en el caso del maíz una puesta alcanza hasta 700 huevos (Volp *et al.*, 2022). Como ocurre en otros insectos, algunos factores como el estado nutricional de la hembra, las fuentes de alimento y las condiciones ambientales tienen un impacto directo en la fertilidad y el éxito reproductivo de la especie (Prasad *et al.*, 2022; He *et al.*, 2021).

Para encontrar un sitio idóneo donde ovipositar, los insectos procesan una gran cantidad de información de su entorno (Honda, 1995). En el caso de *S. frugiperda*, las características táctiles de la superficie son importantes. En estudios de laboratorio, se ha observado que las hembras muestran preferencia por las superficies estriadas o con agujeros, además de evitar aquellas superficies previamente tratadas con extractos frescos de hojas de maíz. Esto se debe probablemente a la presencia de VOCs asociados al daño mecánico severo, y cuya presencia impulsa a las hembras a buscar otro lugar para depositar sus huevos (Rojas *et al.*, 2003). Además, se conocen algunos de los componentes responsables de las preferencias alimenticias y de oviposición de *S. frugiperda* en cultivos de maíz, entre los que se encuentran el geranil acetato y el (E)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno, ambos con capacidad de modular la conducta alimenticia de las larvas de este insecto (Yactayo-Chang *et al.*, 2021).

Se han reportado hasta 182 especies vegetales atacadas por el insecto, distribuidas en 42 familias vegetales, principalmente Poaceae, Fabaceae, Solanaceae y Asteraceae (Casmuz *et al.*, 2010). Esta cifra es mucho menor a lo que Montezano *et al.* (2018) reportarían posteriormente, con 353 especies en 76 familias. Sin embargo, el insecto sigue teniendo patrones de preferencia claros hacia ciertos cultivos, principalmente al maíz, arroz y el sorgo (Volp *et al.*, 2022; Silva *et al.*, 2017).

Las técnicas de control en campo de las poblaciones de *S. frugiperda* se dividen en cuatro tipos: i) el uso de insecticidas sintéticos, ii) de compuestos bioactivos naturales, iii) el control biológico y iv) el uso de feromonas. Generalmente las larvas tienen preferencia a consumir brotes frescos y los meristemos de las plantas por lo que se recomienda realizar su control durante las etapas tempranas del cultivo (Paredes-Sánchez *et al.*, 2021; Mitchell & McLaughlin, 1982).

Entre los insecticidas sintéticos más utilizados en su control destacan la metoxifenoazida (un inductor de la muda prematura por su analogía estructural con

la hormona de insecto 20-hidroxiecdisona), los derivados de la quinoxalina (neurotóxicos en lepidópteros a nivel de receptores tipo colinesterasa), derivados sintéticos de los flavonoides, y antagonistas del ácido γ -aminobutírico como la 7-pirazolopirimidina (Paredes-Sánchez *et al.*, 2021). Sin embargo, hay múltiples reportes de resistencia a diversos insecticidas sintéticos. Por ejemplo, se ha observado el desarrollo de resistencia al clorantraniliprol y al espinetoram en poblaciones de Brasil, y que son utilizadas contra diversos grupos de lepidópteros (Bolzan *et al.*, 2019; Lira *et al.*, 2020) así como al indoxacarb (neurotóxico) y teflubenzuron (bloqueador de la quitina sintetasa 1) (Hafeez *et al.*, 2022; Amaral *et al.*, 2023). Para las poblaciones mexicanas de *S. frugiperda* se conocen casos de resistencia desde la década de los 90's (Pacheco-Covarrubias, 1993). Los múltiples reportes de resistencia a insecticidas ponen de manifiesto la plasticidad fenotípica de este lepidóptero y advierten sobre su enorme capacidad para adaptarse a las estrategias de control químico convencionales ante la presión selectiva tan fuerte que estos componentes representan para sus poblaciones, y obligan también a replantearse otras estrategias alternativas que evadan mejor estas adaptaciones.

2.13. Importancia socioeconómica de *S. frugiperda*

Como plaga polifágica, *S. frugiperda* genera daños considerables sobre los cultivos. Por las condiciones cálidas en buena parte del territorio mexicano, se encuentra presente durante todo el año con hasta cinco generaciones anuales, sin embargo, se ha predicho que este número se incrementará con el paso de las décadas hasta finales de siglo, cuando los modelos predicen una disminución del número de generaciones, todo esto impulsado por el calentamiento global y el cambio climático (Ramírez-Cabral *et al.*, 2017; Ramírez-Cabral *et al.*, 2019; Zacarias *et al.*, 2020).

Los daños económicos generados por esta plaga son mayores en los países pobres y en vías de desarrollo. En Brasil se han observado pérdidas de entre el 19 y el 100%, por su parte en África tiene el potencial de generar pérdidas de entre el

21 al 53% anual en cultivos de maíz, lo que se estima en un costo entre 2.4 y 6.19 billones de dólares anuales (Montezano *et al.*, 2018). En contraste, en el territorio de Estados Unidos genera pérdidas de alrededor de 3 billones de dólares anuales (Sierra-Ruíz *et al.*, 2022). En México, 3 millones de hectáreas son afectadas por esta plaga, lo que representa alrededor del 45% del maíz sembrado en el territorio nacional, siendo el periodo con mayor presencia de este insecto entre los meses de mayo y agosto (Blanco *et al.*, 2014).

Una de las principales preocupaciones con este insecto es que desde 2016 inició un proceso de expansión que comenzó con su introducción en el este y centro de África y que continuó su avance por 70 países de África y Asia, hasta llegar a Australia a inicios de 2020 (Tay *et al.*, 2022). Es un insecto con una notable capacidad de vuelo, manteniendo vuelos sostenidos hasta de 100 km en una sola noche, lo que incrementa su potencial de expansión (Johnson, 1987). La internacionalización de esta plaga en menos de un lustro puede ser impulsado por el cambio climático; esto es consistente con los modelos de expansión propuestos para la plaga y que consideran diferentes variables climatológicas (Zacarias *et al.*, 2020; Yan *et al.*, 2022).

Los daños producidos por el insecto en campo son considerables. La mayoría de los cultivos son atacados por *S. frugiperda*, aunque la mayoría de los daños se observan en el maíz, arroz, sorgo, caña de azúcar y algodón, inclusive se ha observado que ataca cultivos genéticamente modificados con la endotoxina Cry1F (Jaramillo-Barrios *et al.*, 2019). Normalmente se alimenta de las plantas jóvenes o de plántulas, y prefiere consumir los meristemos de la planta, encontrándose muchas veces oculto entre las hojas que lo rodean, siendo este hábito de conducta problemático para los métodos tradicionales de control, pues las hojas y los desechos del insecto dificultan su interacción con el insecticida (Paredes-Sánchez *et al.*, 2021).

2.14. El uso de agentes de biocontrol contra *S. frugiperda*

Por el desarrollo de resistencia a múltiples agentes plagicidas, se ha propuesto el control de *S. frugiperda* por medio del uso de agentes de biocontrol, entre ellos bacterias, virus y hongos entomopatógenos (Abbas *et al.*, 2022).

Los insectos parasitoides son aquellos que cumplen necesariamente una parte de su ciclo de vida como parásitos de otros insectos durante su fase larvaria, ocasionándole la muerte a su huésped, teniendo una fase adulta de vida libre (Bernal, 2007). Los taxones parasitoides son frecuentes en la naturaleza y contribuyen significativamente a mantener bajo control a las poblaciones de insectos en todos los ecosistemas (Lafferty & Kuris, 2002; Saunders & Ward, 2018). Mantienen una estrecha relación con sus huéspedes, pues dependen de ellos para completar sus ciclos de vida, además de que son altamente específicos y realizan una búsqueda activa de sus huéspedes, una conducta que está determinada genéticamente y es producto de la adaptación, lo que explica su alta eficacia como agentes de biocontrol en campo (Bernal, 2007).

S. frugiperda tiene diferentes insectos parasitoides, los más relevantes ecológicamente son las avispas (Hymenoptera) de las familias Braconidae, Ichneumonidae, Tachinidae y Eulophidae. Algunas de las especies más relevantes de avispas parasitoides son *Aleoides laphygmae*, *Chelonus sonorensis*, *C. insularis*, *Meteorus arizonensis*, *M. laphygmae*, *Campoletis sonorensis*, *Ophion flavidus*, *Pristomerus spinator* y *Euplectrus platyhypenae*. La incidencia de parasitoides en las poblaciones nativas de *S. frugiperda* varía en la literatura, pero es probablemente de entre el 13.8 y 26% (Serrano-Domínguez *et al.*, 2020; Molina-Ochoa *et al.*, 2004; Hernández-Trejo *et al.*, 2018).

De entre los diversos grupos virales que infectan a los insectos, uno de los más estudiados son los baculovirus. Estos son virus de DNA que infectan poblaciones de artrópodos, principalmente insectos lepidópteros, himenópteros y algunos dípteros, ejerciendo importantes efectos sobre su dinámica poblacional

(Cory & Myers, 2003). Los baculovirus tienen la característica de producir agregados proteicos conocidos como “cuerpos de oclusión” (con un diámetro de aproximadamente 1µm) y que consisten en agregados de múltiples partículas virales, actuando como estructuras infectivas. En lepidópteros, la infección se disemina en todo el cuerpo del insecto y culmina con la transformación del cuerpo del huésped en millones de estos cuerpos de oclusión que son dispersados al ambiente cuando el insecto ha muerto. Por su parte, en otros grupos la infección está restringida al intestino medio, y estos cuerpos de oclusión son excretados por las heces del insecto al ambiente de manera continua (Rohrmann, 2019; Blissard & Theilmann, 2018). Se han utilizado los baculovirus para el biocontrol de *S. frugiperda*, sin embargo, la necesidad de dosis elevadas de este agente en campo, así como su lento ciclo de infección, limitan su eficacia cuando se le compara con el control químico tradicional (Hussain *et al.*, 2021).

B. turingensis es posiblemente el agente de biocontrol mejor conocido y del que se han reportado múltiples casos de éxito contra diferentes plagas de insectos, particularmente de lepidópteros. Se trata de una bacteria Gram positiva productora de toxinas insecticidas al pasar a su fase exponencial durante el proceso de esporulación, y que se agregan en una estructura cristalina conocida como “cristal parasporal” (Bravo *et al.*, 2011). Este cristal proteico se compone principalmente de las toxinas Cry y Cyt (Bravo *et al.*, 2007; Bravo *et al.*, 2010). Las toxinas actúan al formar canales en la membrana de las células del intestino medio del lepidóptero, lo que tiene como consecuencia la lisis celular y el daño en el epitelio intestinal, lo que finalmente mata al insecto (Bravo *et al.*, 2011). Diferentes estrategias se utilizan para aprovechar este agente en el control de plagas: desde la aplicación directa en forma de spray en el campo hasta la producción de cultivos transgénicos con la toxina Cry (Bravo *et al.*, 2011). Sin embargo, existen múltiples reportes sobre el desarrollo de resistencia de *S. frugiperda* a estos cultivos (Machado *et al.*, 2020; Omoto *et al.*, 2016; Farias *et al.*, 2014; Santos-Amaya *et al.*, 2015), esto representa

una amenaza a su eficacia a mediano y largo plazo para contener a esta plaga (de Bortoli & Jurat-Fuentes, 2019).

Entre otros entomopatógenos que han sido estudiados con fines de biocontrol para este lepidóptero encontramos *M. anisopliae* (Lezama *et al.*, 2005; Graciano *et al.*, 2016), *Metarhizium pinghaense* (Wu *et al.*, 2022), *Nomuraea rileyi* (Lezama-Gutierrez *et al.*, 1994), *Paecilomyces fumosoroseus*, *P. javanicus* (Lezama-Gutierrez *et al.*, 1996) y *B. bassiana* (Wraight *et al.*, 2010; González-Maldonado *et al.*, 2015; Idrees *et al.*, 2022; Rivero-Borja *et al.*, 2018; Ramos *et al.*, 2020), además de algunos nemátodos como *Heterorhabditis bacteriophora* (García *et al.*, 2008; Lezama-Gutierrez *et al.*, 1996; Sánchez *et al.*, 2019).

2.15. Respuestas fisiológicas y bioquímicas de las plantas a los VOCs

Por su baja polaridad y tamaño pequeño, los VOCs interactúan con la membrana celular y difunden en ella, ejerciendo diferentes efectos en los procesos celulares (Heil, 2014). La percepción de estos compuestos por parte de las plantas induce cambios en la arquitectura radicular, ganancias de biomasa, incremento de clorofila, o también inducen la activación de los mecanismos de defensa en las plantas (como ISR) y la resistencia al estrés biótico y abiótico (Heil, 2014; Sharifi & Ryu, 2018).

Estos efectos fisiológicos son asociados con modificaciones en los perfiles químicos de los metabolitos que producen las plantas. Por ejemplo, la exposición del trigo al Z-3-hexenil acetato induce la producción de especies reactivas de oxígeno, asociado con un incremento de compuestos proveniente de la ruta de los fenilpropanoides, el metabolismo del glutatión y la ruta de los ácidos tricarbónicos, así como un incremento en la glicosilación de diferentes metabolitos, entre ellos terpenoides iridoides e interesantemente el ácido salicílico observado en la forma de ácido salicílico-2-O- β -D-glicósido (Ameje *et al.*, 2020). En particular, el Z-3-hexenil acetato pertenece a los conocidos como “volátiles de hoja verde” (en inglés

green leaf volatiles, GLV), producidos por las plantas durante la herbivoría o el daño mecánico (Aartsma *et al.*, 2017).

Las plantas modulan su fisiología y metabolismo para adaptarse a las condiciones adversas del medio. Se ha observado que los VOCs microbianos modulan respuestas metabólicas para ayudar a las plantas a adaptarse al estrés. Así, Flores-Cortez *et al.* (2019) estudiaron el efecto de los compuestos gaseoso emitidos por *Arthrobacter agilis* UMCV2 sobre *Medicago truncatula* en condiciones de suficiencia y deficiencia de hierro, en donde observaron diferencias significativas en elementos del metabolismo primario como el piruvato, 3-pentanona, glicolato o la coenzima A, así como compuestos del metabolismo secundario implicados en procesos de estrés por deficiencia de hierro, como los brasinoesteroides, y otros involucrados en el estrés oxidativo como flavonoides, tiamina y galactinol. Estos profundos cambios metabólicos inducidos por VOCs microbianos abren la posibilidad de que cumplan funciones importantes en las plantas nativas al mejorar su adaptabilidad a condiciones nutricionales distintas al reducir el estrés al que se ven sometidas (Flores-Cortez *et al.*, 2019).

Santoro *et al.* (2011) examinaron los efectos de los VOCs liberados por *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* y *Azospirillum brasilense* sobre los parámetros de crecimiento y la composición de aceites esenciales en la planta de menta (*Mentha piperita*). Además de observar modificaciones en el crecimiento vegetal, se observaron incrementos en los perfiles de monoterpenos en los tratamientos con exposición a los VOCs de *P. fluorescens*, de entre los que destacan incrementos en la emisión de pulegona y mentona, además de una reducción en la emisión de mentol en respuesta a la exposición de los VOCs de *A. brasilense* (Santoro *et al.*, 2011).

2.16. El sorgo (*Sorghum bicolor*) y su importancia económica.

El sorgo (*S. bicolor*) es una planta de la familia Poaceae de ciclo anual, monoecia, que crece hasta 3 m de altura, con hojas con una anchura de 7 cm, largas

y liguladas, con panículas muy densas de hasta 50 cm. Posee espiguillas unifloradas agrupadas en parejas, una de las cuales es masculina y pedicelada, y la otra es femenina y sésil. Cada una de las espiguillas tiene tres glumas. La semilla es una cariósida ovoide de hasta 6 mm de largo (Canals *et al.*, 2019).

Es un cultivo tolerante a las sequías, inundaciones, salinidad y pH bajo, por lo que se le considera un cultivo de buena adaptabilidad. Por este motivo, muchas de las tierras cultivadas con este cereal se encuentran en regiones áridas y semiáridas de los trópicos y subtropicos (Quintero *et al.*, 2017). Sin embargo, también es vulnerable a diferentes patógenos e insectos plaga. Okosun *et al.* (2021) dan una lista no exhaustiva de algunos de los insectos plaga más dañinos en los cultivos de sorgo en Nortamérica, donde mencionan 31 especies de insectos clave pertenecientes principalmente a los órdenes Coleoptera, Hymenoptera, Heteroptera, y Lepidoptera, entre ellos *Phyllophaga crinita*, *Solenopsis invicta*, *Sipha flava*, *Diatrea saccharalis*, *D. grandiosella*, *Helicoverpa zea*, *Nysius raphanus* y *S. frugiperda*.

S. bicolor es el quinto cereal de importancia a nivel global en términos de producción y de tierras cultivadas. Actualmente es la fuente de alimentación de una parte considerable de las poblaciones de países en zonas marginadas de más de cien países, principalmente en África y Asia, donde se concentra alrededor de la mitad de la producción mundial de sorgo, seguido por el territorio del continente americano que produce alrededor del 30%. De los países latinoamericanos, México y Argentina son productores destacados de este cultivo, por lo que es de relevancia mundial su protección contra los diferentes insectos plaga que lo atacan, puesto que vulneran la seguridad alimentaria de los países pobres y en desarrollo, principalmente (Hariprasanna & Rakshit, 2016; Pérez *et al.*, 2010).

En México, el cultivo de sorgo contribuye con casi 2.2% del PIB agrícola nacional, lo que representa 4.43% del total de la producción de forrajes. La mayoría de este grano es usado en la producción de alimentos para el ganado, además de

ser utilizado como materia prima para la obtención de almidón, alcohol y glucosa, también de acetona y butanol por medio por medio de fermentación aceto butílica. La producción nacional de este cultivo ha logrado satisfacer hasta el 60% de los requerimientos totales del mercado mexicano, por lo que la producción sostenible de este cereal es clave para la industria agropecuaria en el país (SAGARPA, 2017).

Uno de los insectos que atacan al sorgo es *S. frugiperda*, en donde produce daños considerables observados principalmente en los verticilos, además el insecto se alimenta de las espigas que están en desarrollo o maduración, y destruye el meristemo de la planta. En ocasiones el insecto corta la planta desde la base (Casmuz *et al.*, 2010). Como ocurre con muchas plagas, la susceptibilidad al insecto también incrementa en condiciones de estrés, como en suelos ácidos o de calidad pobre, lo que genera plantas más bajas que son más susceptibles al ataque (Hariprasanna & Rakshit, 2016). La planta es más susceptible a *S. frugiperda* durante el estadio de cinco hojas, donde genera una reducción de la producción de hasta el 80%. Los daños más severos sobre este cultivo ocurren en los países pobres cuya población depende en buena medida del este cereal para sobrevivir. Con este fin, se desarrollaron algunas líneas mejoradas que son más resistentes al ataque por estos insectos, tal es el caso de la línea CIMMYT 1821 que presenta una mayor resistencia a *S. frugiperda* en Estados Unidos, así como las líneas GT-IR6/7/8 desarrolladas en la década de los 90's (Harris-Shultz *et al.*, 2015; Diawara *et al.*, 1991).

Todo lo anterior pone de manifiesto la necesidad de generar investigación alrededor de estrategias sustentables en la protección del cultivo de sorgo que tomen en cuenta de forma integral la conducta de *S. frugiperda* en diferentes condiciones ambientales, así como la participación de los compuestos señal en los patrones de conducta alimenticia y reproductiva tanto en su estadio larval y como de adulto. En este sentido, los métodos ofrecidos por la ecología química representan herramientas invaluable para generar conocimiento alrededor de la

mediación de los VOCs fúngicos sobre esta plaga en interacción con las plantas, como es el caso de *S. bicolor*, y ofrecen nuevos horizontes tanto en los procesos químicos que tienen lugar en las comunidades naturales de artrópodos y en las implicaciones que esto pueda tener en los programas de manejo. Así, surge la motivación para el planteamiento de la siguiente pregunta de investigación: ¿Cuál es el efecto de los VOCs emitidos por aislados de *B. bassiana* de diferente fuente ambiental y grados de virulencia en la conducta reproductiva y de herbivoría en *S. frugiperda*?

3. JUSTIFICACIÓN

Los VOCs son las moléculas mediadoras de las interacciones en la naturaleza. Los lepidópteros dependen de la percepción de los aromas para orientarse en su medio, encontrar fuentes de alimento y seleccionar sitios de puesta, además de modular diferentes patrones de conducta que les facilitan el explotar los recursos de su medio. Los hongos entomopatógenos como *B. bassiana* emiten una gran diversidad de VOCs, por lo que los efectos que éstos tienen en la conducta en insectos es un área de interés en la ecología química moderna. Un estudio de ecología química y etología del lepidóptero plaga *S. frugiperda* en plantas de *S. bicolor* ayudaría a mejorar nuestra comprensión sobre la relación planta-microbio-insecto durante la interacción por herbivoría.

4. HIPÓTESIS

Los compuestos orgánicos volátiles de *Beauveria bassiana* modifican el comportamiento reproductivo y los patrones de herbivoría del insecto defoliador *Spodoptera frugiperda* en plantas de *Sorghum bicolor*.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Estudiar el efecto de los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) de *B. bassiana* en el comportamiento y los patrones de herbivoría del insecto defoliador *S. frugiperda* en plantas de *S. bicolor*.

5.2. Objetivos particulares

1. Explorar la capacidad infectiva de distintos aislados de *B. bassiana* y analizar la variabilidad en la emisión de VOCs.
2. Determinar si los VOCs fúngicos modifican los hábitos de comportamiento de oviposición en *S. frugiperda*.
3. Estudiar el efecto de los VOCs fúngicos sobre los patrones de consumo de *S. frugiperda* por herbivoría en *S. bicolor* en un sistema de interacción tripartito.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para la realización del presente proyecto, se utilizaron ocho cepas del hongo entomopatógeno *B. bassiana* obtenidas de dos fuentes diferentes: por una parte, aislados del muestreo de núcleos de suelo de huertos frutales del estado de Chihuahua y de cadáveres de insectos micosados encontrados *in situ* en los mismos huertos. Estos aislados fueron donados por la D.C. Nuvia Orduño Cruz de la facultad de Ciencias Agropecuarias, de la Universidad Autónoma de Chihuahua. Los aislados se mantuvieron por resiembra en medio agar PDA. Por otra parte, como insecto modelo se utilizaron larvas de *S. frugiperda* en instar L2 y/o adultos recién emergidos obtenidos de una población experimental mantenida en condiciones controladas del Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad de la UNAM, campus Morelia. El cultivo modelo usado para la realización del proyecto fue la planta de sorgo (*S. bicolor* variedad Fortuna) y que, por su importancia económica, la susceptibilidad al ataque de *S. frugiperda* y su facilidad de propagación en laboratorio la convierten en una planta modelo idónea para estudiar las interacciones planta-insecto (Silva *et al.*, 2022). Los experimentos realizados se dividieron en tres grupos, dependiendo de la interacción de interés: i) interacción hongo-insecto, ii) interacción hongo-planta e iii) interacción tripartita (Fig. 1).

Primeramente, se determinó la identidad taxonómica de los aislados de *B. bassiana* por la secuenciación del espaciador transcrito interno ribosomal (ITS) y la construcción de filogenias con secuencias tipo depositadas en la base de datos NCBI. Adicionalmente, se realizó un perfilado global de los VOCs emitidos por los ocho aislados de *B. bassiana* por medio de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masa (GC-MS) con el uso de microextracción en fase sólida (en inglés *solid-phase microextraction*, SPME) como método de extracción. Como cepa de referencia en esta caracterización se usó a *Trichoderma atroviride* IMI 206040 con el fin de contrastar la variabilidad de la emisión de volátiles del entomopatógeno con otro hongo taxonómica y ecológicamente apartado.

Los ensayos hongo-insecto se orientaron con el fin de estudiar tres aspectos clave de la interacción del entomopatógeno con el huésped: i) la virulencia del entomopatógeno en la fase larvaria L2 del insecto, ii) el efecto de la percepción de los volátiles fúngicos en el comportamiento reproductivo del adulto y iii) el efecto de la percepción de los volátiles fúngicos en el comportamiento alimenticio de las larvas. Con este fin, se realizaron bioensayos de virulencia y mortalidad de los aislados en larvas de *S. frugiperda*, ensayos de oviposición en jaulas de los adultos de *S. frugiperda* expuestos a los VOCs fúngicos emitidos, ensayos de olfatometría en jaula con el compuesto estándar puro del alcohol isoamílico (3-metilbutanol) y finalmente ensayos de olfatometría de elección a diferentes combinaciones de micelio y fuentes alimenticias, o estándares presentados a las larvas.

Con el fin de estudiar si los VOCs fúngicos afectan el desempeño de las plantas de sorgo y explorar su impacto potencial en la resistencia a la herbivoría i) se expusieron las plántulas de este cultivo a los volátiles fúngicos por medio de un sistema de compartimentos cerrados por un lapso de 7 días, y una vez transcurrido ese periodo se recolectaron las plantas para medir parámetros de crecimiento y desarrollo. Además, ii) se utilizó este follaje con el fin de someterlo a posteriores ensayos en olfatometría de elección.

Finalmente, para explorar la participación de los VOCs fúngicos en la interacción por herbivoría de *S. frugiperda* en plantas de *S. bicolor* i) se realizaron ensayos de la cantidad de consumo por parte del insecto sobre el follaje recolectado de plántulas de sorgo de 7 días en un sistema de placa dividida donde el insecto percibe los aromas emitidos por el micelio crecido en PDA por 8 días y ii) se realizaron ensayos de olfatometría de elección de la larva L2 a una batería de alimentos y follaje previamente expuesto a los VOCs fúngicos de *B. bassiana* de los aislados de mayor y menor virulencia, para observar si la exposición previa de la planta modificaba la atracción de la larva a éste follaje pre tratado.

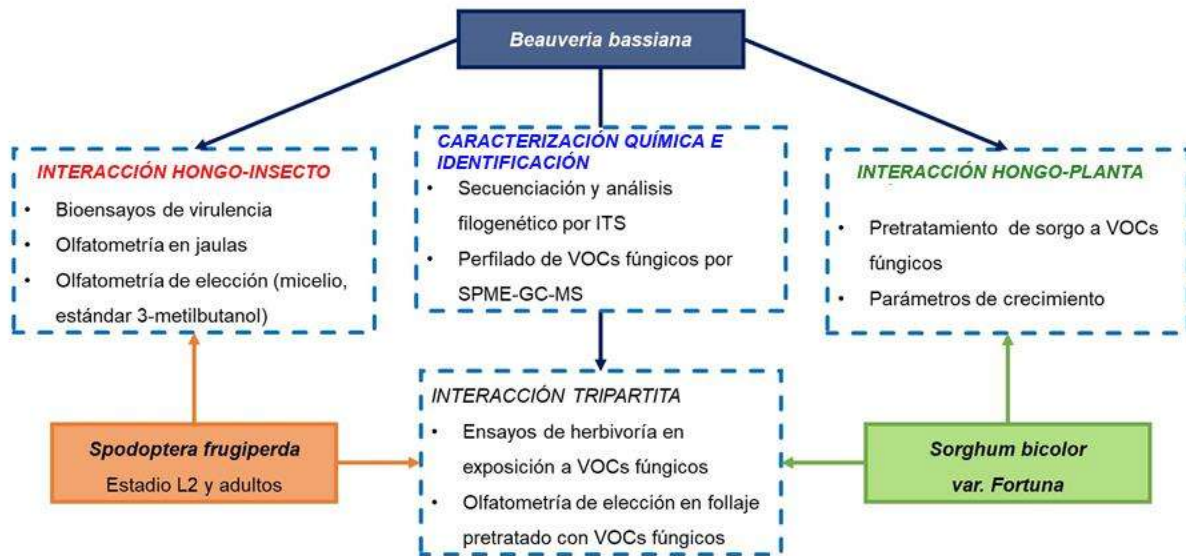


Figura 1. Estrategia experimental del proyecto

7. RESULTADOS

Capitulo I. Volatiles released by *Beauveria bassiana* induce oviposition behaviour in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)

Capitulo II. Los VOCs emitidos por *B. bassiana* modifican el comportamiento de consumo de *S. frugiperda* en plantas de *S. bicolor* en un sistema *in vitro*

Capítulo I. Volatiles released by *Beauveria bassiana* induce oviposition behaviour in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)

Resumen

Los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) emitidos por los hongos son moléculas sumamente importantes por su participación en la modulación de diferentes procesos como la esporulación o el dimorfismo, además de mediar las interacciones de los hongos con otros organismos en la naturaleza, por ejemplo, al inducir cambios en la conducta de los animales (Weisskopf *et al.*, 2021). El hongo entomopatógeno *B. bassiana* produce VOCs que median distintas respuestas conductuales en insectos. Sin embargo, se desconoce que tan variable es la producción de VOCs en esta especie fúngica y si la fuente ambiental de los aislados tiene algún efecto en la naturaleza de los compuestos producidos, en tanto que *B. bassiana* coloniza diferentes nichos tróficos. Además, se desconoce que tan extendidos son estos efectos entre los diferentes grupos de insectos, como en el lepidóptero plaga *S. frugiperda*. En este estudio, se observó el efecto de los VOCs de *B. bassiana* en la conducta de oviposición de *S. frugiperda*. Para ello, se caracterizaron molecularmente y químicamente ocho aislados de *B. bassiana* obtenidos de dos fuentes ambientales: cadáveres de insectos micosados y núcleos de suelo. La tipificación molecular se realizó por medio de la amplificación de la región transcrita interna (ITS) de la secuencia genómica del mRNA 18S. Por su parte, los perfiles de VOCs fueron analizados por el método de microextracción en fase sólida (*solid-phase microextraction*, SPME) y cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS). Los grados de virulencia de los aislados se estimaron mediante el cálculo del tiempo letal medio (LT₅₀) en larvas L2 del insecto utilizando el método de aspersion de esporas (10⁸ esporas mL⁻¹). El efecto de los VOCs fúngicos sobre la oviposición de *S. frugiperda* se evaluó utilizando ensayos de olfatometría en jaulas, donde se colocaron seis machos y seis hembras junto con ocho cajas de Petri con micelio de *B. bassiana* de 8 días de edad como fuente de VOCs fúngicos. Los insectos copularon y ovipositaron por 15 días, después se midió el número de huevos, el área y tamaño de las puestas, así como el conteo de las mismas. El análisis de VOCs permitió la identificación de 39 compuestos cuyas

categorías dominantes fueron alcoholes, terpenos, cetonas, ácidos grasos y compuestos fenólicos. Algunos de los compuestos detectados fueron el 3-metilbutanol, 2-feniletanol, alcohol bencílico, etanol y 2-nonanona, entre otros. Estas moléculas se han reportado como semioquímicos entre diferentes familias de lepidópteros. La fracción mayoritaria correspondió al alcohol de fusel 3-metilbutanol, que contribuyó con más de la mitad de la abundancia total. Interesantemente, se observó que la variación en la composición de los perfiles refleja la fuente ambiental del aislado, ya sean de núcleos de suelo o de cadáveres micosados. Además, la virulencia de los aislados provenientes de cadáveres de insecto también fue mayor. Así, el aislado AI2 de insecto mostró el mayor nivel de virulencia, mientras que el menos virulento fue el AS5. Interesantemente, se observó que los VOCs de *B. bassiana* incrementaron el tamaño de puestas y el número de huevos colocados por los adultos de *S. frugiperda*. Esta respuesta fue de tipo dosis-dependiente. De manera semejante, el 3-metilbutanol indujo cambios en los patrones de oviposición de los insectos a dosis de 1 μ L. Por lo tanto, se concluyó que *B. bassiana* estimula la conducta de oviposición de *S. frugiperda* por mediación de los VOCs emitidos, lo que se interpreta como una ventaja adaptativa para el entomopatógeno al incrementar la población de su potencial huésped. Este efecto es en parte explicado por la emisión del 3-metilbutanol. Además, los perfiles de VOCs reflejan los ambientes de donde se obtuvieron los aislados, así como las diferencias en la virulencia.

Volatiles released by *Beauveria bassiana* induce oviposition behavior in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)

Arturo Ramírez-Ordorica¹, Hexon Angel Contreras-Cornejo¹, Nuvia Orduño-Cruz², Alfonso Luna-Cruz³, Robert Winkler⁴, Lourdes Macías-Rodríguez^{1*}

¹Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, 58030, México

²Facultad de Ciencias Agrotecnológicas, Universidad Autónoma de Chihuahua, Chihuahua, Chihuahua, 31350, México

³CONACYT-Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, 58030, México

⁴Department of Biotechnology and Biochemistry, CINVESTAV-Irapuato, Instituto Politécnico Nacional, Irapuato, Guanajuato, 36824, México

*Corresponding author: Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, 58030, México.

E-mail: lourdes.macias@umich.mx

Editor: Paolina Garbeva

Abstract

Microbial volatile organic compounds may act as semiochemicals, inciting different behavioral responses in insects. *Beauveria bassiana* is an entomopathogenic fungus, and physiological and environmental factors are positively related to fungal virulence. In this study, we examined the volatile profiles produced by eight *B. bassiana* strains, isolated from soil plots and mycosed insect cadavers, with different speeds of kill and determined if these compounds induce oviposition behavior in *Spodoptera frugiperda*. Fungal volatiliome analysis revealed differences between the isolates. Isolates from mycosed insects showed higher virulence, larger egg mass area and length, and a higher number of eggs by mass, than those obtained from soil. Furthermore, a dilution of the fungal odoriferous compounds increased the insect response, suggesting that *S. frugiperda* is highly susceptible to the fungal compound's fingerprint. Otherwise, the insect response to the natural blend of volatiles released by the fungus was different from that obtained with 3-methylbutanol, which was the most abundant compound in all isolates. The ability of an entomopathogen to produce volatiles that can induce olfactory stimulation of egg-laying behavior could represent an ecological adaptive advantage in which the entomopathogen stimulates the insect population growth.

Keywords: entomopathogenic fungi, fungal volatile compounds, insect, oviposition

Introduction

Entomopathogenic fungi are defined as facultative or obligate parasites of insects. They are present in all ecosystems, and approximately 1000 different species distributed in ~100 genera have been reported, making them the most phylogenetically diverse group of invertebrate pathogens (Vega et al. 2012). *Beauveria* belongs to the Ascomycota division (Esparza Mora et al. 2017), and currently 28 different species of which have been identified (Bustamante et al. 2019). *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill is undoubtedly the most studied entomopathogenic species because it is capable of attacking ~700 insect species from most orders (Gul et al. 2014, Jiang et al. 2019, Dannon et al. 2020). Additionally, the fungus can thrive in the plant's endosphere, making it more resilient across ecosystems (Uma Devi et al. 2008, Wei et al. 2020). The virulence of *B. bassiana* is highly variable among different strains (Rohrlich et al. 2018). Successful insect infection depends on the combined effects of environmental factors, host susceptibility, and genes that contribute to virulence (Uma Devi et al. 2008, Gul et al. 2014). The virulence factor genes reported for *Beauveria* are involved in the adhesion of spores to the insect cuticle; secretion of lytic enzymes, toxins, and invasive blastospores in intracelomic insect cavity; and the production of biologically active volatile metabo-

lites related to the mechanism of pathogenicity (Valero-Jiménez et al. 2016).

Microorganisms produce volatile organic compounds (VOCs), which act as signal compounds for inter- and intraspecies communication; these VOCs modulate specific responses in the recipient organisms (Hung et al. 2015). The role of microbial VOCs in inducing behavioral changes in insects has gained increasing interest in recent years. Different studies have revealed that insects can be attracted or respond evasively to these signals, and behaviors such as mating and oviposition can be triggered as long as the compounds have the odor information to incite it (Davis et al. 2013).

VOCs from entomopathogenic fungi are chemically diverse, and the responses of the insects to these microbial odors ranges from inducing repellency to foraging behaviors, which may in turn be dependent on the virulence of the tested species (Hussain et al. 2010, Mburu et al. 2013). Crespo et al. (2008) reported on the volatile fingerprint for *B. bassiana*, which varies according to the carbon source in the culture medium, and identified two unknown sesquiterpenes and n-decane. An additional study compared the VOC profiles of seven species of entomopathogenic fungi. The analysis indicated that *B. bassiana* releases a high content of short

Received: May 19, 2022. Revised: July 11, 2022. Accepted: September 23, 2022

© The Author(s) 2022. Published by Oxford University Press on behalf of FEMS. All rights reserved. For permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com

chain fatty acids (78.62%), and its VOCs profile was slightly different from that of *Pandora* sp., *Hirsutella danubiensis*, and *Batkoa* sp., and fairly different from that of *Metharhizium anisopliae*, *Metharhizium flavoviride*, and *Isaria fumosorosea* (Bojke et al. 2018).

Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) is a global insect pest with a high voracity for crops such as corn, sorghum, rice, wheat, and sugar cane (CABI 2021, Goergen et al. 2016, Du Plessis et al. 2020). Oviposition is a critical step in the arthropod life cycle. Female moths can lay their eggs on plants and nonplant materials; thus, chemical and tactile cues may influence egg-laying behavior because the choice of oviposition location is a crucial task for the performance of the offspring (Rojas et al. 2003, Silva et al. 2017). The insect response to an odorant detection and its sensitivity depends on the olfactory receptors, the function of which seems to be conserved in Lepidoptera. In particular, short-chain aliphatic alcohols, aromatics, and terpenes that are naturally released by leaves and flowers are efficiently perceived by herbivores at concentrations below than 1 pmol (de Fouchier et al. 2017).

The role of VOCs released by *B. bassiana* in oviposition behavior in *S. frugiperda* is unknown. Considering that virulence and fungal VOC profiles are strain-specific, it is tempting to speculate that the response of *S. frugiperda* to the exposure of these compounds emitted by different strains is dissimilar. In this study, we report isolates obtained from soil and from mycosed insect cadavers. Moreover, we determined their virulence, analyzed their VOC profiles, and studied their effects on egg-laying behavior in *S. frugiperda*. Our results provide new insights into the relationship between fungal entomopathogens and insect hosts.

Materials and methods

Rearing of *S. frugiperda*

A colony of *S. frugiperda* was established and maintained in the laboratory with an artificial diet set up according to the guidelines of Poitout et al. (1972). Larvae were placed in 11 plastic containers and kept in a growth chamber (Lumistell® ICP-18) at 28°C, 25% RH, and under an 8:16 (L to D) photoperiod. Larvae at stage L5 were individually placed in plastic containers with 1 g of food until they completed their maturation into pupae. Subsequently, the insects were separated by sex. This was done by observing the position of the genital aperture, which in lepidopteran females is seen as a cleft on the eighth caudal segment; in males, it is on the ninth segment and is flanked by two bulges (Butt and Cantu 1962). The sex ratio in the experimental population was very close to 1:1 throughout the trials. Emerging imagines were provided with a 15% natural honey solution in distilled water (v/v) *ad libitum*.

Isolation and molecular characterization of *B. bassiana* strains

The fungal strains were isolated from different communities in Chihuahua, Mexico (Table 1). The strains AS1, AS2, AS3, AS4, and AS5 were isolated from soils of different field crops, and AI1, AI2, and AI3 were isolated from mycosed insect cadavers. Soil nuclei were sampled in a zig zag manner on a linear transect from different locations in the crop field. The soil sample consisted of 10 subsamples with a total weight of 2 kg. The sampling consisted of making a hole with a "V" shape at a depth of 30 cm. Subsequently, a 2–3 cm thick section was cut from one of the sides of the "V". Once the soil section had been recovered, it was deposited in a bucket. This procedure was repeated until the desired number of subsamples was obtained, and all the materials were mixed into one, which was then deposited in a previously labeled polyethy-

lene bag and transferred to the laboratory. The soil samples were sieved to remove rocks and plant debris; thereafter, 60 g of soil was moistened with distilled water and placed into 100 ml polyethylene flasks. A total of five larvae of *Tenebrio molitor* were added according to the technique described by Zimmermann (1986). The flasks were maintained at 25°C for 15 days. Meanwhile, insect cadavers with typical symptoms of mycosis caused by *B. bassiana* were collected from the field and placed in a humid chamber. This chamber consisted of a Petri dish containing a circle of filter paper and 300 µl of sterile distilled water. The Petri dishes were incubated at 25°C for 5 days. After that time, the mycosed insect cadavers were immersed in 70% ethanol for 10 s, 1% sodium hypochlorite for 3 min, rinsed in sterile distilled water, and dried at room temperature for 20 min. An insect section measuring 1 cm was cut and placed in a Petri dish with Sabouraud dextrose agar (SDA) culture medium. The isolates were maintained by reculturing them in potato dextrose agar (PDA) medium in the dark at room temperature for 15 days, when the fungi sporulated.

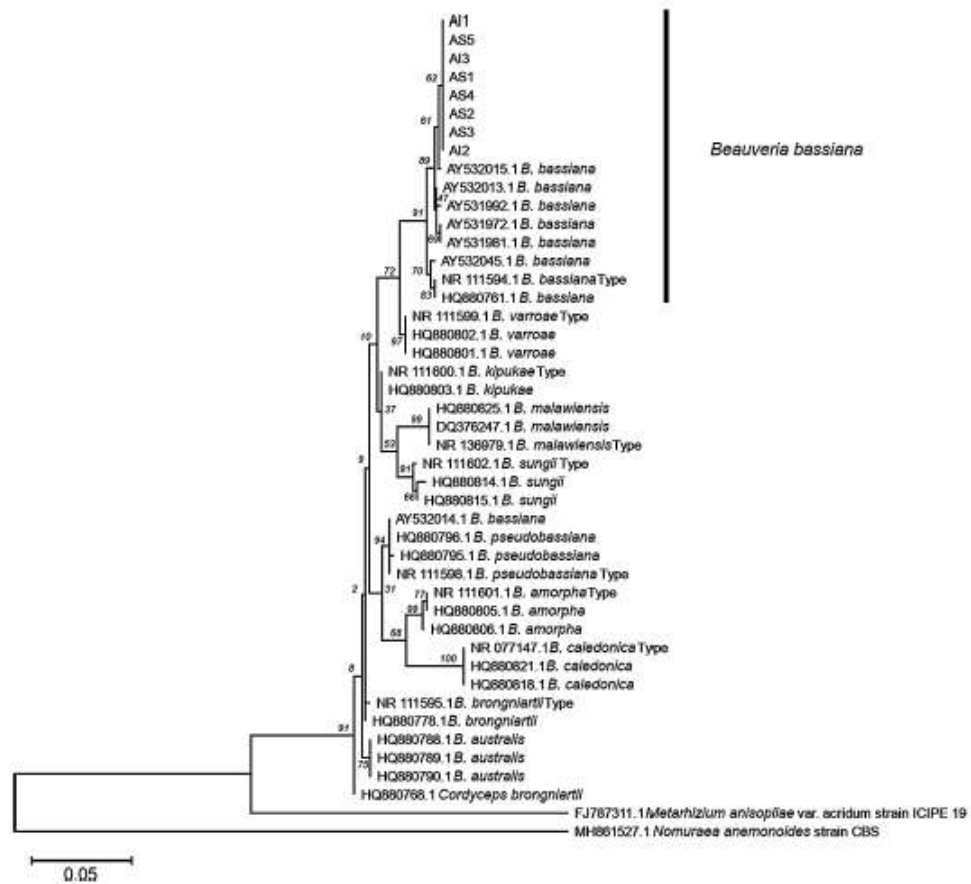
The fungal isolates grown on PDA medium were sent to the Laboratorio de Producción de Semillas in Colegio de Postgraduados in Montecillo, Texcoco, Mexico to determine the taxonomic affinity of the fungal isolates. DNA was extracted using a modified version of the 2% cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) method described by Cervantes-Romero et al. (2021). The quality and quantity of DNA were evaluated using PCR and a Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, USA), respectively (Cervantes-Romero et al. 2021). The rRNA ITS1–ITS2 region was amplified using primers ITS5/ITS4 (ITS5: 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3' and ITS4: 5'-TCCTCGCTTATTGATATGC-3') and ITS5/NIA (NIA: 5'-GGTCC GTGTTTCAAGACGG-3'; White et al. 1990, O'Donnell 1993). The sequences ranged from 529 to 1119 bp. The amplified sequences were compared with their respective homologous sequences deposited in GenBank (NCBI) using BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast). Using these sequences, a phylogenetic tree was constructed with the MEGA software (version 10.2.4) using the ClustalW algorithm to execute the alignment of *Beauveria* sequences using *M. anisopliae* and *Nomuraea anemonoides* as external outgroups. The construction of the phylogeny was performed using the maximum likelihood estimator, and using the Tamura-Nei substitution model, with bootstraps of 500 replicates for its validation (Fig. 1).

Comparative virulence of *B. bassiana* strains against *S. frugiperda* larvae

The lethality of the fungal strains was determined by calculating the median lethal time (LT₅₀). For this purpose, *B. bassiana* isolates were grown on PDA, and a spore suspension was prepared by scraping the culture medium and dissolving spores in 0.1% Tween (v/v). The spore concentration was determined using a Neubauer counting chamber, and the solution was adjusted to a final concentration of 10⁸ spores/ml. The spore suspensions were refrigerated at 4°C, for a period not exceeding 24 h. Inoculum viability was verified by observing the spore germination under a microscope, and in all cases it was higher than 90%. Larvae in stage L2 were inoculated by them spraying with ~ 200 µl of the spore solution, and then each was placed in a 10 ml plastic cup with ~ 1 g of food. Every 24 h, the larvae were monitored and mortality was recorded for 16 days, after which time there was no further accumulation of dead insects. A total of two controls were used: an absolute control of larvae treated with axenic 0.1% Tween solution, and a second control using the nonentomopathogenic fungal specie *Trichoderma atroviride* IMI 206040, whose spore suspension was prepared in the same way as that mentioned above. A total of

Table 1. *Beauveria bassiana* isolates, host, and field location.

Label	Soil/insect	Location	Coordinates	Altitude	Field crop
AI1	<i>Chlorochroa ligata</i>	Coyame del Sotol, Chihuahua	29° 27' 15.80" N, 105° 8' 52.94" W	1424 m	<i>Punica granatum</i>
AI2	<i>Phyllophaga</i> sp.	Norogachi, Guachochi, Chihuahua	27° 25' 48" N, 107° 15' 00" W	-	<i>Solanum tuberosum</i>
AI3	<i>Phyllophaga</i> sp.	Coyame del Sotol, Chihuahua	29° 27' 15.80" N, 105° 8' 52.94" W	1424 m	<i>Punica granatum</i>
AS1	Soil	Cusuhtémoc, Chihuahua	107° 01' 12" N, 28° 24' 36" W	2220 m	<i>Malus domestica</i>
AS2	Soil	Cusuhtémoc, Chihuahua	106° 52' 48" N, 28° 27' 00" W	2019 m	<i>Malus domestica</i>
AS3	Soil	Cusuhtémoc, Chihuahua	28° 24' 39" N, 106° 52' 54" W	2048 m	<i>Vitis vinifera</i>
AS4	Soil	Coyame del Sotol, Chihuahua	29° 27' 15.80" N, 105° 8' 52.94" W	1424 m	<i>Punica granatum</i>
AS5	Soil	Guerrero, Chihuahua	28° 31' 10.50" N, 107° 26' 46" W	2060 m	<i>Malus domestica</i>

**Figure 1.** Phylogenetic tree of *B. bassiana* strains AS1, AS2, AS3, AS4, AS5, AI1, AI2, and AI3 based on the ITS sequences in rDNA. Sequence comparisons were performed with their closest species and an additional eight type strains. Phylogenetic tree estimation under the maximum likelihood and bootstrapping of 500 replicates were used for inferring confidence.

10 larvae per isolate were used, and four independent replicates were created.

The appearance of mycelia on the dead insects and their subsequent growth on PDA confirmed infection with *B. bassiana*. Using this information, a cumulative mortality curve was constructed, and the median lethal time (LT_{50}) was estimated by fitting the data to a probit function using the *ecotox* package (v. 1.4.2) in R language, and Abbott's correction (Abbott 1925).

Analysis of fungal volatiles

Fungal volatiles were extracted using solid-phase microextraction (SPME, Supelco®, Bellefonte, PA, USA). Each fungal strain was inoculated in 4 ml SPME vials containing PDA slants medium (1.5 ml) and kept in the dark at room temperature for 8 days. A blue fiber (65 μ m PDMS/DVB) was inserted into the vial for 30 min, and the compounds were desorbed in the injection port of a gas chromatograph (GC, Agilent 6850 Series II, Agilent, Foster City, CA, USA) coupled with a mass spectrometer (MS, Agilent 5973) and free fatty acid phase capillary column (HP-FFAP) at 180°C for 30 s. The fiber was reactivated at 180°C for 15 min before each extraction. The instrument was programmed at 40°C for 3 min, with a temperature increment of 5°C/min to a final temperature of 180°C, which was maintained for 10 min. Analyses ($n = 3$) were programmed in scan mode with an acquisition range of 45–250 m/z . All isolates were analyzed in triplicate. All compounds were tentatively identified by their best match to the NIST/EPA/NIH mass spectra database 11 and NIST Mass Spectral Search Program 2.0; Chem Station Agilent Technologies Rev. D.04.00.2002. In addition, to find all the separate components, we used a deconvolution software (Automated Mass spectral Deconvolution and Identification System v.2.0). The chemical taxonomic categories were assigned using ClassyFire (Djournbou Feunang et al. 2016). For reference, we also calculated the Kovats retention index for all compounds using an alkane pool of C_5 – C_{25} and compared it to the standard literature (El-Sayed 2022). Finally, the pure standards, ethanol ($\geq 99.9\%$, JT Baker® B5924-02), 2-propanol (100%, JT Baker® 9095-02), dimethyl disulfide ($\geq 99\%$, Sigma-Aldrich® 471569), 3-methylbutanol ($> 98.5\%$, Sigma-Aldrich® 19392), 3-octanone ($\geq 98\%$, Sigma-Aldrich® 136913), and 3-hydroxybutan-2-one ($\geq 95\%$, Sigma-Aldrich® W200832) were used to confirm the identity of the compounds. Compounds emitted by the PDA medium alone were subtracted.

To identify biomarkers from the VOC matrix to distinguish between fungal isolation sources (soil vs. mycosed insect cadavers), a principal component analysis (PCA) was performed. Random forest (RF) through the *rattle* package in R (v.4.0.3), with a division of the data from 70/15/15 (training/validation/testing), was used to construct 500 decision trees for sample classification. The 10 compounds with the greatest contribution, according to the Gini's index, were selected for model classification. With these compounds, ordination analysis was reconstructed to validate the separation between both conditions, and PERMANOVA was used to compare the separation between groups on the PCA-ordinated plane.

Egg-laying response to the fungal volatiles in *S. frugiperda*

For the oviposition bioassays, we made cages of expanded polystyrene and paper with dimensions of 20 cm \times 20 cm \times 40 cm, and six male and six female pupae were placed inside them. Using pupae instead of adults reduces the handling and stress of the emerged moth. A total of eight inoculated Petri dishes were

introduced inside the cages (one Petri dish containing an 8-day-old *B. bassiana* strain grown on PDA medium). A total of 10 holes were made in each Petri dish to allow for headspace diffusion of the fungal volatiles. Similarly, the effect of VOCs released by the most (AI2) and least (AS5) virulent strains was assayed in two subsequent experiments, and eight Petri dishes of each strain were introduced into the cages. The controls consisted of eight Petri dishes with PDA culture media and Petri dishes inoculated with 15-day-old of *T. atroviride* IMI 206040. Plastic cups of approximately 10 ml in volume, containing a natural honey solution, were also introduced into the cage to feed the adults. After an interval of approximately 15 days the egg masses were counted and photographed. The number of egg masses was recorded using the ImageJ 1.53e software, and the area and length of each egg mass, as well as the number of eggs and layers per egg mass, were manually counted using a stereoscopic microscope.

Bioassays were carried out inside the laboratory at an average room temperature of 25°C during the two experimental periods (July–September 2020 and February–August 2021). The number of repetitions varied among treatments, but there were at least three for the AI2, AS5, and *T. atroviride* treatments, and six for the *B. bassiana* strain pool treatment.

Response of *S. frugiperda* to a dilution of fungal volatiles

To study the effect of a fungal VOC dilution on the egg-laying insect response, we reduced the number of inoculated Petri dishes inside the cages. We called this experiment as microbial odor dilution analysis (MODA). Thus, we introduced four Petri dishes and one Petri dish instead of eight inside the cage. For this bioassay, we used the most virulent strain, AI2. These experiments were performed in triplicate in September of 2021.

Exploratory trial of the effect of 3-methylbutanol on the egg-laying behavior of *S. frugiperda*

Additionally, to discern the effect of 3-methylbutanol on *S. frugiperda* oviposition, we used lures that consisted of a 1.5-ml Eppendorf tube loaded with three different volumes of the standard (1, 2, and 5 μ l) and 30 μ l of mineral oil with a 5-mm cotton wick, following the methodology of Tasin et al. (2018). Lures loaded with 30 μ l mineral oil were used as controls. Each bait was placed on the roof of a cage. A total of six males and six females were introduced according to the methodology described above. Each treatment was performed in triplicate in February 2022, with contrasting differences in the area, length of the egg mass, the number of eggs, and layers per egg mass. These variables were manually determined using the ImageJ 1.53e software.

Statistical analysis

Fungal compound abundances were analyzed using one-way ANOVA, and contrasting the observed effects with the LSD post hoc test ($\alpha = 0.05$). Additionally, generalized linear models with a negative binomial distribution (Myers et al. 2019) were generated using the MASS package in R (v. 4.0.5.). These were then used to compare the number of masses, length of the mass on its major axis, the area of the egg mass, and number of visible eggs. For specific comparisons between the most and least virulent strains, AI2 and AS5, respectively, a t-test was used.

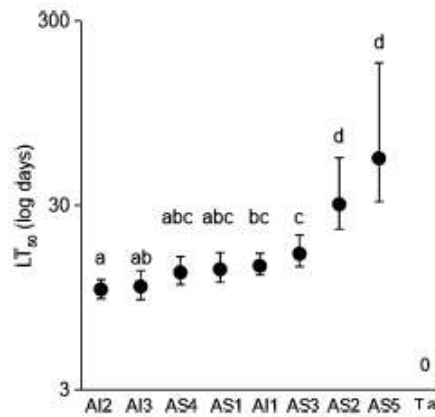


Figure 2. Virulence (LT_{50}) of the eight strains of *B. bassiana* isolated from soil and mycosed insect cadavers against *S. frugiperda* L2. A total of 10 larvae per isolate were used and four independent replicates were performed. The data was fitted with the probit function. A 95% confidence interval was used.

Results

Molecular characterization of *B. bassiana* isolates using the ITS amplification region

The sequences obtained from ITS had sizes ranging from ~500 bp (ITS5/ITS4 primers) to ~1000 bp (ITS5/NL4 primers), which comprises the ITS1/2 regions and the sequence corresponding to the 5.8S small subunit. The first coincidence for all sequences corresponded to sequences reported for *B. bassiana* (< 99.8% identity, 100% coverage). A phylogenetic tree was constructed using type sequences downloaded from GenBank, and the isolates were grouped within the clade corresponding to *B. bassiana* (bootstrap value, 89%; Fig. 1).

Beauveria bassiana strains showed variation in virulence against *S. frugiperda*

All the isolates of *B. bassiana* were effective in killing the insects; however, variations in virulence were observed among them. The most virulent strains were AI2 and AI3, with the shortest LT_{50} values (10.5 days and 10.9 days, respectively), whereas the least virulent strains were AS2 and AS5, with higher LT_{50} values (30.4 days and 54 days, respectively; Fig. 2). As expected, the control with *T. atroviridae* did not exhibit lethality.

The emission of volatiles in *B. bassiana* strains was source-specific

A total of 39 compounds were tentatively identified in the *B. bassiana* strains using SPME-GC-MS. Alcohols, ketones, terpenes, phenolics, and fatty acids, among others, were matched with the mass spectra database (Table 2). Interestingly, the isolates showed variation in the mean alcohol content ($P = .012$), mainly 3-methylbutanol ($P < .001$) and ethanol ($P < .001$). Furthermore, the ketone 2-undecanone ($P = .052$), and the fatty acids octanoic ($P = .003$) and nonanoic ($P = .004$) acids, differed among the strains; meanwhile, the phenolic compounds showed a significant variations ($P = .021$). The projection of the data on the ordered plane showed a clear separation between the isolates from insect cadavers and those from soil nuclei ($P = .003$ PERMANOVA; Fig.

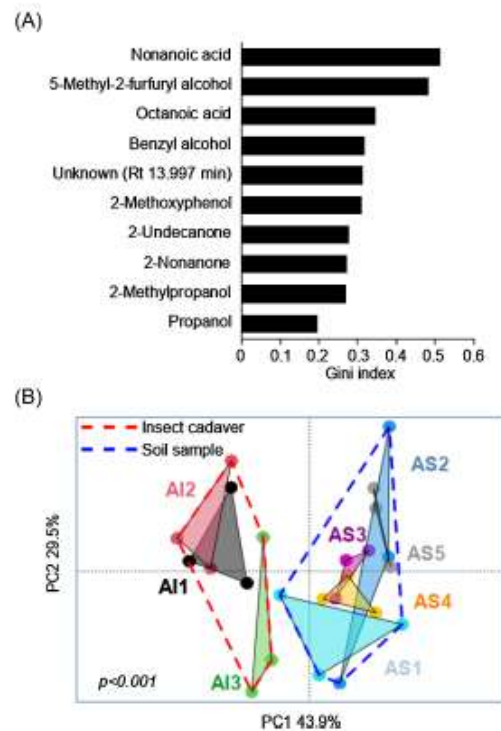


Figure 3. Contribution of compound importance according to the RF algorithm, ranked by (A) Gini index and (B) ordination analysis for the discrimination of the fungal isolation source (soil vs. mycosed insect cadavers) using the SPME-GC-MS data. The two sets of isolates are marked with an interrupted line polygon. The results were contrasted with PERMANOVA analysis ($\alpha = 0.05$, $n = 3$).

ure S1, Supporting Information). Otherwise, the volatile profile of *B. bassiana* was different from that of the nonentomopathogenic fungus *T. atroviridae* (Table S1 and Figure S1, Supporting Information).

To determine which compounds differentiated the samples according to the isolation source (soil vs. mycosed insect cadavers), we generated a RF model that showed the 10 compounds with the highest mean decrease in Gini values, that better discriminated between sample classes (Fig. 3A). These compounds were nonanoic acid, 5-methyl-furfuryl-alcohol, octanoic acid, benzyl alcohol, an unknown compound with a retention time of 13.997 min, 2-methoxyphenol, 2-undecanone, 2-nonanone, 2-methylpropanol, and propanol. These compound biomarkers were associated with an increased relative abundance in samples from mycosed insect cadavers (Table 2). The loading plot of the PCA obtained after the RF model showed a better distribution of both sample classes on the plane ($P = .001$; Fig. 3B).

VOCs emitted by *B. bassiana* stimulate oviposition behavior in *S. frugiperda*

Analyses of fungal VOCs using GC-MS showed that chromatographic profiles were quantitatively rather than qualitatively different among the samples. Thus, the question arises as to whether the pool of compounds emitted by *B. bassiana* strains is able to

Table 2. VOCs produced by *E. faecalis* in PDA medium after 8 days of growth and identified by SPME-GC-MS.

Name	Kovats index		Relative abundance (\pm standard error)							
	Calculated	Reported	A11	A12	A13	A14	A15	A16	A17	A18
Alcohols										
2-Propanol	703		0.38 (0.05) a	0.31 (0.05) a	0.35 (0.05) a	0.33 (0.03) a	0.40 (0.04) a	0.32 (0.05) a	0.36 (0.03) a	0.25 (0.03) a
Ethanol	709	996	9.07 (0.47) cd	7.83 (0.69) de	7.88 (0.55) de	13.53 (0.77) a	7.99 (0.26) de	10.63 (0.82) bc	11.32 (0.75) b	6.36 (0.11) e
Propanol	829		0.40 (0.08) a	0.46 (0.11) a	nd	0.26 (0.03) a	0.28 (0.02) a	0.27 (0.03) a	0.23 (0.01) a	0.43 (0.06) a
2-Methylpropanol	1064		1.53 (0.14) a	1.80 (0.16) a	1.72 (0.13) a	1.48 (0.20) a	1.45 (0.35) a	1.61 (0.19) a	1.55 (0.08) a	2.09 (0.07) a
3-Methylbutanol	1215		53.88 (2.7) bcd	53.40 (3.97) bcd	56.53 (1.44) bc	54.72 (2.82) bcd	58.60 (3.06) b	49.17 (1.83) d	51.31 (0.39) cd	72.73 (0.79) a
4-Pentanol	1308		0.41 (0.004) c	0.91 (0.17) a	0.55 (0.05) bc	0.43 (0.03) bc	0.35 (0.03) c	0.45 (0.02) bc	0.64 (0.06) b	0.39 (0.07) c
2-Urdeanol	1726		0.23 (0.03) a	0.12 (0.07) a	nd	0.21 (0.06) a	0.21 (0.03) a	0.36 (0.13) a	0.35 (0.06) a	nd
5-Methyl-2-furfuryl alcohol	1726		0.29 (0.03) bc	0.41 (0.07) a	0.33 (0.05) ab	0.14 (0.004) d	0.20 (0.02) cd	0.27 (0.005) bc	0.26 (0.01) bc	0.24 (0.05) bcd
Benzyl alcohol	1889		0.21 (0.01) abc	0.23 (0.05) ab	0.27 (0.05) a	0.14 (0.03) c	0.21 (0.003) abc	0.16 (0.01) bc	0.16 (0.01) bc	0.14 (0.01) c
2-Phenylethanol	1922		7.01 (0.36) a	7.85 (2.78) a	9.68 (0.44) a	8.37 (1.22) a	7.09 (0.21) a	10.81 (0.52) a	10.47 (1.75) a	6.31 (0.95) a
Total mean abundance			74.32 b	73.70 b	77.86 b	79.85 b	77.09 b	74.31 b	76.98 b	89.23 a
Terpenes										
Unknown Terpene (204 m/z)	1587		2.43 (0.48) b	2.40 (0.13) b	1.97 (0.20) b	2.43 (0.66) b	2.49 (0.63) b	3.88 (0.49) a	2.84 (0.30) ab	0.62 (0.21) c
β -Elemene	1591		0.49 (0.29) c	2.96 (0.29) a	1.85 (0.60) b	1.06 (0.33) c	0.56 (0.29) bc	1.70 (0.51) b	0.62 (0.16) c	0.04 (0.04) c
2-Methylisobornol	1594		1.16 (0.47) ab	1.83 (0.19) a	1.67 (0.32) ab	nd	0.88 (0.86) bc	0.93 (0.27) bc	0.26 (0.18) c	1.84 (0.30) a
γ -Selinene	1671		0.23 (0.06) a	0.20 (0.11) a	0.19 (0.02) a	0.21 (0.11) a	0.23 (0.07) a	0.37 (0.07) a	0.31 (0.05) a	nd
Valencene	1704		0.20 (0.03) a	0.20 (0.05) a	nd	0.17 (0.05) a	0.14 (0.04) a	0.26 (0.02) a	0.25 (0.07) a	0.11 (0.07) a
Alloaromadendrene	1712		0.89 (0.22) bc	0.51 (0.19) cd	0.57 (0.14) bcd	0.99 (0.43) abc	1.09 (0.28) abc	1.66 (0.30) a	1.28 (0.21) ab	0.07 (0.07) d
β -Selinene	1716		0.46 (0.18) a	0.28 (0.08) a	0.37 (0.10) a	nd	0.28 (0.28) a	0.26 (0.20) a	0.20 (0.20) a	nd
α -Selinene	1718		0.95 (0.24) bcd	0.53 (0.21) cd	0.58 (0.15) cd	1.41 (0.60) abc	1.30 (0.31) abc	1.94 (0.31) a	1.55 (0.29) ab	0.08 (0.08) d
2-Isopropenyl-4 α ,8-dimethyl-1,2,3,4,4a,5,6,7-octahydronaphthalene	1722		0.63 (0.23) a	0.41 (0.12) a	0.37 (0.16) a	0.47 (0.19) a	0.59 (0.30) a	0.63 (0.27) a	0.55 (0.14) a	nd
Guaiacols										
Guaiac-9,11-diene	1758		2.96 (0.80) abc	1.64 (0.63) bcd	1.39 (0.42) cd	2.86 (1.21) abc	3.13 (0.86) abc	4.45 (0.98) a	3.72 (0.45) ab	0.13 (0.13) d
γ -Guaiajene	1761		0.49 (0.18) a	0.11 (0.11) a	0.27 (0.07) a	0.35 (0.16) a	0.43 (0.19) a	0.41 (0.18) a	0.20 (0.10) a	nd
Total mean abundance			10.88 ab	11.06 ab	9.24 b	9.36 b	11.14 ab	16.49 a	11.79 ab	2.89 c
Ketones										
3-Octanone	1769		0.07 (0.07) a	0.13 (0.07) a	0.25 (0.02) a	0.09 (0.02) a	0.19 (0.04) a	0.11 (0.03) a	0.16 (0.012) a	0.05 (0.05) a

Table 2. Continued

Name	Kovats index		Relative abundance (\pm standard error)									
	Calculated	Reported	A11	A12	A13	A14	A15	A16	A17	A18	A19	A20
3-Hydroxybutano-2-one	1293		0.81 (0.07) a	0.86 (0.06) a	0.93 (0.27) a	1.10 (0.23) a	0.83 (0.12) a	0.82 (0.17) a	1.05 (0.08) a	1.38 (0.20) a		
2-Nonanone	1390	1388	1.47 (0.28) a	1.94 (0.84) a	1.56 (0.31) a	0.58 (0.27) a	1.16 (0.23) a	0.63 (0.07) a	0.76 (0.12) a	0.58 (0.07) a		
2-Undecanone	1602		2.86 (0.35) ab	3.41 (0.35) ab	3.83 (0.57) a	1.89 (0.80) bc	2.84 (0.74) ab	2.15 (0.52) bc	2.60 (0.53) abc	0.98 (0.13) c		
6,10-Dimethyl-5,9-undecan-2-one	1863		0.52 (0.11) ab	0.29 (0.10) bc	0.19 (0.05) c	0.64 (0.13) a	0.17 (0.06) c	0.55 (0.09) ab	0.54 (0.06) ab	rd.		
Total mean abundance			5.73 a	6.64 a	6.57 a	4.31 a	5.19 a	4.27 a	5.11 a	2.99 a		
Fatty acids												
Octanoic acid	2114		1.76 (0.41) ab	2.72 (0.66) a	0.79 (0.50) bc	0.74 (0.70) bc	0.08 (0.04) c	rd.	0.07 (0.07) c	0.52 (0.35) bc		
Nonanoic acid	2222	2940	1.46 (0.31) a	0.80 (0.51) b	0.63 (0.18) bc	0.16 (0.08) bc	0.17 (0.009) bc	0.07 (0.04) c	0.09 (0.08) c	0.24 (0.05) bc		
Total mean abundance			3.24 a	3.52 a	1.42 b	0.90 bc	0.24 c	0.07 c	0.16 c	0.25 bc		
Phenolic compounds												
2-Methoxyphenol	1874		0.51 (0.09) b	0.53 (0.11) b	0.77 (0.14) a	0.23 (0.04) c	0.48 (0.09) b	0.33 (0.02) bc	0.33 (0.02) bc	0.44 (0.01) bc		
2-Methoxy-6-methylphenol	1885		0.28 (0.04) abc	0.28 (0.06) abc	0.41 (0.06) a	0.16 (0.03) c	0.34 (0.05) ab	0.30 (0.03) ab	0.24 (0.04) bc	0.26 (0.06) bc		
2-Methoxy-5-methylphenol	1956		0.32 (0.03) a	0.38 (0.10) a	0.56 (0.14) a	0.29 (0.15) a	0.30 (0.02) a	0.25 (0.02) a	0.28 (0.05) a	0.30 (0.05) a		
2-Toluonolol	1964		0.18 (0.03) a	0.11 (0.07) a	0.14 (0.02) a	0.18 (0.04) a	0.14 (0.02) a	0.20 (0.04) a	0.25 (0.02) a	0.12 (0.06) a		
Total mean abundance			1.11 b	1.19 b	1.74 a	0.67 b	1.11 b	0.86 b	0.84 b	0.99 b		
Others												
2,5-Dimethylfuran	729		2.39 (0.25) bc	1.57 (0.27) c	1.63 (0.36) c	2.65 (0.18) ab	3.01 (0.09) ab	2.23 (0.15) bc	3.44 (0.34) a	1.70 (0.49) c		
Dimethyl disulfide	868		0.51 (0.12) a	0.42 (0.02) a	rd.	rd.	0.47 (0.06) a	0.34 (0.07) a	rd.	0.25 (0.02) a		
Urolovin	1405		0.20 (0.02) ab	0.26 (0.06) a	0.27 (0.03) a	0.05 (0.02) c	0.20 (0.05) ab	0.13 (0.02) bc	0.18 (0.04) bc	0.20 (0.02) ab		
1-Ethyl-4-methoxybenzene	1688		0.58 (0.14) a	0.76 (0.29) a	0.57 (0.07) a	0.27 (0.10) a	0.65 (0.07) a	0.59 (0.17) a	0.82 (0.11) a	0.49 (0.20) a		
Urolovin	1747		0.35 (0.08) a	0.25 (0.04) a	0.24 (0.04) a	0.13 (0.05) a	0.13 (0.07) a	0.20 (0.04) a	0.13 (0.07) a	0.04 (0.04) a		
2,4-Dibromo-1-methoxybenzene	2002		0.60 (0.07) a	0.22 (0.12) a	0.61 (0.16) a	1.15 (0.91) a	0.79 (0.04) a	0.94 (0.15) a	0.54 (0.03) a	0.56 (0.20) a		
Urolovin	2279		0.61 (0.16) a	0.68 (0.37) a	0.29 (0.09) a	0.20 (0.08) a	0.13 (0.02) a	0.21 (0.03) a	0.07 (0.07) a	0.08 (0.09) a		
Total mean abundance			4.29 a	3.24 a	3.08 a	4.11 a	5.13 a	3.64 a	4.93 a	3.2 a		

Compounds were tentatively identified on the basis of NIST library matches and Kovats retention indices. Bhanol, 2-propanol, dimethyl disulfide, 3-methylbutanol, 3-octanone, and 3-hydroxybutano-2-one were confirmed by comparison with standards. Mean values correspond to the sum of three independent determinations. Statistical analysis was performed using the analytical component manager. Letters indicate significant differences according to the LSD test ($P \leq 0.05$). Kovats index was calculated using the mixture of normal paraffin C₆-C₂₀ on the HP-FFAP capillary column, and compared to that available in the NIST library (NIST 2022). rd. = not detected.

influence the reproductive habits of *S. frugiperda* (Fig. 4). We performed a bioassay, called the *B. bassiana* treatment, in which one inoculated Petri dish per strain was introduced into a polystyrene cage, where insect adults emerged from pupae with the fungal odor background stimulus. The results showed no significant differences in the total number of egg masses per cage (average, 17), or in the eggs laid per clutch (average, 2), compared to the axenic control. However, we observed an increase of ~ 18% in the area of the egg masses (axenic: 34.59 mm², *Beauveria* treatment: 43.585 mm², $P = .006$; Fig. 4A), ~ 18% in the length (axenic: 11.08 mm, *Beauveria* treatment: 13.90 mm, $P < .001$; Fig. 4B), and ~ 20% in the number of eggs (axenic: 139 eggs, *Beauveria* treatment: 177 eggs, $P = .006$; Fig. 4C). The VOCs emitted by the nonentomopathogenic fungus *T. atroviride* 206040 did not induce a significant response in *S. frugiperda* for any of the variables evaluated (Fig. 4A–C), perhaps because the chemical fingerprint of those VOCs is different from that of *B. bassiana* (Table S1 and Figure S1, Supporting Information).

To explore the ability of Lepidoptera to respond to the VOCs released by two different strains of *B. bassiana* with different virulence levels, we performed bioassays with the most virulent strain AI2 and the least virulent strain AS5. The results showed that the fingerprint of compounds from AS5 slightly stimulated egg-laying behavior in *S. frugiperda*; furthermore, the effect of AI2 was strongest (Fig. 4A–C). The VOCs from AI2 had an effect similar to that of the *B. bassiana* treatment. Table 2 shows that AI2 emitted more terpenes (t -test, $P = .010$), fatty acids (t -test, $P = .004$), and alcohols (t -test, $P = .017$), whereas the VOCs profile of AS5 was the poorest in terms of compound diversity when compared with that of AI2. For example, the compounds 2-undecanol, 6,10-dimethyl-5,9-undecadien-2-one, γ -selinene, β -selinene, 2-isopropenyl-4a,8-dimethyl-1,2,3,4,4a,5,6,7-octahydronaphthalene, and γ -gurjunene were not detected in AS5. These results suggest that *B. bassiana* has a unique fingerprint of compounds, and *S. frugiperda* may respond to them accordingly to the isolation source and strains virulence.

The response of *S. frugiperda* to fungal VOC dilution is dynamic

To study the dilution effect of fungal VOCs on the laying behavior of *S. frugiperda*, a MODA bioassay was performed. The experiment consisted of reducing from eight to four the number of AI2 inoculated Petri dishes inside the cage (Fig. 5). The treatment consisting of four Petri dishes did not show a diminished area of egg mass compared with the treatment with eight Petri dishes; whereas, the treatment consisted of one Petri dish had a similar effect to that of the axenic control (axenic: 26.22 mm², eight plates: 33.59 mm², $P = .029$; four plates: 47.38 mm², $P = .008$; one plate: 28.84 mm², $P = .621$; Fig. 5A). Nevertheless, the decrease in VOCs in the headspace of the cage slightly affected the egg mass length (axenic: 9.517 mm, eight plates: 11.537 mm, $P = .101$; four plates: 13.984 mm, $P = .0383$; one plate: 12.394 mm, $P = .096$; Fig. 5B). Finally, no significant differences were found in the number of eggs (axenic: 120 eggs, eight plates: 136 eggs, $P = .349$; four plates: 131 eggs, $P = .688$; one plate: 127 eggs, $P = .742$; Fig. 5C).

The VOCs produced by *B. bassiana* strains are mainly composed of alcohols (relative abundance > 75%); additionally, minor compounds such as ketones and terpenes complement the overall fungal odor (Table 1). Thus, the fungal odor background inside the cage may have modified the insect response.

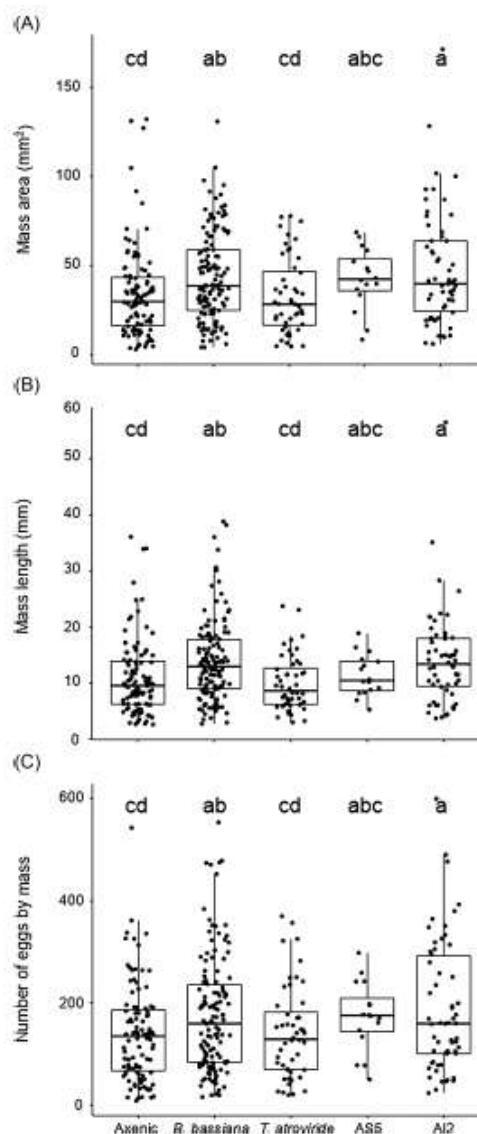


Figure 4. Effect of volatiles emitted by *B. bassiana* on the oviposition behavior of *S. frugiperda*. (A) Surface area, (B) length of egg masses, and (C) total egg count. Bioassays were performed in polystyrene and paper cages (20 cm × 20 cm × 40 cm), and eight inoculated Petri dishes with 15-day-old entomopathogenic fungus were introduced inside the cages. *Beauveria bassiana* treatment consisted of the pool of VOCs emitted by all fungal isolates obtained from the soil and mycosed insect cadavers. The other treatments included the VOCs produced particularly by the AI2 and AS5 strains. The control treatment comprised Petri dishes with PDA medium. *Trichoderma atroviride* was used as a control as it is a nonpathogenic fungus. The results were contrasted with the generalized linear model and negative binomial distribution ($\alpha = 0.05$). The same letter indicates no significant differences.

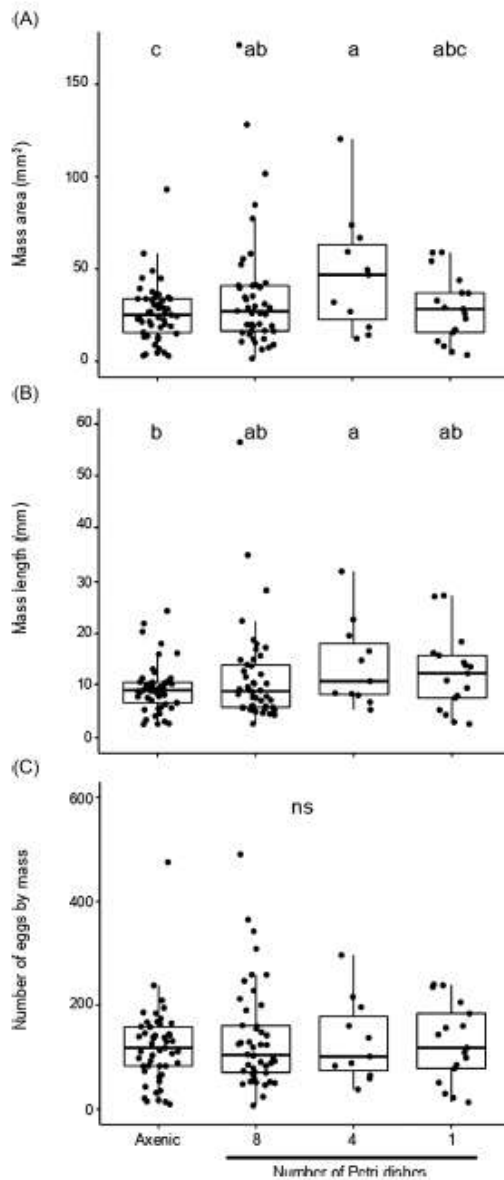


Figure 5. Effect of the fungal odor dilution of the most virulent strain, AI2, on the oviposition behavior of *S. frugiperda*. (A) Surface area, (B) length of egg masses, and (C) egg counting. Bioassays consisted of reducing the number of inoculated Petri dishes by four inside the polystyrene and paper cages (20 cm × 20 cm × 40 cm). The control treatment comprised eight Petri dishes with FDA medium. The strain AI2 had 15 days of growth before use. The results were contrasted with the generalized linear model and negative binomial distribution ($\alpha = 0.05$). The same letter indicates no significant differences.

Lower doses of 3-methylbutanol affect egg-laying behavior in *S. frugiperda*

3-Methylbutanol is the most abundant compound produced by *B. bassiana* strains. The least virulent strain AS5 produced the most of this compound (72.7%), whereas the most virulent strain AI2 produced the least (53.4%; Table 1). Thus, we performed an exploratory trial to prepare lures based on three different doses (1, 2, and 5 μ l) of 3-methylbutanol, and studied its effect on egg-laying in *S. frugiperda*. The results showed no effect of the standard at 2 and 5 μ l on the mass area, mass length, and number of eggs by mass (Fig. 6A-C). However, a dose of 1 μ l decreased the mass area (mineral oil: 23.911 mm², 1 μ l: 10.153 mm²; $P = .004$) and number of eggs by mass (mineral oil: 105 eggs, 1 μ l: 50 eggs; $P = .009$; Fig. 6A and C). These results suggest that the alcohol, as a single compound, may affect oviposition, depending on the concentration used.

Discussion

Microbial semiochemicals play different roles in nature (Davis et al. 2013, Müller et al. 2013). The investment in matter and energy by microorganisms to produce and release these compounds is expected to be significant (Kanchiswamy et al. 2015). However, in an ecological context, such investments aid in communication with members from different trophic levels, thereby increasing the chances of microbes colonizing new environments or switching between different trophic lifestyles (Davis et al. 2013). In the case of some entomopathogens, these semiochemicals may contribute to the attraction of potential hosts or play different roles, inciting other responses in insects. In this study, we uncovered an important effect of VOCs released by the entomopathogenic fungus *B. bassiana* on the oviposition behavior of the lepidopteran *S. frugiperda*. To the best of our knowledge, this effect had not been previously explored. Interestingly, the fungal VOCs profile was specific to the isolate source from which the fungus was obtained, i.e. soil or insect cadavers. Importantly, *S. frugiperda* responded according to the fungal compounds fingerprint.

Beauveria bassiana isolates from mycosed insect cadavers showed a different chemical signature and higher virulence than those obtained from soil

In this study, we examined the virulence of eight isolates of *B. bassiana* obtained from mycosed insect cadavers and soil samples against *S. frugiperda* larvae in stage I2. Our results showed that virulence among the isolates varied according to the environmental source from which they were isolated. In general, isolates from insects showed the shortest LT_{50} values, although cannot rule out that isolates from soil may display increased virulence in a different and more susceptible hosts. For a successful infection, *B. bassiana* requires contact with its hosts (Urna Devi et al. 2008, Gul et al. 2014, Valero-Jiménez et al. 2016). Thus, the production of secondary metabolites is crucial as a part of the pathogenesis. *Beauveria bassiana* constitutively produces VOCs, and their role as a chemical signal before insect contact has been the subject of study by diverse research groups. Interestingly, the VOC profiles of the soil and mycosed insect cadaver isolates differed. Using the SPME-GC-MS technique and classification models, we were able to discriminate *B. bassiana* strains according to the isolation source. The RF algorithm displayed 10 compounds that differentiated soil isolates from insect cadaver isolates; these included nonanoic acid, 5-methylfurfuryl alcohol, octanoic acid,

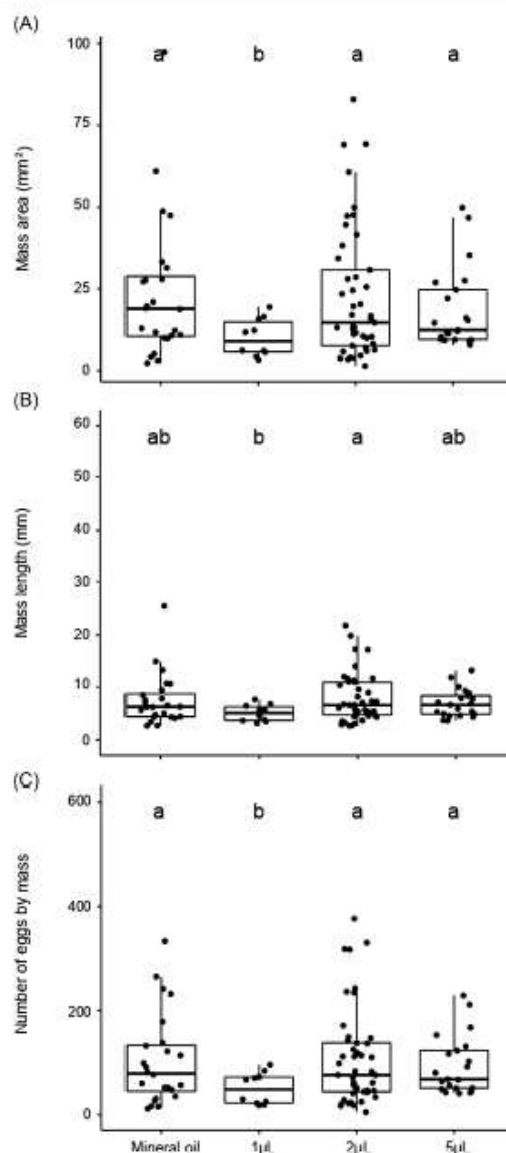


Figure 6. Dose-response effect of 3-methylbutanol on the oviposition behavior of *S. frugiperda*. Parameters such as (A) surface area, (B) length of egg masses, and (C) egg count were measured. Lures made with 1, 2, and 5 μ l of the pure standard were introduced into the polystyrene and paper cages (20 cm \times 20 cm \times 40 cm). The results were contrasted with the generalized linear model and negative binomial distribution ($\alpha = 0.05$). The same letter indicates no significant differences.

benzyl alcohol, an unknown compound with a retention time of 13.99 min, 2-methoxyphenol, 2-undecanone, 2-nonanone, 2-methylpropanol, and propanol. These results may be related to the fungal lifestyle and ecological adaptation to the habitat, which in turn may indicate different abilities when interacting with their

hosts (Crespo et al. 2008, Bojke et al. 2018, Schenkel et al. 2015, Fitzgerald et al. 2020, Guo et al. 2021).

VOCs tentatively identified within the chromatographic profile of *B. bassiana* have been reported as inducers of behavioral responses in arthropods

A total of 39 compounds were tentatively identified in *B. bassiana* strains using SPME-GC-MS, 14 of which are known to induce activity in different subfamilies of lepidoptera (El-Sayed 2022; Fig. 7). The most abundant component of the VOCs produced by *B. bassiana* strains were alcoholic compounds, especially 3-methylbutanol and 2-phenylethanol, which by the way have been widely reported as semiochemicals in lepidoptera in the Pherobase data base report (Fig. 7). Both alcohols belong to the so-called fusel alcohols, which are produced as by-products of fermentation processes from amino acids via Ehrlich pathway (Ravasio et al. 2014). These fusel alcohols impart fruity aromas to fermentation products, and can elicit antennal and behavioral responses in many groups of insects (Dzialo et al. 2017). For instance, field-trapping trials have confirmed the attractive effect of both alcohols in *Lobesia botrana* adults (Tasin et al. 2018); whereas 2-phenylethanol is attractive to other species, such as *Helicoverpa armigera*, *Carandrina morpheus*, and *Mamestra configurata* (Clearwater 1975, Li et al. 2005, Davis and Landlot 2013). Additionally, 2-phenylethanol has been identified as a sex hormone in Noctuidae moth *Tricoplusia* spp. (Jacobson et al. 1976), and its binary combination with acetic acid attracts to *Choristoneura rosaceana* (Lepidoptera: Tortricidae; Knight et al. 2017). Other nonentomopathogenic fungi like *Hanseniaspora uvarum*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Pichia anomala*, and *Saccharomyces cerevisiae*, naturally produce 3-methylbutanol and 2-phenylethanol. Furthermore, in oviposition preference tests using females of the lepidopteran *L. botrana* (Tortricidae), the authors observed that oviposition occurred more in fruits inoculated with the fungal consortium than in uninoculated control fruits. The analysis of VOCs from the consortium showed higher emission of both alcohols, as well as ethanol and ethyl acetate, suggesting that these compounds play an important role in stimulating the insect response. Moreover, subsequent field trapping trials confirmed the attractive effect of the inoculated fruits on *L. botrana* adults (Tasin et al. 2018).

Different terpenes were tentatively identified in the fungal VOCs profiles. Terpenes are a chemical group with diverse effects on insects, and their roles as hormones and semiochemicals are well-known (Beran et al. 2016). Binder and Robbins (1997) studied the effect of different cyclic and acyclic terpenes on the stimulation of oviposition of the corn borer moth, *Ostrinia nubilalis*. The authors found that certain structural motifs trigger specific responses, ranging from being deterrents to stimulants in the insects. In particular, the sesquiterpenes alpha-humulene, and alpha- and beta-farnesene exerted a strong stimulatory effect on oviposition, whereas farnesal and farnesol showed dissuasive effects. In contrast, studies on terpenes of microbial origins, such as geosmin produced by hazardous molds, act as alarm cues in females of the diptera *Drosophila melanogaster*, which leads them to avoid oviposition on surfaces contaminated by these toxic microbes (Stensmyr et al. 2012). Within the VOC profiles of *B. bassiana* strains, we tentatively identified 2-methylisoborneol. This monoterpene has previously been reported in *Streptomyces* sp. WAC-288 to attract *D. melanogaster*. In this study, after being attracted by the compound, *D. melanogaster* deposited their eggs over the inoculated substrate, and the resulting larvae were killed

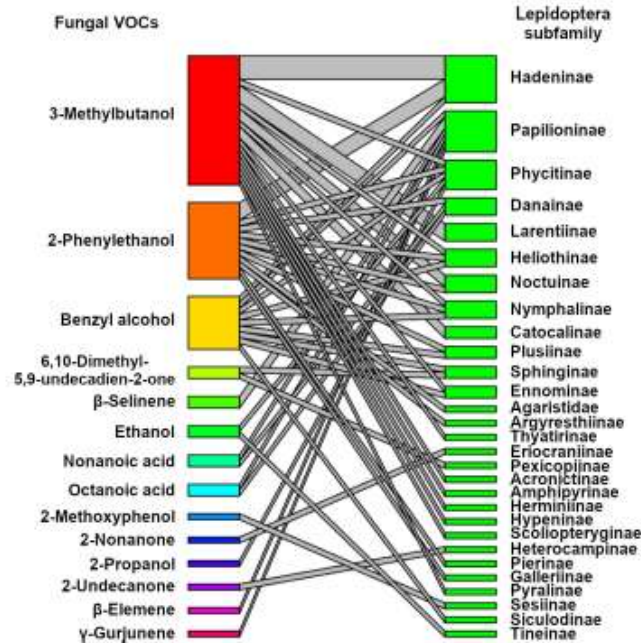


Figure 7. Bipartite interaction network of the VOCs identified in *B. bassiana* strains using SPME-GC-MS, and their reported role as semiochemicals in different lepidopteran subfamilies. Reports were manually searched in the Pherobase database (El-Sayed 2022).

by the bacteria (Ho et al. 2020). The insect-attracting effect of 2-methylisoborneol has also been reported for the collembolans *Folsomia candida* to promote the dispersal of *Streptomyces* spores (Becher et al. 2020).

A total of two fatty acids, octanoic and nonanoic acids were tentatively identified within the VOC profiles of *B. bassiana* strains, and their abundances was higher in the profiles of insect cadaver isolates. Fatty acids are important precursors of bioactive compounds in insects, such as the biosynthesis of pheromones (Dettner 2014). In lepidopteras, both nonanoic and octanoic acids are components of the sex pheromone of *Papilio protenor* sub. *demetrius* (Omura et al. 2012), and are also bioactive in other insect groups, such as Coleoptera, Hymenoptera, Diptera, and Heteroptera (El-Sayed 2022). Furthermore, some reports have shown that nonanoic acid is a component of the pygidial gland secretion of the coleopteran *Duvallius militari* with defensive functions (Vesović et al. 2015). It appears that insects are able to perceive and respond to the presence of fatty acids. Several reports have indicated that insects can perceive fatty acids from their diet, and behavioral tests have shown that larvae and adults of *D. melanogaster* have different preferences for saturated and unsaturated fatty acids as dietary components (Fougeron et al. 2011). Bioassays with pure long-chain fatty acids, such as tetradecanoic, palmitic, palmitoleic, stearic, oleic, linoleic, and linolenic acids, have shown disruption in oviposition behavior in *Ostrinia* species (Li and Ishikawa 2005). Furthermore, specific fatty acids, such as nonanoic acid, tetradecanoic acid, and methyl tetradecanoate of bacterial origin, are known to be potent inducers of oviposition in the diptera *Aedes aegypti* (Ponnuasamy et al. 2008).

Beauveria bassiana incite egg-laying behavior in *S. frugiperda* through VOC emissions

Insect responses are strongly influenced by the environmental context of the perceived odoriferous landscape, which explains the high specificity of the observed responses at different life stages, and diurnal and seasonal cycles (Conchou et al. 2019). Studies on the perception of microbial odorous stimuli have shown that insects can convert stimuli into a particular behavioral response, thereby influencing feeding, attracting or repelling, or by mimicking sexual pheromones through inciting insect mating and oviposition (Davis et al. 2013, Lozano-Soria et al. 2020). In particular, we observed that the pool of VOCs released by *B. bassiana* induced oviposition behavior in *S. frugiperda* in cages made with polystyrene and paper, regardless of the level of virulence or the isolate source. Indeed, bioassays performed with strain AI2 showed that half the number of inoculated Petri dishes inside the cage consequently increased the egg mass area and length, whereas, with one inoculated Petri dish, the insect response was similar to that of the axenic treatment. These results suggest that the insect response is dynamic and may be affected by odor intensity, which could be a part of an ecological balance strategy. The host-pathogen relationship is very complex, and changes in population size are usually involved. On the one hand, pathogens have a negative effect on their host, but on the other hand, a decrease in host population affects them (Dobson 1988). Infections by entomopathogenic fungi essentially require penetration of the host cuticle; thus, it is tempting to speculate that egg-laying stimulation in target hosts by the emission of specific VOC profiles could represent an adaptive advantage where the entomopathogen stimulates the population growth of their

hosts, thereby increasing their rate of transmission, as well as their own population growth.

3-Methylbutanol, an abundant compound released by *B. bassiana*, shows activity as single compound that affects the egg-laying response in *S. frugiperda*

Often, insect perception of the complex blend of compounds in natural odors elicits behavioral responses that are distinct from those elicited by the individual constituents (Tasin et al. 2018, Su et al. 2011). Considering that the pool of VOCs released by *B. bassiana* modulates the behavioral ecology of oviposition in *S. frugiperda*, we performed bioassays with the standard 3-methylbutanol as a single microbial compound to explore its effect on egg-laying when adults perceive it as an odor background after pupal emergence. Notably, this alcohol was the most abundant compound produced by all *B. bassiana* strains. Under our experimental conditions, a 1- μ l dose (~1 mg) diminished the egg mass area and the number of eggs per mass. Previously, Tasin et al. (2012) identified 3-methylbutanol in odorous grapes artificially infected with the necrotrophic plant pathogenic fungus *Botrytis cinerea*. The authors used different doses (1–100 μ g) of the synthetic standard as olfactory stimuli in behavioral choice assays with *L. lotrana*. They found that the compound acted as a repellent at high doses and was attractive at low doses. In the oviposition choice assay, both the odor from *B. cinerea* and that of the standard elicited avoidance behavior in egg-laying females. Similarly, we found that 3-methylbutanol affects oviposition in *S. frugiperda*. 3-Methylbutanol is a common microbial compound, and it is part of the volatilome of fungi with different lifestyles, which includes saprophytes such as *T. atroviride* or insect pathogens such as *B. bassiana*. However, binary or more complex mixtures of this alcohol with other volatiles can trigger different responses in insects (Epsky et al. 1998, Nout and Bartelt 1998, Tasin et al. 2018). Thus, with respect to oviposition, our results showed that *S. frugiperda* specifically responded to the intensity of the natural blend of VOCs released by *B. bassiana*, whereas no response was observed when insects were exposed to the VOCs produced by *T. atroviride*.

Finally, our findings revealed that the pool of VOCs from *B. bassiana* stimulated oviposition in *S. frugiperda*, and isolates from mycosed insect cadavers appeared to be more effective in inducing this behavior than those isolated from soil. The use of the nonentomopathogenic fungus *T. atroviride* as a control highlights the complexity of the response of lepidopterans to the VOCs emitted by entomopathogenic fungi.

In addition, it will be very interesting to perform further follow-up studies on the progeny (e.g. sexual ratio, size, and longevity) to determine the real impact of *Beauveria* VOCs on *S. frugiperda*. This study focused on the short distance and local effects of fungal VOCs in *S. frugiperda*, however, the real impact of these fungal VOCs in natural environments is an open question that deserves attention because of its implications in the management of bio-control programs using *B. bassiana*.

Acknowledgments

We thank García-Rodríguez YM for providing us with the larvae of fall armyworm *S. frugiperda*.

Supplementary data

Supplementary data are available at FEMSEC online.

Conflict of interest statement. The authors declare that they have no conflict of interest.

Funding

This work was supported by the Coordinación de la Investigación Científica-Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (Grant number 2.24).

References

- Abbott W. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J Econ Entomol* 1925;**18**:265–7.
- Becher PG, Verschut V, Bibb MJ et al. Developmentally regulated volatiles geosmin and 2-methylisoborneol attract a soil arthropod to *Streptomyces* bacteria promoting spore dispersal. *Nat Microbiol* 2020;**5**:821–9.
- Beran F, Rahfeld P, Luck K et al. Novel family of terpene synthases evolved from trans-isoprenyl diphosphate synthases in a flea beetle. *Proc Natl Acad Sci* 2016;**113**:2922–7.
- Binder BF, Robbins JC. Effect of terpenoids and related compounds on the oviposition behavior of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: pyralidae). *J Agric Food Chem* 1997;**45**:980–4.
- Bojke A, Tkaczuk C, Stepnowski P et al. Comparison of volatile compounds released by entomopathogenic fungi. *Microbiol Res* 2018;**214**:129–36.
- Bustamante DE, Oliva M, Leiva S et al. Phylogeny and species delimitations in the entomopathogenic genus *Beauveria* (Hypocreales, Ascomycota), including the description of *B. peruviensis* sp. nov. *Mycologia* 2019;**58**:47–68.
- Butt B, Cantu E. *Sex Determination of Lepidopterous Pupae*. Washington: Agricultural Research Service, US Department of Agriculture, 1962.
- CABI Knowledge Bank. *Spodoptera frugiperda*. 2021.
- Cervantes-Romero B, Pérez-Rodríguez P, Rott P et al. Distribution, phylogeny, and pathogenicity of *Xantomonas albilineans* causing sugarcane leaf scald in Mexico. *Crop Prot* 2021;**150**:105799.
- Clearwater JR. Pheromone metabolism in male *Pseudaletia separata* (Walk.) and *Mamestra configurata* (Walk.) (Lepidoptera: noctuidae). *CBP* 1975;**50B**:77–82.
- Conchou L, Lucas P, Meslin C et al. Insect odorscapes: from plant volatiles to natural olfactory scenes. *Front Physiol* 2019;**10**:972.
- Crespo R, Pedrini N, Juárez MP et al. Volatile organic compounds released by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Microbiol Res* 2008;**163**:148–51.
- Dannon HF, Dannon AE, Douro-Kpindou OK et al. Toward the efficient use of *Beauveria bassiana* in integrated cotton insect pest management. *J Cotton Res* 2020;**3**:24.
- Davis TS, Crippen TL, Hofstetter RW et al. Microbial volatile emissions as insect semiochemicals. *J Chem Ecol* 2013;**39**:840–59.
- Davis TS, Landolt PJ. A survey of insect assemblages responding to volatiles from a ubiquitous fungus in an agricultural landscape. *J Chem Ecol* 2013;**39**:860–8.
- de Fouchier A, Walker W, Montagné N et al. Functional evolution of lepidoptera olfactory receptors revealed by deorphanization of a moth repertoire. *Nat Commun* 2017;**8**:15709.
- Dettner K. Chemical ecology and biochemistry of dytiscidae. In: Yee DA (ed.), *Ecology, Systematics, and the Natural History of Predaceous Diving Beetles (Coleoptera: Dytiscidae)*. Dordrecht: Springer, 2014, 235–306.
- FeunangDjombou Y, Eisner R, Knox C et al. ClassyFire: automated chemical classification with a comprehensive, computable taxonomy. *J Cheminform* 2016;**8**:61.

- Dobson AP. The population biology of parasite-induced changes in host behavior. *Q Rev Biol* 1988;**63**:139–65.
- Du Plessis HD, Schlemmer ML, Van den Berg J. The effect of temperature on the development of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: noctuidae). *Insects* 2020;**11**:228.
- Dzialo MC, Park R, Steensels J et al. Physiology, ecology and industrial applications of aroma formation in yeast. *FEMS Microbiol Rev* 2017;**41**:S95–S128.
- El-Sayed AM. The pherobase: database of pheromones and semiochemicals. 2022. <https://www.pherobase.com>. (5 February 2022, date last accessed).
- Epsky ND, Heath RR, Dueben BD et al. Attraction of 3-methyl-1-butanol and ammonia identified from *Enterobacter agglomerans* to *Anastrepha suspensa*. *J Chem Ecol* 1998;**24**:1867–80.
- Mora MEspaña, Castilho A, Fraga M. Classification and infection mechanism of entomopathogenic fungi. *Arq Inst Biol* 2017;**84**:1–10.
- Fitzgerald S, Duffy E, Holland L et al. Multi-strain volatile profiling of pathogenic and commensal cutaneous bacteria. *Sci Rep* 2020;**10**:17971.
- Fougeron AS, Farine JP, Flaven-Pouchon J et al. Fatty acid preference changes during development in *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE* 2011;**6**:e26899.
- Goergen G, Kumar PL, Sankung SB et al. First report of outbreaks of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J E Smith) (Lepidoptera, noctuidae), a new alien invasive pest in west and central Africa. *PLoS ONE* 2016;**11**:e0165632.
- Gul HT, Saeed S, Khan FZA. Entomopathogenic fungi as effective insect pest management tactic: a review. *ASBE* 2014;**1**:10–8.
- Guo Y, Jud W, Weikl F et al. Volatile organic compound patterns predict fungal trophic mode and lifestyle. *Commun Biol* 2021;**4**:673.
- Ho LK, Daniel-Ivadi M, Jeedigunta SP et al. Chemical entrapment and killing of insects by bacteria. *Nat Commun* 2020;**11**:4608.
- Hung R, Lee S, Bennett JW. Fungal volatile organic compounds and their role in ecosystems. *Appl Microbiol Biotechnol* 2015;**99**:3395–405.
- Hussain A, Tian MY, He YR et al. Behavioral and electrophysiological responses of *Coptotermes formosanus shiraki* towards entomopathogenic fungal volatiles. *Biol Control* 2010;**55**:166–73.
- Jacobson M, Adler VE, Kishaba AN et al. 2-Phenylethanol, a presumed sexual stimulant produced by the male cabbage looper moth, *Trichoplusia ni*. *Experientia* 1976;**32**:964–6.
- Jiang A, Yuan Y, Yang R et al. *Beauveria bassiana* is a potential effective biological agent against *Psoroptes ovis* var. *cuniculi* mites. *Biol Control* 2019;**131**:43–8.
- Kanchiswamy CN, Malnoy M, Maffei ME. Chemical diversity of microbial volatiles and their potential for plant growth and productivity. *Front Plant Sci* 2015;**6**:151.
- Knight AL, El-Sayed AM, Judd GIR et al. Development of 2-phenylethanol plus acetic acid lures to monitor obliquebanded leafroller (Lepidoptera: tortricidae) under mating disruption. *J Appl Entomol* 2017;**141**:729–39.
- Li G, Ishikawa Y. Oviposition deterrents from the egg masses of the adzuki bean borer, *Ostrinia scapularis* and Asian corn borer, *O. furnacalis*. *Entomol Exp Appl* 2005;**115**:401–7.
- Li WZ, Yuan GH, Sheng CF et al. Active compounds in *Populus nigra* L. wilted leaves responsible for attracting *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lep., noctuidae) and new agarosectin formulation. *J Appl Entomol* 2005;**129**:557–62.
- Lozano-Soria A, Picciotti U, Lopez-Moya F et al. Volatile organic compounds from entomopathogenic and nematophagous fungi, repellent banana black weevil (*Cosmopolites sordidus*). *Insects* 2020;**11**:509.
- Mburu DM, Maniania NK, Hassanali A. Comparison of volatile blends and nucleotide sequences of two *Beauveria bassiana* isolates of different virulence and repellency towards the termite *Macrotermes michelseni*. *J Chem Ecol* 2013;**39**:101–8.
- Müller A, Faubert P, Hagen M et al. Volatile profiles of fungi - chemotyping of species and ecological functions. *Fung Genet Biol* 2013;**54**:25–33.
- Myers A, Bahlai CA, Landis DA. Habitat type influences *Danaus plexippus* (Lepidoptera: nymphalidae) oviposition and egg survival on *Asclepias syriaca* (Gentianales: apocynaceae). *Environ Entomol* 2019;**48**:674–84.
- Nout MJR, Bartelt RJ. Attraction of a flying nitidulid (*Carpophilus humeralis*) to volatiles produced by yeasts grown on sweet corn and a corn-based medium. *J Chem Ecol* 1998;**24**:1217–39.
- O'Donnell K. *Fusarium* and its near relatives. In: Reynolds DR, Taylor JW (eds). *The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics*. Wallingford: CAB International, 1993, 225–33.
- Omura H, Yanai N, Honda K. Sexual dimorphism in scent substances and cuticular lipids of adult *Papilio protenor* butterflies. *Z Naturforsch C J Biosci* 2012;**67**:331–41.
- Poitout S, Bues R, Le Rumeur C. Élevage sur milieu artificiel simple de deux noctuelles parasites du coton *Earias insulana* et *Spodoptera litoralis*. *Entomol Exp Appl* 1972;**15**:341–50.
- Ponnuamy L, Xu N, Nojima S et al. Identification of bacteria and bacteria-associated chemical cues that mediate oviposition site preferences by *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci* 2008;**105**:9262–7.
- Ravasio D, Wendland J, Walther A. Major contribution of the Ehrlich pathway for 2-phenylethanol/rose flavor production in *Ashbya gossypii*. *FEMS Yeast Res* 2014;**14**:833–44.
- Rohrlich C, Merle I, Hassani IM et al. Variation in physiological host range in three strains of two species of the entomopathogenic fungus *Beauveria* s. *PLoS ONE* 2018;**13**:e0199199.
- Rojas JC, Virgen A, Cruz-López L. Chemical and tactile cues influencing oviposition of a generalist moth, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: noctuidae). *Environ Entomol* 2003;**32**:1386–92.
- Schenkel D, Lemfack MC, Piechulla B et al. A meta-analysis approach for assessing the diversity and specificity of belowground root and microbial volatiles. *Front Plant Sci* 2015;**6**:707.
- Silva D, de Freitas Bueno A, Andrade K et al. Biology and nutrition of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: noctuidae) fed on different food sources. *Sci Agric* 2017;**74**:18–31.
- Stensmyr MC, Dweck HK, Farhan A et al. A conserved dedicated olfactory circuit for detecting harmful microbes in *Drosophila*. *Cell* 2012;**151**:1345–57.
- Su CY, Martelli C, Emonet T et al. Temporal coding of odor mixtures in an olfactory receptor neuron. *Proc Natl Acad Sci* 2011;**108**:5075–80.
- Tasin M, Knudsen GK, Pertot I. Smelling a diseased host: grapevine moth responses to healthy and fungus-infected grapes. *Anim Behav* 2012;**83**:555–62.
- Tasin M, Larsson Herrera S, Knight AL et al. Volatiles of grape inoculated with microorganisms: modulation of grapevine moth oviposition and field attraction. *Microb Ecol* 2018;**76**:751–61.
- Uma Devi K, Padmavathi J, Maheswara Rao C et al. A study of host specificity in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Hypocreales, clavicipitaceae). *Biocontrol Sci Technol* 2008;**18**:975–89.
- Valero-Jiménez CA, Wieggers H, Zwaan BJ et al. Genes involved in virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *J Invertebr Pathol* 2016;**133**:41–9.
- Vega FE, Meyling NV, Luangsa-ard JJ et al. Fungal entomopathogens. In: Vega FE, Kaya HK (eds). *Insect Pathology*. San Diego: Academic Press, 2012,171–220.

- Vesović N, Čurčić S, Vujisić L et al. Molecular diversity of compounds from pygidial gland secretions of cave-dwelling ground beetles: the first evidence. *J Chem Ecol* 2015;**41**:533–9.
- Wei QY, Li YY, Xu C et al. Endophytic colonization by *Beauveria bassiana* increases the resistance of tomatoes against *Bemisia tabaci*. *Arthropod Plant Interac* 2020;**14**:289–300.
- White TJ, Bruns T, Lee S et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds), *PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*, New York: Academic Press, 1990,315–22.
- Zimmermann G. The 'Galleria bait method' for detection of entomopathogenic fungi in soil. *J Appl Entomol* 1986;**102**:213–5.

Capítulo II. Los VOCs emitidos por *B. bassiana* modifican el comportamiento de consumo de *S. frugiperda* en plantas de *S. bicolor* en un sistema *in vitro*

II.1. INTRODUCCIÓN

La respuesta de los insectos a los aromas es dependiente de diferentes factores que le proveen de un contexto específico. En este sentido, las respuestas observadas son el producto de diversas estrategias adaptativas en donde el insecto ha encontrado la forma de optimizar su comportamiento acorde a las condiciones ambientales, dándole la capacidad de filtrar gran cantidad de información del medio circundante de acuerdo a las condiciones presentes. Algunos de estos factores determinantes de la respuesta incluyen el estadio de desarrollo, el sexo, factores climáticos y la presencia de otros organismos que puedan significar una oportunidad o una amenaza (Conchou *et al.*, 2019). Uno de los contextos donde la respuesta probablemente se ve alterada es durante la alimentación de los insectos, en particular durante la herbivoría.

El efecto de la presencia de los numerosos microorganismos que habitan con las plantas sobre su resistencia o susceptibilidad al consumo por los insectos es un aspecto de gran relevancia (Moisan *et al.*, 2020; Howe & Jander, 2008), si se toma en consideración además que todas las plantas terrestres establecen relaciones con microbios del suelo (Gaiero *et al.*, 2013). En consecuencia, el impacto de estas interacciones en el resultado global de la distribución y estructura de las comunidades vegetales se han subestimado (Dazzo & Ganter, 2009; Bulgarelli *et al.*, 2013). Por ejemplo, la inoculación de *T. atroviride* induce el crecimiento y reduce la herbivoría en plantas de maíz infestadas con *S. frugiperda*, y esto se correlaciona con el incremento en la emisión de terpenos y ácido jasmónico en las plantas inoculadas (Contreras-Cornejo *et al.*, 2018). Aún más revelador es el hecho de que las propias comunidades de artrópodos se modifican en los agroecosistemas de maíz inoculados con *T. harzianum* (Contreras-Cornejo *et al.*, 2021). Además, los propios VOCs microbianos inducen resistencia a la herbivoría, de forma que en estos casos no se requiere siquiera el contacto del microbio y la planta para observar efectos biológicamente relevantes. Por ejemplo, la exposición de las raíces de *Brassica rapa* a los VOCs de *Fusarium oxysporum* y *Phoma leveillei* disminuye

el consumo de inflorescencias por la larva del lepidóptero plaga *Pieris brassicae* (Moisan *et al.*, 2020).

Entre las conductas modificadas por los aromas de los microbios se encuentra la preferencia de los insectos hacia una o más fuentes alimenticias en específico. Así, diferentes insectos usan VOCs microbianos para encontrar fuentes de alimento, como frutas, animales y plantas en descomposición, o en general materia orgánica en proceso de degradación (Davis *et al.*, 2013). Los dípteros carroñeros localizan los cadáveres por la emisión de compuestos sulfurados producidos por la acción bacteriana sobre las carcasas en descomposición (Hyde *et al.*, 2013). De hecho, algunas plantas imitan esta huella aromática para atraer moscas que funcionen como polinizadores, como la arácea *Helicodiceros muscivoru* (Stensmyr *et al.*, 2002). Además de esto, los VOCs fúngicos benefician a las plantas que los perciben, disminuyendo el estrés por factores bióticos y abióticos, así como al promover su crecimiento o facilitando la adquisición de nutrientes del medio, como hierro y fósforo. La percepción de estos componentes volátiles tiene, en última instancia, un efecto global en la fisiología vegetal (Weisskopf *et al.*, 2021).

S. frugiperda es uno de los lepidópteros plaga con mayor relevancia en la actualidad, no solamente por ser una plaga de tipo polífago con la capacidad de generar daños considerables en cultivos estratégicos como el sorgo, sino además por su alarmante velocidad de expansión en todo el mundo impulsado por el cambio climático (Ramírez-Cabral *et al.*, 2017). Además, es una plaga con una gran plasticidad fenotípica que genera resistencia a múltiples agentes de control químico tradicional, convirtiéndola en una seria amenaza para la seguridad alimentaria de países pobres o en vías de desarrollo (Tay *et al.*, 2022). Si bien se conocen algunos de los factores que el insecto toma en cuenta para seleccionar una planta huésped (Rojas *et al.*, 2003; Yactayo-Chang *et al.*, 2021), no se conoce el impacto de la presencia de estos semioquímicos fúngicos en su conducta alimenticia.

Muchos insectos son atraídos a los aromas emitidos por las frutas en estado de fermentación. Por ejemplo, diferentes mariposas tropicales se alimentan de frutos maduros que han caído al suelo, y usan los VOCs producidos por la fermentación microbiana para localizarlos (Sourakov *et al.*, 2012). Entre estas moléculas producto de la fermentación, destacan los alcoholes de fusel, originados de la transaminación y descarboxilación de diferentes aminoácidos por medio de la ruta de Ehrlich (Ravasio *et al.*, 2014). Este proceso les permite a los microbios aprovechar el nitrógeno del grupo amino y genera como subproducto la formación de un alcohol ramificado o con una decoración aromática (Dzialo *et al.*, 2017). Los alcoholes de fusel también son de importancia industrial pues confieren distintos atributos aromáticos y de sabor a los alimentos (Etschmann *et al.*, 2002). Algunos ejemplos de estos compuestos son el 1-propanol y 1-butanol, derivados de la L-treonina, el tirosol que deriva de la L-tirosina, el 2-metilbutanol que proviene de la isoleucina, el 2-feniletanol de la L-fenilalanina, y el 3-metilbutanol derivado de la L-leucina (Hazelwood *et al.*, 2008).

Con esto en mente, queda abierta la cuestión de si los hongos entomopatógenos modifican las preferencias alimenticias de los insectos sobre las plantas al entrar en interacción con estas por mediación de sus VOCs fúngicos. En particular, *B. bassiana* establece interacciones tanto como organismo de vida libre, como parásito de insectos, o como endófito de plantas (Ortiz-Urquiza, 2021). Esta capacidad de variar su ciclo de vida lo convierte en un modelo de interés para estudiar el impacto de la presencia de los entomopatógenos en un sistema de interacción tripartito (planta-insecto-entomopatógeno) (Shikano, 2017) y el efecto que tiene en la proporción de consumo o en las preferencias alimenticias del insecto herbívoro. En un trabajo previo (Ramírez-Ordorica *et al.*, 2022) se caracterizó el perfil de VOCs emitidos por diferentes aislados del *B. bassiana* provenientes de núcleos de suelo y cadáveres de insecto. Estos perfiles se compusieron predominantemente de alcoholes, terpenos, cetonas y ácidos grasos y cuyas proporciones son dependientes de la fuente del aislado. De especial relevancia es

que el alcohol mayoritario en estos perfiles fue el 3-metilbutanol, y cuya presencia redujo la oviposición de las hembras adultas de *S. frugiperda* a una dosis de 1 μ L, siendo evidencia de la importancia de este componente emitido por el hongo entomopatógeno en la conducta reproductiva de sus potenciales huéspedes. Además, las hembras disminuyen la cantidad de huevos ovipositados al ser expuestas a la mezcla de VOCs emitidos por *B. bassiana* crecido en medio PDA (Ramírez-Ordorica *et al.*, 2022).

Con el fin de averiguar si el estadio larvario de *S. frugiperda* también es sensible a la presencia de los VOCs fúngicos y si su percepción modula la respuesta conductual del insecto, se propuso como objetivo de este trabajo estudiar la atracción de las larvas de *S. frugiperda* y la preferencia en el consumo del follaje de plantas de *S. bicolor* expuesto a los VOCs del entomopatógeno *B. bassiana*.

II.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se utilizó el estadio L2 de *S. frugiperda* en condiciones de laboratorio mantenidas con dieta artificial (Sierra-Ruiz *et al.*, 2022) en una cámara de crecimiento (Lumistell ®) con humedad relativa del 25%, temperatura de 28°C y fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad. Las larvas se mantuvieron en caja de plástico con capacidad de 1 L y la población mostró una proporción sexual aproximada 1:1 durante el desarrollo del estudio (Sierra-Ruiz *et al.*, 2022). Además, *S. bicolor* variedad “Fortuna” certificada se adquirió de la comercializadora “Semillas Barriga”. El porcentaje de germinación en ensayos piloto fue cercano al 90%.

Propagación y colecta de esporas de B. bassiana

Los aislados de *B. bassiana* AI2 y AS5 se obtuvieron de fuentes ambientales diferentes. El aislado AI2 proviene del cadáver de un insecto micosado colectado *in situ*, y AS5 proviene de núcleos de suelo, ambos de huertos frutales del estado de Chihuahua (Ramírez-Ordorica *et al.*, 2022). Ambas cepas se propagaron por

resiembrada masiva en placas de Petri con medio agar PDA (BD Bixon ®, 211900, grado clínico), las cuales se inocularon y mantuvieron en la oscuridad a temperatura ambiente (25°C) por un lapso de 7 días, momento en el cual se observó la esporulación del hongo. Se realizó la colecta de las esporas del hongo por medio del raspado del micelio con asa bacteriológica y la adición del ~ 2 mL de una solución de Tween 0.01% en agua destilada, que se recuperó y almacenó en viales Eppendorf de 1.5 mL. La densidad de esporas se estimó por medio de cámara de Neubauer y se ajustó la densidad del inóculo a 10^7 esporas mL⁻¹. Las suspensiones de esporas se almacenaron a 4°C hasta su uso por un lapso no mayor a 24 h.

Desinfección y germinación S. bicolor

Las semillas de *S. bicolor* usadas se colocaron en tubos Falcon® de 50 mL para su limpieza y desinfección por medio de un enjuague inicial en hipoclorito de sodio al 12% en agitación por 3 min, seguidos de un enjuague con agua desionizada estéril por 30 s, posteriormente se agregó etanol al 70% y se mantuvo en agitación por 3 min. Finalmente se realizaron múltiples enjuagues con agua destilada estéril por al menos 10 min. Las semillas enjuagadas se colocaron en cajas de Petri con medio agar agua (fitoagar 10% v/v en agua destilada, PhytoTech ®, A111) y se mantuvieron en cámara de crecimiento en condiciones de humedad relativa del 25%, temperatura de 28°C y fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad. Las cajas se orientaron en posición vertical por 4 días hasta que la raíz principal tuviera una longitud de ~ 1 cm para posteriormente ser usadas en los ensayos de interacción.

Sistema de interacción B. bassiana - S. bicolor mediada por VOCs

En frascos de taparrosca de 500 mL se vaciaron 25 mL de medio Murashige & Skoog 0.25x (1g de sales basales Sigma-Aldrich ®, M5519-50L, 6g sacarosa BD Bixon ®, 217000 grado clínico, 10 g fitoagar, 1 L de agua, pH 6), en donde se colocaron las plántulas de *S. bicolor* previamente germinadas, colocando la raíz principal en el medio. En el interior del frasco se colocó un vial con 1 mL de agar PDA inclinado ubicado en una orilla del frasco. Por cada frasco se colocaron tres

plántulas de *S. bicolor*. Las plantas se dividieron en tres grupos: un grupo control sin inocular, un grupo en donde se inoculó el vial con PDA con 10^6 esporas de la suspensión inicial con Tween 0.01% del aislado AS5 (tratamiento VOCs AS5) y un grupo donde se colocó de la misma forma 10^6 esporas del aislado AI2 en el vial (tratamiento VOCs AI2). Este sistema permitió que tanto el hongo como las plántulas de sorgo crecieran en cercanía, pero sin contacto directo, permitiendo el libre flujo de gases dentro del frasco, así se estableció un sistema de interacción mediado exclusivamente por los VOCs emitidos (Fig. 2). Las plántulas crecieron por un lapso de 7 días, momento en el cual se realizó la medición de distintos parámetros de crecimiento de la parte aérea y raíz de las plántulas. Cada planta a los 7 días en el sistema (~ 10 días post-germinación) tuvo tres hojas: una hoja basal (H1) que envuelve la base del tallo, una hoja media (H2) de mayor longitud, y una hoja joven en el centro del meristemo que no alcanzó la talla para ser usada en los ensayos y se descartó. En los casos donde se discriminó el tipo de hoja, se hace referencia a las hojas H1 y H2 con esta convención.

Cada frasco se consideró una repetición (3 plantas por frasco), lo que contabilizó un mínimo de 3 y un máximo de 10 frascos por repetición por tratamiento (n=9-30 plantas) para la medición de parámetros de crecimiento, y 24 frascos (n=72 plantas) para los ensayos de olfatometría de elección y 74 frascos (n=222 plantas) para los ensayos de herbivoría en interacción tripartita.



Figura 2. Fotografía representativa del sistema de interacción de *B. bassiana*-*S. bicolor* mediada por VOCs a los 7 días post siembra.

Herbivoría y patrones de consumo en sistema tripartito (B. bassiana - S. bicolor - S. frugiperda) y en presencia del 3-metilbutanol

Con el uso de placas de Petri divididas, se colocaron en un compartimento tres hojas de *S. bicolor* cosechadas de frascos sin exposición previa a los VOCs microbianos, o bien de hojas H1 o H2. En el segundo compartimento se creció previamente los de *B. bassiana* (AI2 o AS5) inoculados sobre agar PDA por goteo con 10^6 esporas por un lapso previo de 8 días. En estas cajas con la colonia de micelio *B. bassiana* y tres hojas de sorgo, se colocaron tres larvas de *S. frugiperda* estadio L2 con la ayuda de un pincel, posicionando a una larva por cada hoja en el sistema para que se alimentaran de las hojas *ad libitum*; previamente las larvas se sometieron a ayuno de 5 h, individualizadas en recipientes de plástico (Fig. 3). Inmediatamente las cajas se sellaron y se colocaron en cámara de crecimiento con

condiciones de humedad relativa del 25%, temperatura de 28°C y fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad. Transcurridas 12 h, se retiraron las larvas de las cajas y se recuperaron las hojas con mordidas del insecto. Estas hojas se escanearon en fondo blanco y con una retícula milimétrica de papel al lado. Las imágenes generadas se analizaron para estimar el área consumida, el porcentaje de herbivoría y el número de mordidas por hoja. Para esto, se consideró el área total de las láminas en la imagen escaneada, además del número y el área de las regiones removidas por el consumo del insecto. Las imágenes se calibraron con la retícula milimétrica y se analizaron con la ayuda del software ImageJ. Por cada ensayo, se usaron un mínimo de 38 plantas y larvas de *S. frugiperda* L2 por triplicado, obteniendo un total de 183 hojas del tratamiento VOCs A12, 114 hojas del tratamiento VOCs A5, y 147 hojas del control (N=222 plantas y 444 insectos).

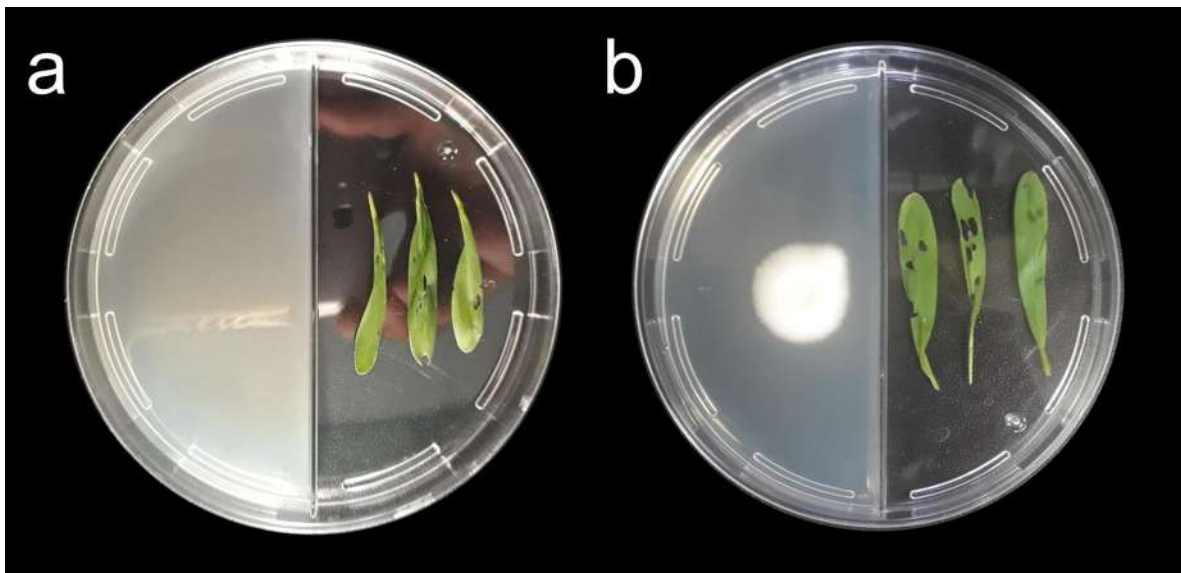


Figura 3. Fotografías representativas del sistema de herbivoría de *S. frugiperda* en hojas de *S. bicolor*. Panel a) Placa control con tres hojas H1 y PDA axénico, b) placa inoculada con 10^6 esporas de *B. bassiana* a los 8 días post inoculación. Se ilustran las mordidas dejadas por el insecto durante el ensayo.

Para estudiar el efecto del compuesto 3-metilbutanol (Sigma-Aldrich®, I9392-500ML, >98.5% de pureza) en la herbivoría del insecto, se preparó una solución a una concentración de $80 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ del compuesto puro disolviendo un volumen de $9.88 \mu\text{l}$ en $100 \mu\text{L}$ de agua destilada, a esta solución se le llamó 10x ($80 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ de 3-metilbutanol). Posteriormente de esta solución se tomaron $10 \mu\text{L}$ y se completó el volumen con agua destilada hasta $100 \mu\text{L}$, para obtener una solución a una concentración de $0.00988 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ de 3-metilbutanol, a esta solución se le llamo 1x (con $8 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ de 3-metilbutanol). Finalmente, de cada solución se tomó un microlitro y se depositó en un círculo de papel filtro de 5 mm de ancho colocado en el lado de la caja con medio PDA, mientras en el otro compartimento se colocaron tres hojas de follaje H1 o H2. Nuevamente, se colocaron tres larvas L2 para que se alimentaran *ad libitum* de las hojas de follaje por un lapso de 12 h. Transcurrido dicho tiempo, se removieron a las larvas y se escanearon las hojas con las mordidas hechas por las larvas. Nuevamente, con las imágenes generadas se estimó el área consumida, el porcentaje de herbivoría y el número de mordidas por hoja; las imágenes se calibraron con una retícula milimétrica. Para este ensayo se usaron 59 plantas e insectos en el tratamiento control (sin exposición al 3-metilbutanol), 57 plantas e insectos para el tratamiento con $8 \mu\text{g}$ de 3-metilbutanol (tratamiento x1) y 57 plantas e insectos para el tratamiento de $80 \mu\text{g}$ de 3-metilbutanol (tratamiento x10) divididos en triplicados de 19 plantas (Fig. 5).

Olfatometría de elección de *S. frugiperda* en estadio L2

Para estos ensayos se construyó un dispositivo (Kecskeméti *et al.*, 2020) que consistió en una placa Petri plástica a la que se unieron tres tubos Eppendorf de 0.6 mL de capacidad por medio de tres orificios practicados en la base de la caja (Fig. 4). Con el fin de evitar que los olores de la caja o los restos de plástico interfirieran con el ensayo, las cajas se limpiaron con aire comprimido y se dejaron en ventilación por al menos 48 h antes de los ensayos.

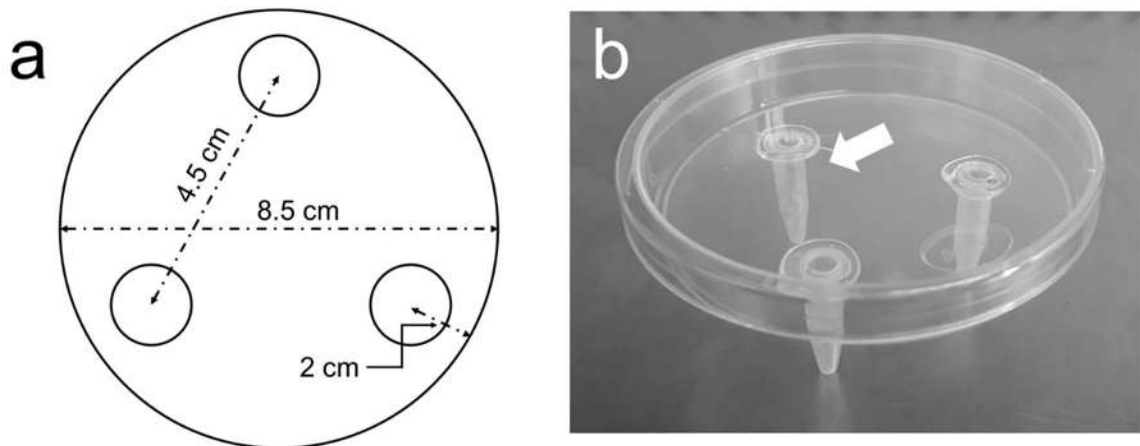


Figura 4. Diagrama del dispositivo de olfatometría dual para larvas de *S. frugiperda* en estadio L2 (a), fotografía representativa del dispositivo montado y cargado con alimento en uno de los compartimentos (flecha) (b).

Con el uso de este sistema, cada compartimento se llenó con diferentes materiales de prueba con el fin de observar la afinidad de la larva a ellos. En todos los casos se dejó un tubo vacío para registrar la incidencia de las larvas a caer en él. Como controles negativos se usaron 200 μ L de agua destilada y se dejó un tubo vacío, y como control positivo se colocaron \sim 180 mg de dieta artificial en los contrastes correspondientes.

Las pruebas se dividieron en tres fases: i) ensayos de afinidad por el micelio de los aislados AI2 y AS5 de *B. bassiana*, ii) ensayos de afinidad a las hojas de sorgo pretratadas (\sim 3 mg) con los volátiles emitidos por AI2 y AS5 por 7 días, iii)

ensayos de afinidad a 8 μ L del alcohol de fusel 3-metilbutanol. Los ensayos se realizaron con larvas de *S. frugiperda* en estadio L2 individualizadas en recipientes de plástico de 10mL y que se mantuvieron en ayuno por un lapso mínimo de 5 h (no mayor a 8 h). Para la realización del ensayo, en dispositivos individuales se colocó una larva en el centro, previamente se cargó cada muestra en los tubos respectivos. Posteriormente el dispositivo se cerró y se esperó un lapso de 12 h en la oscuridad. Transcurrido dicho tiempo, se procedió a registrar en que tubo se encontró el insecto al momento de realizar la observación, ya sea en el interior del tubo o bien en la entrada del mismo tocando el borde. En caso contrario, se registró como “sin respuesta”. Además, se registraron el número de insectos que eligieron el tubo vacío, cuya frecuencia en todo el ensayo no fue mayor del 1.6%. Cada ensayo se realizó con un mínimo de 10 insectos (controles vacíos) y un máximo de 21 insectos por tratamiento, el experimento se realizó por triplicados. En total se realizaron 16 baterías de contraste, teniendo un mínimo de 30 y un máximo de 63 insectos por tratamiento (N=770 insectos) (Fig. 5).

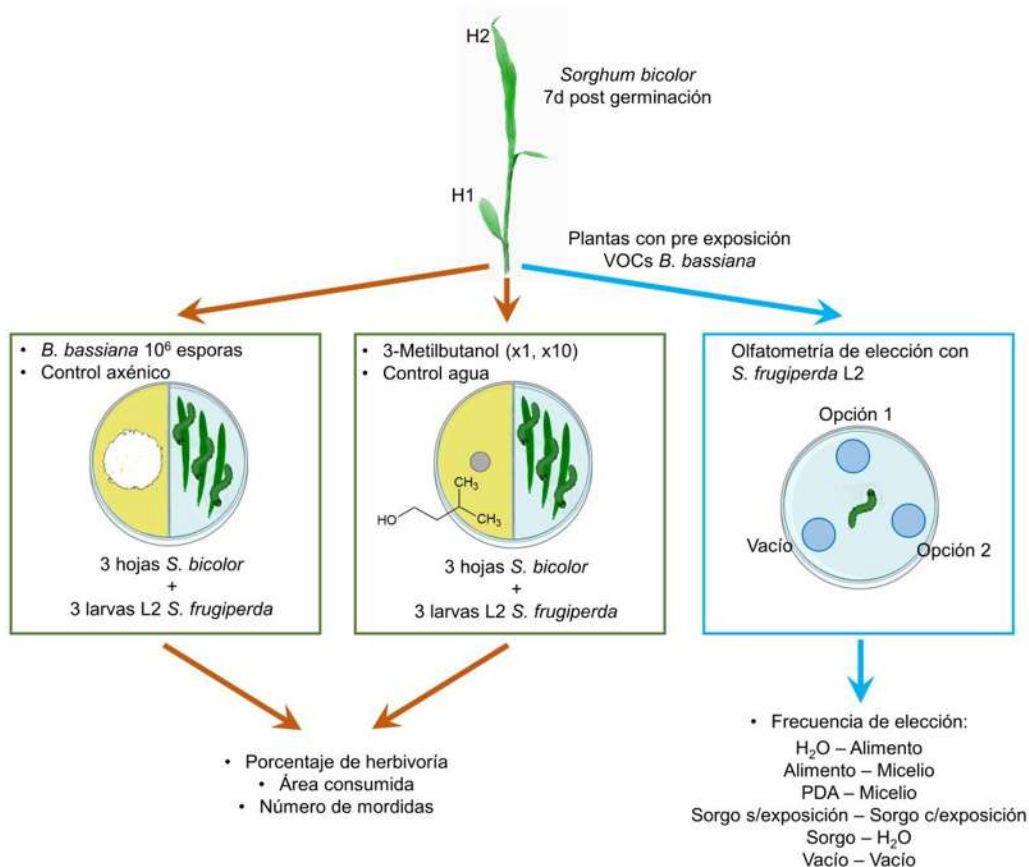


Figura 5. Diagrama de flujo de los experimentos para estudiar modificaciones en la conducta de herbivoría y preferencias de elección de *S. frugiperda* inducidas por los VOCs fúngicos y el 3-metilbutanol.

Análisis estadístico

Para contrastar las medias de los parámetros de crecimiento se utilizó una prueba t-Student entre control y plantas expuestas a los VOCs. En los tratamientos de herbivoría se ajustaron los datos a una distribución Gamma y se contrastó por el uso modelos lineales generalizados. Finalmente, se utilizó una prueba Chi-cuadrada para los ensayos de olfatometría. Se tomó en consideración el total de insectos que respondieron. La significancia en todos los ensayos fue de $\alpha=0.05$.

II.3. RESULTADOS

La exposición de *S. bicolor* a los VOCs de *B. bassiana* no estimula el crecimiento vegetal

Con el fin de estudiar si los VOCs del aislado más virulento (AI2) y menos virulento (AS5) de *B. bassiana* ejercen efectos sobre el crecimiento y desarrollo del sorgo en un sistema *in vitro*, se colocaron en frascos cerrados y en exposición a los volátiles fúngicos por un lapso de 7 días. A este tiempo, se registraron diferentes parámetros de crecimiento de follaje y raíz.

La biomasa total (AI2: Control: 0.22 g, VOCs: 0.22 g; AS5: Control: 0.21 g, VOCs: 0.22 g), biomasa aérea (AI2: Control: 0.11 g, VOCs: 0.11 g; AS5: Control: 0.07 g, VOCs: 0.08 g) y biomasa radicular (AI2: Control: 0.11 g, VOCs: 0.11 g; AS5: Control: 0.10 g, VOCs: 0.11 g) no mostraron incrementos significativos (Fig. 6 a-c). Tampoco se observaron incrementos significativos en la longitud total (AI2: Control: 15.85 cm, VOCs: 16.38 cm; AS5: Control: 12.4 cm, VOCs: 13.87 cm), de follaje (AI2: Control: 12.07 cm, VOCs: 12.85 cm; AS5: Control: 8.55 cm, VOCs: 9.22 cm), ni de raíz (AI2: Control: 3.78 cm, VOCs: 3.52 cm; AS5: Control: 4.01 cm, VOCs: 4.63 cm) de las plantas expuestas a los VOCs fúngicos (Fig. 6 e-g), aunque sí se observaron incrementos en algunos de los promedios, si bien en ninguno de los casos fue significativo. De mera semejante, no se observaron diferencias significativas en el número de hojas y el número de raíces laterales (Fig. 6 d, h).

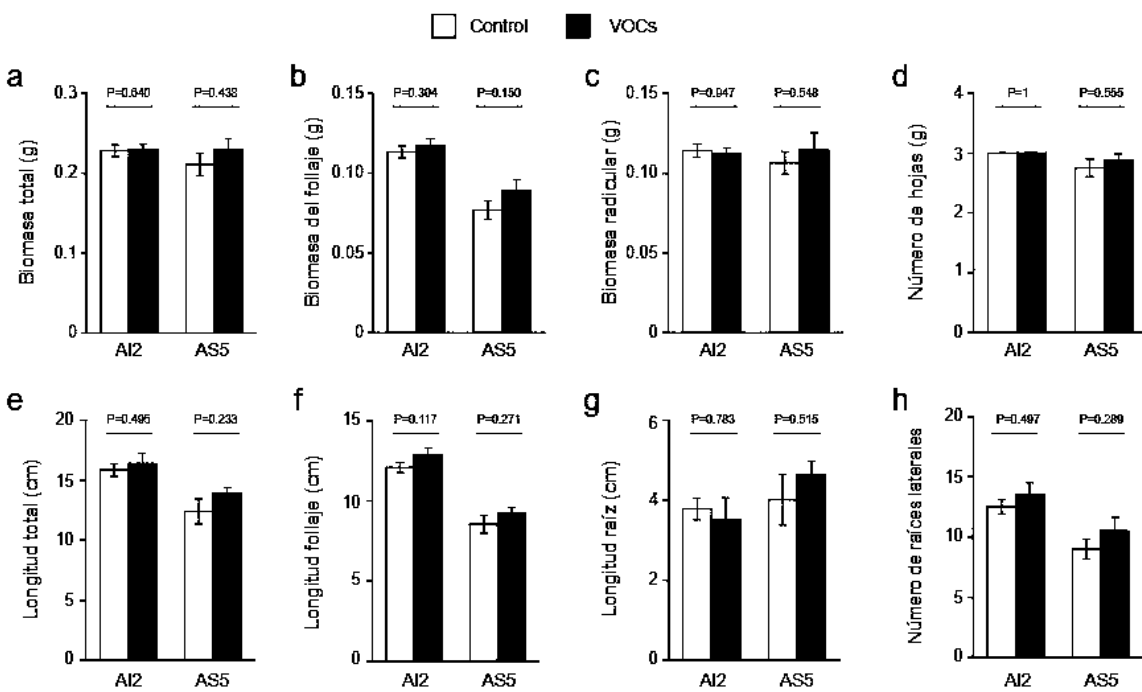


Figura 6. Parámetros de crecimiento de *S. bicolor* en respuesta a la exposición de los VOCs fúngicos de los aislados de *B. bassiana* AI2 y AS5. N=9/30, t-Student, $\alpha=0.05$.

La presencia de los VOCs fúngicos de *B. bassiana* modifica los patrones de consumo de *S. frugiperda* en estadio L2

Al exponer a las larvas de *S. frugiperda* a los VOCs de AI2 y AS5 durante el consumo de follaje de *S. bicolor*, se observó la disminución del porcentaje de herbivoría (Control: 7.88%, VOCs AI2: 5.11%; $P=0.035$) de alrededor del 20% en los tratamientos donde se expuso a las larvas a los volátiles de AI2 (Fig. 7 b). Si bien no hubo diferencias significativas en otros parámetros observados, si se observaron reducciones consistentes de los promedios de área consumida (Control: 9.25 mm², VOCs AI2: 6.87 mm², $P=0.063$) (Fig. 7 a) y número de mordidas promedio por hoja (Control: 3.58, VOCs AI2: 3.08. $P=0.233$) (Fig. 7 c) en el sistema de interacción por VOCs de AI2. En particular, es posible apreciar estos en la forma de la distribución de frecuencia del número de mordidas. De manera semejante, no se observaron diferencias significativas en los parámetros medidos para las larvas expuestas a los VOCs de AS5 en términos del promedio de área consumida (Control: 6.43 mm², VOCs AS5: 5.84 mm², $P=0.566$), el porcentaje de herbivoría (Control: 6.14%, VOCs AS5: 5.26%, $P=0.423$) ni el número de mordidas (Control: 3.45, VOCs AS5: 3.26, $P=0.603$) (Fig. 7 d-f).

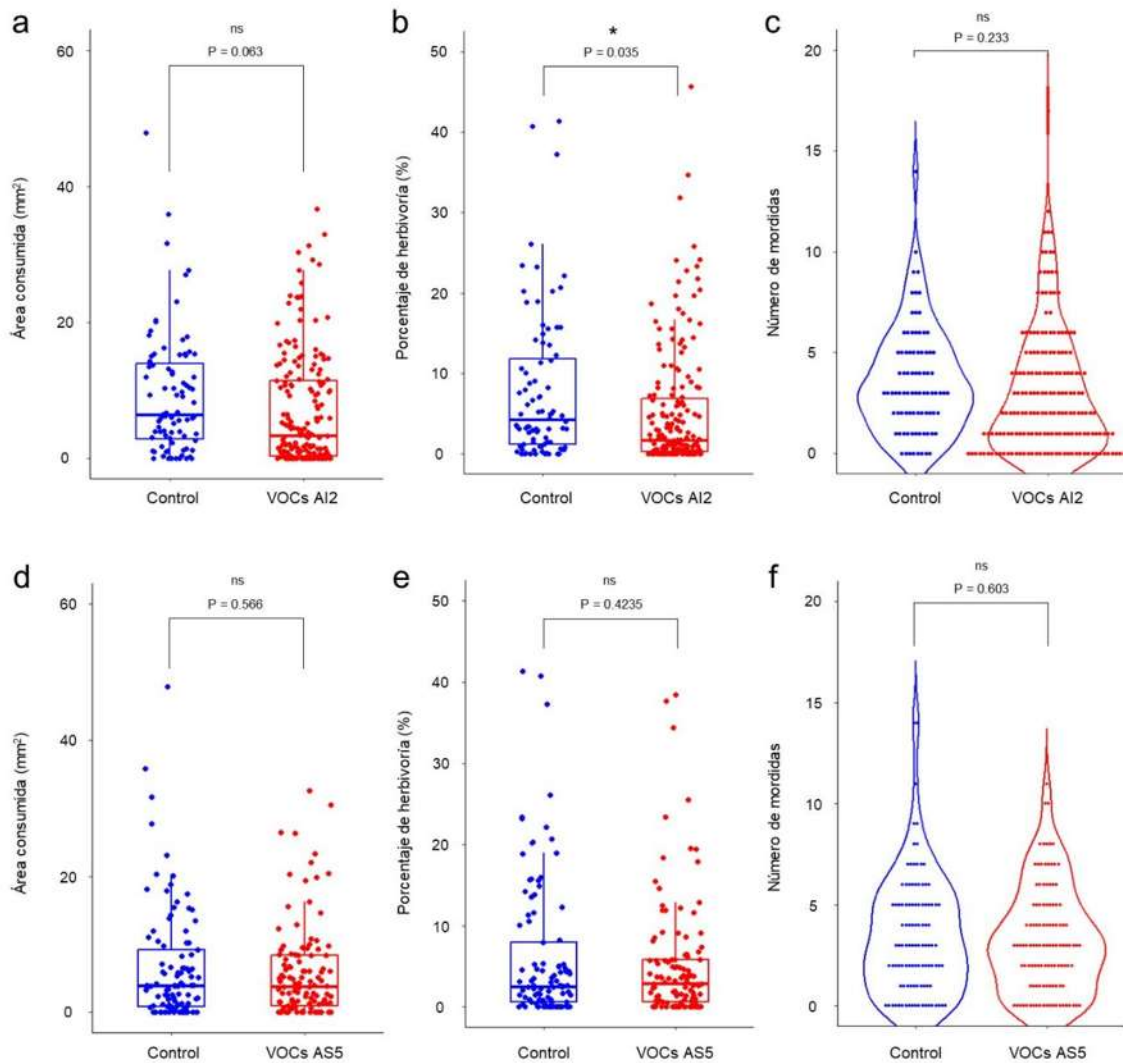


Figura 7. Parámetros de consumo de *S. frugiperda* en follaje de *S. bicolor* durante la exposición a los VOCs fúngicos de los aislados de *B. bassiana* AI2 y AS5. N=114/183, glm con distribución gamma, $\alpha=0.05$.

Con el fin de entender si en la dinámica observada influye la preferencia de las larvas de *S. frugiperda* en consumir un tipo de tejido, se realizó el ensayo tomando en consideración la separación de las hojas de las plántulas de sorgo en H1 y H2. De manera semejante a lo observado con anterioridad, existe una disminución consistente de los promedios de consumo de *S. frugiperda* al exponerla a los VOCs del aislado AI2 (Fig. 8). En particular, existen una reducción significativa

del porcentaje de herbivoría en las hojas H2 (Control H1: 8.9%, Control H2: 6.84%, VOCs AI2 H1: 6.28%, VOCs AI2 H2: 3.98%), acompañado de disminuciones semejantes en el área consumida (Control H1: 9.96 mm², Control H2: 8.54 mm², VOCs AI2 H1: 7.05 mm², VOCs AI2 H2: 6.69 mm²) (Fig. 8 a, b), sin embargo el número de mordidas promedio (Control H1: 3.42, Control H2: 3.73, VOCs AI2 H1: 2.86, VOCs AI2 H2: 3.29) fue ligeramente más alto en los tratamientos con exposición (Fig. 8 c). Interesantemente, éste no fue el caso para el tratamiento con exposición a los VOCs del aislado AS5, en donde no se observó un patrón claro de reducción que variara en función del tejido (Fig. 8 d, f).

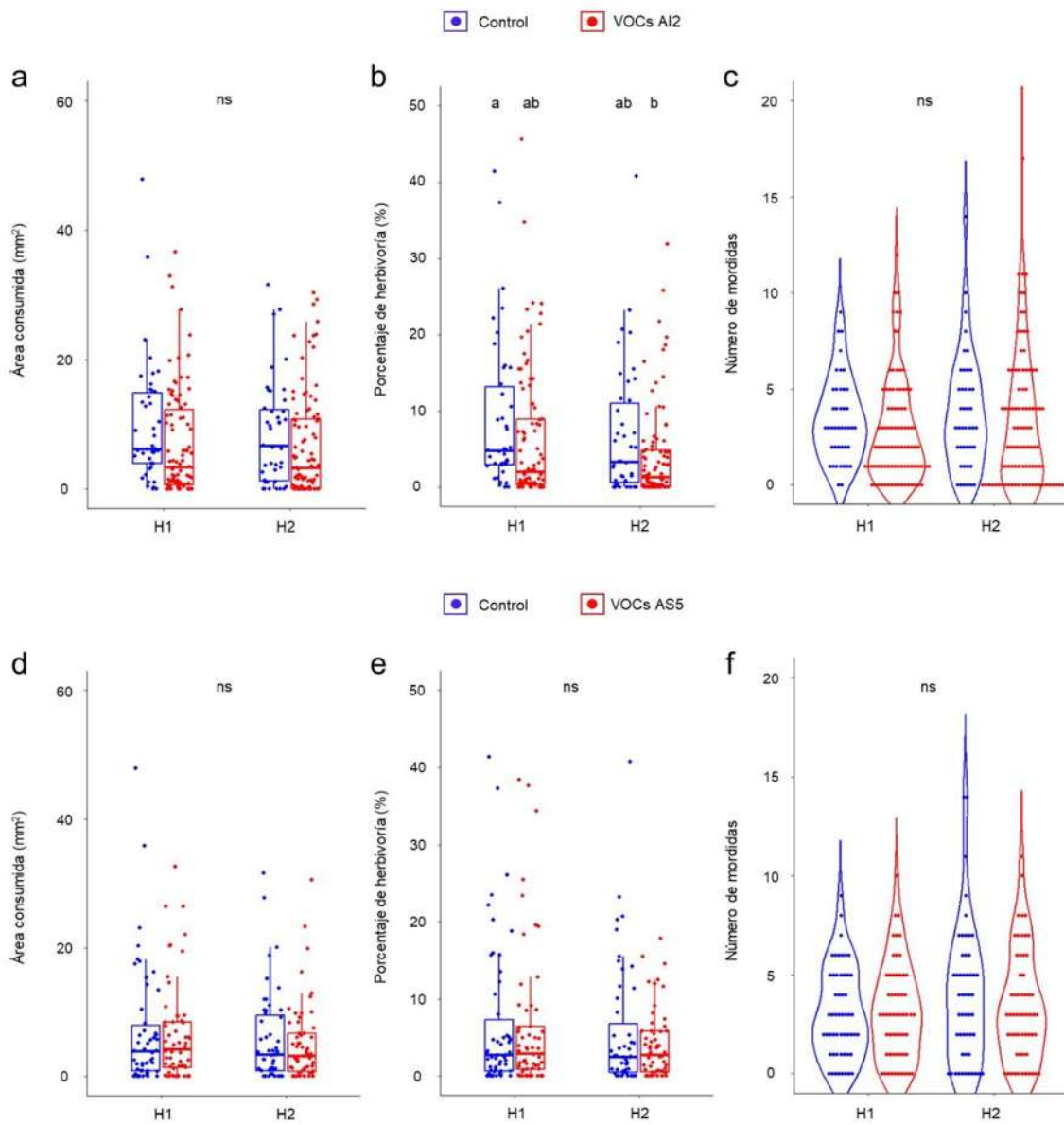


Figura 8. Parámetros de consumo de *S. frugiperda* entre distintas hojas del follaje de *S. bicolor* durante la exposición a lo VOCs fúngicos de los aislados de *B. bassiana* AI2 y AS5. N=114/183, glm con distribución gamma, $\alpha=0.05$.

El 3-metilbutanol induce modificaciones en el patrón de consumo de larvas de *S. frugiperda* en plantas de *S. bicolor*.

En vista de que la emisión en las cepas AI2 y AS5 de *B. bassiana* está constituida mayormente por el alcohol de fusel 3-metilbutanol, además de la observación (Ramírez-Ordorica *et al.*, 2022) de que la presencia de este alcohol modifica los patrones de oviposición del adulto de *S. frugiperda*, se probaron diferentes concentraciones del compuesto puro comparables a la emisión promedio observada en los perfiles de VOCs, y que fue $\sim 8 \mu\text{g}$. Con este fin, se probaron dos dosis: $8 \mu\text{g}$ (x1) y $80 \mu\text{g}$ (x10) (Fig. 9). Interesantemente, la dosis de $8 \mu\text{g}$ del compuesto indujo un ligero incremento del promedio de mordidas de *S. frugiperda* en el follaje colectado de *S. bicolor* (Control: 11.66 mordidas, x1: 14.01 mordidas, $P=0.37$), lo que contrastó significativamente con el tratamiento de $80 \mu\text{g}$ en donde se observó una disminución marginal de dicho parámetro (Control: 11.66, x10: 9.01 mordidas, $P=0.15$) (Fig. 9 c). Además, el número de mordidas contrastó significativamente entre los tratamientos de 8 y $80 \mu\text{g}$ ($P=0.006$). No se observaron diferencias significativas en los promedios de área consumida ni porcentaje de herbivoría (Fig. 9 a, b).

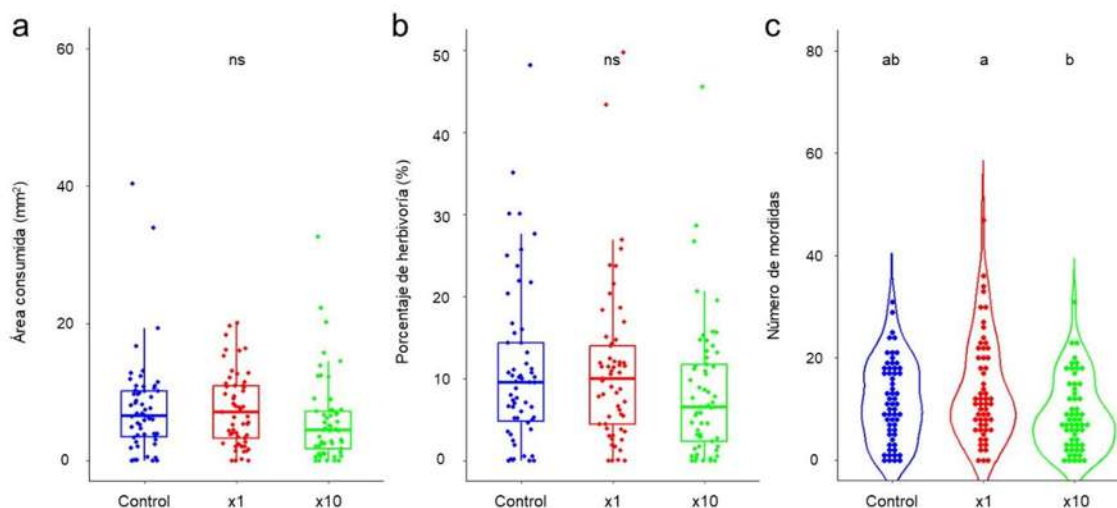


Figura 9. Parámetros de consumo de las larvas de *S. frugiperda* en estadio L2 durante la exposición al 3-metilbutanol en follaje de *S. bicolor*. N=114/183, glm con distribución gamma, $\alpha=0.05$.

Nuevamente, se buscaron diferencias que pudieran ser explicadas por el tipo de hoja consumida por el insecto. Así, se observó que el porcentaje de herbivoría disminuyó significativamente entre los tratamientos con hojas H2, en particular se observó un fuerte contraste entre el promedio de consumo del control H1 y el control H2 (Control H1: 14.07%, Control H2: 7.97%, $P=0.002$), entre los tratamiento de 8 μg de 3-metilbutanol con hoja H1 y 8 μg con hoja H2 (x1 H1: 13.81%, x1 H2: 8.59%, $P=0.002$) y entre los tratamiento de 80 μg de 3-metilbutanol con hoja H1 y 80 μg con hoja H2 (x10 H1: 11.17%, x10 H2: 5.78%, $P=0.002$). Otro parámetro cuyas diferencias fueron significativas entre las hojas H1 y H2 es el número de mordidas, en particular entre 8 μg de hoja H1 y 80 μg en hoja H2 (x1 H1: 14.07 mordidas, x10 H2: 7.56 mordidas, $P=0.005$) (Fig. 10).

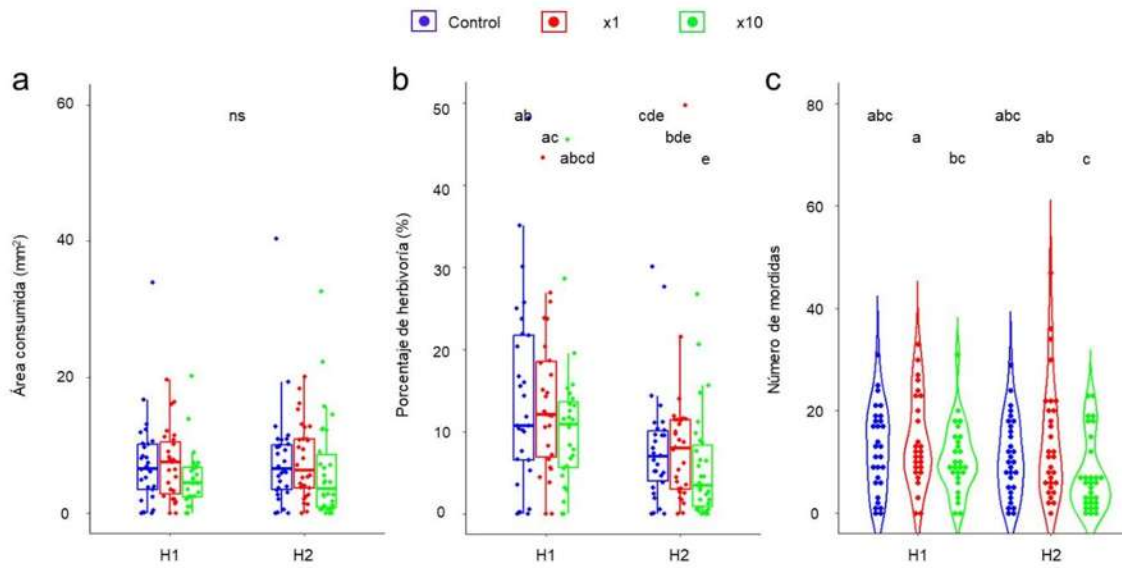


Figura 10. Parámetros de consumo de las larvas de *S. frugiperda* en estadio L2 durante la exposición al 3-metilbutanol en diferentes hojas de *S. bicolor*. N=114/183, glm con distribución gamma, $\alpha = 0.05$.

Las preferencias de *S. frugiperda* a los VOCs fúngicos son dependientes del contexto de elección.

En vista de los resultados anteriores, fue de nuestro interés entender las preferencias que la larva en L2 de *S. frugiperda* tiene hacia diferentes fuentes aromáticas asociadas a sus respectivas fuentes alimenticias y a los aromas del micelio de los aislados AI2 y AS5 de *B. bassiana* por medio de ensayos de olfatometría de elección (Fig. 11 y 12)

De esta manera, se observó que las larvas prefieren consumir el micelio de los aislados AI2 y AS5 en situaciones donde no se les presenta con ninguna otra fuente alimenticia, por lo que contrasta fuertemente la frecuencia de larvas que eligen micelio al tratamiento vacío. Sin embargo, al presentarles como fuentes de alimentación los micelios de AI2 y AS5 y medio PDA, la mayoría de las larvas prefirieron consumir el PDA, esta preferencia fue marcada en el caso del contraste entre PDA vs micelio AS5 ($P=0.0006$) (Fig. 12). Por otra parte, en el caso de las baterías de alimento artificial vs micelios AI2 o AS5 se observó una marcada preferencia de las larvas a consumir el alimento, que fue altamente significativa en ambos casos ($P < 0.0001$) (Fig. 11 y 12). Como era de esperar, tanto los contrastes del control positivo (agua vs alimento) como del control negativo (vacío vs vacío) mostraron diferencias significativas ($P < 0.0001$) o bien no diferencias ($P=0.142$).



Figura 11. Ensayos de olfatometría de elección de larvas L2 de *S. frugiperda* con diferentes fuentes alimenticias y el micelio de *B. bassiana* AI2. N=40/53, prueba chi-cuadrada, $\alpha=0.05$.

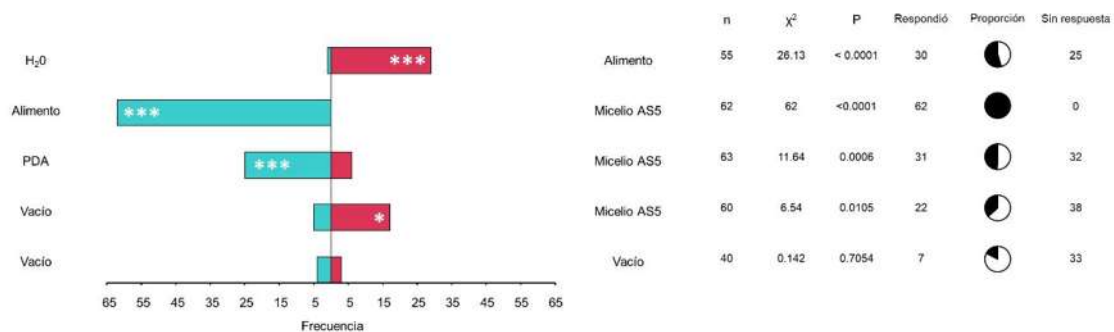


Figura 12. Ensayos de olfatometría de elección de larvas L2 de *S. frugiperda* con diferentes fuentes alimenticias y el micelio de *B. bassiana* AS5. N=40/63, prueba chi-cuadrada, $\alpha=0.05$.

La exposición previa de *S. bicolor* a los VOCs de *B. bassiana* no modifica las preferencias de consumo de *S. frugiperda* L2

Para tratar de entender si la preferencia de las larvas de *S. frugiperda* al sorgo se ve modificada por la pre exposición del follaje de las plantas a los VOCs fúngicos de *B. bassiana*, se usaron plantas previamente expuestas por un lapso de 7 días al sistema dual *S. bicolor*- *B. bassiana* sin contacto directo (Fig. 13). Cuando se comparó la frecuencia de elección de las baterías de sorgo control vs agua, sorgo pre tratado con VOCs AI2 vs agua, y sorgo pre tratado con VOCs AS5 vs agua, se observó una clara preferencia hacia el follaje de sorgo en todos los casos ($P < 0.001$). Sin embargo, al contrastar el sorgo control vs sorgo pre tratado (con VOCs AI2 o AS5) no se observaron diferencias en la preferencia de las larvas entre estos pares de elección. De forma semejante, no se observaron diferencias en la frecuencia de elección entre el sorgo pre tratado con los VOCs AI2 y el sorgo pre tratado con los VOCs AS5 ($P = 0.715$) (Fig. 13).

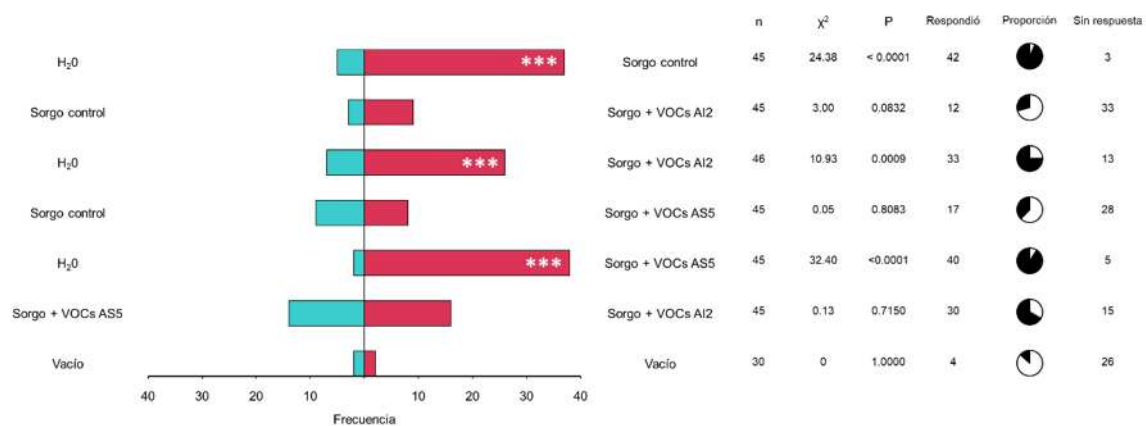


Figura 13. Ensayos de olfatometría de elección de larvas L2 de *S. frugiperda* al follaje de *S. bicolor* pre tratado con los VOCs de *B. bassiana*. N=30/46, prueba chi-cuadrada, $\alpha = 0.05$.

El 3-metilbutanol no influye en el comportamiento de elección en las larvas

En vista de la observación de que el alcohol de fusel 3-metilbutanol induce cambios en los patrones de consumo de *S. frugiperda* durante la herbivoría del follaje de sorgo, se estudió la preferencia de las larvas a 8 µg de 3-metilbutanol. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la frecuencia de elección entre el cebo con 3-metilbutanol y agua ($P=1.00$), además hay una preferencia marcada al alimento contra el alcohol ($P < 0.0001$) (Fig. 14). Por lo tanto, no existe preferencia de las larvas en estadio L2 por el alcohol de fusel 3-metilbutanol.

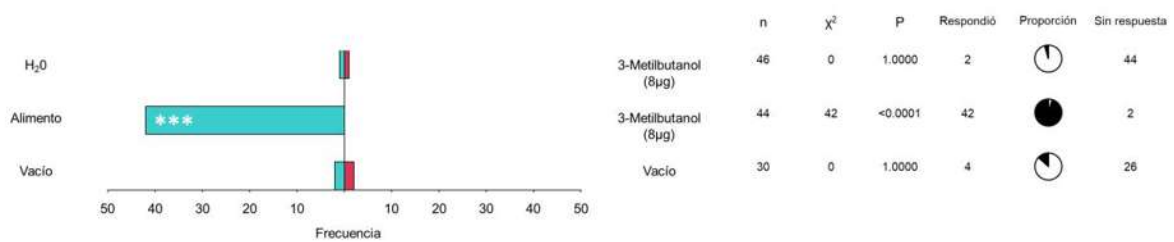


Figura 14. Ensayos de olfatometría de elección de larvas L2 de *S. frugiperda* expuestas a 8 µg de 3-metilbutanol. N=30/46, prueba chi-cuadrada, $\alpha=0.05$.

II.4. DISCUSIÓN

Recientemente ha crecido el interés en el estudio de los procesos etológicos desencadenados por los aromas en insectos y sus implicaciones en el control de plagas (Reisenman *et al.*, 2016; Oppliger *et al.*, 2000). En particular, resulta esencial comprender la relevancia de los aromas no solo en la localización y elección de fuentes de alimento, sino también en variables como la velocidad de consumo y en los patrones de selección de hábitat por parte de los insectos herbívoros, con implicaciones significativas para el control y gestión de plagas (War *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2021).

Dado que las plantas y los insectos coexisten en un ambiente compartido con diversos microbios del suelo, ambos se encuentran expuestos a mezclas complejas de moléculas emitidas por los microorganismos, lo que ejerce un considerable impacto sobre la fisiología de las plantas y sus patrones de desarrollo y crecimiento (Weisskopf *et al.*, 2021). No obstante, nuestro entendimiento acerca de cómo los VOCs microbianos influyen en el comportamiento de los insectos aún es limitado (Calcagnile *et al.*, 2019). En este sentido, resulta intrigante y poco conocido cómo los aromas derivados de microbios entomopatógenos ejercen influencia sobre los insectos, más aún por el hecho de que estos microorganismos usan a los artrópodos como fuente de carbono.

La reacción de los insectos ante los estímulos aromáticos se encuentra invariablemente ligada al contexto ambiental (Conchou *et al.*, 2019). Esto se explica en términos adaptativos, pues posibilita una precisa modulación del comportamiento en correspondencia con diversas condiciones ambientales que demandan respuestas apropiadas y específicas (Zhou & Jander, 2022). Los insectos herbívoros no captan solamente las señales olfativas emanadas por la planta hospedera, pues también vigilan en busca de la presencia de señales de depredadores al acecho, la existencia de otros individuos de su misma especie o de otras con los que compiten al explotar los mismos rangos tróficos, así como las

condiciones atmosféricas y de iluminación, por mencionar solo algunas (Schröder & Hilker, 2008). Bajo circunstancias apropiadas y en el umbral de concentración adecuado, se observan respuestas diversas que deben adaptarse en función de estas exigencias contextuales (Renou, 2014).

Los lepidópteros tienen la particularidad de explotar dos nichos tróficos y ambientales totalmente diferentes a lo largo de su ciclo de vida: mientras que las larvas son mayoritariamente herbívoras con una preferencia por las partes blandas del tejido de las plantas (hojas jóvenes principalmente) (Suits *et al.*, 2017) y son de movilidad limitada, los adultos por su parte consumen el néctar de las flores, son eficientes polinizadores, y además tienen la capacidad de recorrer grandes distancias durante el vuelo (Berenbaum & Isman, 1989). Este cambio tan marcado de su estilo de vida al pasar a la fase de adulto exige también cambios drásticos en el tipo de señales químicas percibidas por el insecto y como responde a ellas. Esto tiene como consecuencia el hecho de que los comportamientos observados hacia la presencia de diferentes estímulos aromáticos en los adultos no necesariamente se observen en las larvas, inclusive entre larvas de diferentes estadios de desarrollo, como se ha demostrado por la expresión diferencial de receptores olfativos entre larvas L2 y L4 de *S. littoralis*, por mencionar un ejemplo (Revadi *et al.*, 2021).

En este trabajo se observó una disminución en el consumo de follaje por parte de las larvas de *S. frugiperda* expuestas a los VOCs derivados de *B. bassiana*. Cabe destacar que estos aislados poseen una característica distintiva: exhiben diversos niveles de virulencia (AI2 presenta una mayor virulencia y proviene de cadáveres de insectos, mientras que AS5 presenta una menor virulencia y se obtuvo de núcleos de suelo) (Ramírez-Ordorica *et al.*, 2022).

Se ha observado la existencia de diferencias innatas a nivel genético, fisiológico y bioquímico entre diferentes aislados de hongos entomopatógenos, resultado de su adaptación a poblaciones de huéspedes diversas, condiciones ambientales heterogéneas o a las variaciones en los modos tróficos del propio

hongo, pudiendo desarrollarse exitosamente como organismo de vida libre en el suelo, como endófito de plantas o como microbio entomopatógeno (Shikano, 2017). Este fenómeno sugiere que las emisiones de VOCs fúngicos posiblemente también difieren entre aislados, al ser productos del metabolismo derivados de una amplia variedad de vías y precursores, los cuales reflejan su diversidad bioquímica y los distintos modos de vida de los entomopatógenos (Farh & Jeon, 2020; Guo *et al.*, 2021).

Estas diferencias explican también el hecho de que los efectos conductuales inducidos por los aislados AI2 y AS5 muestren ligeras variaciones en los parámetros de consumo registrados. Esta observación es acorde con otros reportes que muestran la especificidad de distintos aislados de entomopatógenos para generar respuestas conductuales variables en función de su nivel de virulencia en insectos. Un ejemplo es la respuesta de evasión en poblaciones completas de isópteros de la especie *M. michaelseni* ante el micelio infeccioso de los hongos *B. bassiana* y *M. anisopliae*, y que incrementa en proporción a la virulencia de dichos aislados (Mburu *et al.*, 2009; Mburu *et al.*, 2013). Hallazgos semejantes se conocen en otros grupos como heterópteros y coleópteros (Meyling & Pell, 2006; Villani *et al.*, 1994), sugiriendo la existencia de un patrón de conducta condicionada por la virulencia que constituiría una estrategia adaptativa generalizada entre diversos grupos de insectos sometidos a una presión selectiva suficiente para detectar y evitar a agentes infecciosos como los hongos entomopatógenos.

En el sistema de estudio usado, no fue posible observar diferencias significativas en los parámetros de crecimiento entre el grupo de plantas de sorgo expuesto a los VOCs fúngicos y las plantas control. La promoción del crecimiento vegetal inducida por entomopatógenos ha sido estudiada en diferentes cultivos con efectos muy variados (Jaber & Ownley, 2018), por ejemplo, se conocen casos en los que la promoción ha sido notable en cultivos de maíz (Liu *et al.*, 2022), otros donde ejercen un efecto discreto (Tall & Meyling, 2018), así como estudios donde

han sido totalmente neutros (Tefera & Vidal, 2009). Esto probablemente es explicado por el hecho de que la promoción del crecimiento vegetal inducida por VOCs es dependiente de varios factores ambientales e intrínsecos de la interacción que afectan la eficacia o el resultado observado en condiciones naturales (Orellana *et al.*, 2022; Blom *et al.*, 2011; Liu & Zhang, 2015).

Es interesante notar la disminución en el consumo de follaje cuando el insecto es expuesto a los VOCs de *B. bassiana*, lo que se refleja en la reducción consistente de los promedios de área consumida, porcentaje de herbivoría y número de mordidas sobre las hojas en el experimento. La respuesta de evasión a agentes infecciosos es bien conocida en insectos (Stock *et al.*, 2023; de Roode & Lefèvre, 2012). Estas conductas se manifiestan en la forma de conductas de limpieza en los insectos eusociales (Zhukovskaya *et al.*, 2013), hasta en el tiempo de huida en una superficie contaminada con esporas de hongos entomopatógenos (Meyling & Pell, 2006). Por otra parte, la presencia de agentes infecciosos en fuentes alimenticias también genera respuestas de aversión, lo que disminuye las probabilidades de que la población de insectos sufra la enfermedad (Capinera *et al.*, 1976; Parker *et al.*, 2010). Por ejemplo; se ha reportado que la fase larvaria de *Lymantria dispar* evita consumir el follaje contaminado con baculovirus patógenos (Parker *et al.*, 2010).

En nuestro trabajo, y en vista de que la fuente alimenticia no estaba propiamente contaminada en el sistema utilizado, además del hecho de que el follaje usado en los ensayos de herbivoría tampoco fue expuesto previamente a los VOCs fúngicos, la única explicación para esta reducción de los promedios es una respuesta conductual inducida exclusivamente por el aroma de los hongos presentes en el sistema en el momento. Una limitante en este sistema es que los VOCs fúngicos se acumulan progresivamente conforme transcurren las horas en el espacio de cabeza de la caja. En ambientes nativos, los VOCs fluyen con las corrientes de agua y aire (Weisskopf *et al.*, 2021), además de que solo en circunstancias adecuadas alcanzarían umbrales de concentración tan elevados

como los obtenidos en este ensayo. Por este motivo, el umbral mínimo requerido para alcanzar las respuestas observadas no se puede determinar de esta manera. Sin embargo, los insectos también son particularmente sensibles a los olores. Por ejemplo, se ha estudiado que *S. litoralis* detecta los terpenos geraniol y linalool de origen vegetal en cantidades tan pequeñas como 10^{-14} g, mientras que al componente mayoritario de la hormona sexual de la hembra (el (Z,E)-9,12-tetradecadienil acetato) los machos responden con alrededor de 10^{-19} g, equivalente a 240 moléculas de compuesto en fase gaseosa (Angioy *et al.*, 2003). Además, la mayoría de los insectos poseen sistemas olfativos altamente especializados para detectar las moléculas emitidas por fuentes alimenticias en estado de fermentación, como los alcoholes de fusel emitidos en mayor abundancia por estos entomopatógenos (Dzialo *et al.*, 2017; Becher *et al.*, 2018), por lo tanto, sería de esperar que en un ambiente natural se lograra alcanzar la concentración necesaria para observar esta respuesta de disminución de la herbivoría.

Muchos insectos herbívoros presentan preferencias en el consumo de diferentes tejidos vegetales (Ye *et al.*, 2022), lo que se manifiesta también en su comportamiento de ubicación sobre la planta (Reisig *et al.*, 2020). Los herbívoros prefieren el consumo de parte blandas y tejidos jóvenes, esto es debido a la mayor acumulación de azúcares almacenados en estos órganos (Suits *et al.*, 2017). En el sistema usado, los promedios más altos para todos los parámetros de consumo fue en la hoja basal H1 de las plántulas de sorgo, siendo esta la hoja más chica que presentaron las plántulas a los 10 días post germinación.

En estas condiciones, el consumo tuvo una mayor reducción de los promedios en los tratamientos expuestos al aislado AI2 con mayor virulencia. Si bien algunos insectos responden a los aislados de entomopatógenos en función de su virulencia (Hussain *et al.*, 2010a), no se tiene reportes de este comportamiento en larvas de lepidópteros. Otra deducción sacada del comportamiento de las larvas en nuestro sistema es que no se necesita un contacto directo entre el micelio y el

insecto para inducir estos cambios conductuales, basta con que el agente patógeno se encuentre en la cercanía para que el insecto se percate de la presencia del patógeno y responda en consecuencia.

En la actualidad es bien sabido que los microbios participan en los procesos clave que determinan la estructura y composición de las comunidades vegetales (Williams *et al.*, 2013; Marian *et al.*, 2022), sin embargo, hasta qué punto la presencia de estos afectan las capacidades funcionales de las plantas para hacer frente al estrés biótico, con especial atención a la herbivoría, y las consecuencias que esto tendría para la composición de herbívoros en estas comunidades vegetales no se tiene del todo claro (Shikano, 2017). Por ejemplo, la aplicación de *T. atroviride* en cultivos de maíz induce una fuerte reestructuración en la comunidad de artrópodos asociados al cultivo en comparación con los cultivos testigos sin cultivar (Contreras-Cornejo *et al.*, 2021). Los resultados obtenidos en las reducciones en los promedios de consumo de *S. frugiperda* sugieren que la presencias de entomopatógenos como *B. bassiana* probablemente impacta en la actividad de forrajeo de este insecto herbívoro por la emisión exclusiva de VOCs *in situ*, aunque esto deberá ser estudiado en mayor detalle con un sistema diseñado para este fin.

La gran mayoría de los insectos tienen la capacidad de detectar los aromas generados por fuentes de alimento en diversas etapas de descomposición (Davis *et al.*, 2013). Los lepidópteros, por ejemplo, responden a las fragancias liberadas por frutas maduras o en proceso de fermentación, y una parte crucial de estas fragancias está asociada a los alcoholes fusel (Dzialo *et al.*, 2017). Entre los componentes aromáticos predominantes liberados por los aislados de *B. bassiana* se encuentran los alcoholes fusel, específicamente el 3-metilbutanol y el 2-feniletanol. Resulta notable el hecho de que la exposición de las larvas a concentraciones de 3-metilbutanol de 8 y 80 μg provoque una disminución en los promedios de consumo. Este efecto es particularmente evidente en los valores

medios de área consumida y porcentaje de herbivoría. Lo anterior sugiere la presencia de una mayor cantidad de mordidas producidas por las larvas en las láminas de la hoja, sin que ello se traduzca en un aumento en el área consumida. En otras palabras, los insectos muerden con mayor frecuencia, pero con una menor remoción de material. Este comportamiento posiblemente se debe interpretar como una indecisión por parte de la larva en relación a consumir el follaje cuando está expuesto a la presencia del alcohol. Lo anterior es similar a lo reportado con respecto al tiempo que ciertos heterópteros tardan en comenzar a desplazarse sobre superficies contaminadas con el hongo entomopatógeno (Meyling & Pell, 2006). Además, las diferencias en las respuestas observadas entre las dosis de alcohol probadas también sugieren la existencia de una relación dosis-respuesta. Esta relación ya ha sido observada en las alteraciones provocadas por el 3-metilbutanol en el comportamiento de oviposición de los adultos (Ramírez-Ordorica *et al.*, 2022).

Es relevante destacar que estas variaciones dependientes de la dosis se hicieron más evidentes al analizar los promedios de consumo en distintas hojas. Similar al escenario de la exposición a la mezcla de VOCs fúngicos, los valores promedio de los parámetros disminuyeron de manera coherente al aumentar la cantidad del alcohol. Una vez más, se observó un mayor consumo en la hoja H1, donde las discrepancias en el porcentaje de herbivoría entre los controles, por ejemplo, eran casi duplicadas en magnitud.

El patrón registrado concuerda con una reducción en el consumo que esta intrínsecamente ligada a la presencia del alcohol, y esta disminución se intensifica particularmente en el tejido preferido por el insecto (las hojas jóvenes H1). Aunque las tendencias de incremento en el número de mordidas entre las diferentes hojas no son tan claras, se evidencia claramente una disminución en las mordidas cuando se emplea la dosis más alta del alcohol. Esto probablemente ocurre cuando el insecto ha superado el umbral de percepción y respuesta. De esta forma, es

plausible que la dosis mínima percibida bajo nuestras condiciones de experimentación sea cercana a los 8 µg, ya que es a partir de esta cantidad cuando se comienza a apreciar una reducción marginal en el consumo, reflejada en el porcentaje de herbivoría en la hoja H1.

La respuesta ante los aromas siempre se encuentra influenciada por el contexto ambiental circundante (Conchou *et al.*, 2019). Esta tendencia se puso en evidencia en los resultados obtenidos de las pruebas de olfatometría de elección realizadas con las larvas L2 de *S. frugiperda*. En todos los escenarios, la reacción de los insectos hacia la fuente de alimento empleado para su crianza fue extremadamente pronunciada. Esta respuesta es claramente un resultado de las experiencias tempranas olfativas y gustativas de las larvas y posiblemente también como una adaptación a lo largo de múltiples generaciones en condiciones de laboratorio.

No obstante, el insecto demuestra ser lo suficientemente adaptable como para responder y consumir otras fuentes de alimento. Cuando se les presentó el micelio de AI2 o AS5, en ambos casos los insectos respondieron positivamente si no disponían de ninguna otra fuente de alimento. Sin embargo, cuando se les presentó el micelio junto con otra fuente de alimentación, en todos los casos se observó una disminución en la frecuencia de respuesta hacia el micelio, mientras que la preferencia por las alternativas de alimento fue mayor. Este patrón de comportamiento se interpretaría como una respuesta de aversión de las larvas de *S. frugiperda* hacia el micelio del entomopatógeno. Estos hallazgos concuerdan con observaciones realizadas en otros grupos de insectos que evitan el contacto con agentes infecciosos (de Roode & Lefèvre, 2012).

Es relevante también notar que la proporción de larvas eligiendo el micelio de AI2 en comparación con no elegir ninguna opción (sin respuesta) fue menor en comparación con el micelio de AS5. En el caso de AS5, no solo la proporción de larvas que optaron por el micelio fue mayor, sino que el porcentaje de respuestas

favorables casi se duplicó. Esto sugiere que las larvas L2 sienten una mayor aversión hacia el aislado menos virulento, un resultado que contrasta con lo reportado para isópteros (Mburu *et al.*, 2009; Mburu *et al.*, 2013).

El sorgo es un cultivo atacado por diversas plagas de insectos que ocasionan pérdidas considerables y, en consecuencia, esto ha impulsado el uso de biopesticidas sea particularmente útil con este cultivo (Okosun *et al.*, 2021). Un efecto deseable de los bioinoculantes a base de microbios del suelo es generar efectos protectores al activar los mecanismos innatos de defensa de la planta (efecto conocido como resistencia sistémica inducida) (Mauch-Mani *et al.*, 2017). La naturaleza de estos efectos en plantas ha sido poco explorada para microorganismos entomopatógenos, por lo tanto, sus implicaciones ecológicas no son bien conocidas (Shikano, 2017). Al ser un hongo también con hábitos endófitos, cabe la posibilidad de que una estrategia para propagarse como patógeno de insectos sea el volver a las plantas más atractivas para su consumo por los herbívoros. Esto ya ha sido observado antes en la inoculación de *B. rapa* con *Metarrihizum* en inoculación directa (Cotes *et al.*, 2020). Sin embargo, en nuestro sistema por VOCs fúngicos, la pre exposición de las plántulas de sorgo de 10 días a estos compuestos no indujo cambios en la preferencia de las larvas a este follaje. Este efecto, de existir, probablemente dependería del contacto directo con la raíz o habitando en interior del tejido como hongo endófito. Sin embargo, se ha reportado que la exposición de las raíces a los VOCs cambia la tasa de consumo de insectos herbívoros de follaje y raíz en plantas más grandes y con mayor desarrollo (Moisan *et al.*, 2020), por lo tanto, no se descarta la existencia de este efecto de forma acumulativa, requiriéndose de tiempos más prolongados de exposición y desarrollo de la planta para poder apreciarse.

El 3-metilbutanol se ha reportado como atrayente de dípteros, en particular de *Anastrepha suspensa* (Epsky *et al.*, 1998), y de lepidópteros adultos de las familias Thyatiridae, Noctuidae y Geometridae (Utrio & Eriksson, 1977; Tóth *et al.*,

2010), además de ser un quimioestimulante en *D. melanogaster* (Oppliger *et al.*, 2000), sin embargo, en este trabajo no fue posible encontrar un efecto atrayente en el sistema de olfatometría de elección. La respuesta olfativa de los lepidópteros no es la misma entre los estadios adultos y larvarios, pues cada uno posee adaptaciones particulares para lidiar con los ambientes que colonizan y sus necesidades alimenticias. Así, mientras los adultos de mariposas son sensibles a este compuesto (Ramírez-Ordorica *et al.*, 2022), lo mismo no necesariamente es verdad para las larvas. Este resultado es también consistente con la observación de que la exposición al 3-metilbutanol reduce los parámetros de consumo en las plantas de sorgo, por lo tanto, se concluye que en el sistema utilizado el alcohol actúa como compuesto repelente o disuasivo del consumo de follaje.

II.5. CONCLUSIÓN

Los VOCs fúngicos emitidos por los aislados de *B. bassiana* AI2 y AS5 modifican diferencialmente la conducta de herbivoría de las larvas L2 de *S. frugiperda*, lo que se observa en la reducción de los parámetros de consumo medidos. Además, el 3-metilbutanol participaría de este comportamiento al inducir un efecto disuasivo del consumo del follaje. Esto abre la posibilidad de que el efecto del hongo entomopatógeno *B. bassiana* en la conducta de los insectos herbívoros como *S. frugiperda* pueda ser un factor importante en la modulación del consumo y remoción de follaje en los agroecosistemas donde se aplica.

II.6. BIBLIOGRAFÍA

Angioy, A. M., Desogus, A., Barbarossa, I. T., Anderson, P., & Hansson, B. S. (2003). Extreme sensitivity in an olfactory system. *Chemical Senses*, 28(4): 279–284. <https://doi.org/10.1093/chemse/28.4.279>

Becher, P. G., Hagman, A., Verschut, V., Chakraborty, A., Rozpędowska, E., Lebreton, S., Bengtsson, M., Flick, G., Witzgall, P., & Piškur, J. (2018). Chemical signaling and insect attraction is a conserved trait in yeasts. *Ecology and Evolution*, 8(5): 2962–2974. <https://doi.org/10.1002/ece3.3905>

Berenbaum, M. R., & Isman, M. B. (1989). Herbivory in holometabolous and hemimetabolous insects: contrasts between Orthoptera and Lepidoptera. *Experientia*, 45(3): 229–236. <https://doi.org/10.1007/BF01951808>

Blom, D., Fabbri, C., Connor, E. C., Schiestl, F. P., Klauser, D. R., Boller, T., Eberl, L., & Weiskopf, L. (2011). Production of plant growth modulating volatiles is widespread among rhizosphere bacteria and strongly depends on culture conditions. *Environmental Microbiology*, 13(11): 3047–3058. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02582.x>

Bulgarelli, D., Schlaeppi, K., Spaepen, S., Ver Loren van Themaat, E., & Schulze-Lefert, P. (2013). Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annual review of plant biology*, 64: 807–838. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120106>

Calcagnile, M., Tredici, S. M., Talà, A., & Alifano, P. (2019). Bacterial semiochemicals and transkingdom interactions with insects and plants. *Insects*, 10(12): 441. <https://doi.org/10.3390/insects10120441>

Capinera, J. L., Kirouac, S. P., & Barbosa, P. (1976). Phagodeterency of cadaver components to gypsy moth larvae, *Lymantria dispar*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 28(2): 277–279. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(76\)90138-5](https://doi.org/10.1016/0022-2011(76)90138-5)

Conchou, L., Lucas, P., Meslin, C., Proffit, M., Staudt, M., & Renou, M. (2019). Insect odorscapes: from plant volatiles to natural olfactory scenes. *Frontiers in Physiology*, 10(August): 972. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00972>

Contreras-Cornejo, H. A., del-Val, E., Macías-Rodríguez, L., Alarcón, A., González-Esquivel, C. E., & Larsen, J. (2018). *Trichoderma atroviride*, a maize root associated fungus, increases the parasitism rate of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* by its natural enemy *Campoletis sonorensis*. *Soil Biology and Biochemistry*, 122: 196–202. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.04.013>

Contreras-Cornejo, H. A., Viveros-Bremauntz, F., del-Val, E., Macías-Rodríguez, L., López-Carmona, D. A., Alarcón, A., González-Esquivel, C. E., & Larsen, J. (2021). Alterations of foliar arthropod communities in a maize agroecosystem induced by the root-associated fungus *Trichoderma harzianum*. *Journal of Pest Science*, 94(2): 363–374. <https://doi.org/10.1007/s10340-020-01261-3>

Cotes, B., Thöming, G., Amaya-Gómez, C. V., Novák, O., & Nansen, C. (2020). Root-associated entomopathogenic fungi manipulate host plants to attract herbivorous insects. *Scientific Reports*, 10: 22424. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80123-5>

Davis, T. S., Crippen, T. L., Hofstetter, R. W., & Tomberlin, J. K. (2013). Microbial volatile emissions as insect semiochemicals. *Journal of Chemical Ecology*, 39(7): 840–859. <https://doi.org/10.1007/s10886-013-0306-z>

Dazzo, F. B., Ganter, S., & Lansing, E. (2009). Rhizosphere. En *Environmental Microbiology and Ecology*, 335–349.

de Roode, J., & Lefèvre, T. (2012). Behavioral immunity in insects. *Insects*, 3(3): 789–820. <https://doi.org/10.3390/insects3030789>

Dzialo, M. C., Park, R., Steensels, J., Lievens, B., & Verstrepen, K. J. (2017). Physiology, ecology and industrial applications of aroma formation in yeast. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(August): S95–S128. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux031>

Epsky, N. D., Heath, R. R., Dueben, B. D., Lauzon, C. R., Proveaux, A. T., & MaCcollom, G. B. (1998). Attraction of 3-methyl-1-butanol and ammonia identified from *Enterobacter agglomerans* to *Anastrepha suspensa*. *Journal of Chemical Ecology*, 24: 1867–1880. <https://doi.org/10.1023/A:1022363718193>

Etschmann, M. M. W., Bluemke, W., Sell, D., & Schrader, J. (2002). Biotechnological production of 2-phenylethanol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(1): 1–8. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-0992-x>

Farh, M. E. A., & Jeon, J. (2020). Roles of fungal volatiles from perspective of distinct lifestyles in filamentous fungi. *Plant Pathology Journal*, 36(3): 193–203. <https://doi.org/10.5423/PPJ.RW.02.2020.0025>

Gaiero, J. R., McCall, C. A., Thompson, K. A., Day, N. J., Best, A. S., & Dunfield, K. E. (2013). Inside the root microbiome: bacterial root endophytes and plant growth promotion. *American Journal of Botany*, 100(9): 1738–1750. <https://doi.org/10.3732/ajb.1200572>

Guo, Y., Jud, W., Weigl, F., Ghirardo, A., Junker, R. R., Polle, A., Benz, J. P., Pritsch, K., Schnitzler, J. P., & Rosenkranz, M. (2021). Volatile organic compound patterns predict fungal trophic mode and lifestyle. *Communications Biology*, 4: 673. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02198-8>

Hazelwood, L. A., Daran, J. M., van Maris, A. J. A., Pronk, J. T., & Dickinson, J. R. (2008). The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(8): 2259–2266. <https://doi.org/10.1128/AEM.02625-07>

Howe, G. A., & Jander, G. (2008). Plant immunity to insect herbivores. *Annual Review of Plant Biology*, 59: 41–66. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092825>

Hussain, A., Tian, M. Y., He, Y. R., Bland, J. M., & Gu, W. X. (2010a). Behavioral and electrophysiological responses of *Coptotermes formosanus* Shiraki towards entomopathogenic fungal volatiles. *Biological Control*, 55(3): 166–173. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.08.009>

Hyde, E. R., Haarmann, D. P., Lynne, A. M., Bucheli, S. R., & Petrosino, J. F. (2013). The living dead: bacterial community structure of a cadaver at the onset and end of the bloat stage of decomposition. *PLOS ONE*, 8(10): e77733. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077733>

Jaber, L. R., & Ownley, B. H. (2018). Can we use entomopathogenic fungi as endophytes for dual biological control of insect pests and plant pathogens? *Biological Control*, 116: 36–45. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.01.018>

Kecskeméti, S., Szelényi, M. O., Erdei, A. L., Geösel, A., Fail, J., & Molnár, B. P. (2020). Fungal volatiles as olfactory cues for female fungus gnat, *Lycoriella ingenua* in the avoidance of mycelia colonized compost. *Journal of Chemical Ecology*, 46(10): 917–926. <https://doi.org/10.1007/s10886-020-01210-5>

Liu, X. M., & Zhang, H. (2015). The effects of bacterial volatile emissions on plant abiotic stress tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 6: 774. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00774>

Liu, Y., Yang, Y., & Wang, B. (2022). Entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* play roles of maize (*Zea mays*) growth promoter. *Scientific Reports*, 12: Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-19899-7>

Marian, M., Licciardello, G., Vicelli, B., Pertot, I., & Perazzolli, M. (2022). Ecology and potential functions of plant-associated microbial communities in cold environments. *FEMS Microbiology Ecology*, 98(1): fiab161. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiab161>

Mauch-Mani, B., Baccelli, I., Luna, E., & Flors, V. (2017). Defense priming: an adaptive part of induced resistance. *Annual Review of Plant Biology*, 68: 485–512. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042916-041132>

Mburu, D. M., Ochola, L., Maniania, N. K., Njagi, P. G. N., Gitonga, L. M., Ndung'u, M. W., Wanjoya, A. K., & Hassanali, A. (2009). Relationship between virulence and repellency of entomopathogenic isolates of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* to the termite *Macrotermes michaelseni*. *Journal of Insect Physiology*, 55(9): 774–780. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2009.04.015>

Mburu, D. M., Maniania, N. K., & Hassanali, A. (2013). Comparison of volatile blends and nucleotide sequences of two *Beauveria bassiana* isolates of different virulence and repellency towards the termite *Macrotermes michealseni*. *Journal of Chemical Ecology*, 39: 101–108. <https://doi.org/10.1007/s10886-012-0207-6>

Meyling, N., & Pell, J. (2006). Detection and avoidance of an entomopathogenic fungus by a generalist insect predator. *Ecological Entomology*, 31: 162–171. <https://doi.org/10.1111/j.0307-6946.2006.00781.x>

Moisan, K., Aragón, M., Gort, G., Dicke, M., Cordovez, V., Raaijmakers, J. M., & Lucas-Barbosa, D. (2020). Fungal volatiles influence plant defence against above-ground and below-ground herbivory. *Functional Ecology*, 34(11): 2259–2269. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13633>

Okosun, O. O., Allen, K. C., Glover, J. P., & Reddy, G. V. P. (2021). Biology, ecology, and management of key Sorghum insect pests. *Journal of Integrated Pest Management*, 12(1): 4. <https://doi.org/10.1093/jipm/pmaa027>

Oppliger, F. Y., M Guerin, P., & Vlimant, M. (2000). Neurophysiological and behavioural evidence for an olfactory function for the dorsal organ and a gustatory one for the terminal organ in *Drosophila melanogaster* larvae. *Journal of Insect Physiology*, 46(2): 135–144. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(99\)00109-2](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(99)00109-2)

Orellana, D., Machuca, D., Ibeas, M. A., Estevez, J. M., & Poupin, M. J. (2022). Plant-growth promotion by proteobacterial strains depends on the availability of phosphorus and iron in *Arabidopsis thaliana* plants. *Frontiers in Microbiology*, 13: 1083270. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1083270>

Ortiz-Urquiza, A. (2021). The split personality of *Beauveria bassiana*: understanding the molecular basis of fungal parasitism and mutualism. *mSystems*, 6(4): 1–5. <https://doi.org/10.1128/msystems.00766-21>

Parker, B. J., Elder, B. D., & Dwyer, G. (2010). Host behaviour and exposure risk in an insect-pathogen interaction. *The Journal of Animal Ecology*, 79(4): 863–870. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2010.01690.x>

Ramírez-Cabral, N., Kumar, L., & Shabani, F. (2017). Future climate scenarios project a decrease in the risk of fall armyworm outbreaks. *The Journal of Agricultural Science*, 155: 1219–1238.

Ramírez-Ordorica, A., Contreras-Cornejo, H. A., Orduño-Cruz, N., Luna-Cruz, A., Winkler, R., & Macías-Rodríguez, L. (2022). Volatiles released by *Beauveria bassiana* induce oviposition behavior in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *FEMS microbiology ecology*, 98(10): fiac114. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiac114>

Ravasio, D., Wendland, J., & Walther, A. (2014). Major contribution of the Ehrlich pathway for 2-phenylethanol/rose flavor production in *Ashbya gossypii*. *FEMS Yeast Research*, 14(6): 833–844. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12172>

Reisenman, C. E., Lei, H., & Guerenstein, P. G. (2016). Neuroethology of olfactory-guided behavior and its potential application in the control of harmful insects. *Frontiers in Physiology*, 7: 271. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00271>

Reisig, D. D., Cook, D., Greene, J., Caprio, M., Gore, J., Musser, F., & Reay-Jones, F. (2020). Location of *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae on different plant parts of determinate and indeterminate soybean. *Bulletin of Entomological Research*, 110(6): 725–731. <https://doi.org/10.1017/S0007485320000280>

Renou, M. (2014). Pheromones and General Odor Perception in Insects. En C. Mucignat-Caretta (Ed.), *Neurobiology of Chemical Communication*. CRC Press/Taylor & Francis. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK200986/>

Revadi, S. V., Giannuzzi, V. A., Rossi, V., Hunger, G. M., Conchou, L., Rondoni, G., Conti, E., Anderson, P., Walker, W. B., Jacquin-Joly, E., Koutroumpa, F., & Becher, P. G. (2021). Stage-specific expression of an odorant receptor underlies olfactory behavioral plasticity in *Spodoptera littoralis* larvae. *BMC Biology*, 19(1): 231. <https://doi.org/10.1186/s12915-021-01159-1>

Rojas, J. C., Virgen, A., & Cruz-López, L. (2003). Chemical and tactile cues influencing oviposition of a generalist moth, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Environmental Entomology*, 32(6): 1386–1392. <https://doi.org/10.1603/0046-225X-32.6.1386>

Schröder, R., & Hilker, M. (2008). The relevance of background odor in resource location by insects: a behavioral approach. *BioScience*, 58(4): 308–316. <https://doi.org/10.1641/B580406>

Shikano, I. (2017). Evolutionary ecology of multitrophic interactions between plants, insect herbivores and entomopathogens. *Journal of Chemical Ecology*, 43(6): 586–598. <https://doi.org/10.1007/s10886-017-0850-z>

Sierra-Ruíz, M. D. L. L., García-Rodríguez, Y. M., Torres-Martínez, R., Delgado-Lamas, G., & Espinosa-García, F. J. (2022). Procedimientos para establecer y mantener una cría del gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) en condiciones de laboratorio. *Avances en Investigación Agropecuaria*, 26(1): 134–154. <https://doi.org/10.53897/RevAIA.22.26.22>

Sourakov, A., Duehl, A., & Sourakov, A. (2012). Foraging behavior of the blue morpho and other tropical butterflies: the chemical and electrophysiological basis of olfactory preferences and the role of color. *Psyche: A Journal of Entomology*, 2012: 1–10. <https://doi.org/10.1155/2012/378050>

Stensmyr, M. C., Urru, I., Collu, I., Celander, M., Hansson, B. S., & Angioy, A. M. (2002). Rotting smell of dead-horse arum florets. *Nature*, 420(6916):6916. <https://doi.org/10.1038/420625a>

Stock, M., Milutinović, B., Hoenigsberger, M., Grasse, A. V., Wiesenhofer, F., Kamleitner, N., Narasimhan, M., Schmitt, T., & Cremer, S. (2023). Pathogen evasion of social immunity. *Nature Ecology & Evolution*, 7(3):3. <https://doi.org/10.1038/s41559-023-01981-6>

Suits, R., Reisig, D., & Burrack, H. (2017). Feeding preference and performance of *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae on various soybean tissue types. *Florida Entomologist*, 100(1): 162–167. <https://doi.org/10.1653/024.100.0123>

Sun, Z., Lin, Y., Wang, R., Li, Q., Shi, Q., Baerson, S. R., Chen, L., Zeng, R., & Song, Y. (2021). Olfactory perception of herbivore-induced plant volatiles elicits counter-defences in larvae of the tobacco cutworm. *Functional Ecology*, 35(2): 384–397. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13716>

Tall, S., & Meyling, N. V. (2018). Probiotics for plants? Growth promotion by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* depends on nutrient availability. *Microbial Ecology*, 76(4), 1002-1008. <https://doi.org/10.1007/s00248-018-1180-6>

Tay, W. T., Rane, R. V., Padovan, A., Walsh, T. K., Elfekih, S., Downes, S., Nam, K., d'Alençon, E., Zhang, J., Wu, Y., Nègre, N., Kunz, D., Kriticos, D. J., Czepak, C., Otim, M. H., & Gordon, K. H. J. (2022). Global population genomic signature of *Spodoptera frugiperda* (fall armyworm) supports complex introduction events across the Old World. *Communications Biology*, 5: 297. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03230-1>

Tefera, T., & Vidal, S. (2009). Effect of inoculation method and plant growth medium on endophytic colonization of sorghum by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *BioControl*, 54(5), 663-669. <https://doi.org/10.1007/s10526-009-9216-y>

Tóth, M., Szarukán, I., Dorogi, B., Gulyás, A., Nagy, P., & Rozgonyi, Z. (2010). Male and female noctuid moths attracted to synthetic lures in Europe. *Journal of Chemical Ecology*, 36(6): 592–598. <https://doi.org/10.1007/s10886-010-9789-z>

Utrio, P., & Eriksson, K. (1977). Volatile fermentation products as attractants for Macrolepidoptera. *Annales Zoologici Fennici*, 14(2): 98–104.

Villani, M. G., Krueger, S. R., Schroeder, P. C., Consolie, F., Consolie, N. H., Preston-Wilsey, L. M., & Roberts, D. W. (1994). Soil application effects of *Metarhizium anisopliae* on Japanese Beetle (Coleoptera: Scarabaeidae) behavior and survival in turfgrass microcosms. *Environmental Entomology*, 23(2), 502–513. <https://doi.org/10.1093/ee/23.2.502>

War, A. R., Sharma, H. C., Paulraj, M. G., War, M. Y., & Ignacimuthu, S. (2011). Herbivore induced plant volatiles. *Plant Signaling & Behavior*, 6(12): 1973–1978. <https://doi.org/10.4161/psb.6.12.18053>

Weisskopf, L., Schulz, S., & Garbeva, P. (2021). Microbial volatile organic compounds in intra-kingdom and inter-kingdom interactions. *Nature Reviews Microbiology*, 19: 391–404. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00508-1>

Williams, M. A., Jangid, K., Shanmugam, S. G., & Whitman, W. B. (2013). Bacterial communities in soil mimic patterns of vegetative succession and ecosystem climax but are resilient to change between seasons. *Soil Biology and Biochemistry*, 57: 749–757. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.08.023>

Yactayo-Chang, J. P., Mendoza, J., Willms, S. D., Rering, C. C., Beck, J. J., & Block, A. K. (2021). *Zea mays* volatiles that influence oviposition and feeding behaviors of *Spodoptera frugiperda*. *Journal of Chemical Ecology*, 47(8): 799–809. <https://doi.org/10.1007/s10886-021-01302-w>

Ye, L. M., Di, X. Y., Yan, B., Liu, J. F., Wang, X. Q., & Yang, M. F. (2022). Population parameters and feeding preference of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) on different *Asparagus officinalis* tissues. *Insects*, 13(12): Article 12. <https://doi.org/10.3390/insects13121149>

Zhou, S., & Jander, G. (2022). Molecular ecology of plant volatiles in interactions with insect herbivores. *Journal of Experimental Botany*, 73(2): 449–462. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab413>

Zhukovskaya, M., Yanagawa, A., & Forschler, B. T. (2013). Grooming behavior as a mechanism of insect disease defense. *Insects*, 4(4): 609–630. <https://doi.org/10.3390/insects4040609>

8. DISCUSIÓN GENERAL

Como un producto de la adaptación, la conducta es un componente de la irritabilidad de los organismos que les permite modificar sus patrones de estímulo-respuesta acorde a las condiciones presentes y, por lo tanto, es un carácter sujeto a los mismos mecanismos de selección que rigen a otras funciones adaptativas, además de ser uno de los componentes del fenotípico que más rápidamente evoluciona, siendo notablemente distinto incluso entre especies estrechamente emparentadas en términos filogenéticos (Hernández *et al.*, 2021).

El presente trabajo nace de la motivación por mejorar la comprensión sobre la importancia de los semioquímicos en las interacciones que se desarrollan en la naturaleza y su implicación en la relación multitrófica planta-microbio-insecto. Sin lugar a dudas, la conducta influye notablemente en la relación de consumo de los insectos herbívoros. Decisiones básicas como la selección del sitio de puesta, la conducta misma de oviposición, la selección de una planta para consumir y la atracción de las larvas hacia una fuente alimenticia, marcan momentos clave en el ciclo de vida del insecto donde debe tomar la elección óptima con respecto a los recursos disponibles, y en donde la percepción aromática es fundamental. La presencia de microbios, entre ellos patógenos, así como los perfiles moleculares emitidos por estos, pueden desencadenar eventos conductuales en favor del insecto huésped, o también volverlo más vulnerable para ser infectado por un microbio patógeno, como el entomopatógeno *B. bassiana*.

Los insectos poseen algunos de los sentidos más agudos de la naturaleza, siendo la quimio percepción de los más importantes y fundamental para la toma de decisiones clave en su ciclo de vida. Al ser tan importante para el insecto, su sistema olfativo debería ser capaz de percibir las señales correspondientes a amenazas particulares, en especial aquellas que ejercen una fuerte presión selectiva en las poblaciones. La presencia de agentes infecciosos como los hongos entomopatógenos tienen un efecto considerable en la regulación poblacional de los

insectos y, por lo tanto, sería de esperar que la capacidad de estos para responder acorde a la presencia de los entomopatógenos sería una característica general entre diversos órdenes (Baverstock *et al.*, 2010). Sin embargo, son escasos los reportes de modificaciones en la conducta reproductiva en insectos inducidos por el ataque de hongos entomopatógenos (Hansen & de Fine Licht, 2019) y son pocos los que han explorado la posibilidad de que estos hongos modifiquen o incrementen el éxito reproductivo del insecto en favor del patógeno, en eventos tales como la inducción de la oviposición en un sitio (Cotes *et al.*, 2020; Rännbäck *et al.*, 2015), la cópula (Naundrup *et al.*, 2022) o el consumo (Zhu *et al.*, 2023). La razón no es del todo clara y se podrían barajar diferentes explicaciones, por ejemplo el ajuste fino de los mecanismos de infección del patógeno que han logrado moldear estas conductas para neutralizarlas, o en algunos casos reconducirlas en favor del patógeno, o inclusive que estas modificaciones posiblemente son demasiado sutiles para haber sido interpretadas correctamente, siendo necesario el desarrollo de estrategias experimentales mejor dirigidas hacia la observación de estos patrones de conducta (Hansen & de Fine Licht, 2019). En cualquier caso, el desarrollo de modelos experimentales dirigidos hacia entender en particular el comportamiento de lepidópteros en su interacción con hongos entomopatógenos debería ayudar a encontrar más casos correspondientes con estas adaptaciones conductuales.

Las particularidades metabólicas subyacentes a los mecanismos de infección en patógenos, y en particular de los patógenos fúngicos, son claves para entender las estrategias de infección, su significado evolutivo y sus implicaciones en el éxito del establecimiento de una enfermedad (Ene *et al.*, 2014). Si nos limitamos a entender al metabolismo sencillamente como la totalidad de reacciones químicas que acontecen en una célula viva (Sánchez & Raja, 2023), podemos perder de vista que, siendo un sistema complejo, en su funcionamiento hay una gran cantidad de componente y factores que no se deben entender como simplemente la suma de las partes; libre de las interacciones o de nuevas propiedades emergiendo del sistema (Ma'ayan, 2017).

Así, el metabolismo también puede ser visto como un sistema en equilibrio dinámico que acontece en condiciones ambientales particulares, con diferentes subsistemas a su vez con su propio equilibrio dependiente del influjo de otros factores externos. Siguiendo esta línea, el metabolismo es el mediador entre la célula y su entorno, siendo el enlace entre los procesos individuales dependientes enteramente de la fisiología del individuo y los procesos poblacionales que dependen del entorno (Pulido *et al.*, 2018). El metabolismo también impone reglas básicas sobre la asignación de recursos en un medio cambiante a través de las propiedades de sus redes y módulos metabólicos, convirtiendo al sistema en una entidad altamente adaptable (Ravasz *et al.*, 2002; Sambamoorthy *et al.*, 2019).

Por este motivo, el metabolismo en su abordaje ecológico, debe tener en consideración las interacciones tróficas en las que está ocurriendo, así como los factores de estrés bióticos y abióticos a los que se enfrenta el organismo (Chown & Gaston, 1999; Steiner & Van Buskirk, 2009). Una población en un proceso de especiación incipiente debe especializarse en la explotación de un conjunto particular de recursos y, en consecuencia, debe modificar también su metabolismo de acuerdo a las necesidades, incluyendo propiamente a la fuente de carbono de la cual depende (Martínez *et al.*, 2023; Warsi *et al.*, 2019). Estos cambios y especialización, en mayor o menor medida, deberían verse reflejados en la composición y abundancia de compuestos sintetizados y emitidos al medio, entre ellos los VOCs (Guo *et al.*, 2021). Estos son percibidos por otros individuos para establecer diferentes relaciones, ya sea de competencia, depredación o cooperación, y por lo tanto son factores que les conferirán una ventaja, o bien, jugaran en su contra al desenvolverse en el medio. Si la emisión de estas moléculas tiene el potencial de mejorar la adecuación biológica del emisor (*fitness* darwiniano) (Demetrius & Ziehe, 2007) se convierten en candidatos a transformarse en semioquímicos. La contribución y el sinergismo de todos estos factores convierten al estudio del metabolismo y de los compuestos semioquímicos, desde el punto de vista evolutivo y ecológico, en objetos de estudio particularmente desafiantes.

En ecología, entendemos por nicho a la representación de todos factores ambientales y recursos dentro de los cuales la tasa de crecimiento neto tiene valores positivos. La interacción entre factores bióticos (nicho eltoniano) y abióticos (nicho grineliano) determinan la capacidad de una especie para propagarse y colonizar ambientes distintos, pues afectan directamente la tasa de crecimiento de la población, siendo positiva en las regiones del nicho favorables (Baquero *et al.*, 2021). En especial, nos referimos al nicho trófico como aquellas dimensiones que solo toman en consideración a los sustratos y/o fuentes de carbono usadas por el organismo por el uso de diferentes estrategias (autotrofia, heterotrofia, detritívoro, etc.) (Bearhop *et al.*, 2004). En la actualidad, se considera que los nichos son “fundamentales” (NF), cuando solo toman en consideración la idoneidad de los factores abióticos, o bien “realizados” (NR), cuando además se considera el efecto de las interacciones (benéficas o deletéreas) establecidas por un organismo, como la competencia, la depredación, el parasitismo, y que limitan o favorecen su proliferación (Soberón, 2007). En este contexto, los compuestos semioquímicos cumplirían su función al incrementar el número de interacciones llevadas a cabo de una especie con otras, incrementando de esta forma el NR siempre y cuando las interacciones establecidas por la mediación de estos compuestos sean positivas al menos para el emisor. A pesar de la enorme inversión de recursos implicados en la síntesis de estas moléculas, los hongos como *B. bassiana* dedican una parte considerable de su energía y carbono para producirlos (Inamdar *et al.*, 2020). La explicación sería, en parte, las considerables ventajas conferidas a los hongos que las sintetizan con el fin de mejorar sus capacidades competitivas, o bien para explotar recursos nuevos debido a las interacciones bióticas mediadas por estos compuestos. En otros términos, los semioquímicos expanden el NR al incrementar la adecuación de la especie por la dimensión de factores bióticos, esto es, al incrementar el número de interacciones intra- e interespecíficas establecidas (Fig. 15). Estas interacciones incluyen a las modificaciones conductuales inducidas por

los VOCs emitidos por los entomopatógenos, como estrategia que únicamente favorece al hongo en detrimento del insecto huésped.

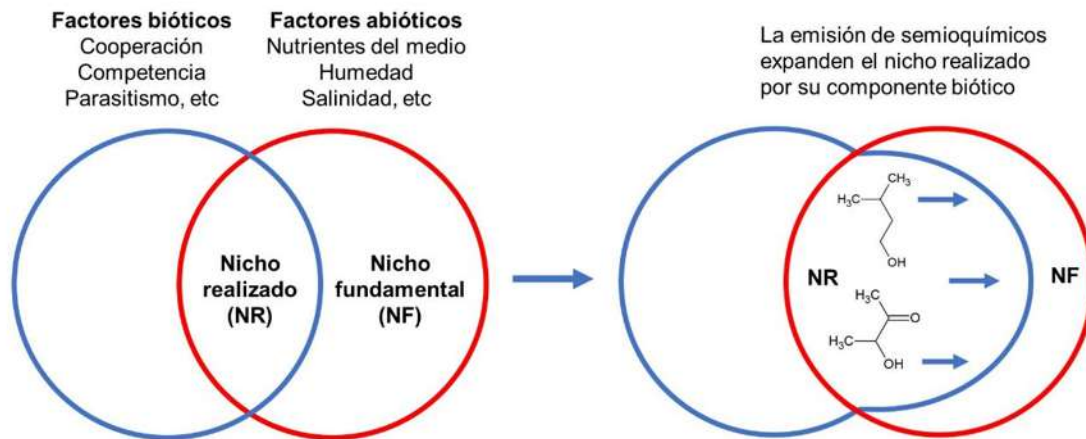


Figura 15. El conjunto de factores bióticos en conjunción de los abióticos (nicho fundamental) que necesita una especie para proliferar determina el componente ambiental del nicho (nicho realizado). Al incrementar el número y el tipo de interacciones bióticas establecidas por un organismo al emitir VOCs semioquímicos, el NR por su componente biótico se expande. Así, el costo-beneficio de la emisión es el balance de la inversión de su biosíntesis y los recursos obtenidos por las interacciones establecidas. Basado en (Soberón, 2007) con modificaciones.

Esto explica el hecho de que los VOCs puedan predecir los estilos de vida de los microbios emisores (Guo *et al.*, 2021), pues son un reflejo de sus capacidades metabólicas, confiriéndoles ventajas al explotar sus respectivos nichos. Siguiendo esta lógica, los organismos del suelo, sometidos a microambientes altamente heterogéneos, de alta competencia y donde ocurren simultáneamente una gran diversidad de interacciones (Philippot *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2021) deberían de reflejar esa diversidad en sus perfiles químicos. Recientemente esto ha sido reportado (Guo *et al.*, 2021; Gualtieri *et al.*, 2022; Adelusi *et al.*, 2022). Además, los hongos producen muchos compuestos cuya diversidad funcional y estructural también reflejan

claramente las necesidades ambientales que deben de cubrir para sus supervivencia y desarrollo (Duc *et al.*, 2022).

Los hongos patógenos, durante su ciclo de vida parasítico, explotan un ambiente particularmente hostil pues deben enfrentarse a las defensas activas del organismo huésped y, en consecuencia, la constante guerra armamentística establecida entre patógeno y huésped los ha llevado, a lo largo de su historia evolutiva, a la aparición de un sinnúmero de moléculas que funcionan como moduladores de la inmunidad, toxinas, o compuestos señal (Tola & Kebede, 2016; Hogan *et al.*, 1996; Mendes-Giannini *et al.*, 2005). Además de esto, la disponibilidad de nutrientes es diferente en los distintos compartimentos celulares del huésped. Por ejemplo, existe evidencia de que los patógenos fúngicos *Histoplasma* y *Paracoccidioides* no utilizan el catabolismo de hexosas para su fase intracelular dentro de los fagocitos. En cambio, el catabolismo de aminoácidos libres dentro del fagosoma donde se encuentra parece ser la principal fuente de carbono para su crecimiento (Shen & Rappleye, 2020). Por otra parte, los hongos de vida libre se mantienen de la degradación de materia orgánica del ambiente tanto en condiciones aerobias como anaerobias (Hess *et al.*, 2020).

Los aislados fúngicos obtenidos en este proyecto presentaron perfiles de virulencia diferentes en correspondencia con la fuente ambiental de donde provienen (Fig. 16). Los aislados más virulentos de *B. bassiana* en este trabajo fueron los provenientes de cadáveres de insectos en comparación con los obtenidos de núcleos de suelo. Entre los hongos entomopatógenos existen notables variaciones en los rangos de huéspedes que atacan, así como en sus estrategias de propagación, y que son aún más acentuadas entre diferentes concentraciones de inóculo (Doolotkeldieva *et al.*, 2019). Muchas de las diferencias observadas entre distintos tratamientos fúngicos de *B. bassiana* deberían ser interpretadas como la consecuencia de la especialización del hongo a explotar fuentes de carbono diferentes. La plasticidad fenotípica y metabólica de los entomopatógenos es amplia

si consideramos sus múltiples estilos de vida: parasitando insectos, creciendo como organismos de vida libre saprófitos o como organismos endófitos explotando los recursos disponibles en la interior de los tejidos vegetales (Cory & Ericsson, 2010; Shikano, 2017). El estilo de vida parásito ha aparecido en diferentes linajes de hongos en múltiples ocasiones a lo largo de la historia evolutiva, y en el caso de los entomopatógenos se piensa tuvieron ancestros más relacionados con el estilo de vida endófito, en un proceso de diversificación que coincide con la diversificación de sus huéspedes artrópodos (Wang & Wang, 2017).

Parte de la discusión alrededor de la historia evolutiva de estos grupos gira en torno a la observación sobre como algunos géneros de patógenos fúngicos tienen huéspedes taxonómica y filogenéticamente muy distantes. Por ejemplo, los patógenos de plantas y de insectos son en muchos casos afines filogenéticamente. Aún más sorprendente es la afinidad entre el patógeno de abejas *Ascophaera apis* y *Aspergillus fumigatus* (Shang *et al.*, 2016), un fenómeno que posiblemente se explica por la convivencia de potenciales huéspedes en los mismos ambientes que estos hongos parásitos en el pasado, o bien por la semejanza de los mecanismos de infección usados en huéspedes diferentes. Esto pone en relevancia la capacidad adaptativa de los hongos patógenos para explotar las diferentes fuentes de carbono a su disposición, lo que los llevó a realizar saltos entre huéspedes de diferentes filos o reinos (Wang & Wang, 2017). Las adaptaciones moleculares y metabólicas necesarias para infectar a huéspedes diferentes son de distinto grado (Shang *et al.*, 2016) pero requieren de una considerable inversión de recursos que se vería reflejado en el perfil de los VOCs emitidos; esto último es respaldado por las observaciones en este trabajo.

De los aislados obtenidos de suelo y de cadáveres de insecto, las diferencias en los perfiles son lo suficientes como para clasificarlas en categorías diferentes. Notablemente, tanto los aislados de suelo como los de insecto conservan su infectividad independientemente del ambiente donde se obtuvieron, aunque con

diferentes grados de virulencia, por lo tanto, la correlación entre virulencia y emisión es consistente con observaciones hechas anteriormente (Hussain *et al.*, 2010b; Mburu *et al.*, 2009), con la posibilidad de que existan implicaciones funcionales capaces de favorecer al hongo durante el proceso de infección. Recientemente, se ha comenzado a cuestionar si los VOCs desempeñan una función como micotoxinas, y su implicación en otras funciones ignoradas hasta el momento durante el establecimiento de la enfermedad (Bennett & Inamdar, 2015; Que *et al.*, 2013; Inamdar *et al.*, 2010). En consecuencia, no se descarta que los perfiles de VOCs caracterizados contengan compuestos directamente implicados durante el proceso de infección con *S. frugiperda*.

Los perfiles de VOCs reportados anteriormente para entomopatógenos destacan por ser ricos en hidrocarburos de diferente tamaño, tanto lineales como ramificados. Sin embargo, la presencia de estos compuestos en los perfiles estudiados no se observó, y en los casos en donde fueron observados en las muestras de micelio también se observaron en los perfiles del medio de cultivo, motivo por el cual se descartaron del análisis. Por ejemplo, diferentes trabajos han reportado la presencia de decano, 2,4-dimetil-1-hepteno, 4-metiloctano, tridecano, tetradecano, hexadecano, 2,6,8-trimetildecano, entre muchos otros (Hussain *et al.*, 2010a; Hussain *et al.*, 2010b, Camele *et al.*, 2023). Si bien la presencia de estos compuestos ha sido asociada a las adaptaciones del hongo a degradar los componentes del exoesqueleto de los insectos que incluye diferentes proporciones de alcanos alifáticos, alquenos metil ramificados, o inclusive alquenos tan grandes como C₂₉, C₃₀ y C₃₁ (Ortiz-Urquiza & Keyhani, 2013), la ausencia de estos componentes en nuestros perfiles (inclusive en aquellos pertenecientes a los aislados más virulentos) puede deberse al tipo de cepa, medio de cultivo, condiciones de crecimiento o a la especificidad del método de extracción usado. En este trabajo, se eligió el método de SPME que ha sido ampliamente reportado en el análisis de VOCs microbianos y que dependiendo del tipo de fibra utilizado se logra extraer compuestos de distinta naturaleza química. En particular, se eligieron las

fibras azules de PDMS/DVB por su especificidad para la captura de compuestos semivolátiles, alcoholes, ésteres, ácidos carboxílicos de cadena corta, aminas y compuestos aromáticos nitrogenados (Supelco®, 2023).

La mayor parte de los compuestos emitidos por los diferentes aislados de *B. bassiana* cae dentro de la categoría de los alcoholes. Estos componentes son relevantes desde el punto de vista ecológico ya que una gran cantidad de compuestos semioquímicos son alcoholes, y entre estos destacan los alcoholes de fusel (Hazelwood *et al.*, 2008). De estos, dos alcoholes destacaron por su abundancia y afinidad: el 3-metilbutanol (alcohol isoamílico) y el 2-feniletanol (alcohol fenilico). Interesantemente, estos compuestos han sido ampliamente reportados como compuestos semioquímicos en diferentes grupos de insectos, entre ellos lepidópteros (El-Sayed, 2022), siendo además utilizados como cebos de trampas en campo (Landolt *et al.*, 2007; Knight *et al.*, 2017). Se puede suponer que esta particularidad de emitir compuestos semioquímicos de insectos por parte de *B. bassiana* se trata de una estrategia desarrollada por el parásito para hacerse de un huésped, lo cual consigue por al menos tres mecanismos: i) atrayendo al huésped por medio de una señal imitando la presencia de algún recurso aprovechado por el insecto, ii) al estimular fisiológicamente al huésped para incrementar el número de cópulas y mejorar su dispersión por proximidad entre insectos sanos e infectados, iii) emitiendo señales que alerten al huésped e incrementen la frecuencia de oviposición cerca del sitio donde se encuentra el patógeno como una estrategia de compensación. Ninguno de estos escenarios sería mutuamente excluyente y, por lo tanto, la explicación de las conductas observadas dependería tanto del costo-beneficio para el hongo al explotar estas estrategias, así como del contexto ecológico en el cual se desarrolle esta interacción (Conchou *et al.*, 2019).

En este sentido, el incremento de la oviposición observado por *S. frugiperda* al exponerse a los VOCs de *B. bassiana* puede ser interpretado de diferentes formas. Una de ella es que al percibir los VOCs de *B. bassiana* se activa una

respuesta de defensa poblacional por el insecto, en donde las hembras grávidas incrementan el número de huevos colocados para maximizar el tamaño de su progenie en un contexto ambiental potencialmente hostil por la alta probabilidad de infección con el hongo entomopatógeno. Este comportamiento se ha reportado para el parasitoide *Trybliographa rapae*. Este parasitoide es susceptible a la infección tanto de *M. brunneum* KVL 04-57 como de *B. bassiana* KVL 03-90, al igual que ocurre con su huésped natural, el lepidóptero *D. radicum*. Cuando las hembras de este parasitoide se exponen a sustratos contaminados con los propágulos de los hongos entomopatógenos, se observa un aumento en el número de huevos depositados por el parasitoide en presencia del huésped. Además, la cantidad de huevos puestos por estas hembras guarda una correlación con la probabilidad de mortalidad de la hembra debido a la infección provocada por los hongos. Los autores del estudio interpretan este comportamiento como la respuesta del insecto frente a la amenaza que representa el hongo para el parasitoide mismo. Esta respuesta se traduce en un incremento en la oviposición como consecuencia de la disminución en la esperanza de vida de *T. rapae* como resultado de la infección por parte del entomopatógeno (Rännbäck *et al.*, 2015). Sin embargo, se carece de reportes de esta estrategia en lepidópteros, además del hecho que los parasitoides están sujetos a una mayor presión selectiva por las enfermedades de sus huéspedes, puesto que dependen de ellos para completar su ciclo de vida, lo que no ocurre en el caso de los lepidópteros (Bernal, 2007).

Una explicación alternativa sería que el insecto responda directamente a los VOCs fúngicos al ser estimulado por ellos a elegir un sitio particular para ovipositar, considerando que dicho efecto posiblemente debe atribuirse a uno o más componentes de la mezcla aromática. Al menos dos reportes (Zhu *et al.*, 2023; Cotes *et al.*, 2020) apuntan a que en circunstancias específicas los entomopatógenos modifican las señales químicas emitidas por las plantas huéspedes para atraer insectos. Por ejemplo, Zhu *et al.* (2023) observaron que la inoculación de plantas de maíz con *B. bassiana* tiene como efecto el incremento de

la oviposición de *Ostrinia furnicalis* sobre dichas plantas comparados con los controles sin inocular, esto correlacionado con la disminución de la tasa de supervivencia de la progenie crecida sobre este cultivo. Los incrementos en la oviposición reportados fueron casi del doble en comparación con los controles. Esto se correlacionó con el incremento de la emisión de diversos volátiles de hoja verde, como (Z)-3-hexenol, 2-etil-1-hexanol, (E)-2-hexenal, hexanal y el terpeno α -pineno, entre otros. Además, se observó el incremento en la oviposición del insecto en presencia de estos compuestos, por lo tanto, se les atribuyó un efecto estimulador de la oviposición, correlacionado con una respuesta electroantenográfica también incrementada. Los autores concluyen que esta disminución en la supervivencia de la progenie estaría relacionada con cambios en la calidad de los tejidos de la planta y cambios en el perfil de metabolitos secundarios de las hojas (Zhu *et al.*, 2023). Las plantas inoculadas con el hongo en el trabajo mencionado presentaron además perfiles globales de emisión de VOCs alterados, notablemente enriquecidos con alcoholes, la misma familia que constituye la fracción mayoritaria en los perfiles observados para los aislados del presente trabajo.

Por su parte, Cotes *et al.* (2020) observaron que el lepidóptero plaga *Delia radicum* prefiere ovipositar en plantas de *Brassica oleraceae* inoculadas con *M. brunneum*, esto en condiciones de invernadero y en campo. El hongo logra manipular a su planta huésped por medio de cambios en la absorbancia de las hojas de la planta y por los volátiles emitidos. Esto se traduce en mayores probabilidades del hongo para encontrar un potencial huésped artrópodo. Es importante destacar que, si bien los trabajos mencionados fueron realizados con ensayos en plantas inoculadas, demuestran el potencial de los hongos entomopatógenos para manipular la conducta de sus huéspedes y de esa manera facilitar su propia dispersión. Además, si se toma en consideración la diversidad de compuestos detectados en los perfiles de *B. bassiana* con reportes como semioquímicos de lepidópteros (3-metilbutanol, 2-feniletanol, alcohol bencílico, β -selineno, etanol,

ácido nonanoico, ácido octanoico, entre otros) (El-Sayed, 2022) es muy probable que estos sean los responsables de manipular la conducta de *S. frugiperda*.

En primer lugar, el alcohol de fusel 3-metilbutanol (cuya abundancia representó más de la mitad del total de compuestos aromáticos emitidos) ha sido ampliamente reportado como modulador en la conducta de diferentes lepidópteros, en particular de los pertenecientes a la familia Noctuidae, donde parece ejercer una influencia significativa en la respuesta de atracción y comportamiento de estas especies (El-Sayed, 2022). En diversos estudios, se ha demostrado que este alcohol es un componente atractivo para las especies *Lacanobia subjuncta*, *Mamestra configurata* y *Xestia c-nigrum*. Al usar este componente en combinación con otros semioquímicos (como el ácido acético o el 3-metilpentanol) se observan altas tasas de captura en experimentos de trampeo (Landolt, 2000). En otro trabajo, 77 especies diferentes lepidópteros de las familias Geometridae, Noctuidae, Nymphalidae y Thyatiridae se capturaron en trampas por el uso de una combinación de 3-metilbutanol y ácido acético (Landolt *et al.*, 2007).

Un caso semejante es el 2-feniletanol, también un alcohol de fusel, del que se ha reportado un efecto atrayente de lepidópteros como *Mamestra brassicae*, *Trichoplusia spp.*, *Pandemis limitata*, *Lobesia botrana* y *Choristoneura rosaceana* (Jacquin *et al.* 1991; Haynes *et al.*, 1991; Judd *et al.*, 2017; Knight *et al.*, 2017; Tasin *et al.*, 2018, Tasin *et al.*, 2012). Además, se tienen reportes de su efecto como disuasivo de la herbivoría para *S. littoralis* (Labbé *et al.*, 2005). Este alcohol también ha sido señalado como uno de los componentes responsables de la atracción de los adultos *Epiphyas postvittana* a plantas de manzana atacadas por las larvas de su misma especie, en un notable ejemplo de atracción conoespecífica mediada por volátiles (El-Sayed *et al.*, 2016). Sin embargo, no se conocen reportes apuntando a la participación de este compuesto en la conducta reproductiva *S. frugiperda*. La capacidad del 3-metilbutanol y el 2-feniletanol para evocar una respuesta atractiva en diversos lepidópteros sugiere que se trata de una conducta general en este

grupo, considerando además que las emisiones de este alcohol de fusel se produce en fuentes alimenticias en fermentación ricas en azúcares y, en consecuencia, los lepidópteros han desarrollado una reacción de aproximación hacia la fuente (Becher *et al.*, 2018).

Por otra parte, los efectos sobre el comportamiento inducidos por el alcohol bencílico han sido estudiados en el género *Spodoptera*. Por ejemplo, de Fouchier *et al.* (2018) muestran como varios compuestos volátiles emitidos por plantas poseen propiedades atrayentes para las larvas de *S. littoralis*. Entre los compuestos identificados como atrayentes se encuentran el 1-hexanol, la acetofenona, el benzaldehído, el (Z)-3-hexenol, el (E)-2-hexenol, el (Z)-3-hexenil acetato y el alcohol bencílico. Estas señales químicas ayudan a la larva durante la búsqueda de una planta huésped. Por otra parte, Wan *et al.* (2015) analizaron las respuestas neuronales en el lóbulo antenal de *S. litura* con relación a la exposición a diversos compuestos volátiles liberados por plantas. Los resultados obtenidos indicaron una respuesta altamente dependiente del sexo, con una marcada reacción en los machos. Estos machos demostraron ser particularmente atraídos por el benzaldehído y el alcohol bencílico, esto observado en experimentos de elección en túnel de viento. Entre otras familias para las cuales este compuesto está reportado como semioquímico son Noctuidae, Papilionidae, Pyralidae, Spingidae, Geometridae y Thyrididae (El-Sayed, 2022), por lo cual, si bien no se han reportados efectos directos sobre *S. frugiperda*, no debe descartarse su participación en la estimulación de la oviposición observado.

Los ácidos orgánicos influyen en la conducta alimentaria de los insectos. Un ejemplo se observa en el caso del ácido oxálico, cuya presencia desencadena una respuesta aversiva en el hemíptero *Nilaparvata lugens*, llevándolo a disminuir el consumo de los cultivares de arroz ricos en este compuesto (Kang *et al.* 2023). Así, los ácidos orgánicos afectan directamente las elecciones alimentarias de los insectos. Otro ejemplo es la formulación conocida como C8910, compuesta por los

ácidos octanoico, nonanoico y decanoico, y que ha sido estudiada para evaluar su efectividad como repelente ante moscas y mosquitos. Investigaciones llevadas a cabo por Samuel *et al.* (2015) así como Mullens *col.* (2009) respaldan la capacidad de esta formulación como repelente. Además, la influencia de los ácidos orgánicos en la conducta alimentaria se extiende a una variedad de especies de insectos. El ácido nonanoico, por ejemplo, ha demostrado su efecto disuasivo para el coleóptero *Hylobius abietis* en pruebas de selección realizadas con fragmentos de pino. Resultados similares se han observado en los coleópteros *Trogoderma granarium* y *Tribolium castaneum* (Mansson *et al.*, 2006; Cohen *et al.*, 1974).

Otras investigaciones han explorado el potencial insecticida de ciertos ácidos orgánicos en lepidópteros. Así, se ha encontrado que los ácidos linolénico, linoleico y oleico son insecticidas para *S. frugiperda* y otros lepidópteros plaga como *Helicoverpa zea*, *Lymantria dispar*, *Orgyia leucostigma* y *Malacosoma disstria* (Ramsewak *et al.*, 2001; Ramos-López *et al.*, 2012; Figueroa *et al.*, 2002). Estos descubrimientos subrayan aún más la versatilidad de los ácidos orgánicos en la manipulación de poblaciones de insectos perjudiciales, tanto a través de la modificación de sus comportamientos alimentarios como de su salud y supervivencia general. Si bien no queda clara la contribución de los ácidos grasos observados en los perfiles de *B. bassiana* en las modificaciones conductuales observadas en el presente trabajo, se sabe que el ácido octanoico y nonanoico actúan como semioquímicos de las familias Papilionidae y Danaidae (El-Sayed, 2022).

Es importante destacar que los efectos observados probablemente no deban atribuirse a un solo compuesto en específico, sino al conjunto de los componentes. La respuesta olfativa depende de la correcta percepción a diferentes niveles del aparato sensorial, cuya sensibilidad y especificidad también sigue patrones temporales y especiales. Los estímulos así percibidos son integrados por el sistema nervioso central del insecto a través del complejo aparato olfativo que poseen

(Renou, 2014). Con respecto a esto, las mezclas de compuestos aromáticos que imitan a los componentes florales son más efectivos en inducir respuestas conductuales consistentes en rangos de dilución de hasta mil veces al ser percibidos por el lepidóptero *Manduca sexta* en comparación con los componentes por separado. Esto pone en relevancia el sinergismo entre los componentes que codifican para un aroma sobre la respuesta del insecto (Riffell *et al.*, 2009). Sin embargo, los resultados observados en este trabajo apoyan la idea que la fracción mayoritaria perteneciente al 3-metilbutanol participaría en la respuesta reproductiva y de consumo de *S. frugiperda*, sin descartar la importancia de los componentes minoritario perfiles el los perfiles de VOCs fúngicos (Fig. 16).

Una mayor tasa de oviposición debería de traducirse en una progenie más abundante. Pero no es claro si los incrementos en la oviposición observados en este trabajo se traducen en una mayor tasa de infección del hongo entomopatógeno, puesto que no se realizó un seguimiento de la infección en la progenie. Sin embargo, se ha reportado de efectos transgeneracionales en patógenos de insectos sobre el desempeño de la progenie de progenitores infectados (Kangassalo *et al.*, 2015). Además, en la naturaleza la tasa de contagio de una enfermedad incrementa al aumentar la densidad poblacional, motivo por el cual el entomopatógeno sacaría provecho al estimular la oviposición. La disminución del desempeño de una especie al incrementar la densidad poblacional es uno de los mecanismos de regulación denso-dependiente en la naturaleza y es un proceso clave en la regulación de las comunidades de animales (Freckleton & Lewis, 2006; Parker & Gilbert, 2019). Por ejemplo, un incremento en la incidencia de infecciones por los hongos entomopatógenos *Cordyceps militaris*, *Paecilomyces farinosus* y *B. bassiana* es el principal factor que controla la dinámica poblacional en los incrementos y disminuciones periódicos en la abundancia del lepidóptero *Syntypistis punctatella* en Japón en intervalos de entre 8 y 11 años de duración (Kamata, 2000). Más aún, se ha propuesto que la inversión en mecanismos de resistencia en los insectos incrementa al aumentar la densidad de las poblaciones (un fenómeno conocido

como “profilaxis denso-dependiente”) (Wilson *et al.*, 2002), esto pone en evidencia la relevancia de este factor en el éxito de la propagación de las enfermedades de invertebrados. Así, se ha observado que *S. littoralis* es más resistente en poblaciones crecidas en alta densidad, además esta resistencia se correlaciona con una mayor melanización de la cutícula y la actividad de las enzimas fenoloxidasas (Wilson *et al.*, 2001). De esta forma, también se especula en un escenario donde el incremento de la densidad poblacional por parte de *S. frugiperda* es explicado como una estrategia de resistencia para hacer frente a la presencia del patógeno en los sitios de oviposición, compensando de esta forma las pérdidas generadas por la letalidad de la enfermedad. Sería tentador especular si dichas estrategias por parte del insecto se ven reflejadas en el éxito de los programas de biocontrol con hongos entomopatógenos en la agricultura (Fig. 16).

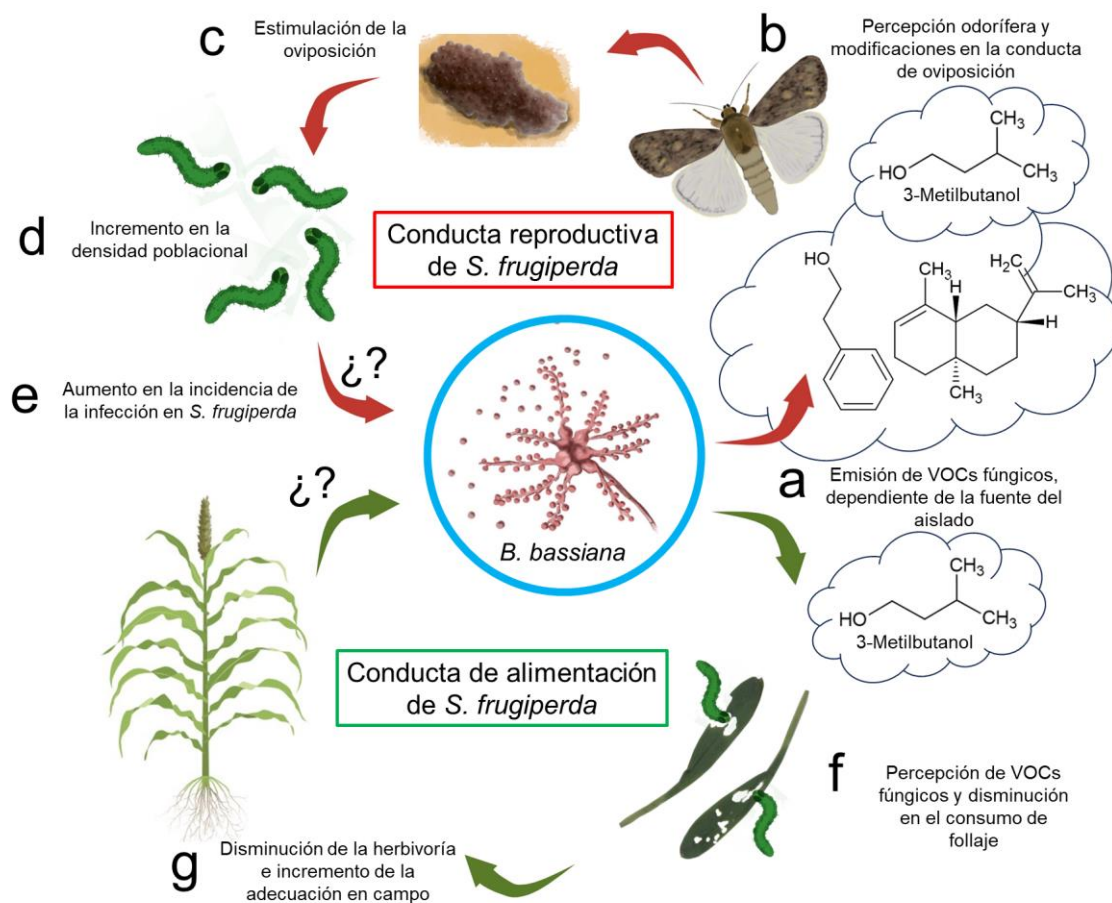


Figura 16. *B. bassiana* modifica la conducta reproductiva y de consumo de *S. frugiperda* por la mediación de los VOCs que emite. a) Los perfiles caracterizados muestran que esta emisión es dependiente de la fuente ambiental de donde se obtuvieron los aislados, lo que se asocia con sus diferentes niveles de virulencia. El compuesto emitido en mayor abundancia fue el 3-metilbutanol. b) La percepción de estas moléculas por los adultos modifica su conducta de oviposición, traduciéndose c) en la estimulación y el incremento del número de huevos. d) Esto debería dar como resultado un incremento en la densidad de la progenie y e) podría incrementar la incidencia de la enfermedad en la población de *S. frugiperda*. Por otra parte, f) los VOCs fúngicos emitidos y el 3-metilbutanol disminuyen el consumo de follaje. f) Esto podría disminuir la herbivoría sobre la planta en campo. Sin embargo, la contribución de estos VOCs *in situ* en la propagación de *B. bassiana* y su efecto en la adecuación del sorgo en campo debe ser explorado con mayor detalle (f y g).

Además, que el patógeno haya desarrollado la capacidad de explotar estos mecanismos denso-dependiente con el fin de incrementar las probabilidades de contagiar a otros miembros en las poblaciones de *S. frugiperda* es un escenario plausible, en tanto estas modificaciones se entienden como la expresión de un fenotipo extendido del parásito/patógeno para mejorar su dispersión (Heil, 2016). Cambios en la conducta reproductiva han sido observados, por ejemplo, en la manipulación sexual de la mosca doméstica *Musca domestica* por el hongo entomopatógeno *Entomophthora muscae*, que induce la cópula de los machos en cadáveres de hembras infectados con el hongo (Zurek *et al.*, 2002; Naundrup *et al.*, 2022). En otro ejemplo, la infección de *M. acridum* en la langosta *Schistocerca gregaria* tiene el efecto de inducir la conducta de cópula entre machos, cuya frecuencia incrementa conforme transcurren los días posteriores al inicio de la infección (Clancy *et al.*, 2017). Es notable la escasez de reportes en la literatura sobre el tema, probablemente a consecuencia de la sutileza de estos efectos sobre la conducta, o bien, como producto de la falta de investigación en diferentes grupos de insectos (Hansen & de Fine Licht, 2019).

Por otra parte, en el presente trabajo el insecto *S. frugiperda* fue capaz de responder en función del contexto odorífero presentado. Así, los adultos responden a la presencia del micelio de *B. bassiana* o del alcohol puro 3-metilbutanol, y además las propias larvas del adulto parecen ser más proclives a responder a la dieta artificial durante los ensayos de olfatometría dual. En este punto hay que destacar la compleja integración de las señales olfativas en los insectos, siendo un proceso que ocurre a diferentes niveles, comenzando en los receptores olfativos encargados de percibir los compuestos aromáticos y que desencadenan un potencial de acción transmitido por las neuronas receptoras olfativas (Leal, 2013; Wicher & Miazzi, 2021). Los axones de estas neuronas hacen sinapsis con las dendritas de las neuronas de proyección en los glomérulos dentro del glóbulo antenal, constituyendo los centros olfativos primarios en insectos (Renou, 2014). A su vez, estas neuronas de proyección transmiten la señal a centros olfativos de segundo orden en el

sistema nervioso central del insecto tales como los “cuerpos de hongo” (también llamada corpora pedunculata) y el protocerebro, donde se llevan a cabo procesos de integración de mayor nivel, como por ejemplo el aprendizaje asociativo, un proceso que también ha sido reportado en insectos (Galizia & Sachse, 2010; Webb, 2012).

Debido a esta organización sensitiva y de integración, los insectos presentan una notable capacidad de integrar los estímulos del ambiente, además de tener capacidades cognitivas normalmente asociadas con animales superiores, poseedores de sistemas nerviosos más desarrollados (Punzo, 1985; Webb, 2012). En particular los lepidópteros han mostrado tener la capacidad de aprender por asociación de estímulos, esto es, el asociar una recompensa (muchas veces una fuente de alimento) o un estímulo con un contenido semántico intrínseco con otro estímulo ambiental neutro (Heard, 1999; Renou, 2014). Las mariposas aprenden a identificar las potenciales fuentes de alimento en su entorno, además de que presentan una notable plasticidad neuronal dependiente de experiencias previas y, por lo tanto, poseen por definición una “memoria olfativa” bastante desarrollada (Cunningham *et al.*, 2004; Balkenius *et al.*, 2006). Más aún, los lepidópteros modifican su respuesta hacia los olores percibidos en etapas más avanzadas por la influencia de experiencias previas durante el comienzo de su fase adulta (Gámez & Leon, 2018), y también en su etapa larvaria o durante la eclosión de la pupa (Olsson *et al.*, 2006). Este condicionamiento clásico (“pavloviano”) explica lo observado con respecto a la respuesta consistente de las larvas a preferir la dieta artificial en los tratamientos control o cuando se les daba a elegir junto con otra fuente alimenticia, inclusive follaje fresco de sorgo, puesto que desde su crianza fueron sometidas al mismo estímulo olfativo y seguramente presentan cierto condicionamiento hacia esta fuente de alimento.

Por otra parte, la contribución del aprendizaje de insectos en el reconocimiento de patógenos es un área completamente inexplorada. El

aprendizaje les permite a los animales reconocer correlaciones entre diferentes estímulos y de esa forma predecir el resultado futuro sobre la ocurrencia de un recurso (Smith, 1993). Se ha descrito que los insectos eusociales reconocen cadáveres infectados con patógenos y los evitan, así como limpian sus nidos de los restos de estos cadáveres infecciosos como medida profiláctica para evitar la propagación de brotes infecciosos en las colonias (Pereira & Detrain, 2020). El grado en que estos patrones de conducta son aprendidos o si son exclusivamente innatos es desconocido. Sin embargo, es posible especular que en ambientes donde la abundancia o la incidencia de enfermedades por entomopatógenos son altas, los insectos desarrollan mayor sensibilidad a los compuestos marcadores de la presencia de estos microorganismos. Se sabe que el lepidóptero *Pieris rapae* asocia las características ambientales de los sitios en donde oviposita en las 24 horas previas, y esto influye en su conducta de oviposición. Cuando las hembras ovipositan en discos de color impregnados con el glucosinolato sinigrina (un compuesto estimulante de la oviposición), asocian dicho color con sus preferencias futuras a ovipositar en discos de ese mismo color sin que estén impregnados con la sinigrina (Traynier, 1984). Conductas semejantes atribuibles a esta plasticidad fenotípica en la conducta de los insectos se observa en las respuestas desarrolladas por estos para hacer frente a las modificaciones antrópicas (van Baaren & Candolin, 2018), o en como los insectos modifican su afinidad a ovipositar sobre ciertas plantas huéspedes en función de experiencias previas en esa planta huésped para incrementar las posibilidades de éxito de su progenie (Heard, 1999).

Siendo frecuentes los ejemplos de aprendizaje ligados a la reproducción en diversos grupos de insectos, es muy probable que escenarios semejantes en donde el insecto detecte la presencia de señales químicas asociadas con entomopatógenos también influyan en la selección de sitios de oviposición, o en la frecuencia y abundancia de puestas colocadas en estos ambientes. Esto también explica la dificultad en observar modificaciones conductuales en diferentes grupos de insectos inducidas por la presencia de entomopatógenos, siendo que en muchos

casos estas poblaciones experimentales están privadas de estímulos ambientales como ocurre en sus entornos silvestres, entre ellos las señales que marcan la presencia de microbios. Por lo anterior, se necesita profundizar la contribución del aprendizaje asociativo y no asociativo en el desarrollo de respuestas de evasión a agentes patógenos, así como en el desarrollo de estrategias experimentales que tomen en consideración aspectos como la memoria asociativa en la respuesta del insecto a los semioquímicos percibidos.

El presente trabajo contribuye a mejorar nuestra comprensión sobre la complejidad detrás de las interacciones entre insectos y entomopatógenos. Hay que destacar la escasez de reportes donde se aborde el tema de la conducta en lepidópteros en respuesta a entomopatógenos. En particular para *B. bassiana*, aun siendo uno de los agentes de control con mayor comercialización, ha sido poco estudiado desde este punto de vista. Además, los aspectos teóricos detrás de las implicaciones evolutivas de la emisión de VOCs desde un enfoque adaptativo tienen importantes implicaciones en entender cómo se constituyó la red de interacciones que acontece en los ecosistemas y contribuye, además, a mejorar y proponer alternativas sustentables en beneficio de la agricultura y para garantizar la seguridad alimentaria en el mundo.

9. CONCLUSIONES GENERALES

Las conclusiones obtenidas en este estudio derivan de los resultados descritos en los capítulos I y II, en los que se aporta información sobre la relevancia de los VOCs emitidos por los hongos entomopatógenos como potenciales semioquímicos de insectos y sus funciones en las comunidades naturales, motivando la pregunta de investigación del presente proyecto: ¿los VOCs emitidos por aislados de *B. bassiana* de diferente fuente ambiental y grados de virulencia modifican la conducta reproductiva y de forrajeo de *S. frugiperda*?

1. El perfil de VOCs es cepa-específico. La diversidad química de los perfiles de VOCs emitidos por los aislados de *B. bassiana* están asociados con la fuente ambiental, lo que se explica como una consecuencia de las adaptaciones metabólicas de estos hongos a sus nichos tróficos iniciales. Esto no había sido observado para hongo entomopatógenos hasta el momento y contribuye a otros reportes asociando la diversidad química de la microbiota del suelo con su diversidad trófica.
2. Los perfiles de VOCs de los distintos aislados de *B. bassiana* pueden asociarse a los distintos grados de virulencia. El efecto de los VOCs fúngicos sobre las larvas L2 de *S. frugiperda* es consistente con la observación de que algunos grupos de insectos discriminan la virulencia de los entomopatógenos en función de los perfiles de VOCs emitidos. Este resultado representa el primer reporte de dicha relación para lepidópteros, lo que abre la posibilidad a la existencia de patrones más generales que asocien la diversidad química con la virulencia de entomopatógenos para otros grupos de insectos.
3. Los VOCs de *B. bassiana* estimulan la conducta de oviposición de los adultos de *S. frugiperda*. Esto se explica en parte por la presencia del alcohol de fusel 3-metilbutanol en los perfiles aromáticos, además de ser un efecto dependiente de la virulencia de los aislados, lo que no había sido observado con anterioridad para lepidópteros, contribuyendo a las pocas observaciones existentes sobre

modificaciones en la conducta reproductiva en insectos inducidos por entomopatógenos, y apuntan a que serían más abundantes de lo que se sospechaba para diferentes grupos de insectos.

4. La percepción de los VOCs de *B. bassiana* y el 3-metilbutanol por las larvas L2 de *S. frugiperda* modificó la conducta de forrajeo. Esto probablemente tendría consecuencias positivas para el desempeño del sorgo en condiciones de campo. Este es el primer reporte sobre modificaciones en la conducta de consumo por la mediación de VOCs de entomopatógenos para lepidópteros, además de asociar este efecto a un compuesto en específico.

5. La interacción de un hongo entomopatógeno con su hospedero es un evento complejo y dinámico. Los VOCs emitidos por el hongo forman parte crucial durante el reconocimiento por parte del hospedero que deriva en cambios en su comportamiento, por lo que se necesitan investigar otros aspectos relevantes de los fenómenos conductuales observados, como por ejemplo los efectos transgeneracionales que posiblemente existan en las poblaciones de *S. frugiperda* expuestas a los VOCs de *B. bassiana*, así como el impacto de estas moléculas en condiciones de campo. Además, es probable que existan cambios en los perfiles químicos del follaje de sorgo inducidos por estas moléculas y que disminuyan la defoliación por *S. frugiperda*, por lo tanto, los perfiles químicos de las plantas de *S. bicolor* expuestas a los VOCs fúngicos deberían ser estudiados.

10. BIBLIOGRAFÍA

Aartsma, Y., Bianchi, F. J. J. A., van der Werf, W., Poelman, E. H., & Dicke, M. (2017). Herbivore-induced plant volatiles and tritrophic interactions across spatial scales. *New Phytologist*, 216(4): 1054–1063. <https://doi.org/10.1111/nph.14475>

Abbas, A., Ullah, F., Hafeez, M., Han, X., Dara, M. Z. N., Gul, H., & Zhao, C. R. (2022). Biological control of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Agronomy*, 12(11):11. <https://doi.org/10.3390/agronomy12112704>

Adelusi, O. A., Gbashi, S., Adebisi, J. A., Makhuvele, R., Adebo, O. A., Aasa, A. O., Targuma, S., Kah, G., & Njobeh, P. B. (2022). Variability in metabolites produced by *Talaromyces pinophilus* SPJ22 cultured on different substrates. *Fungal Biology and Biotechnology*, 9: 15. <https://doi.org/10.1186/s40694-022-00145-8>

Ahuja, I., Kissen, R., & Bones, A. M. (2012). Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends in Plant Science*, 17(2): 73–90. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.11.002>

Alves, S. B., Rossi, L. S., Lopes, R. B., Tamai, M. A., & Pereira, R. M. (2002). *Beauveria bassiana* yeast phase on agar medium and its pathogenicity against *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) and *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 81(2): 70–77. [https://doi.org/10.1016/S0022-2011\(02\)00147-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2011(02)00147-7)

Amaral, F. S., Kanno, R. H., do Nascimento, A. R. B., Guidolin, A. S., & Omoto, C. (2023). Trends towards lower susceptibility of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to teflubenzuron in Brazil: an evidence for field-evolved resistance. *Insects*, 14(2): 129. <https://doi.org/10.3390/insects14020129>

Ameye, M., Van Meulebroek, L., Meuninck, B., Vanhaecke, L., Smagghe, G., Haesaert, G., & Audenaert, K. (2020). Metabolomics reveal induction of ROS production and glycosylation events in wheat upon exposure to the green leaf volatile

Z-3-hexenyl acetate. *Frontiers in Plant Science*, 11: 596271. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.596271>

Andersen, S. B., Gerritsma, S., Yusah, K. M., Mayntz, D., Hywel-Jones, N. L., Billen, J., Boomsma, J. J., & Hughes, D. P. (2009). The life of a dead ant: The expression of an adaptive extended phenotype. *The American Naturalist*, 174(3): 424–433. <https://doi.org/10.1086/603640>

Angioy, A. M., Desogus, A., Barbarossa, I. T., Anderson, P., & Hansson, B. S. (2003). Extreme sensitivity in an olfactory system. *Chemical Senses*, 28(4): 279–284. <https://doi.org/10.1093/chemse/28.4.279>

Balkenius, A., Rosén, W., & Kelber, A. (2006). The relative importance of olfaction and vision in a diurnal and a nocturnal hawkmoth. *Journal of Comparative Physiology. A, Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 192(4): 431–437. <https://doi.org/10.1007/s00359-005-0081-6>

Baquero, F., Coque, T. M., Galán, J. C., & Martinez, J. L. (2021). The origin of niches and species in the bacterial world. *Frontiers in Microbiology*, 12(657986). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.657986>

Barelli, L., Padilla-Guerrero, I. E., & Bidochka, M. J. (2011). Differential expression of insect and plant specific adhesin genes, Mad1 and Mad2, in *Metarhizium robertsii*. *Fungal Biology*, 115(11): 1174–1185. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.08.003>

Bar-On, Y. M., Phillips, R., & Milo, R. (2018). The biomass distribution on Earth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(25): 6506–6511. <https://doi.org/10.1073/pnas.1711842115>

Baverstock, J., Roy, H. E., & Pell, J. K. (2010). Entomopathogenic fungi and insect behaviour: from unsuspecting hosts to targeted vectors. *BioControl*, 55: 89–102. <https://doi.org/10.1007/s10526-009-9238-5>

Bayry, J., Aïmanianda, V., Guijarro, J. I., Sunde, M., & Latgé, J. P. (2012). Hydrophobins-unique fungal proteins. *PLoS Pathogens*, 8(5): e1002700. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002700>

Bearhop, S., Adams, C. E., Waldron, S., Fuller, R. A., & Macleod, H. (2004). Determining trophic niche width: a novel approach using stable isotope analysis. *Journal of Animal Ecology*, 73(5), 1007-1012. <https://doi.org/10.1111/j.0021-8790.2004.00861.x>

Becher, P. G., Hagman, A., Verschut, V., Chakraborty, A., Rozpędowska, E., Lebreton, S., Bengtsson, M., Flick, G., Witzgall, P., & Piškur, J. (2018). Chemical signaling and insect attraction is a conserved trait in yeasts. *Ecology and Evolution*, 8(5): 2962–2974. <https://doi.org/10.1002/ece3.3905>

Becher, P. G., Verschut, V., Bibb, M. J., Bush, M. J., Molnár, B. P., Barane, E., Al-Bassam, M. M., Chandra, G., Song, L., Challis, G. L., Buttner, M. J., & Flärdh, K. (2020). Developmentally regulated volatiles geosmin and 2-methylisoborneol attract a soil arthropod to *Streptomyces* bacteria promoting spore dispersal. *Nature Microbiology*, 5(6), 821–829. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0697-x>

Behie, S. W., Zelisko, P. M., & Bidochka, M. J. (2012). Endophytic insect-parasitic fungi translocate nitrogen directly from insects to plants. *Science*, 336(6088): 1576–1577. <https://doi.org/10.1126/science.1222289>

Behie, S. W., & Bidochka, M. J. (2014). Ubiquity of insect-derived nitrogen transfer to plants by endophytic insect-pathogenic fungi: an additional branch of the soil nitrogen cycle. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(5): 1553–1560. <https://doi.org/10.1128/AEM.03338-13>

Bennett, J. W., & Inamdar, A. A. (2015). Are some fungal volatile organic compounds (VOCs) mycotoxins? *Toxins*, 7(9): 3785–3804. <https://doi.org/10.3390/toxins7093785>

Berenbaum, M. R., & Isman, M. B. (1989). Herbivory in holometabolous and hemimetabolous insects: contrasts between Orthoptera and Lepidoptera. *Experientia*, 45(3): 229–236. <https://doi.org/10.1007/BF01951808>

Bernal, J. (2007). Biología, Ecología y Etología de Parasitoides. En: L. A. Rodríguez-del-Bosque y H. C. Arredondo-Bernal (eds.), Teoría y aplicación del control biológico. Sociedad Mexicana de Control Biológico, México.

Bidochka, M. J., Pfeifer, T. A., & Khachatourians, G. G. (1987). Development of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in liquid cultures. *Mycopathologia*, 99: 77–83. <https://doi.org/10.1007/BF00436909>

Binneck, E., Lastra, C. L. L., & Sosa-Gómez, D. R. (2019). Genome sequence of *Metarhizium rileyi*, a microbial control agent for lepidoptera. *Microbiology Resource Announcements*, 8(36): e00897-19. <https://doi.org/10.1128/mra.00897-19>

Blanco, C. A., Pellegaud, J. G., Nava-Camberos, U., Lugo-Barrera, D., Vega-Aquino, P., Coello, J., Terán-Vargas, A. P., & Vargas-Camplis, J. (2014). Maize pests in Mexico and challenges for the adoption of integrated pest management programs. *Journal of Integrated Pest Management*, 5(4): E1–E9. <http://dx.doi.org/10.1603/IPM14006>

Blanford, S., & Thomas, M. B. (1999). Host thermal biology: the key to understanding host-pathogen interactions and microbial pest control? *Agricultural and Forest Entomology*, 1(3): 195–202. <https://doi.org/10.1046/j.1461-9563.1999.00027.x>

Blissard, G. W., & Theilmann, D. A. (2018). Baculovirus entry and egress from insect cells. *Annual Review of Virology*, 5: 113–139. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-092917-043356>

Blom, D., Fabbri, C., Connor, E. C., Schiestl, F. P., Klauser, D. R., Boller, T., Eberl, L., & Weiskopf, L. (2011). Production of plant growth modulating volatiles is

widespread among rhizosphere bacteria and strongly depends on culture conditions. *Environmental Microbiology*, 13(11): 3047–3058. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02582.x>

Boltaña, S., Rey, S., Roher, N., Vargas, R., Huerta, M., Huntingford, F. A., Goetz, F. W., Moore, J., Garcia-Valtanen, P., Estepa, A., & MacKenzie, S. (2013). Behavioural fever is a synergic signal amplifying the innate immune response. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 280(1766): 20131381. <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.1381>

Bolzan, A., Padovez, F. E., Nascimento, A. R., Kaiser, I. S., Lira, E. C., Amaral, F. S., Kanno, R. H., Malaquias, J. B., & Omoto, C. (2019). Selection and characterization of the inheritance of resistance of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to chlorantraniliprole and cross-resistance to other diamide insecticides. *Pest Management Science*, 75(10): 2682–2689. <https://doi.org/10.1002/ps.5376>

Bravo, A., Gill, S. S., & Soberón, M. (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 49(4): 423–435. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.11.022>

Bravo, A., Soberón, M., & Gill, S. S. (2010). *Bacillus thuringiensis* mechanisms and use. En *Insect Control. Biological and synthetic agents*, 247–281. <https://doi.org/10.1016/B0-44-451924-6/00081-8>

Bravo, A., Likitvivatanavong, S., Gill, S. S., & Soberón, M. (2011). *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41(7): 423–431. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.02.006>

Bruck, D. J. (2010). Fungal entomopathogens in the rhizosphere. *BioControl*, 55: 103–112. <https://doi.org/10.1007/s10526-009-9236-7>

Bulgarelli, D., Schlaeppi, K., Spaepen, S., Ver Loren van Themaat, E., & Schulze-Lefert, P. (2013). Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annual review of plant biology*, 64: 807–838. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120106>

Calcagnile, M., Tredici, S. M., Talà, A., & Alifano, P. (2019). Bacterial semiochemicals and transkingdom interactions with insects and plants. *Insects*, 10(12): 441. <https://doi.org/10.3390/insects10120441>

Camele, I., Sadeek, S. A., Racioppi, R., & Elshafie, H. S. (2023). Antimicrobial activity of diffusible and volatile metabolites emitted by *Beauveria bassiana*: chemical profile of volatile organic compounds (VOCs) using SPME-GC/MS analysis. *Plants*, 12(15): Article 15. <https://doi.org/10.3390/plants12152854>

Canals, R. M., Peralta, J., & Zubiri, E. (2019). *Sorghum bicolor* (L.) Moench. https://www.unavarra.es/herbario/pratenses/htm/Sorg_bico_p.htm

Capinera, J. L., Kirouac, S. P., & Barbosa, P. (1976). Phagodeterrence of cadaver components to gypsy moth larvae, *Lymantria dispar*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 28(2): 277–279. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(76\)90138-5](https://doi.org/10.1016/0022-2011(76)90138-5)

Carazo, P., & Font, E. (2010). Putting information back into biological communication. *Journal of Evolutionary Biology*, 23(4): 661–669. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2010.01944.x>

Casmuz, A., Juárez, M. L., Socías, M. G., Murúa, M. G., Prieto, S., Medina, S., Willink, E., & Gastaminza, G. (2010). Revisión de los hospederos del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 69(3–4): 209–231.

Chen, A., Wang, Y., Shao, Y., Zhou, Q., Chen, S., Wu, Y., Chen, H., & Liu, E. (2018). Genes involved in *Beauveria bassiana* infection to *Galleria mellonella*.

Archives of Microbiology, 200(4), 541–552. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1456-0>

Chen, Y., Zhao, C., Zeng, W., Wu, W., Zhang, S., Zhang, D., & Li, Z. (2023). The effect of ergosterol on the allogrooming behavior of termites in response to the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Insect Science*, 30(1): 185–196. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.13055>

Choudhary, D. K., Prakash, A., & Johri, B. N. (2007). Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanism of action. *Indian Journal of Microbiology*, 47(4): 289–297. <https://doi.org/10.1007/s12088-007-0054-2>

Chown, S. L., & Gaston, K. J. (1999). Exploring links between physiology and ecology at macro-scales: the role of respiratory metabolism in insects. *Biological Reviews*, 74(1): 87–120. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1999.tb00182.x>

Christe, P., Oppliger, A., Bancala, F., Castella, G., & Chapuisat, M. (2003). Evidence for collective medication in ants. *Ecology Letters*, 6: 19–22. <https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2003.00395.x>

Christiaens, J. F., Franco, L. M., Cools, T. L., De Meester, L., Michiels, J., Wenseleers, T., Hassan, B. A., Yaksi, E., & Verstrepen, K. J. (2014). The fungal aroma gene ATF1 promotes dispersal of yeast cells through insect vectors. *Cell Reports*, 9(2): 425–432. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.09.009>

Clancy, L. M., Cooper, A. L., Griffith, G. W., & Santer, R. D. (2017). Increased male-male mounting behaviour in desert locusts during infection with an entomopathogenic fungus. *Scientific Reports*, 7:1. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05800-4>

Clancy, L. M., Jones, R., Cooper, A. L., Griffith, G. W., & Santer, R. D. (2018). Dose-dependent behavioural fever responses in desert locusts challenged with the

entomopathogenic fungus *Metarhizium acridum*. *Scientific Reports*, 8:1. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32524-w>

Cohen, E., Stanić, V., & Shulov, A. (1974). Olfactory and gustatory responses of *Trogoderma granarium*, *Dermestes maculatus* and *Tribolium castaneum* to various straight-chain fatty acids. *Zeitschrift für Angewandte Entomologie*, 76(1–4): 303–311. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1974.tb01889.x>

Combet, E., Eastwood, D. C., Burton, K. S., Combet, E., Henderson, J., Henderson, J., & Combet, E. (2006). Eight-carbon volatiles in mushrooms and fungi: properties, analysis, and biosynthesis. *Mycoscience*, 47(6): 317–326. <https://doi.org/10.1007/S10267-006-0318-4>

Conchou, L., Lucas, P., Meslin, C., Proffit, M., Staudt, M., & Renou, M. (2019). Insect odorscapes: from plant volatiles to natural olfactory scenes. *Frontiers in Physiology*, 10(August): 972. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00972>

Contreras-Cornejo, H. A., del-Val, E., Macías-Rodríguez, L., Alarcón, A., González-Esquivel, C. E., & Larsen, J. (2018). *Trichoderma atroviride*, a maize root associated fungus, increases the parasitism rate of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* by its natural enemy *Campoletis sonorensis*. *Soil Biology and Biochemistry*, 122: 196–202. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.04.013>

Contreras-Cornejo, H. A., Viveros-Bremauntz, F., del-Val, E., Macías-Rodríguez, L., López-Carmona, D. A., Alarcón, A., González-Esquivel, C. E., & Larsen, J. (2021). Alterations of foliar arthropod communities in a maize agroecosystem induced by the root-associated fungus *Trichoderma harzianum*. *Journal of Pest Science*, 94(2): 363–374. <https://doi.org/10.1007/s10340-020-01261-3>

Cook, B., Haverkamp, A., Hansson, B. S., Roulston, T., Lerdau, M., & Knaden, M. (2020). Pollination in the Anthropocene: a moth can learn ozone-altered floral

blends. *Journal of Chemical Ecology*, 46: 987–996. <https://doi.org/10.1007/s10886-020-01211-4>

Cooley, J. R., Marshall, D. C., & Hill, K. B. R. (2018). A specialized fungal parasite (*Massospora cicadina*) hijacks the sexual signals of periodical cicadas (Hemiptera: Cicadidae: Magicicada). *Scientific Reports*, 8: 1432. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19813-0>

Cory, J. S., & Myers, J. H. (2003). The ecology and evolution of insect baculoviruses. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 34: 239–272.

Cory, J. S., & Ericsson, J. D. (2010). Fungal entomopathogens in a tritrophic context. *BioControl*, 55(1): 75–88. <https://doi.org/10.1007/s10526-009-9247-4>

Cotes, B., Thöming, G., Amaya-Gómez, C. V., Novák, O., & Nansen, C. (2020). Root-associated entomopathogenic fungi manipulate host plants to attract herbivorous insects. *Scientific Reports*, 10: 22424. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80123-5>

Crespo, R., Juárez, M. P., Dal Bello, G. M., Padín, S., Fernández, G. C., & Pedrini, N. (2002). Increased mortality of *Acanthoscelides obtectus* by alkane-grown *Beauveria bassiana*. *BioControl*, 47: 685–696. <https://doi.org/10.1023/A:1020545613148>

Crespo, R., Pedrini, N., Juárez, M. P., & Dal Bello, G. M. (2008). Volatile organic compounds released by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Microbiological Research*, 163(2): 148–151. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.03.013>

Cruz-Esteban, S., Rojas, J. C., Malo, E. A. (2020). A pheromone lure for catching fall armyworm males (Lepidoptera: Noctuidae) in Mexico. *Acta zoológica mexicana*, 36(1): 1–11. <https://doi.org/10.21829/azm.2020.3612271>

Cunningham, J. P., Moore, C. J., Zalucki, M. P., & West, S. A. (2004). Learning, odour preference and flower foraging in moths. *The Journal of Experimental Biology*, 207(1): 87–94. <https://doi.org/10.1242/jeb.00733>

Dannon, H. F., Dannon, A. E., Douro-Kpindou, O. K., Zinsou, A. V., Houndete, A. T., Toffa-Mehinto, J., Elegbede, I. A. T. M., Olou, B. D., & Tamò, M. (2020). Toward the efficient use of *Beauveria bassiana* in integrated cotton insect pest management. *Journal of Cotton Research*, 3: 24. <https://doi.org/10.1186/s42397-020-00061-5>

Dara, S. K. (2019). Non-entomopathogenic roles of entomopathogenic fungi in promoting plant health and growth. *Insects*, 10(9): 227. <https://doi.org/10.3390/insects10090277>

Davis, T. S., Boundy-Mills, K., & Landolt, P. J. (2012). Volatile emissions from an epiphytic fungus are semiochemicals for eusocial wasps. *Microbial Ecology*, 64(4): 1056–1063. <https://doi.org/10.1007/s00248-012-0074-2>

Davis, T. S., Crippen, T. L., Hofstetter, R. W., & Tomberlin, J. K. (2013). Microbial volatile emissions as insect semiochemicals. *Journal of Chemical Ecology*, 39(7): 840–859. <https://doi.org/10.1007/s10886-013-0306-z>

Dazzo, F. B., Ganter, S., & Lansing, E. (2009). Rhizosphere. In *Environmental Microbiology and Ecology*, 335–349.

de Bortoli, C. P., & Jurat-Fuentes, J. L. (2019). Mechanisms of resistance to commercially relevant entomopathogenic bacteria. *Current Opinion in Insect Science*, 33: 56–62. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2019.03.007>

de Fouchier, A., Walker, W. B., Montagné, N., Steiner, C., Binyameen, M., Schlyter, F., Chertemps, T., Maria, A., François, M. C., Monsempes, C., Anderson, P., Hansson, B. S., Larsson, M. C., & Jacquín-Joly, E. (2017). Functional evolution of Lepidoptera olfactory receptors revealed by deorphanization of a moth repertoire. *Nature Communications*, 8(1), 15709. <https://doi.org/10.1038/ncomms15709>

de Fouchier, A., Sun, X., Caballero-Vidal, G., Travaillard, S., Jacquin-Joly, E., & Montagné, N. (2018). Behavioral effect of plant volatiles binding to *Spodoptera littoralis* larval odorant receptors. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 12: 264. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00264>

de Roode, J., & Lefèvre, T. (2012). Behavioral immunity in insects. *Insects*, 3(3): 789–820. <https://doi.org/10.3390/insects3030789>

Demetrius, L., & Ziehe, M. (2007). Darwinian fitness. *Theoretical Population Biology*, 72(3): 323–345. <https://doi.org/10.1016/j.tpb.2007.05.004>

Diawara, M. M., Wiseman, B. R., & Isenhour, D. J. (1991). Mechanism of whorl feeding resistance to fall armyworm among converted sorghum accessions. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 60(3): 225–231. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1991.tb01542.x>

Dicke, M., & Sabelis, M. (1988). Infochemical terminology: based on cost-benefit analysis rather than origin of compounds? *Functional Ecology*, 2(2): 131–139. <https://doi.org/10.2307/2389687>

Doolotkeldieva, T., Bobusheva, S., Kulmanbetova, A., Zholdosbekova, S., & Amanbek Kyzy, A. (2019). Characterization of *Beauveria bassiana* isolates from Kyrgyzstan. *Journal of Invertebrate Pathology*, 167(August), 107243. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.107243>

Drés, M., & Mallet, J. (2002). Host races in plant-feeding insects and their importance in sympatric speciation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 357(1420): 471–492. <https://doi.org/10.1098/rstb.2002.1059>

Duc, N. H., Vo, H. T. N., van Doan, C., Hamow, K. A., Le, K. H., & Posta, K. (2022). Volatile organic compounds shape belowground plant-fungi interactions. *Frontiers in Plant Science*, 13: 1046685. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1046685>

Dzialo, M. C., Park, R., Steensels, J., Lievens, B., & Verstrepen, K. J. (2017). Physiology, ecology and industrial applications of aroma formation in yeast. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(August): S95–S128. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux031>

El-Sayed, A. M., Knight, A. L., Byers, J. A., Judd, G. J. R., & Suckling, D. M. (2016). Caterpillar-induced plant volatiles attract conspecific adults in nature. *Scientific Reports*, 6:1. <https://doi.org/10.1038/srep37555>

El-Sayed AM. (2022). The Pherobase. Recuperado el 1 de septiembre de 2021, de <https://www.pherobase.com>

Ene, I. V., Brunke, S., Brown, A. J. P., & Hube, B. (2014). Metabolism in fungal pathogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 4(12): a019695. <https://doi.org/doi:10.1101/cshperspect.a019695>

Enebe, M. C., & Babalola, O. O. (2019). The impact of microbes in the orchestration of plants' resistance to biotic stress: a disease management approach. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103: 9–25. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9433-3>

Epsky, N. D., Heath, R. R., Dueben, B. D., Lauzon, C. R., Proveaux, A. T., & MaCollom, G. B. (1998). Attraction of 3-methyl-1-butanol and ammonia Identified from *Enterobacter agglomerans* to *Anastrepha suspensa*. *Journal of Chemical Ecology*, 24: 1867–1880. <https://doi.org/10.1023/A:1022363718193>

Etschmann, M. M. W., Bluemke, W., Sell, D., & Schrader, J. (2002). Biotechnological production of 2-phenylethanol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(1): 1–8. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-0992-x>

Fäldt, J., Jonsell, M., Göran, N., & Borg-Karlson, A. K. (1999). Volatiles of bracket fungi *Fomitopsis pinicola* and *Fomes fomentarius* and their function as insect

attractants. *Journal of Chemical Ecology*, 25(3): 567–590. <https://doi.org/10.1023/A:1020958005023>

Fan, Y., Liu, X., Keyhani, N. O., Tang, G., Pei, Y., Zhang, W., & Tong, S. (2017). Regulatory cascade and biological activity of *Beauveria bassiana* oosporein that limits bacterial growth after host death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(9): E1578–E1586. <https://doi.org/10.1073/pnas.1616543114>

Farh, M. E. A., & Jeon, J. (2020). Roles of fungal volatiles from perspective of distinct lifestyles in filamentous fungi. *Plant Pathology Journal*, 36(3): 193–203. <https://doi.org/10.5423/PPJ.RW.02.2020.0025>

Faria, M., & Wraight, S. (2007). Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*, 43(3): 237–256. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.08.001>

Farias, J. R., Andow, D. A., Horikoshi, R. J., Sorgatto, R. J., Fresia, P., dos Santos, A. C., & Omoto, C. (2014). Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *Crop Protection*, 64: 150–158. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.06.019>

Figueroa, R., Camino, M., Perez-Amador, M., Munoz, V., Bratoeff, E., & Labastida, C. (2002). Fatty acid composition and toxic activity of the acetonic extract of *Carica papaya* L. (Caricaceae) seeds. *Phyton*, 2002: 97–99.

Fleischer, J., Pregitzer, P., Breer, H., & Krieger, J. (2018). Access to the odor world: olfactory receptors and their role for signal transduction in insects. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(3): 485–508. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2627-5>

Flores-Cortez, I., Winkler, R., Ramírez-Ordorica, A., Elizarraraz-Anaya, M. I. C., Carrillo-Rayas, M. T., Valencia-Cantero, E., & Macías-Rodríguez, L. (2019). A mass spectrometry-based study shows that volatiles emitted by *Arthrobacter agilis* UMCV2 increase the content of brassinosteroids in *Medicago truncatula* in response to iron deficiency stress. *Molecules*, 24(16): 16. <https://doi.org/10.3390/molecules24163011>

Freckleton, R. P., & Lewis, O. T. (2006). Pathogens, density dependence and the coexistence of tropical trees. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273(1604): 2909–2916. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3660>

Gaiero, J. R., McCall, C. A., Thompson, K. A., Day, N. J., Best, A. S., & Dunfield, K. E. (2013). Inside the root microbiome: bacterial root endophytes and plant growth promotion. *American Journal of Botany*, 100(9): 1738–1750. <https://doi.org/10.3732/ajb.1200572>

Galizia, C. G., & Sachse, S. (2010). Odor coding in insects. En A. Menini (Ed.), *The Neurobiology of Olfaction*. CRC Press/Taylor & Francis. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK55975/>

Gámez, A. M., & León, S. P. (2018). The role of learning in the oviposition behavior of the silkworm moth (*Bombyx mori*). *Behavioural Processes*, 157: 286–290. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2018.10.023>

Gao, Q., Jin, K., Ying, S. H., Zhang, Y., Xiao, G., Shang, Y., Duan, Z., Hu, X., Xie, X. Q., Zhou, G., Peng, G., Luo, Z., Huang, W., Wang, B., Fang, W., Wang, S., Zhong, Y., Ma, L. J., Leger, R., ... Wang, C. (2011). Genome sequencing and comparative Transcriptomics of the model entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum*. *PLOS Genetics*, 7(1): e1001264. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001264>

Garcia, L. C., Raetano, C. G., & Leite, L. G. (2008). Application technology for the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis indica* and *Steinernema* sp.

(Rhabditida: Heterorhabditidae and Steinernematidae) to control *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) in corn. *Neotropical Entomology*, 37: 305–311. <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2008000300010>

Gauthier, G. M. (2015). Dimorphism in fungal pathogens of mammals, plants, and insects. *PLoS Pathogens*, 11(2): e1004608. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004608>

González-Guzmán, A., Rey, M. D., Froussart, E., & Quesada-Moraga, E. (2022). Elucidating the effect of endophytic entomopathogenic fungi on bread wheat growth through signaling of immune response-related hormones. *Applied and Environmental Microbiology*, 88(18): e0088222. <https://doi.org/10.1128/aem.00882-22>

González-Maldonado, M. B., Gurrola-Reyes, J. N., & Chaírez-Hernández, I. (2015). Productos biológicos para el control de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 41(2), 200-204.

Graciano, R. B. R., Pereira, J. G., & Aviña-Martínez, G. (2016). Uso de bioinsecticidas para el control del gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) en el cultivo de maíz. *Biotecnología y Sustentabilidad*, 1(1): 1. <https://revistas.uaz.edu.mx/index.php/biotecnologiaysust/article/view/201>

Gualtieri, L., Monti, M. M., Mele, F., Russo, A., Pedata, P. A., & Ruocco, M. (2022). Volatile organic compound (VOC) profiles of different *Trichoderma* species and their potential application. *Journal of Fungi*, 8(10): 10. <https://doi.org/10.3390/jof8100989>

Guo, Y., Jud, W., Weikl, F., Ghirardo, A., Junker, R. R., Polle, A., Benz, J. P., Pritsch, K., Schnitzler, J. P., & Rosenkranz, M. (2021). Volatile organic compound patterns predict fungal trophic mode and lifestyle. *Communications Biology*, 4: 673. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02198-8>

Gupta, R., Keppanan, R., Leibman-Markus, M., Rav-David, D., Elad, Y., Ment, D., & Bar, M. (2022). The entomopathogenic fungi *Metarhizium brunneum* and *Beauveria bassiana* promote systemic immunity and confer resistance to a broad range of pests and pathogens in tomato. *Phytopathology*, 112(4): 784–793. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-21-0343-R>

Hafeez, M., Li, X., Ullah, F., Zhang, Z., Zhang, J., Huang, J., Chen, L., Siddiqui, J. A., Ren, X., Zhou, S., Imran, M., Assiri, M., Zalucki, M. P., Lou, Y., & Lu, Y. (2022). Characterization of indoxacarb resistance in the fall armyworm: selection, inheritance, cross-resistance, possible biochemical mechanisms, and fitness costs. *Biology*, 11(12): 1718. <https://doi.org/10.3390/biology11121718>

Hansen, A. N., & De Fine Licht, H. H. (2019). Why are there so few examples of entomopathogenic fungi that manipulate host sexual behaviors? *Fungal Ecology*, 38: 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2018.09.004>

Hariprasanna, K., & Rakshit, S. (2016). Economic importance of *Sorghum*. En S. Rakshit & Y. H. Wang (Eds.), *The Sorghum Genome* (pp. 1–25). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-47789-3_1

Harris, M. A., Gardner, W. A., & Oetting, R. D. (1996). A review of the scientific literature on fungus gnats (Diptera: Sciaridae) in the genus *Bradysia*. *Journal of Entomological Science*, 31(3): 252–276. <https://doi.org/10.18474/0749-8004-31.3.252>

Harris-Shultz, K. R., Ni, X., Anderson, W. F., & Knoll, J. E. (2015). Evaluation of whorl damage by fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) on field- and greenhouse-grown sweet *Sorghum* plants. *Journal of Entomological Science*, 50(1): 14–27. <https://doi.org/10.18474/0749-8004-50.1.14>

Haynes, K. F., Zhao, J. Z., & Latif, A. (1991). Identification of floral compounds from *Abelia grandiflora* that stimulate upwind flight in cabbage looper moths. *Journal of Chemical Ecology*, 17(3): 637–646. <https://doi.org/10.1007/BF00982132>

Hazelwood, L. A., Daran, J. M., van Maris, A. J. A., Pronk, J. T., & Dickinson, J. R. (2008). The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(8): 2259–2266. <https://doi.org/10.1128/AEM.02625-07>

He, L. M., Wang, T. L., Chen, Y. C., Ge, S. S., Wyckhuys, K. A. G., & Wu, K. M. (2021). Larval diet affects development and reproduction of East Asian strain of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Journal of Integrative Agriculture*, 20(3): 736–744. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(19\)62879-0](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(19)62879-0)

Heard, T. A. (1999). Concepts in insect host-plant selection behavior and their application to host specificity testing. Host specificity of exotic arthropod biological control agents: the biological basis for improvement in safety, *Proceedings of Session: X International Symposium on Biological Control of Weeds*, 1–10.

Heil, M. (2014). Herbivore-induced plant volatiles: targets, perception and unanswered questions. *New Phytologist*, 204(2): 297–306. <https://doi.org/10.1111/nph.12977>

Heil, M. (2016). Host manipulation by parasites: cases, patterns, and remaining doubts. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 4: 80. <https://doi.org/10.3389/fevo.2016.00080>

Hernández, D. G., Rivera, C., Cande, J., Zhou, B., Stern, D. L., & Berman, G. J. (2021). A framework for studying behavioral evolution by reconstructing ancestral repertoires. *eLife*, 10: e61806. <https://doi.org/10.7554/eLife.61806>

Hernández-Trejo, E. (2018). Insectos benéficos asociados al control del gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*) en cultivos de maíz (*Zea mays* L.). *Agro Productividad*, 11(1). <https://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/142>

Hess, M., Paul, S. S., Puniya, A. K., van der Giezen, M., Shaw, C., Edwards, J. E., & Fliegerová, K. (2020). Anaerobic fungi: past, present, and future. *Frontiers in Microbiology*, 11: 584893. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.584893>

Hogan, L. H., Klein, B. S., & Levitz, S. M. (1996). Virulence factors of medically important fungi. *Clinical Microbiology Reviews*, 9(4): 469–488. <https://doi.org/10.1128/cmr.9.4.469>

Holighaus, G., & Rohlf, M. (2019). Volatile and non-volatile fungal oxylipins in fungus-invertebrate interactions. *Fungal Ecology*, 38: 28–36. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2018.09.005>

Honda, K. (1995). Chemical basis of differential oviposition by lepidopterous insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 30(1): 1–23. <https://doi.org/10.1002/arch.940300102>

Howe, G. A., & Jander, G. (2008). Plant immunity to insect herbivores. *Annual Review of Plant Biology*, 59: 41–66. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092825>

Hussain, A., Tian, M. Y., He, Y. R., Bland, J. M., & Gu, W. X. (2010a). Behavioral and electrophysiological responses of *Coptotermes formosanus* Shiraki towards entomopathogenic fungal volatiles. *Biological Control*, 55(3): 166–173. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.08.009>

Hussain, A., Tian, M. Y., He, Y. R., & Lei, Y. Y. (2010b). Differential fluctuation in virulence and VOC profiles among different cultures of entomopathogenic fungi. *Journal of Invertebrate Pathology*, 104(3): 166–171. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2010.03.004>

Hussain, A. G., Wennmann, J. T., Goergen, G., Bryon, A., & Ros, V. I. D. (2021). Viruses of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*: a review with prospects for biological control. *Viruses*, 13(11): Article 11. <https://doi.org/10.3390/v13112220>

Hyde, E. R., Haarmann, D. P., Lynne, A. M., Bucheli, S. R., & Petrosino, J. F. (2013). The living dead: bacterial community structure of a cadaver at the onset and end of the bloat stage of decomposition. *PLOS ONE*, 8(10): e77733. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077733>

Idrees, A., Afzal, A., Qadir, Z. A., & Li, J. (2022). Bioassays of *Beauveria bassiana* isolates against the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Journal of Fungi*, 8(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/jof8070717>

Imoulan, A., Hussain, M., Kirk, P. M., El Meziane, A., & Yao, Y. J. (2017). Entomopathogenic fungus *Beauveria*: host specificity, ecology and significance of morpho-molecular characterization in accurate taxonomic classification. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 20(4): 1204–1212. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2017.08.015>

Inamdar, A. A., Masarekar, P., & Bennett, J. W. (2010). Neurotoxicity of fungal volatile organic compounds in *Drosophila melanogaster*. *Toxicological Sciences*, 117(2): 418–426. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq222>

Inamdar, A. A., Morath, S., & Bennett, J. W. (2020). Fungal volatile organic compounds: more than just a funky smell? *Annual Review of Microbiology*, 74, 101–116. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-012420-080428>

Inglis, G. D., Johnson, D. L., & Goettel, M. S. (1996). Effects of temperature and thermoregulation on mycosis by *Beauveria bassiana* grasshoppers. *Biological Control*, 7(2): 131–139. <https://doi.org/10.1006/bcon.1996.0076>

Iwanicki, N. S. A., Delalibera, I., Eilenberg, J., & de Fine Licht, H. H. (2020). Comparative RNAseq analysis of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* reveals specific transcriptome signatures of filamentous and yeast-like development. *G3 Genes, Genomes, Genetics*, 10(7): 2141–2157. <https://doi.org/10.1534/g3.120.401040>

Jaber, L. R., & Ownley, B. H. (2018). Can we use entomopathogenic fungi as endophytes for dual biological control of insect pests and plant pathogens? *Biological Control*, 116: 36–45. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.01.018>

Jacquin, E., Nagnan, P., & Frerot, B. (1991). Identification of hairpencil secretion from male *Mamestra brassicae* (L.) (Lepidoptera: Noctuidae) and electroantennogram studies. *Journal of Chemical Ecology*, 17: 239–246. <https://doi.org/10.1007/BF00994436>

Jaramillo-Barrios, C. I., Quijano, E. B., & Andrade, B. M. (2019). Populations of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) cause significant damage to genetically modified corn crops. *Revista Facultad Nacional de Agronomía - Medellín*, 72(3): 8953–8962.

Johnson, S. J. (1987). Migration and the life history strategy of the fall armyworm. *International Journal of Tropical Insect Science*, 8(4-5-6): 543–549. <https://doi.org/10.1017/S1742758400022591>

Judd, G. J. R., Knight, A. L., & El-Sayed, A. M. (2017). Trapping *Pandemis limitata* (Lepidoptera: Tortricidae) moths with mixtures of acetic acid, caterpillar-induced apple-leaf volatiles, and sex pheromone. *The Canadian Entomologist*, 149(6): 813–822. <https://doi.org/10.4039/tce.2017.38>

Kaddes, A., Fauconnier, M. L., Sassi, K., Nasraoui, B., & Jijakli, M. H. (2019). Endophytic fungal volatile compounds as solution for sustainable agriculture. *Molecules*, 24(6): 6. <https://doi.org/10.3390/molecules24061065>

Kamata, N. (2000). Population dynamics of the beech caterpillar, *Syntypistis punctatella*, and biotic and abiotic factors. *Population Ecology*, 42(3), 267–278. <https://doi.org/10.1007/PL00012005>

Kanchiswamy, C. N., Malnoy, M., & Maffei, M. E. (2015). Chemical diversity of microbial volatiles and their potential for plant growth and productivity. *Frontiers in Plant Science*, 6(MAR): 151. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00151>

Kang, K., Zhang, M., Yue, L., Chen, W., Dai, Y., Lin, K., Liu, K., Lv, J., Guan, Z., Xiao, S., & Zhang, W. (2023). Oxalic acid inhibits feeding behavior of the brown planthopper via binding to gustatory receptor Gr23a. *Cells*, 12(5): 771. <https://doi.org/10.3390/cells12050771>

Kangassalo, K., Valtonen, T. M., Roff, D., Pölkki, M., Dubovskiy, I. M., Sorvari, J., & Rantala, M. J. (2015). Intra- and trans-generational effects of larval diet on susceptibility to an entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, in the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *Journal of Evolutionary Biology*, 28(8): 1453–1464. <https://doi.org/10.1111/jeb.12666>

Karthiba, L., Saveetha, K., Suresh, S., Raguchander, T., Saravanakumar, D., & Samiyappan, R. (2010). PGPR and entomopathogenic fungus bioformulation for the synchronous management of leafhopper pest and sheath blight disease of rice. *Pest Management Science*, 66(5): 555–564. <https://doi.org/10.1002/ps.1907>

Kecskeméti, S., Szelényi, M. O., Erdei, A. L., Geösel, A., Fail, J., & Molnár, B. P. (2020). Fungal volatiles as olfactory cues for female fungus gnat, *Lycoriella ingenua* in the avoidance of mycelia colonized compost. *Journal of Chemical Ecology*, 46(10): 917–926. <https://doi.org/10.1007/s10886-020-01210-5>

Kergoat, G. J., Goldstein, P. Z., Le Ru, B., Meagher, R. L., Zilli, A., Mitchell, A., Clamens, A. L., Gimenez, S., Barbut, J., Nègre, N., d'Alençon, E., & Nam, K. (2021). A novel reference dated phylogeny for the genus *Spodoptera* Guenée (Lepidoptera: Noctuidae: Noctuinae): new insights into the evolution of a pest-rich genus. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 161: 107161. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2021.107161>

Khan, R. S., Iqbal, A., Malak, R., Shehryar, K., Attia, S., Ahmed, T., Ali Khan, M., Arif, M., & Mii, M. (2019). Plant defensins: types, mechanism of action and prospects of genetic engineering for enhanced disease resistance in plants. *3 Biotech*, 9: 192. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1725-5>

Kishimoto, K., Matsui, K., Ozawa, R., & Takabayashi, J. (2007). Volatile 1-octen-3-ol induces a defensive response in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of General Plant Pathology*, 73(1), 35-37. <https://doi.org/10.1007/s10327-006-0314-8>

Knight, A. L., El-Sayed, A. M., Judd, G. J. R., & Basoalto, E. (2017). Development of 2-phenylethanol plus acetic acid lures to monitor obliquebanded leafroller (Lepidoptera: Tortricidae) under mating disruption. *Journal of Applied Entomology*, 141(9): 729–739. <https://doi.org/10.1111/jen.12393>

Kost, C. (2008). Chemical communication. En *Encyclopedia of Ecology*, 557–575. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-008045405-4.00036-7>

Kuyulu, A., & Genç, H. (2019). Biology and laboratory rearing of codling moth, *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae) on its natural host “Green Immature Apple” *Malus domestica* (Borkh) (Rosales: Rosaceae). *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 6(3): 546–556. <https://doi.org/10.30910/turkjans.595382>

Labbé, C., Faini, F., Villagrán, C., Coll, J., & Rycroft, D. (2005). Antifungal and insect antifeedant 2-Phenylethanol esters from the liverwort *Balantiopsis cancellata* from Chile. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(2): 247–249. <https://doi.org/10.1021/jf048935c>

Lafferty, K. D., & Kuris, A. M. (2002). Trophic strategies, animal diversity and body size. *Trends in Ecology & Evolution*, 17(11): 507–513. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(02\)02615-0](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(02)02615-0)

Landolt, P. J. (2000). New chemical attractants for trapping *Lacanobia subjuncta*, *Mamestra configurata*, and *Xestia c-nigrum* (Lepidoptera: Noctuidae).

Journal of Economic Entomology, 93(1): 101–106. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-93.1.101>

Landolt, P. J., Pantoja, A., Hagerty, A., Crabo, L., & Green, D. (2007). Moths trapped in Alaska with feeding attractant lures and the seasonal flight patterns of potential agricultural pests. *The Canadian Entomologist*, 139(2): 278–291. <https://doi.org/10.4039/n06-034>

Lang, J. M., & Benbow, M. E. (2013). Species interactions and competition. *Nature Education Knowledge*, 4(4): 8.

Leal, W. S., Barbosa, R. M. R., Xu, W., Ishida, Y., Syed, Z., Latte, N., Chen, A. M., Morgan, T. I., Cornel, A. J., & Furtado, A. (2008). Reverse and conventional chemical ecology approaches for the development of oviposition attractants for *Culex mosquitoes*. *PLoS ONE*, 3(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003045>

Leal, W. S. (2013). Odorant reception in insects: roles of receptors, binding proteins, and degrading enzymes. *Annual Review of Entomology*, 58: 373–391. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153635>

Lezama, R., Molina, J., López, M., Pescador, A., Galindo, E., Angel, C. A., & Michel, A. C. (2005). Efecto del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* sobre el control del gusano cogollero del maíz en campo. *Avances en investigación agropecuaria*, 9(1): Article 1.

Lezama-Gutiérrez, R., Alatorre-Rosas, R., & Sanchez y García-Figueroa, F. (1994). Evaluación de cepas de *Nomuraea rileyi* y *Paecilomyces fumosoroseus* contra *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Vedalia*, 1: 1.

Lezama-Gutierrez, R., Alatorre-Rosas, R., Bojalil-Jaber, L. F., Molina-Ochoa, J., Arena-Vargas, M., Gonzales-Ramírez, M., & Rebolledo-Dominguez, O. (1996). Virulence of five entomopathogenic fungi (Hyphomycetes) against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) eggs and neonate larvae. *Vedalia*, 3: 35–40.

Li, M., Meng, Q., Zhang, H., Shu, R., Zhao, Y., Wu, P., Li, X., Zhou, G., Qin, Q., & Zhang, J. (2020). Changes in transcriptomic and metabolomic profiles of morphotypes of *Ophiocordyceps sinensis* within the hemocoel of its host larvae, *Thitarodes xiaojinensis*. *BMC Genomics*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-020-07209-2>

Li, J., Wang, C., Liang, W., & Liu, S. (2021). Rhizosphere microbiome: the emerging barrier in plant-pathogen interactions. *Frontiers in Microbiology*, 12: 772420. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.772420>

Li, J., & Xia, Y. (2022). Host–pathogen interactions between *Metarhizium* spp. and Locusts. *Journal of Fungi*, 8(6): 602. <https://doi.org/10.3390/jof8060602>

Lira, E. C., Bolzan, A., Nascimento, A. R., Amaral, F. S., Kanno, R. H., Kaiser, I. S., & Omoto, C. (2020). Resistance of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to spinetoram: inheritance and cross-resistance to spinosad. *Pest Management Science*, 76(8): 2674–2680. <https://doi.org/10.1002/ps.5812>

Liu, X. M., & Zhang, H. (2015). The effects of bacterial volatile emissions on plant abiotic stress tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 6: 774. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00774>

Liu, Y., Yang, Y., & Wang, B. (2022). Entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* play roles of maize (*Zea mays*) growth promoter. *Scientific Reports*, 12: Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-19899-7>

Lobo, L. S., Girotti, J. R., Mijailovsky, S. J., Fernandes, K. K., Luz, C., & Pedrini, N. (2018). Synthesis and secretion of volatile short-chain fatty acids in *Triatoma infestans* infected with *Beauveria bassiana*. *Medical and Veterinary Entomology*, 32(3): 358–364. <https://doi.org/10.1111/mve.12306>

Lorenz, M. C., Cutler, N. S., & Heitman, J. (2000). Characterization of alcohol-induced filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 11(1), 183-199. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.1.183>

Lozano-Soria, A., Picciotti, U., Lopez-Moya, F., Lopez-Cepero, J., Porcelli, F., & Lopez-Llorca, L. V. (2020). Volatile organic compounds from entomopathogenic and nematophagous fungi, repel banana black weevil (*Cosmopolites sordidus*). *Insects*, 11(8): Article 8. <https://doi.org/10.3390/insects11080509>

Ma, W. C. (1976). Experimental observations of food-aversive responses in larvae of *Spodoptera exempta* (Wlk.) (Lepidoptera, Noctuidae). *Bulletin of Entomological Research*, 66(1): 87–96. <https://doi.org/doi:10.1017/S0007485300006519>

Ma'ayan, A. (2017). Complex systems biology. *Journal of the Royal Society Interface*, 14(134): 20170391. <https://doi.org/10.1098/rsif.2017.0391>

Machado, E. P., dos S. Rodrigues Junior, G. L., Führ, F. M., Zago, S. L., Marques, L. H., Santos, A. C., Nowatzki, T., Dahmer, M. L., Omoto, C., & Bernardi, O. (2020). Cross-crop resistance of *Spodoptera frugiperda* selected on Bt maize to genetically-modified soybean expressing Cry1Ac and Cry1F proteins in Brazil. *Scientific Reports*, 10: 10080. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67339-1>

Mansson, P. E., Schlyter, F., Eriksson, C., & Sjödin, K. (2006). Nonanoic acid, other alkanolic acids, and related compounds as antifeedants in *Hylobius abietis* pine weevils. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 121(3): 191–201. <https://doi.org/10.1111/j.1570-8703.2006.00481.x>

Marian, M., Licciardello, G., Vicelli, B., Pertot, I., & Perazzolli, M. (2022). Ecology and potential functions of plant-associated microbial communities in cold environments. *FEMS Microbiology Ecology*, 98(1): fiab161. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiab161>

Martínez, A. A., Conboy, A., Buskirk, S. W., Marad, D. A., & Lang, G. I. (2023). Long-term adaptation to galactose as a sole carbon source selects for mutations outside the canonical GAL pathway. *Journal of Molecular Evolution*, 91: 46–59. <https://doi.org/10.1007/s00239-022-10079-9>

Mascarin, G. M., & Jaronski, S. T. (2016). The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32: 177. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2131-3>

Mascarin, G. M., Iwanicki, N. S., Ramirez, J. L., Delalibera, I., & Dunlap, C. A. (2021). Transcriptional responses of *Beauveria bassiana* blastospores cultured under varying glucose concentrations. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11: 644372. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.644372>

Mauch-Mani, B., Baccelli, I., Luna, E., & Flors, V. (2017). Defense priming: an adaptive part of induced resistance. *Annual Review of Plant Biology*, 68: 485–512. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042916-041132>

Mburu, D. M., Ochola, L., Maniania, N. K., Njagi, P. G. N., Gitonga, L. M., Ndung'u, M. W., Wanjoya, A. K., & Hassanali, A. (2009). Relationship between virulence and repellency of entomopathogenic isolates of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* to the termite *Macrotermes michaelseni*. *Journal of Insect Physiology*, 55(9): 774–780. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2009.04.015>

Mburu, D. M., Maniania, N. K., & Hassanali, A. (2013). Comparison of volatile blends and nucleotide sequences of two *Beauveria bassiana* isolates of different virulence and repellency towards the termite *Macrotermes michealseni*. *Journal of Chemical Ecology*, 39: 101–108. <https://doi.org/10.1007/s10886-012-0207-6>

Mendes-Giannini, M. J. S., Soares, C. P., da Silva, J. L. M., & Andreotti, P. F. (2005). Interaction of pathogenic fungi with host cells: molecular and cellular approaches. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 45(3): 383–394. <https://doi.org/10.1016/j.femsim.2005.05.014>

Meyling, N., & Pell, J. (2006). Detection and avoidance of an entomopathogenic fungus by a generalist insect predator. *Ecological Entomology*, 31: 162–171. <https://doi.org/10.1111/j.0307-6946.2006.00781.x>

Mitchell, E. R., & McLaughlin, J. R. (1982). Suppression of mating and oviposition by fall armyworm and mating by corn earworm in corn, using the air permeation technique. *Journal of Economic Entomology*, 75(2): 270–274. <https://doi.org/10.1093/jee/75.2.270>

Moisan, K., Aragón, M., Gort, G., Dicke, M., Cordovez, V., Raaijmakers, J. M., & Lucas-Barbosa, D. (2020). Fungal volatiles influence plant defence against above-ground and below-ground herbivory. *Functional Ecology*, 34(11): 2259–2269. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13633>

Moisan, K., Lucas-Barbosa, D., Villela, A., Greenberg, L. O., Cordovez, V., Raaijmakers, J. M., & Dicke, M. (2020). No evidence of modulation of indirect plant resistance of *Brassica rapa* plants by volatiles from soil-borne fungi. *Ecological Entomology*, 45(5), 1200–1211. <https://doi.org/10.1111/een.12906>

Molina-Ochoa, J., Carpenter, J. E., Lezama-Gutiérrez, R., Foster, J. E., González-Ramírez, M., Angel-Sahagún, C. A., & Farías-Larios, J. (2004). Natural distribution of hymenopteran parasitoids of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae in Mexico. *The Florida Entomologist*, 87(4): 461–472. [https://doi.org/10.1653/0015-4040\(2004\)087\[0461:NDOHPO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1653/0015-4040(2004)087[0461:NDOHPO]2.0.CO;2)

Montezano, D., Specht, A., Sosa-Gómez, D., Roque-Specht, V., Sousa-Silva, J., Paula-Moraes, S., Peterson, J., & Hunt, T. (2018). Host plants of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas. *African Entomology*, 26(2): 286–300. <https://doi.org/10.4001/003.026.0286>

Moon, K., Aw, S., & Hue, S. M. (2017). Mode of infection of *Metarhizium* spp. fungus and their potential as biological control agents. *Journal of Fungi*, 3(2): 30. <https://doi.org/10.3390/jof3020030>

Mullens, B. A., Reifenrath, W. G., & Butler, S. M. (2009). Laboratory trials of fatty acids as repellents or antifeedants against houseflies, horn flies and stable flies (Diptera: Muscidae). *Pest Management Science*, 65(12): 1360–1366. <https://doi.org/10.1002/ps.1823>

Naundrup, A., Bohman, B., Kwadha, C. A., Jensen, A. B., Becher, P. G., & De Fine Licht, H. H. (2022). Pathogenic fungus uses volatiles to entice male flies into fatal matings with infected female cadavers. *ISME Journal*, 16(10): 2388–2397. <https://doi.org/10.1038/s41396-022-01284-x>

Okosun, O. O., Allen, K. C., Glover, J. P., & Reddy, G. V. P. (2021). Biology, ecology, and management of key *Sorghum* insect pests. *Journal of Integrated Pest Management*, 12(1): 4. <https://doi.org/10.1093/jipm/pmaa027>

Oldfield, E., & Lin, F. Y. (2012). Terpene biosynthesis: modularity rules. *Angewandte Chemie - International Edition*, 51(5): 1124–1137. <https://doi.org/10.1002%2Fanie.201103110>

Olsson, P. O. C., Anderbrant, O., & Löfstedt, C. (2006). Experience influences oviposition behaviour in two pyralid moths, *Ephestia cautella* and *Plodia interpunctella*. *Animal Behaviour*, 72(3): 545–551. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2005.10.023>

Omoto, C., Bernardi, O., Salmeron, E., Sorgatto, R. J., Dourado, P. M., Crivellari, A., Carvalho, R. A., Willse, A., Martinelli, S., & Head, G. P. (2016). Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. *Pest Management Science*, 72(9): 1727–1736. <https://doi.org/10.1002/ps.4201>

Oppliger, F. Y., M Guerin, P., & Vlimant, M. (2000). Neurophysiological and behavioural evidence for an olfactory function for the dorsal organ and a gustatory one for the terminal organ in *Drosophila melanogaster* larvae. *Journal of Insect Physiology*, 46(2): 135–144. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(99\)00109-2](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(99)00109-2)

Orellana, D., Machuca, D., Ibeas, M. A., Estevez, J. M., & Poupin, M. J. (2022). Plant-growth promotion by proteobacterial strains depends on the availability of phosphorus and iron in *Arabidopsis thaliana* plants. *Frontiers in Microbiology*, 13: 1083270. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1083270>

Ortiz-Castro, R., Contreras-Cornejo, H., Macías-Rodríguez, L., & López-Bucio, J. (2009). The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant signaling & behavior*, 4(8): 701–712. <https://doi.org/10.4161/psb.4.8.9047>

Ortiz-Urquiza, A., & Keyhani, N. O. (2013). Action on the surface: entomopathogenic fungi versus the insect cuticle. *Insects*, 4(3): 357–374. <https://doi.org/10.3390/insects4030357>

Ortiz-Urquiza, A., & Keyhani, N. O. (2016). Molecular genetics of *Beauveria bassiana* infection of insects. *Advances in Genetics*, 94: 165–249. <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2015.11.003>

Ortiz-Urquiza, A. (2021). The split personality of *Beauveria bassiana*: understanding the molecular basis of fungal parasitism and mutualism. *mSystems*, 6(4): 1–5. <https://doi.org/10.1128/msystems.00766-21>

Pacheco-Covarrubias, J. J. (1993). Monitoring insecticide resistance in *Spodoptera frugiperda* populations from the Yaqui Valley, Son., Mexico. Resistant pest management (USA).

Pagans, E., Font, X., & Sánchez, A. (2006). Emission of volatile organic compounds from composting of different solid wastes: abatement by biofiltration. *Journal of Hazardous Materials*, 131(1): 179–186. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2005.09.017>

Pandey, D., Rajendran, S. R., Gaur, M., Sajeesh, P. K., & Kumar, A. (2016). Plant defense signaling and responses against necrotrophic fungal pathogens.

Journal of Plant Growth Regulation, 35: 1159–1174. <https://doi.org/10.1007/s00344-016-9600-7>

Paredes-Sánchez, F. A., Rivera, G., Bocanegra-García, V., Martínez-Padrón, H. Y., Berrones-Morales, M., Niño-García, N., & Herrera-Mayorga, V. (2021). Advances in control strategies against *Spodoptera frugiperda*. A review. *Molecules*, 26(18): 5587. <https://doi.org/10.3390/molecules26185587>

Parker, B. J., Elder, B. D., & Dwyer, G. (2010). Host behaviour and exposure risk in an insect-pathogen interaction. *The Journal of Animal Ecology*, 79(4): 863–870. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2010.01690.x>

Parker, I. M., & Gilbert, G. S. (2019). Density-dependent disease, life-history trade-offs, and the effect of leaf pathogens on a suite of co-occurring close relatives. *Journal of Ecology*, 106(5): 1829–1838. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.13024>

Pashley, D. P. (1986). Host-associated genetic differentiation in Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae): A sibling species complex? *Annals of the Entomological Society of America*, 79(6): 898–904. <https://doi.org/10.1093/aesa/79.6.898>

Pask, G. M., & Ray, A. (2016). Chapter 6 - Insect olfactory receptors: an interface between chemistry and biology. En F. Zufall & S. D. Munger (Eds.), *Chemosensory Transduction* (pp. 101–122). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801694-7.00006-8>

Pedrini, N. (2022). The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* shows its toxic side within Insects: expression of genes encoding secondary metabolites during pathogenesis. *Journal of Fungi*, 8(5): 488. <https://doi.org/10.3390/jof8050488>

Pereira, H., & Detrain, C. (2020). Prophylactic avoidance of hazardous prey by the ant host *Myrmica rubra*. *Insects*, 11(7): 444. <https://doi.org/10.3390/insects11070444>

Pérez, A., Saucedo, O., Iglesias, J., Wencomo, H. B., Reyes, F., & Oquendo, G. (2010). Caracterización y potencialidades del grano de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) Characterization and potential of sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) grain. *Pastos y Forrajes*, 33(1), 1–26.

Philippot, L., Raaijmakers, J. M., Lemanceau, P., & van der Putten, W. H. (2013). Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology*, 11(11): Article 11. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3109>

Pieterse, C. M. J., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., & Van Wees, S. C. M. (2012). Hormonal modulation of plant immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 28: 489–521. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154055>

Pieterse, C. M. J., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Van Wees, S. C. M., & Bakker, P. A. H. M. (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology*, 52 347–375. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340>

Poitout, S., Bues, R., & Rumeur, C. (1972). Élevage sur milieu artificiel simple de deux noctuelles parasites du coton earias insulana et *Spodoptera littoralis*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 15(3) 341–350. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1972.tb00219.x>

Pontieri, L., Vojvodic, S., Graham, R., Pedersen, J. S., & Linksvayer, T. A. (2014). Ant colonies prefer infected over uninfected nest sites. *PLoS ONE*, 9(11): e111961. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111961>

Prasad, T. V., Rao, M. S., Rao, K. V., Bal, S. K., Muttapa, Y., Choudhary, J. S., & Singh, V. K. (2022). Temperature-based phenology model for predicting the present and future establishment and distribution of recently invasive *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) in India. *Bulletin of Entomological Research*, 112(2): 271–285. <https://doi.org/doi:10.1017/S0007485321000882>

Pulido, P., Rosales, J., & de Boer, H. J. (2018). A multi-level framework for metabolism in urban energy systems from an ecological perspective. *Resources, Conservation and Recycling*, 132: 230–238. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2017.05.005>

Punzo, F. (1985). Recent advances in behavioral plasticity in insects and decapod crustaceans. *The Florida Entomologist*, 68(1): 89–104. <https://doi.org/10.2307/3494332>

Que, Y. A., Hazan, R., Strobel, B., Maura, D., He, J., Kesarwani, M., Panopoulos, P., Tsurumi, A., Giddey, M., Wilhelmy, J., Mindrinos, M. N., & Rahme, L. G. (2013). A quorum sensing small volatile molecule promotes antibiotic tolerance in bacteria. *PLOS ONE*, 8(12): e80140. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080140>

Quintero, V. P., Herrera, C. C., Hernández, M. M., García, N. M., & Moreno, T. (2017). Tecnología de producción de sorgo dulce (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) en Guanajuato. INIFAP.

Ramírez-Cabral, N., Kumar, L., & Shabani, F. (2017). Future climate scenarios project a decrease in the risk of fall armyworm outbreaks. *The Journal of Agricultural Science*, 155: 1219–1238.

Ramírez-Cabral, N., & Covarrubias, J. M. (2019). "Gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*) JE Smith en Zacatecas. Folleto Técnico Núm 106. Campo Experimental Zacatecas. CIRNOC – INIFAP

Ramírez-Ordorica, A., Contreras-Cornejo, H. A., Orduño-Cruz, N., Luna-Cruz, A., Winkler, R., & Macías-Rodríguez, L. (2022). Volatiles released by *Beauveria bassiana* induce oviposition behavior in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *FEMS microbiology ecology*, 98(10): fiac114. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiac114>

Ramos, Y., Taibo, A. D., Jiménez, J. A., & Portal, O. (2020). Endophytic establishment of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in maize plants and its effect against *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 30(1), 20. <https://doi.org/10.1186/s41938-020-00223-2>

Ramos-López, M. A., González-Chávez, M. M., Cárdenas-Orteg, N. C., & Pérez, S. (2012). Activity of the main fatty acid components of the hexane leaf extract of *Ricinus communis* against *Spodoptera frugiperda*. *African Journal of Biotechnology*, 11(18): 4274–4278. <https://doi.org/10.5897/AJB11.3727>

Ramsewak, R. S., Nair, M. G., Murugesan, S., Mattson, W. J., & Zasada, J. (2001). Insecticidal fatty acids and triglycerides from *Dirca palustris*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(12): 5852–5856. <https://doi.org/10.1021/jf010806y>

Rännbäck, L. M., Cotes, B., Anderson, P., Rämert, B., & Meyling, N. V. (2015). Mortality risk from entomopathogenic fungi affects oviposition behavior in the parasitoid wasp *Trybliographa rapae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 124: 78–86. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.11.003>

Ravasio, D., Wendland, J., & Walther, A. (2014). Major contribution of the Ehrlich pathway for 2-phenylethanol/rose flavor production in *Ashbya gossypii*. *FEMS Yeast Research*, 14(6): 833–844. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12172>

Ravasz, E., Somera, A. L., Mongru, D. A., Oltvai, Z. N., & Barabási, A. L. (2002). Hierarchical organization of modularity in metabolic networks. *Science*, 297(5586): 1551–1555. <https://doi.org/10.1126/science.1073374>

Raya-Díaz, S., Sánchez-Rodríguez, A. R., Segura-Fernández, J., M, Del Campillo, M. C., & Quesada-Moraga, E. (2017). Entomopathogenic fungi-based mechanisms for improved Fe nutrition in Sorghum plants grown on calcareous

substrates. *PLoS ONE*, 12(10): e0185903.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185903>

Rehner, S. A., Minnis, A. M., Sung, G. H., Luangsa-ard, J. J., Devotto, L., & Humber, R. A. (2011). Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycologia*, 103(5): 1055–1073.
<https://doi.org/10.3852/10-302>

Reisenman, C. E., Lei, H., & Guerenstein, P. G. (2016). Neuroethology of olfactory-guided behavior and its potential application in the control of harmful insects. *Frontiers in Physiology*, 7: 271. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00271>

Reisig, D. D., Cook, D., Greene, J., Caprio, M., Gore, J., Musser, F., & Reay-Jones, F. (2020). Location of *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae on different plant parts of determinate and indeterminate soybean. *Bulletin of Entomological Research*, 110(6): 725–731.
<https://doi.org/10.1017/S0007485320000280>

Renou, M. (2014). Pheromones and General Odor Perception in Insects. En C. Mucignat-Caretta (Ed.), *Neurobiology of Chemical Communication*. CRC Press/Taylor & Francis. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK200986/>

Revadi, S. V., Giannuzzi, V. A., Rossi, V., Hunger, G. M., Conchou, L., Rondoni, G., Conti, E., Anderson, P., Walker, W. B., Jacquín-Joly, E., Koutroumpa, F., & Becher, P. G. (2021). Stage-specific expression of an odorant receptor underlies olfactory behavioral plasticity in *Spodoptera littoralis* larvae. *BMC Biology*, 19(1): 231. <https://doi.org/10.1186/s12915-021-01159-1>

Revadi, S. V., Giannuzzi, V. A., Vetukuri, R. R., Walker, W. B., & Becher, P. G. (2021). Larval response to frass and guaiacol: Detection of an attractant produced by bacteria from *Spodoptera littoralis* frass. *Journal of Pest Science*, 94, 1105–1118.
<https://doi.org/10.1007/s10340-021-01352-9>

Riffell, J. A., Lei, H., Christensen, T. A., & Hildebrand, J. G. (2009). Characterization and coding of behaviorally significant odor mixtures. *Current biology*, 19(4): 335–340. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.01.041>

Rivero-Borja, M., Guzmán-Franco, A. W., Rodríguez-Leyva, E., Santillán-Ortega, C., & Pérez-Panduro, A. (2018). Interaction of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* with chlorpyrifos ethyl and spinosad in *Spodoptera frugiperda* larvae. *Pest Management Science*, 74(9), 2047-2052. <https://doi.org/10.1002/ps.4884>

Rohrlich, C., Merle, I., Hassani, I. M., Verger, M., Zuin, M., Besse, S., Robène, I., Nibouche, S., & Costet, L. (2018). Variation in physiological host range in three strains of two species of the entomopathogenic fungus *Beauveria*. *PLoS ONE*, 13(7): e0199199. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199199>

Rohrmann, G. F. (2019). Structural proteins of baculovirus occlusion bodies and virions. En *Baculovirus Molecular Biology*. (4 ed.). National Center for Biotechnology Information (US). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK543455/>

Rojas, J. C., Virgen, A., & Cruz-López, L. (2003). Chemical and tactile cues influencing oviposition of a generalist moth, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Environmental Entomology*, 32(6): 1386–1392. <https://doi.org/10.1603/0046-225X-32.6.1386>

Roy, H. E., Steinkraus, D. C., Eilenberg, J., Hajek, A. E., & Pell, J. K. (2006). Bizarre interactions and endgames: entomopathogenic fungi and their arthropod hosts. *Annual Review of Entomology*, 51: 331–357. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.150941>

SAGARPA. (2017). Sorgo. Planeación Agrícola Nacional 2017-2030. México

Sambamoorthy, G., Sinha, H., & Raman, K. (2019). Evolutionary design principles in metabolism. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 286(1898). <https://doi.org/10.1098/rspb.2019.0098>

Samuel, M., Oliver, S. V., Wood, O. R., Coetzee, M., & Brooke, B. D. (2015). Evaluation of the toxicity and repellence of an organic fatty acids mixture (C8910) against insecticide susceptible and resistant strains of the major malaria vector *Anopheles funestus* Giles (Diptera: Culicidae). *Parasites & Vectors*, 8: 321. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0930-2>

Sánchez, A., & Raja, A. (2023). Physiology, Metabolism. En StatPearls. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK546690/>

Sánchez Jara, J., Valle Delgado, J., Pérez Tesén, E., Neira de Perales, M., & Calderón Arias, C. (2019). Control biológico de *Spodoptera frugiperda* en cultivo de *Zea mays*: uso de nematodos entomopatógenos. *Scientia Agropecuaria*, 10(4): 551–557. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2019.04.12>

Santoro, M. V., Zygodlo, J., Giordano, W., & Banchio, E. (2011). Volatile organic compounds from rhizobacteria increase biosynthesis of essential oils and growth parameters in peppermint (*Mentha piperita*). *Plant physiology and biochemistry: PPB*, 49(10): 1177–1182. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.07.016>

Santos-Amaya, O. F., Rodrigues, J. V. C., Souza, T. C., Tavares, C. S., Campos, S. O., Guedes, R. N. C., & Pereira, E. J. G. (2015). Resistance to dual-gene Bt maize in *Spodoptera frugiperda*: selection, inheritance, and cross-resistance to other transgenic events. *Scientific Reports*, 5: 18243. <https://doi.org/10.1038/srep18243>

Saunders, T. E., & Ward, D. F. (2018). Variation in the diversity and richness of parasitoid wasps based on sampling effort. *PeerJ*, 6: e4642. <https://doi.org/10.7717/peerj.4642>

Schmidt-Dannert, C. (2014). Biosynthesis of terpenoid natural products in fungi. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 148: 19–61. https://doi.org/10.1007/10_2014_283

Schott, M., Wehrenfennig, C., Gasch, T., & Vilcinskas, A. (2013). Insect antenna-based biosensors for in situ detection of volatiles. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 136. https://doi.org/10.1007/10_2013_210

Schröder, R., & Hilker, M. (2008). The relevance of background odor in resource location by insects: a behavioral approach. *BioScience*, 58(4): 308–316. <https://doi.org/10.1641/B580406>

Schulz, S., & Dickschat, J. S. (2007). Bacterial volatiles: the smell of small organisms: *Natural Product Reports*, 24(4): 814–842. <https://doi.org/10.1039/B507392H>

Scott-Phillips, T. C. (2008). Defining biological communication. *Journal of Evolutionary Biology*, 21(2): 387–395. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2007.01497.x>

Serrano-Domínguez, A. K., Coronado-Blanco, J. M., Ruíz-Cancino, E., López-Santillán, J. A., Estrada-Drouaillet, B., & Salas-Araiza, M. D. (2020). Parasitoids of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), at three localities of the state of Tamaulipas, Mexico. *Southwestern Entomologist*, 45(4): 907–916. <https://doi.org/10.3958/059.045.0407>

Shang, Y., Xiao, G., Zheng, P., Cen, K., Zhan, S., & Wang, C. (2016). Divergent and convergent evolution of fungal pathogenicity. *Genome Biology and Evolution*, 8(5): 1374–1387. <https://doi.org/10.1093/gbe/evw082>

Sharifi, R., & Ryu, C. M. (2018). Revisiting bacterial volatile-mediated plant growth promotion: lessons from the past and objectives for the future. *Annals of Botany*, 122(3): 349–358. <https://doi.org/10.1093/aob/mcy108>

Shen, Q., & Rappleye, C. A. (2020). Living within the macrophage: dimorphic fungal pathogen intracellular metabolism. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10: 592259. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.592259>

Shikano, I. (2017). Evolutionary ecology of multitrophic interactions between plants, insect herbivores and entomopathogens. *Journal of Chemical Ecology*, 43(6): 586–598. <https://doi.org/10.1007/s10886-017-0850-z>

Shikano, I., Rosa, C., Tan, C. W., & Felton, G. W. (2017). Tritrophic interactions: microbe-mediated plant effects on insect herbivores. *Annual Review of Phytopathology*, 55: 13.1-13.19. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516-035319>

Sierra-Ruíz, M. D. L. L., García-Rodríguez, Y. M., Torres-Martínez, R., Delgado-Lamas, G., & Espinosa-García, F. J. (2022). Procedimientos para establecer y mantener una cría del gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) en condiciones de laboratorio. *Avances en Investigación Agropecuaria*, 26(1): 134–154. <https://doi.org/10.53897/RevAIA.22.26.22>

Silva, D. M. D., Bueno, A. D. F., Andrade, K., Stecca, C. D. S., Neves, P. D., & Oliveira, M. C. (2017). Biology and nutrition of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) fed on different food sources. *Scientia Agricola*, 74(1): 18–31. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-992X-2015-0160>

Silva, T. N., Thomas, J. B., Dahlberg, J., Rhee, S. Y., & Mortimer, J. C. (2022). Progress and challenges in sorghum biotechnology, a multipurpose feedstock for the bioeconomy. *Journal of Experimental Botany*, 73(3): 646–664. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab450>

Smith, B. H. (1993). Merging mechanism and adaptation: an ethological approach to learning and generalization. En D. R. Papaj & A. C. Lewis (Eds.), *Insect Learning: Ecology and Evolutionary Perspectives* (pp. 126–157). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2814-2_5

Soberón, J. (2007). Grinnellian and Eltonian niches and geographic distributions of species. *Ecology Letters*, 10(12), 1115-1123. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2007.01107.x>

Sourakov, A., Duehl, A., & Sourakov, A. (2012). Foraging behavior of the blue morpho and other tropical butterflies: the chemical and electrophysiological basis of olfactory preferences and the role of color. *Psyche: A Journal of Entomology*, 2012: 1–10. <https://doi.org/10.1155/2012/378050>

Sowjanya Sree and Hemesh Joshi. (s/f). Comparative account of generalist and specialist species of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium*.

Sree, K. S., & Joshi, H. (2015). Comparative account of generalist and specialist species of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium*. En K. S. Sree & A. Varma (Eds.), *Biocontrol of Lepidopteran Pests: Use of Soil Microbes and their Metabolites* (pp. 161–167). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-14499-3_7

Staats, C. C., Junges, A., Guedes, R. L. M., Thompson, C. E., de Moraes, G. L., Boldo, J. T., de Almeida, L. G. P., Andreis, F. C., Gerber, A. L., Sbaraini, N., da Paixão, R. L. A., Broetto, L., Landell, M., Santi, L., Beys-da-Silva, W. O., Silveira, C. P., Serrano, T. R., de Oliveira, E. S., Kmetzsch, L., ... Schrank, A. (2014). Comparative genome analysis of entomopathogenic fungi reveals a complex set of secreted proteins. *BMC Genomics*, 15: 822. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-822>

Steiger, S., Schmitt, T., & Martin Schaefer, H. (2011). The origin and dynamic evolution of chemical information transfer. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 278(1708): 970–979. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.2285>

Steiner, U. K., & Van Buskirk, J. (2009). Predator-induced changes in metabolism cannot explain the growth/predation risk tradeoff. *PLoS ONE*, 4(7): e6160. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006160>

Stensmyr, M. C., Urru, I., Collu, I., Celander, M., Hansson, B. S., & Angioy, A. M. (2002). Rotting smell of dead-horse arum florets. *Nature*, 420(6916):6916. <https://doi.org/10.1038/420625a>

Stock, M., Milutinović, B., Hoenigsberger, M., Grasse, A. V., Wiesenhofer, F., Kamleitner, N., Narasimhan, M., Schmitt, T., & Cremer, S. (2023). Pathogen evasion of social immunity. *Nature Ecology & Evolution*, 7(3):3. <https://doi.org/10.1038/s41559-023-01981-6>

Su, C. Y., Martelli, C., Emonet, T., & Carlson, J. R. (2011). Temporal coding of odor mixtures in an olfactory receptor neuron. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(12): 5075–5080. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100369108>

Suits, R., Reising, D., & Burrack, H. (2017). Feeding preference and performance of *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae on various soybean tissue types. *Florida Entomologist*, 100(1): 162–167. <https://doi.org/10.1653/024.100.0123>

Sun, J., Cardoza, V., Mitchell, D. M., Bright, L., Oldroyd, G., & Harris, J. M. (2006). Crosstalk between jasmonic acid, ethylene and Nod factor signaling allows integration of diverse inputs for regulation of nodulation. *Plant Journal*, 46(6), 961–970. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02751.x>

Sun, Z., Lin, Y., Wang, R., Li, Q., Shi, Q., Baerson, S. R., Chen, L., Zeng, R., & Song, Y. (2021). Olfactory perception of herbivore-induced plant volatiles elicits counter-defences in larvae of the tobacco cutworm. *Functional Ecology*, 35(2): 384–397. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13716>

Sung, G. H., Poinar, G. O., & Spatafora, J. W. (2008). The oldest fossil evidence of animal parasitism by fungi supports a Cretaceous diversification of fungal-arthropod symbioses. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 49(2): 495–502. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.08.028>

Supelco®. (2023). SPME for GC analysis. <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/415/395/spme-gc-analysis-br1410en-mk.pdf>

Swanson, J. A. I., Torto, B., & Kells, S. A. (2009). Odorants that induce hygienic behavior in honeybees: Identification of volatile compounds in chalkbrood-infected honeybee larvae. *Journal of Chemical Ecology*, 35(9): 1108–1116. <https://doi.org/10.1007/s10886-009-9683-8>

Tall, S., & Meyling, N. V. (2018). Probiotics for plants? Growth promotion by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* depends on nutrient availability. *Microbial Ecology*, 76(4), 1002-1008. <https://doi.org/10.1007/s00248-018-1180-6>

Tasin, M., Knudsen, G. K., & Pertot, I. (2012). Smelling a diseased host: grapevine moth responses to healthy and fungus-infected grapes. *Animal Behaviour*, 83(2): 555–562. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2011.12.003>

Tasin, M., Larsson Herrera, S., Knight, A. L., Barros-Parada, W., Fuentes Contreras, E., & Pertot, I. (2018). Volatiles of grape inoculated with microorganisms: modulation of grapevine moth oviposition and field attraction. *Microbial Ecology*, 76(3): 751–761. <https://doi.org/10.1007/s00248-018-1164-6>

Tay, W. T., Rane, R. V., Padovan, A., Walsh, T. K., Elfekih, S., Downes, S., Nam, K., d'Alençon, E., Zhang, J., Wu, Y., Nègre, N., Kunz, D., Kriticos, D. J., Czapak, C., Otim, M. H., & Gordon, K. H. J. (2022). Global population genomic signature of *Spodoptera frugiperda* (fall armyworm) supports complex introduction events across the Old World. *Communications Biology*, 5: 297. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03230-1>

Tefera, T., & Vidal, S. (2009). Effect of inoculation method and plant growth medium on endophytic colonization of sorghum by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *BioControl*, 54(5), 663-669. <https://doi.org/10.1007/s10526-009-9216-y>

Tola, M., & Kebede, B. (2016). Occurrence, importance and control of mycotoxins: A review. *Cogent Food & Agriculture*, 2(1): 1191103. <https://doi.org/10.1080/23311932.2016.1191103>

Tóth, M., Szarukán, I., Dorogi, B., Gulyás, A., Nagy, P., & Rozgonyi, Z. (2010). Male and female noctuid moths attracted to synthetic lures in Europe. *Journal of Chemical Ecology*, 36(6): 592–598. <https://doi.org/10.1007/s10886-010-9789-z>

Tragust, S., Mitteregger, B., Barone, V., Konrad, M., Ugelvig, L. V., & Cremer, S. (2013). Ants disinfect fungus-exposed brood by oral uptake and spread of their poison. *Current Biology*, 23(1): 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.11.034>

Traynier, R. M. M. (1984). Associative learning in the ovipositional behaviour of the cabbage butterfly, *Pieris rapae*. *Physiological Entomology*, 9(4): 465–472. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.1984.tb00789.x>

Tyc, O., Song, C., Dickschat, J. S., Vos, M., & Garbeva, P. (2017). The ecological role of volatile and soluble secondary metabolites produced by soil bacteria. *Trends in Microbiology*, 25(4): 280–292. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.12.002>

Tzin, V., Galili, G., & Aharoni, A. (2012). Shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis. In ELS. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0001315.pub2>

Utrio, P., & Eriksson, K. (1977). Volatile fermentation products as attractants for Macrolepidoptera. *Annales Zoologici Fennici*, 14(2): 98–104.

van Baaren, J., & Candolin, U. (2018). Plasticity in a changing world: behavioural responses to human perturbations. *Current Opinion in Insect Science*, 27: 21–25. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.02.003>

Vega, F. E., Meyling, N. V., Luangsa-Ard, J. J., & Blackwell, M. (2012). Chapter 6: "Fungal entomopathogens". En *Insect Pathology* (2 Ed., Número October 2017). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384984-7.00006-3>

Vélez-Arango, A. M., Arango-I, R. E., M, D. V., Aguilera-G, E., & Saldamando-B, C. I. (2008). Identificación de biotipos de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) mediante marcadores mitocondriales y nucleares. *Revista Colombiana de Entomología*, 34(2): 2. <https://doi.org/10.25100/socolen.v34i2.9270>

Villani, M. G., Krueger, S. R., Schroeder, P. C., Consolie, F., Consolie, N. H., Preston-Wilsey, L. M., & Roberts, D. W. (1994). Soil application effects of *Metarhizium anisopliae* on Japanese Beetle (Coleoptera: Scarabaeidae) behavior and survival in turfgrass microcosms. *Environmental Entomology*, 23(2), 502–513. <https://doi.org/10.1093/ee/23.2.502>

Volp, T. M., Zalucki, M. P., & Furlong, M. J. (2022). What defines a host? Oviposition behavior and larval performance of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) on five putative host plants. *Journal of Economic Entomology*, 115(6): 1744–1751. <https://doi.org/10.1093/jee/toac056>

Wan, X. L., Li, J. H., & Du, Y. J. (2015). Antennal lobe neurons of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) and their responses to plant odors and sex pheromones. *Acta Entomologica Sinica*, 58(3): 223–236.

Wang, C., & Leger, R. J. S. (2007). The MAD1 adhesin of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enables attachment to plants. *Eukaryotic Cell*, 6(5): 808–816. <https://journals.asm.org/doi/10.1128/ec.00409-06>

Wang, C., & Wang, S. (2017). Insect pathogenic fungi: genomics, molecular interactions, and genetic improvements. *Annual Review of Entomology*, 62: 73–90. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-031616-035509>

War, A. R., Sharma, H. C., Paulraj, M. G., War, M. Y., & Ignacimuthu, S. (2011). Herbivore induced plant volatiles. *Plant Signaling & Behavior*, 6(12): 1973–1978. <https://doi.org/10.4161/psb.6.12.18053>

Warsi, O., Lundin, E., Lustig, U., Näsval, J., & Andersson, D. I. (2019). Selection for novel metabolic capabilities in *Salmonella enterica*. *Evolution*, 73(5): 990–1000. <https://doi.org/10.1111/evo.13713>

Webb, B. (2012). Cognition in insects. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367: 2715–2722. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0218>

Wehrenfennig, C., Schott, M., Gasch, T., Düring, R. A., Vilcinskis, A., & Kohl, C. D. (2013). On-site airborne pheromone sensing. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405: 6389–6403. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7113-9>

Weisskopf, L., Schulz, S., & Garbeva, P. (2021). Microbial volatile organic compounds in intra-kingdom and inter-kingdom interactions. *Nature Reviews Microbiology*, 19: 391–404. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00508-1>

Wicher, D., & Miazzi, F. (2021). Functional properties of insect olfactory receptors: ionotropic receptors and odorant receptors. *Cell and Tissue Research*, 383: 7–19. <https://doi.org/10.1007/s00441-020-03363-x>

Williams, M. A., Jangid, K., Shanmugam, S. G., & Whitman, W. B. (2013). Bacterial communities in soil mimic patterns of vegetative succession and ecosystem climax but are resilient to change between seasons. *Soil Biology and Biochemistry*, 57: 749–757. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.08.023>

Wilson, K., Cotter, S. C., Reeson, A. F., & Pell, J. K. (2001). Melanism and disease resistance in insects. *Ecology Letters*, 4(6): 637–649. <https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2001.00279.x>

Wilson, K., & Cotter, S. (2008). Density-dependent prophylaxis in insects. <https://doi.org/10.1201/b10201-7>

Wilson, K., Thomas, M. B., Blanford, S., Doggett, M., Simpson, S. J., & Moore, S. L. (2002). Coping with crowds: density-dependent disease resistance in desert locusts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(8): 5471–5475. <https://doi.org/10.1073/pnas.082461999>

Witzgall, P., Proffit, M., Rozpedowska, E., Becher, P. G., Andreadis, S., Coracini, M., Lindblom, T. U. T., Ream, L. J., Hagman, A., Bengtsson, M., Kurtzman, C. P., Piskur, J., & Knight, A. (2012). “This is not an apple”-yeast mutualism in codling moth. *Journal of Chemical Ecology*, 38(8): 949–957. <https://doi.org/10.1007/s10886-012-0158-y>

Wraight, S. P., Ramos, M. E., Avery, P. B., Jaronski, S. T., & Vandenberg, J. D. (2010). Comparative virulence of *Beauveria bassiana* isolates against lepidopteran pests of vegetable crops. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103(3), 186-199. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2010.01.001>

Wu, S. S., Tseng, C. T., Yang, Y. H., Liu, Y. C., Chang, J. C., Gyawali, P., Li, Y. H., Yang, T. H., Tsai, Y. F., Tang, L. C., & Nai, Y. S. (2022). Potential of a combination of entomopathogenic fungal strains and a non-ionic surfactant to control the fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 25(4): 102001. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2022.102001>

Yactayo-Chang, J. P., Mendoza, J., Willms, S. D., Rering, C. C., Beck, J. J., & Block, A. K. (2021). *Zea mays* volatiles that influence oviposition and feeding behaviors of *Spodoptera frugiperda*. *Journal of Chemical Ecology*, 47(8): 799–809. <https://doi.org/10.1007/s10886-021-01302-w>

Yan, X. R., Wang, Z. Y., Feng, S. Q., Zhao, Z. H., & Li, Z. H. (2022). Impact of temperature change on the Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* under global climate change. *Insects*, 13(11): Article 11. <https://doi.org/10.3390/insects13110981>

Ye, L. M., Di, X. Y., Yan, B., Liu, J. F., Wang, X. Q., & Yang, M. F. (2022). Population parameters and feeding preference of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) on different *Asparagus officinalis* tissues. *Insects*, 13(12): Article 12. <https://doi.org/10.3390/insects13121149>

Zacarias, D. A. (2020). Global bioclimatic suitability for the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), and potential co-occurrence with major host crops under climate change scenarios. *Climatic Change*, 161(4): 555–566. <https://doi.org/10.1007/s10584-020-02722-5>

Zhou, S., & Jander, G. (2022). Molecular ecology of plant volatiles in interactions with insect herbivores. *Journal of Experimental Botany*, 73(2): 449–462. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab413>

Zhu, H., Fu, J., Wang, H., Bidochka, M. J., Duan, M., Xu, W., Sui, L., Ren, B., Li, Q., & Zhang, Z. (2023). Fitness consequences of oviposition choice by an herbivorous insect on a host plant colonized by an endophytic entomopathogenic fungus. *Journal of Pest Science*, 96(2): 745–758. <https://doi.org/10.1007/s10340-022-01527-y>

Zhukovskaya, M., Yanagawa, A., & Forschler, B. T. (2013). Grooming behavior as a mechanism of insect disease defense. *Insects*, 4(4): 609–630. <https://doi.org/10.3390/insects4040609>

Zurek, L., Wes Watson, D., Krasnoff, S. B., & Schal, C. (2002). Effect of the entomopathogenic fungus, *Entomophthora muscae* (Zygomycetes: Entomophthoraceae), on sex pheromone and other cuticular hydrocarbons of the house fly, *Musca domestica*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 80(3): 171–176. [https://doi.org/10.1016/S0022-2011\(02\)00109-X](https://doi.org/10.1016/S0022-2011(02)00109-X)

11.PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

Durante el periodo que abarcó la realización del presente proyecto, se contribuyó con los siguientes productos de investigación:

- **Ramírez-Ordorica A.**, Patiño-Medina J.A., Meza-Carmen V., Macías-Rodríguez L. 2023. Volatiles fingerprint mediating yeast-mycelial conversion in two strains of *Beauveria bassiana* with variation in virulence. *J. Fungi*. En proceso de revisión.
- Contreras-Cornejo H.A., Orozco-Granados O., **Ramírez-Ordorica A.**, García-Juárez P., López-Bucio J., Macías-Rodríguez L. 2022. Light and mycelial injury influences the volatile and non-volatile metabolites and the biocontrol properties of *Trichoderma atroviride*. *Rhizosphere*. 22: 100511
- Contreras-Cornejo H.A., **Ramírez-Ordorica A.**, Álvarez-Navarrete M., Macías-Rodríguez L. 2022. The Role of Phytohormones in Cross-communication Between Plants and Rhizo-Microbes. En: Horwitz, B.A., Mukherjee, P.K. (ed.) *Microbial Cross-talk in the Rhizosphere*. *Rhizosphere Biology*. Editorial Springer, Singapore.
- **Ramírez-Ordorica A.**, Valencia-Cantero E., Flores-Cortez I., Carrillo-Rayas M.T., Elizarraraz-Anaya M.I.C., Montero-Vargas J., Winkler R., Macías-Rodríguez L. 2020. Metabolomic effects of the colonization of *Medicago truncatula* by the facultative endophyte *Arthrobacter agilis* UMCV2 in a foliar inoculation system. *Scientific Reports* 10:8426.
- Flores-Cortez I., Winkler R., **Ramírez-Ordorica A.**, Elizarraraz-Anaya M.I.C., Carrillo-Rayas M.T., Valencia-Cantero E., Macías-Rodríguez L. 2019. A mass spectrometry-based study shows that volatiles emitted by *Arthrobacter agilis* UMCV2 increase the content of brassinosteroids in *Medicago truncatula* in responses to iron deficiency stress. *Molecules* 24:3011

Además, se publicó el siguiente trabajo de divulgación:

- **Ramírez-Ordorica A.**, Macías-Rodríguez L. 2020. La tecnología computacional y la biología de sistemas. Saber más No. 56.

Se tuvieron las siguientes participaciones de congresos:

- **Ramírez-Ordorica A.**, Macías Rodríguez L. “Un modelo de compartimientos para una población microbiana rizosférica”. Modalidad cartel. 15° Congreso Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación. Morelia, Michoacán. 30 de octubre de 2020.
- **Ramírez-Ordorica A.**, Doroteo-Lucas M., Valencia-Cantero E., García-Juárez P., Winkler R., Macías-Rodríguez L. “Especificidad de la respuesta a la inoculación de *Medicago truncatula* por las rizobacterias *Arthrobacter agilis* UMCV2 y *Bacillus amyloliquefaciens* M4-96 en el perfil metabólico de hojas”. Modalidad cartel en línea. 1° Congreso Nacional de Tecnología y Biotecnología Agrícola. 28 al 23 de octubre de 2020.
- **Ramírez-Ordorica A.** “Participación de las señales químicas volátiles emitidas por hongos entomopatógenos en la conducta de los insectos y sus implicaciones ecológicas”. XVI Coloquio Internacional Multidisciplinarios. 14 al 15 de mayo de 2022.
- **Ramírez-Ordorica A.** 17° Congreso Estatal de Ciencia, Tecnología e Innovación. Morelia, Michoacán. Asistente. 28 de octubre de 2022.
- Macías-Rodríguez L., Luna-Cruz A., García-Rodríguez Y., Winkler R., **Ramírez-Ordorica A.** “Los compuestos orgánicos volátiles de *Beauveria bassiana* modifican la conducta de oviposición de *Spodoptera frugiperda*”. VIII Congreso Mexicano de Ecología. Modalidad cartel. Oaxaca de Juárez, Oaxaca. 22 al 27 de mayo de 2022.
- **Ramírez-Ordorica A.**, Luna-Cruz A., Orduño-Cruz N., García-Rodríguez Y., Macías-Rodríguez L. “Perfiles de compuestos volátiles de *Beauveria bassiana* como predictores del nicho trófico y virulencia”. VIII Congreso

Mexicano de Ecología. Ponencia oral. Oaxaca de Juárez, Oaxaca. 22 al 27 de mayo de 2022.

- **Ramírez-Ordorica A.** “El metabolismo y su contexto ecológico: variaciones alrededor de un tema común”. 1° Congreso de Divulgación Científica “La Biología: nuestro experimento de vida”. Modalidad presencial. IIQB, UMSNH. Morelia, Michoacán. 21 al 25 de noviembre de 2022.
- Hernández-Ornelas J., **Ramírez-Ordorica A.**, Figueroa-de la Rosa J., Macías-Rodríguez L. “Potenciales semiquímicos de parasitoides emitidos durante la herbivoría de la mariposa monarca (*Danaus plexippus*) en *Asclepias* spp.”. 18° Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales. Modalidad cartel. Morelia, Michoacán. 24 al 27 de mayo 2023.
- Cornelio-Alvarez M., Garcías-Juárez P., **Ramírez-Ordorica A.**, Macías-Rodríguez L. “Evaluación del consorcio fúngico *Beauveria bassiana* y *Trichoderma atroviride* en el crecimiento vegetal y en el control biológico de plagas”. 18° Congreso Estatal de Ciencia, Tecnología e Innovación. Modalidad cartel Morelia, Michoacán. 4 al 6 de octubre de 2023.
- Hernández-Ornelas J., **Ramírez-Ordorica A.**, García-Juárez P., Mendoza Cuenca L., Macías-Rodríguez L. “Efecto de los COVs de *Penicillium* sp. en la preferencia de oviposición de la mariposa monarca (*Danaus plexippus*) sobre *Asclepias curassavica*”. XXVIII International Course Biological Bases of Behaviour. Modalidad cartel. Morelia, Michoacán. 25 al 27 de octubre de 2023.
- **Ramírez-Ordorica A.**, Macías-Rodríguez L. “La participación de los compuestos orgánicos volátiles de *Beauveria bassiana* como moduladores del comportamiento alimenticio de *Spodoptera frugiperda*”. XXVIII International Course Biological Bases of Behaviour. Modalidad cartel. Morelia, Michoacán. 25 al 27 de octubre de 2023.

1 Volatiles fingerprint mediating yeast-mycelial conversion in two strains of *Beauveria*
2 *bassiana* with variation in virulence

3 Arturo Ramírez-Ordorica 1, José Alberto Patiño-Medina 1, Víctor Meza-Carmen 1, and
4 Lourdes-Macias-Rodríguez 1*

5 Citation: To be added by editorial staff during production.

6 Academic Editor: Firstname Last-name

7

8 1 Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San
9 Nicolás de Hidalgo, Ciudad Universitaria, C.P. 58030, Morelia, Michoacán, México;
10 arturo.ramirez_ordorica@umich.mx (A.R.), jpatino@umich.mx (J.P.),
11 victor.meza@umich.mx (V.M.)

12 * Correspondence: lourdes.macias@umich.mx

13 Abstract: *Beauveria bassiana* is a dimorphic and entomopathogenic fungus with different
14 ecological roles in nature. The yeast-mycelial conversion in the fungus is required for
15 virulence and is controlled by environmental factors. Here, we studied the virulence capacity
16 and the effect of different stimuli on the morphology of two *B. bassiana* strains. In addition,
17 we explored the role of volatiles acting as quorum-sensing-like signals during the dimorphic
18 transition. The killing assays in *Caenorhabditis elegans* showed that strain AI2 isolated from
19 mycosed insect cadaver showed higher virulence than ASS obtained from soil. Furthermore,
20 AI2 showed a rapid growth and an early dimorphic switching compared to ASS. However an
21 increment in the size of the inoculum induced the yeast- to mycelium-phase transition in ASS,
22 suggesting a cell density-dependent phenomenon. The analysis of volatile compounds by
23 GC-MS showed that the fingerprint of volatiles was strain-specific but during the
24 morphological switching, they share in common an inverse ratio between the abundance of
25 total terpenes and 3-methylbutanol. The addition of 3-methylbutanol to the MacConkey
26 culture medium retarded the yeast- to mycelium transition. Hence, as in other dimorphic
27 fungus, volatile compounds are connected with critical events in the life cycle of *B. bassiana*.

28 Keywords: entomopathogen; dimorphism; environmental stimuli; volatiles; 3-methylbutanol

29

30 1. Introduction

31 Dimorphic fungi are those with a unique attribute to transit between yeast- to mycelial-phase.
32 Environmental stimuli such as temperature, pH or nutrition influences this morphological
33 change [1,2,3,4]. Several fungal pathogens of animals and plants are dimorphic and the
34 transition between the two phases favors the fungal in vivo survival and pathogenesis [5].
35 Breakthroughs at molecular level show the mechanisms underlying the infection process in
36 which the virulence factors act as assistants during pathogens colonization's, either for the
37 transition of mycelium to the parasitic phase or as immunosuppressives [6,7,8]. For example,



Light and mycelial injury influences the volatile and non-volatile metabolites and the biocontrol properties of *Trichoderma atroviride*

Hexon Angel Contreras-Cornejo¹, Omar Orozco-Granados¹, Arturo Ramírez-Ordorica, Perla García-Juárez, José López-Bucio, Lourdes Macías-Rodríguez^{*}

Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Ciudad Universitaria, C.P. 58030, Morelia, Michoacán, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:
Trichoderma
Volatiles
Auxin
Biocontrol
B. cinerea
Arabidopsis

ABSTRACT

Trichoderma spp. are common inhabitants of the rhizosphere, which produce volatile organic compounds (VOCs) and diffusible molecules such as indole-3-acetic acid (IAA) for the communication with plants. Here, we report that fungal VOCs and IAA production, as well as growth and sporulation change upon mechanical damage and compromise its biocontrol properties. Mycelium injury in combination with photoperiod conditions triggered conidiogenesis, stimulated IAA secretion, and enhanced the emission of 2-heptanone, 2-nonanone, and 1-octen-3-ol, but diminished the emission of 6-pentyl-2H-pyran-2-one (6-PP). The opposite effects were observed under darkness, where the content of 1-octen-3-ol decreased while the abundance of 6-PP increased. *Arabidopsis thaliana* growth promotion through fungal VOCs and diffusible compounds was sustained upon injury while *in vitro* confrontation experiments showed the influence of light in the performance of the WT strain against the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea* likely via 6-PP production, which inhibited *B. cinerea* growth. These results show that the biochemical and ecological attributes of *T. atroviride* are modulated by the fungal integrity and light signaling.

1. Introduction

Fungi of the genus *Trichoderma* are common rhizosphere inhabitants, well-known for their biocontrol of deleterious plant microorganisms but also for improving nutrient uptake through roots, and host resistance to pathogen attack (Druzhinina et al., 2011; Kottb et al., 2015; Contreras-Cornejo et al., 2016; Zhang et al., 2018). *T. virens* and *T. atroviride* produce a complex blend of volatiles, auxins and other phytohormones providing the framework for the balance between plant growth promotion and the elicitation of defense that are inherently antagonist (Crutcher et al., 2013; Contreras-Cornejo et al., 2009, 2014; Kottb et al., 2015; Garnica-Vergara et al., 2016).

Trichoderma are frequently exposed to stressful environmental conditions such as low water availability, high temperature, acid or alkaline pH, high irradiation, and mechanical damage caused by predators that may trigger the asexual reproduction to guarantee fungal survival (Steyaert et al., 2010). The conidial response of *Trichoderma* to light exposure is specie- and even strain-specific, so the metabolic response for adaptation is crucial to overcome the stress (Steyaert et al., 2010;

Moreno-Ruiz et al., 2020; Speckbacher et al., 2020a).

Light exposure and mechanical injury affects membrane lipids activating the biosynthesis of oxylipins in the fungus by the action of oxygenases (Tisch and Schmoll, 2010; Hernández-Onate et al., 2012; Fischer et al., 2016; Medina-Castellanos et al., 2018; Speckbacher et al., 2020b). Oxylipins regulate fungal growth and interaction with other organisms (Nemčović et al., 2008; Hernández-Onate et al., 2012; Garnica-Vergara et al., 2016; Holighaus and Rohlf, 2019; Moreno-Ruiz et al., 2020). Particularly, light stimulus triggers the production of 1-octen-3-ol, 3-octanone, and 6-PP in *T. atroviride* IMI 206040 (Schmoll et al., 2010; Steyaert et al., 2010; Speckbacher et al., 2020a, Moreno-Ruiz et al., 2020). Consistently, application of 1-octen-ol and 3-octanone triggers conidiogenesis in the fungus (Nemčović et al., 2008; Stoppacher et al., 2010). Meanwhile, the role of 6-PP as inducer of spore formation is unknown, but this compound is widely studied as chemical signal for inter-species interaction. This pyrone stimulates plant growth and development (Garnica-Vergara et al., 2016), antagonizes phytopathogens such as *Rhizoctonia solani* and *Fusarium moniliforme* (Serrano-Carreón et al., 2004; El-Hasan et al., 2007), and activates

^{*} Corresponding author.

E-mail address: lmacias@umich.mx (L. Macías-Rodríguez).

¹ H.A. Contreras-Cornejo and O. Orozco-Granados should be considered joint first author.

<https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2022.100511>

Received 5 January 2022; Received in revised form 22 March 2022; Accepted 29 March 2022

Available online 4 April 2022

2452-2198/© 2022 Published by Elsevier B.V.

defense mechanisms in plants making them more resistant to pathogen attack (Kottb et al., 2015).

Considering the scenario that under field conditions, *Trichoderma* may be exposed to light and mechanical injury due to the anthropogenic practices and agricultural management, it is tempting to speculate that the fungal transition from mycelium to spore, the production of bioactive metabolites and therefore the biological performance of the fungus could be affected. Thus, it is important to determine the fungal response to light and mycelium injury at physiological, biochemical, and ecological levels, which to the best of our knowledge remains to be explored.

In this report, we uncovered an important effect of light and mechanical injury on fungal growth and sporulation and the production of fungal bioactive metabolites. Interestingly, plant growth promotion was sustained, but the biocontrol activity to the necrotrophic fungus *B. cinerea* was reduced by 62% after mycelial damage. Indeed, we could demonstrate the high potential for 6-PP as an antifungal metabolite with a key role in the biocontrol of *B. cinerea*, whose activity is modulated by photoperiod conditions. Our results add to what is known to fungal response to stress and also provide very fundamental information towards managing a critical plant-fungal symbiosis in agroecosystems.

2. Materials and methods

2.1. Fungal growth conditions

Trichoderma atroviride IMI 206040 was used in this study. *T. atroviride* was assayed *in vitro* in Petri dishes (100 × 15 mm) filled with 35 ml of phytagar (Gibco-BRL) containing 0.2x MS medium (Murashige and Skoog basal salts). This medium was used to carry out the VOCs analysis and the interaction studies between *T. atroviride* and plants (Garnica-Vergara et al., 2016; Macías-Rodríguez et al., 2018). Petri dishes were inoculated with 1×10^6 fungal spores suspended in 5 µl of sterile water by placing the inoculum in the center of the solidified agar. Plates were arranged in a completely randomized design and placed in a PERCIVAL AR-36L growth chamber at 22 ± 1 °C with relative humidity of 70%, and a photoperiod of 16 h of light/8 h darkness with a light intensity of $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; these growth conditions were designated as photoperiod treatments. To determine whether the absence of light affects the fungal growth, the number of fungal spores, and VOC emissions, we also performed a darkness treatment, where the inoculated plates were covered with aluminum foil and placed into the growth chamber. For injury treatment, 4-day-old fungal colonies were damaged by making eight transversal and eight longitudinal cuts with a scalpel, and then the damaged colonies were returned to the growth chamber for 4 additional days. Radii and diameters of the colonies were measured with a ruler and expressed in centimeters (cm). Finally, fungal spores were collected from the culture medium by suspending them in 4 ml of water. 1 ml aliquot was taken, and 50 µM of aniline blue per ml was added to the spore solution. Spore solutions were diluted at 1:1000 (v/v) to quantify the microbial structures in a Neubauer counting chamber.

2.2. Bioassays of competence between *T. atroviride* and *B. cinerea* in a bipartite interaction system

For these bioassays, a pure *B. cinerea* strain was grown and maintained on PDA medium (BD Bioxon®) (Vicente-Hernández et al., 2019). Then, mature conidia were collected and suspended in sterilized deionized water, and the final concentration was determined using a Neubauer counting chamber. Bioassays were performed in Petri dishes containing solidified agar supplemented with 0.2x MS salts pH 7. 1×10^6 spores of each *T. atroviride* and *B. cinerea* were co-cultivated on opposite sides, 1 cm from the Petri dish wall. Then, mycelial injury was performed as mentioned above in 2-day-old colonies, and fungal growth was allowed for 3 days. Radial growth of *T. atroviride* and *B. cinerea* and

the growth of the pathogen were measured using a ruler.

Because 6-PP is the main volatile produced by *T. atroviride*, we tested its effect on *B. cinerea* growth, and pharmacological experiments were performed applying 6-PP (catalog number W369608; ≥96% purity, Sigma-Aldrich). The fungal pathogen was inoculated at a density of 1×10^6 fungal spores diluted in ~25 µl of sterilized water and placed in the center of Petri dishes (60 × 15 mm) containing PDA. Next, different 6-PP concentrations were loaded at the site of the fungal inoculum. The concentrations of 10 and 100 µg of 6-PP were prepared in ethanol to a final volume of 1 µl, respectively. The concentration of 1000 µg of 6-PP was applied without previous dilution. Ethanol was used as the control treatment, and no fungal inhibition was detected with the pure solvent. All Petri dishes were placed in darkness for 72 h at 22 ± 1 °C and relative humidity of 70%.

2.3. Analysis of plant growth promotion by *T. atroviride* under adverse growth conditions

Arabidopsis thaliana (ecotype Columbia-0) seeds were disinfected as described previously (Garnica-Vergara et al., 2016) and after five washes in sterilized distilled water, seeds were germinated and grown on Petri dishes or divided Petri dishes containing 1% agar and 0.2x MS medium (Murashige and Skoog basal salts mixture, Sigma®, St. Louis, MO, USA). These experiments consisted of four treatments, including control plants with and without mechanical damage to the agar, and plants inoculated with *T. atroviride* with and without mycelial injury. Then, 4-day-old *A. thaliana* seedlings were inoculated with 1×10^6 spores of *T. atroviride*, and after 2 days of fungal growth, eight transversal and eight longitudinal cuts were made to the colony using a scalpel. Fungal growth was allowed for an additional period of 3 days. During the experiment, Petri dishes were placed vertically at a 65° angle to allow root growth on the agar, and unimpeded aerial growth of the cotyledons and leaves. Seedlings were grown in a plant growth chamber (PERCIVAL AR36-L) at 22 ± 1 °C with a photoperiod of 16 h of light/8 h darkness with light intensity of $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. The fresh shoot weight was measured on an analytical scale immediately after plant harvest, and lateral roots were counted after visual inspection under a stereomicroscope.

2.4. Volatiles collection and analysis

VOCs from 8-day-old *T. atroviride* colonies grown on 0.2x agar-MS media were collected in the headspace of closed Petri dishes by the solid-phase microextraction (SPME) technique, using the blue fiber assembly (polydimethylsiloxane/divinylbenzene, PDMS/DVB; Supelco, Inc., Bellefonte, PA, U.S.A), and then analyzed by HP-FFAP capillary column (free fatty acid-phase, 25 m × 0.25 mm I.D.; film thickness 25 µm) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Chromatography conditions for compounds separation were based on the report made by Garnica-Vergara et al. (2016), although the initial oven temperature was 40 °C. VOCs were identified using a combination of NIST/EPA/NIH Mass Spectral Database 11 and NIST Mass Spectral Search Program 2.0, Chem Station Agilent Technologies (Rev. D.04.00.2002), and deconvolution software (Automated Mass spectral Deconvolution and Identification System v.2.0) to find all the separate components. Linear retention indices (RI) were calculated according to the Kovats method using a mixture of normal paraffin C₆-C₂₀ as external references. The retention index for 6-PP could not be calculated because it eluted after C₂₀ hydrocarbon; however, its identity was further confirmed by comparing the retention time and the mass spectrum of the pure compound with those obtained from samples.

2.5. IAA determinations

IAA determinations were performed by HP5-MS capillary column (25 m × 0.25 mm I.D.; film thickness 25 µm) and GC-MS from the MS

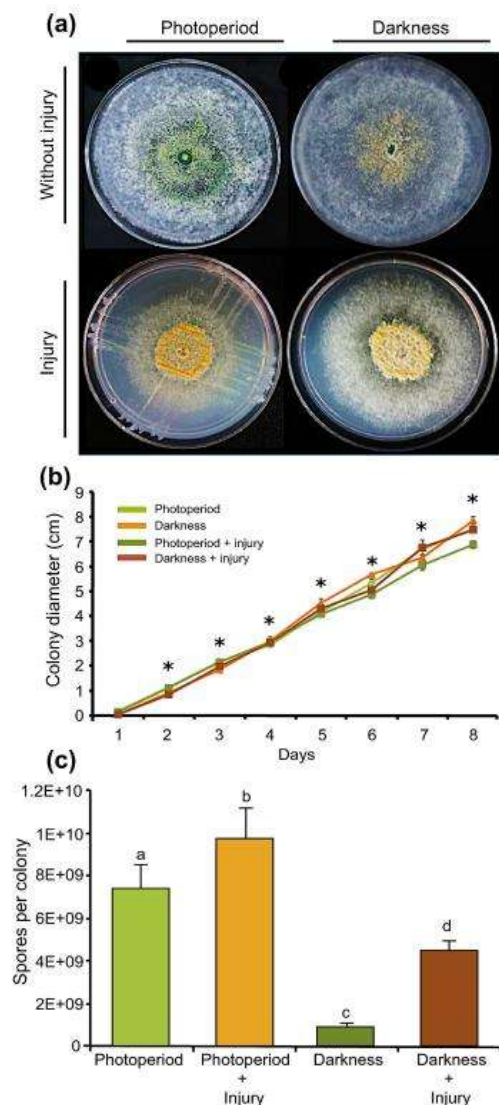


Fig. 1. Effects of the mycelia injury on *T. atroviride* growth under photoperiod and darkness conditions. (a) Representative photographs showing the aspect of 8-day-old fungal colonies grown at 22 °C. (b) Kinetic of the *T. atroviride* growth determined by measuring the colony diameter. Asterisks indicate statistically significant differences by one-way ANOVA Analysis ($P \leq 0.05$). (c) Number of spores per colony of *T. atroviride* growth ($n = 4$). Bars represent the mean values \pm standard deviation, based on two independent experiments each with four Petri dishes. Different letters indicate statistically significant differences by two-way ANOVA Analysis and Tukey's test ($P \leq 0.05$).

agar portion (28 g) of the Petri dishes after 9 d of fungal growth. *Arabidopsis* seedlings with the roots colonized by the fungus and mycelia were removed from the agar surface. The MS agar portions were removed from the dishes, macerated, and placed into a flask containing 100 ml of pure methanol. The indolic compound was extracted at room temperature in the dark for 21 d. For each sample, a 20-ml aliquot was taken and transferred to a glass vial and placed in a thermoblock at 60 °C under a stream of gaseous nitrogen until the samples were dry. Then, IAA present in the samples was methyl esterified (IAA-ME) and analyzed by GC-MS using the selected ion monitoring (SIM) mode with the ions 130 and 189 [M^+] m/z (Contreras-Cornejo et al., 2009). Identification of the indolic compound was confirmed by comparison of the retention time (Rt) in the fungal extract with samples of the pure derivatized IAA standard (Sigma®; Rt = 15.16 min). To estimate the amount of IAA produced by *T. atroviride*, pure IAA-ME was used as an external standard, and the area of the injected concentration ($562 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$) was correlated with the peak area of the eluted compound in the sample. Fungal VOCs and IAA-ME were analyzed using an Agilent 6850 Series II gas chromatograph (Agilent Foster City, CA, USA), equipped with a MS detector from Agilent model 5973.

2.5. Data analysis

Data were statistically analyzed using SPSS 10 software (IBM Corp.). Homogeneity of variance of data was checked using Levene's test. One or two-way analyses of variance (ANOVA) with a Tukey's post hoc test were used to determine differences between factors in the fresh weights, lateral root number, fungal growth, biocontrol rate, and the volatiles and IAA concentrations. To analyze the interactions between the conditions that stimulate the emission of fungal VOCs, we constructed a linear regression with interactions in a factorial model 2^2 (two factors with two levels each), graphed as a response surface with factor's levels coded on a scale between -1 (control) and 1 (treatment) (Yates' notation). Four independent repetitions were used for each combination of factors. To determine the fit between the model and the observed data, R^2 was calculated for each model. In all cases, the R language (v4.0.5) with the *rsm* package and Excel spreadsheet were used. Variance of quantitative measures of the effect of 6-PP on *B. cinerea* growth was performed using generalized linear models (GLM) in R software. The GLM fitted the model with the lowest Akaike information criterion (AIC) exhaustive analysis and post-hoc Tukey's test.

3. Results

3.1. Response of *T. atroviride* to abiotic stress caused by light and mechanical injury

Environmental stimuli can alter the fungal growth and sporulation as well as the production of secondary metabolites in filamentous fungi such as *Trichoderma* (Schmoll et al., 2010; Carreras-Villasenor et al., 2012; Kalinak et al., 2014; Macheleidt et al., 2016; Speckbacher et al., 2020a). These physiological and biochemical alterations are essential for fungal adaptation and ecological performance. We aimed at determining whether the stress caused by light exposure as well as mechanical damage to the mycelium could affect the production of bioactive metabolites of the fungus and consequently, fungal biological interactions. First, we studied the effect of photoperiod (16 h of white light/8 h of darkness) and mechanical injury in the mycelia on the fungal growth and development by measuring the colony diameter and spore formation and found that *T. atroviride* responded differentially in each tested condition (Fig. 1a). Darkness, here considered as an optimal fungal growth condition, enhanced the microbial growth ($P \leq 0.05$). In counterpart, mechanical injury slightly reduced the fungal growth in darkness, and a similar trend was also observed under photoperiod conditions. *T. atroviride* growth was also affected by both photoperiod and mechanical injury (Fig. 1b). A common negative effect of the

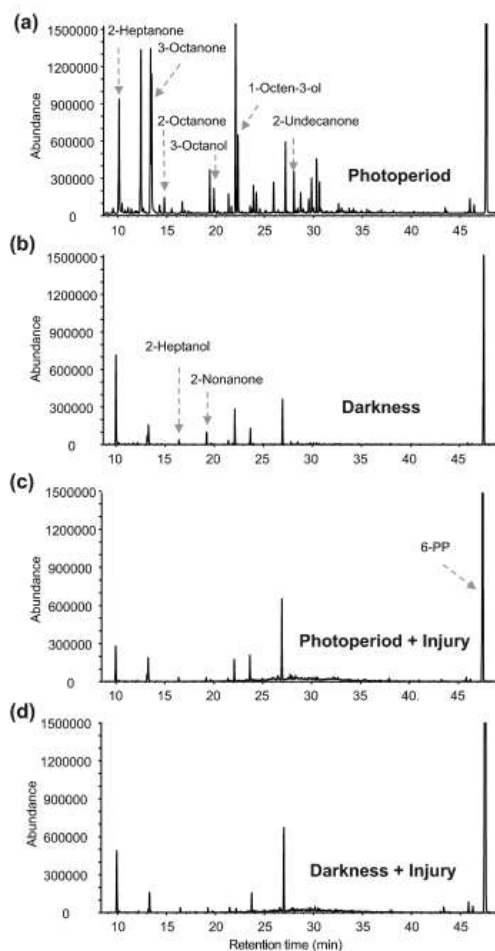


Fig. 2. Differences between chromatographic profiles of volatiles produced by *T. atroviride* after photoperiod exposure (a), darkness (b), and damage to the mycelium (c-d). Analyses were carried out by SPME-GC-MS. The experiment was repeated three times with similar results.

different stress conditions on *T. atroviride* was observed for total number of spores where darkness + mechanical injury induced a 5-fold increase in the number of spores when compared with darkness only ($P \leq 0.05$). Photoperiod and photoperiod + injury increased the number of spores by 8- and 10-fold, respectively (Fig. 1c). These data are in agreement with previous reports that *T. atroviride* modulates its growth according to the type of stressors, i.e., light, mechanical injury, or both (Schmoll et al., 2010; Carreras-Villasenor et al., 2012; Hernández-Oñate et al., 2012).

3.2. Biochemical response of *T. atroviride* to photoperiod and mycelia injury

Fungal VOCs analyses were performed by SPME-GC-MS and

significant differences in the levels of the emitted compounds were observed among the treatments, as shown in the chromatographic profiles (Fig. 2). The identified metabolites in the headspaces of the Petri dishes were compounds with eight carbon atoms, such as 3-octanone, 2-octanone, 3-octanol, and 1-octen-3-ol; however, other lipid-related compounds were also present, such as 2-heptanol, 2-nonanone, 2-undecanone, and 6-PP (Table 1). Under all tested conditions, 6-PP was the major compound released by the fungus. Importantly, we detected changes in the VOCs emissions between the treatments subjected to photoperiod, photoperiod + injury, and darkness + injury when compared with darkness only (Table 1). To understand the effect of both light and the mechanical injury on the production of fungal VOCs, we performed a correlation analysis of the surface responses of 2-heptanone, 3-octanone, 1-octen-3-ol, and 6-PP. Photoperiod + injury induced the emission of 2-heptanone and 1-octen-3-ol with respect to the other conditions (Fig. 3a). Similarly, the photoperiod activated emissions of 3-octanone and 1-octen-3-ol (Fig. 3b and c). In addition, mycelia injury caused by mechanical damage in darkness increased the emission of 6-PP by 3% compared to dark conditions (Fig. 3d). Interestingly, photoperiod + injury reduced the emission of 6-PP by 34% compared to darkness. These data show that detrimental growth conditions additively affect the emission of lipid-related compounds in *T. atroviride*.

3.3. Repression of the plant pathogen *B. cinerea* is comprised in *T. atroviride* after mycelia injury

To determine whether the mycelial mechanical damage altered the biocontrol of *B. cinerea*, experiments of co-interaction in darkness between these two microorganisms were performed (Fig. 4a). First, we determined the growth response of both fungi interacting themselves under *in vitro* conditions. *T. atroviride* growth was modulated by the presence of the fungal pathogen and mycelium injury ($F_{1,32} = 5.66$; $P_{\text{injury} \times \text{fungal strains}} = 0.0235$), whereas *B. cinerea* growth was similar under all the tested conditions (Fig. 4b). Interestingly, the biocontrol of *B. cinerea* by *T. atroviride* was affected by mycelia injury ($t = 2.12$; $P = 1.09 \times 10^{-8}$), being it reduced by 62% (Fig. 4c). Thus, the efficient biocontrol of *T. atroviride* depends, at least in part, on mycelial integrity.

3.4. 6-PP, a *T. atroviride* derived-metabolite, is an antimicrobial agent in which activity is modulated by abiotic factors

Mycelium injury and photoperiod had an inhibitory effect on 6-PP biosynthesis by *T. atroviride* when compared to darkness. Since 6-PP has an antagonistic effect on phytopathogenic fungi (El-Hasan et al., 2007), we determined if its activity diminished in the presence of light. Thus, we performed pharmacological tests applying 6-PP on *B. cinerea* growth medium under photoperiod (16 h of light/8 h of darkness) and darkness conditions. In all treatments, 1×10^5 conidia from *B. cinerea* were inoculated per Petri dish and then germinated and grown for 3 days on agar plates containing PDA with increasing 6-PP concentrations (10–1000 μg). All tested 6-PP concentrations altered *B. cinerea* growth (Fig. 5). A slight growth repression was detected at a 6-PP concentration of 10 μg . Interestingly, 6-PP activity appeared to be modulated by light conditions, as revealed by the fungal response to 100 μg under photoperiod and darkness conditions. Compared with their respective controls, 6-PP reduced *B. cinerea* growth by 25% and 43% under photoperiod and darkness conditions, respectively. Importantly, under both experimental conditions, the growth of the plant pathogen was completely repressed at 6-PP concentration of 1000 μg (Fig. 5).

3.5. Volatile and diffusible fungal compounds promoted *A. thaliana* growth, independently of *T. atroviride* injury

Trichoderma spp. release IAA and auxin-like compounds and emit VOCs, with key roles in plant growth promotion and plant defense

Table 1Volatile organic compounds (VOCs) produced by *T. atroviride* in each treatment. Data are expressed as the normalized amount of compound (%).

Compound	CAS	RI (Rt) ^b	RI ^c	No injury		Injury	
				Darkness	Photoperiod	Darkness	Photoperiod
2-Heptanone	110-43-0	1178	1172	4.98 ± 1.23a	6.44 ± 1.94a	3.80 ± 1.09a	21.49 ± 2.49b
3-Octanone	106-68-3	1259	1192	0.54 ± 0.38a	6.85 ± 4.55b	0.18 ± 0.04a	2.77 ± 0.74ab
2-Octanone	111-13-7	1287		0.03 ± 0.01a	0.71 ± 0.40b	0.06 ± 0.03a	0.18 ± 0.04a
2-Heptanol	543-49-7	1329		0.42 ± 0.15a	0.44 ± 0.24a	0.65 ± 0.30a	0.89 ± 0.17a
2-Nonanone	821-55-6	1391	1388	0.39 ± 0.09ab	1.52 ± 0.85b	0.33 ± 0.09a	3.02 ± 0.23c
3-Octanol	589-98-0	1399	1400	0.15 ± 0.07a	0.98 ± 0.38b	0.17 ± 0.07a	0.30 ± 0.02a
1-Octen-3-ol	3391-86-4	1459	1451	1.37 ± 1.09a	6.98 ± 5.88ab	0.30 ± 0.17a	10.06 ± 2.84b
2-Undecanone	112-12-9	1593	1606	0.52 ± 0.13a	1.77 ± 0.57b	0.33 ± 0.77a	0.68 ± 0.11a
6-PP	27593-23-3	(47.4)		91.57 ± 2.95b	74.26 ± 10.41a	94.16 ± 1.32b	60.49 ± 1.39a

^a Normalized amount of volatile compound = (peak area of volatile compound)/(total peak area of all volatile compounds). Mean values ± standard deviations of the sum of three independent determinations. Statistical analysis was performed from the individual compounds. Different letters indicate statistically significant differences ($P \leq 0.05$).

^b Retention Index (Retention time in min) on HP-FFAP capillary column.

^c RI available for HP-FFAP capillary column in Pherobase database (<https://www.pherobase.com>).

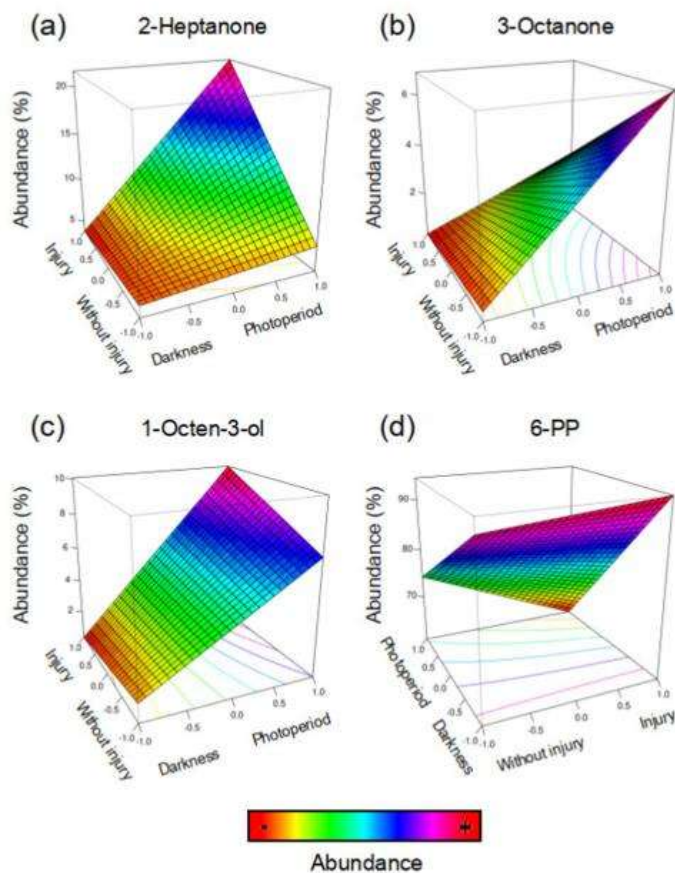


Fig. 3. Surface response of the main volatiles released by *T. atroviride* under the different growth conditions tested. Panels (a-d) show the modulations of the emission of the indicated compounds in response to each stimuli perceived by the fungus. The plane XY indicates the factors light (photoperiods from 0 to 1, and darkness from -0 to -1) and mycelial injury (damage from 0 to 1 and the intact mycelia from -0 to -1). Z-axis represents the abundance in percentage of the compound. Values represent data of $n = 4$ and $P \leq 0.05$.

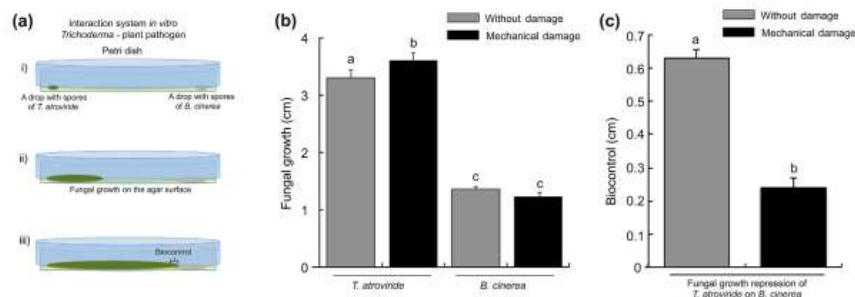


Fig. 4. Fungal growth response to the co-interaction and mechanical injury under dark growth conditions. **(a)** Bipartite interaction system to study the biocontrol activity of *T. atroviride* against *B. cinerea*. i. Both fungi (1×10^6 spores) were co-cultivated on opposite sides of the Petri dish filled with 0.2x agar-MS medium. After 2-d of the fungal growth, the colonies were mechanically injured with a scalpel and then, the growth was allowed for an additional period of 3-d. ii. The image represents the ability of *T. atroviride* to grow and compete for nutrients and space against *B. cinerea*. iii. The image represents the confluent growth of *T. atroviride*, which inhibits the pathogen growth in an advanced stage of the interaction. **(b)** Effect of the mechanical damage on the growth of *T. atroviride* and *B. cinerea*. **(c)** Biocontrol activity of *T. atroviride* with and without mechanical damage against the plant pathogen fungus. The radial mycelial growth of *Trichoderma* on *B. cinerea* was reported in cm. Bars in **(b)** and **(c)** show the mean values \pm standard deviation ($n = 9$) based on two independent experiments, and different letters indicate statistically significant differences by two-way ANOVA Analysis and Tukey's test ($P \leq 0.05$).

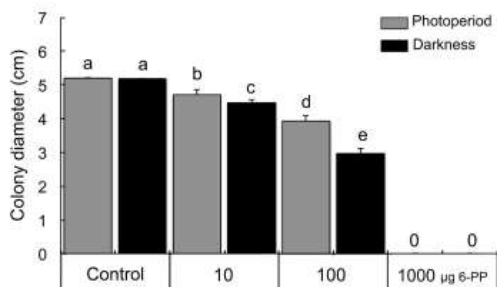


Fig. 5. Effect of 6-PP on *B. cinerea* growth under photoperiod and dark conditions. To determine the effect of 6-PP on the growth of the plant pathogen fungus, 1×10^6 spores were used to inoculate $0.2 \times$ agar-MS medium with or without 6-PP. Bars represent the means \pm standard deviation, based on two independent experiments with $n = 10$ Petri dishes. Different letters indicate statistically significant differences as determined by generalized linear models and post-hoc Tukey's test ($P \leq 0.05$).

(Contreras-Cornejo et al., 2009; Kottb et al., 2015; Garnica-Vergara et al., 2016). To determine whether light conditions or mycelial injury could affect the beneficial effects of *T. atroviride* on plant growth promotion via auxin production and VOCs, we performed *in-vitro* experiments using *A. thaliana*. Both organisms were co-cultivated in Petri dishes with and without physical divisions (I-dishes). In the bioassays with two-sided I-plates, the fungal VOCs promoted 2-fold the shoot biomass accumulation and lateral root formation in plants exposed to the volatile blend of healthy or damaged mycelium, respectively (Fig. 6). Comparable effects on the shoot biomass accumulation and lateral root induction were also observed in the experiments performed in Petri dishes without division (Fig. 7). IAA production by *T. atroviride* was determined in the medium of the plant-fungus interaction system (0.2x agar-MS) after fungal mycelium damage. Mechanical damage increased IAA production in *T. atroviride* from 1.38 to 7.23 ng/ml ($t = 2.7764$, $P = 0.00325$).

4. Discussion

The biotechnological impact of *Trichoderma* is rising due to their beneficial effects on plants and biocontrol traits. Here, we followed the premise that during soil and crop management practices, the fungus may be exposed to stressing sunlight and the mycelium may be damaged affecting its growth and natural performance. To gain more information into this question, we performed a set of *in vitro* experiments to determine the impact of light exposure and mycelial injury on the growth, metabolism, biocontrol and plant growth promotion. Four growth conditions for *T. atroviride* were established i) ideal growth conditions (darkness), ii) darkness + mycelium injury, iii) photoperiod (light/dark cycles), and iv) photoperiod + mycelium injury. Interestingly, light/dark growth conditions modulated both fungal growth and biochemical properties. Simultaneously light + injury stress modified the production of IAA and the emission of fungal VOCs, including oxylipins. Importantly, the mechanical injury did not affect the beneficial effects of the fungus on the plant growth via VOCs or diffusible compounds, but the biocontrol of *T. atroviride* against *B. cinerea* was diminished.

4.1. Physiological and biochemical response of *T. atroviride* under abiotic stress conditions

As reported in the literature, light wavelengths that activate photosynthesis in plants delayed *T. atroviride* growth and promoted fungal sporulation compared with the darkness treatment (Schmoll et al., 2010). Fungal growth and sporulation were further increased upon mechanical injury under photoperiod (Hernández-Oñate et al., 2012). Coincidentally, we found that the number of spores was directly related to the type and degree of abiotic stress. These data suggest that *T. atroviride* delays its growth and activates the sporulation process as an adaptive response to ensure its prevalence under adverse conditions.

Trichoderma releases VOCs constitutively; however, we observed that the compound profiles varied according to the stimulus to which the fungus was exposed. In particular, the abundance of volatiles derived from fatty acids present in the fungal cell membrane (i.e., 1-octen-3-ol, 3-octanone, and 6-PP) already differed. These compounds are collectively known as oxylipins, and play important roles in regulating fungal morphogenesis, plant interactions, and biocontrol (El-Hasan et al., 2007; Nemečović et al., 2008; Steyaert et al., 2010; Garnica-Vergara et al., 2016; Medina-Castellanos et al., 2018; Speckbacher et al., 2020b). Plants and animals also produce their own oxylipins, which perform

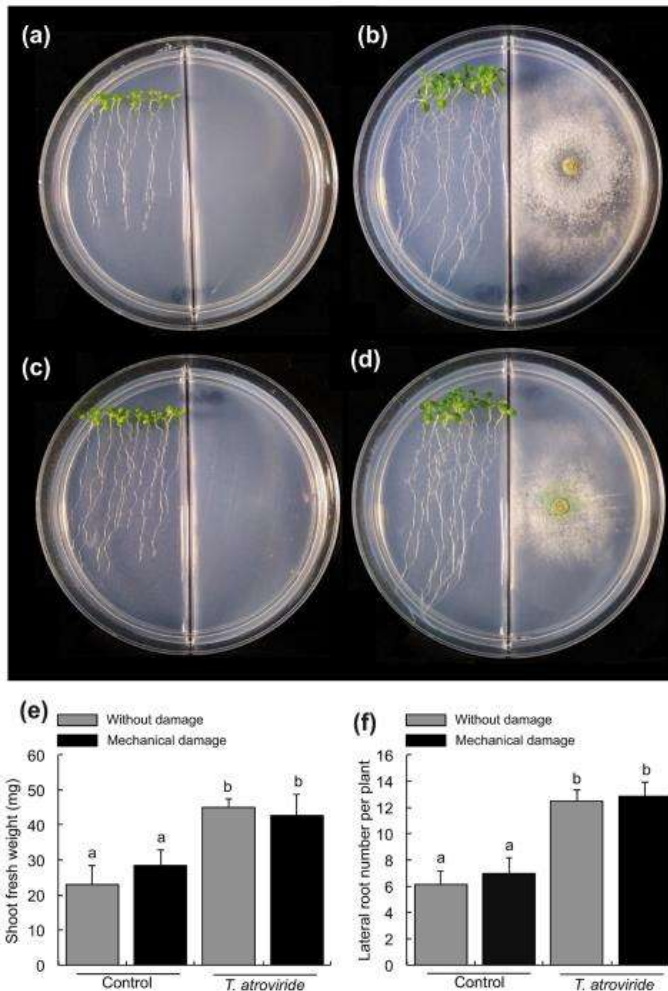


Fig. 6. Effects of volatiles released by *T. atroviride* on the *Arabidopsis* growth (a–d). Representative photographs of 9-days-old *A. thaliana* (Col-0) seedlings cultured on the surface of agar plates containing 0.2x MS medium with or without the perception of volatiles from a fungal colony with or without mechanical injury. Uninoculated control treatment (a) without or (c) with agar damage. Seedlings exposed to the fungal VOCs emitted by colonies (b) without or (d) with mycelium damage. (e) Shoot fresh weight biomass accumulation (five groups of 10 plants [$n = 5$]). (f) Lateral root number per plant ($n = 35$). Bars show the mean values \pm standard deviation. Different letters indicate statistically significant differences by two-way ANOVA Analysis and Tukey's test ($P \leq 0.05$). The experiment was repeated three times.

hormonal functions (Brodhun and Feussner, 2011; Fischer and Keller, 2016). For example, jasmonic acid (JA) is a plant oxylipin that triggers defense responses, and modulates both development and senescence (Browse, 2009).

In *Trichoderma*, the alcohol 1-octen-3-ol together with its analogs 3-octanol and 3-octanone participate in the transition from vegetative growth to conidiation (Nemčović et al., 2008), and considerable attention has been paid to the biological roles of these fungal oxylipins in other organisms (Tsitsigiannis and Keller, 2007). In-vitro experiments showed that plant perception of 1-octen-3-ol activated JA-dependent defense responses in *A. thaliana* (Kishimoto et al., 2007). To the best of our knowledge, the role of 6-PP as an inducer of conidiation in *Trichoderma* was unknown; however, its activity as a plant growth promoter (Garnica-Vergara et al., 2016), and antimicrobial agent (El-Hasan et al., 2007) points to an important role of this volatile in cross-kingdom

communication.

Here, we show that *T. atroviride* modulated the production of oxylipins according to the detrimental growth conditions perceived from the environment; therefore, it is likely that they play a key role in activating mechanisms of resistance under stress conditions. Compounds such as 3-octanone, 3-octanol, and 1-octen-3-ol increased with photoperiod and photoperiod + injury, and this effect was proportional to the production of spores. Additionally, the content of 6-PP decreased when the fungus was subjected to photoperiod and photoperiod + injury. It is logical to reason that 6-PP is a compound that is produced during the fungal growth and most likely it plays some function in such process. Furthermore, it was observed that if the 6-PP abundance decreased, the 1-octen-3-ol content increased, suggesting a negative regulation system whereby the 6-PP/1-octen-3-ol ratio is important to induce sporulation in *T. atroviride*, although further studies are needed

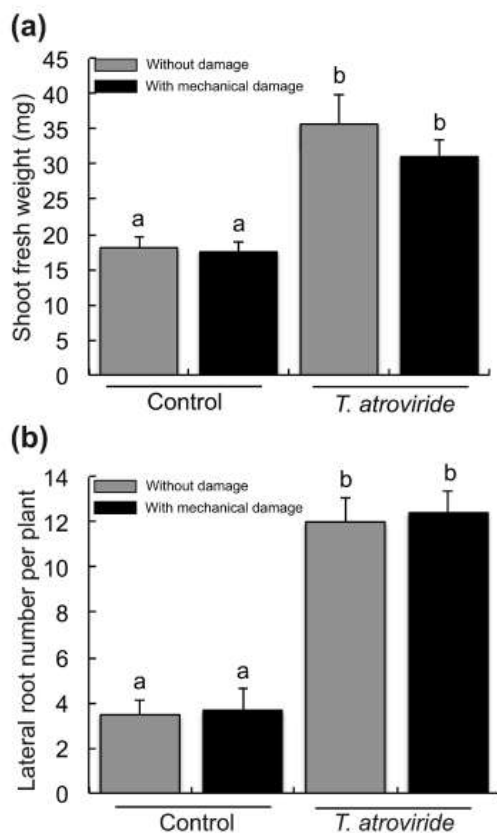


Fig. 7. Effect of root colonization of *T. atroviride* and mycelia injury on the *Arabidopsis* seedlings growth. Seedlings were germinated and grown for 4 d on the surface of agar plates containing 0.2x MS medium. *T. atroviride* was inoculated at a distance of 5 cm from the primary root tip. Two days later, the mycelium was mechanically damaged and the fungal growth was allowed for an additional 3 d for a total of 5 days of growth. (a) Shoot biomass accumulation (10 groups of 10 plants, $n = 10$), based on two independent experiments. (b) Lateral root number per plant. Bars represent the mean values \pm standard deviation ($n = 15$ plants). Control means un-inoculated plants with or without damage to the culture media. The experiment consisted of three independent replicates. Different letters indicate statistically significant differences in mean values by two-way ANOVA Analysis and Tukey's test ($P \leq 0.05$).

to verify this hypothesis.

4.2. Performance of *T. atroviride* under detrimental growth conditions: alteration of the fungal antagonist capacity

In the rhizosphere, *T. atroviride* interacts and competes with other microorganisms that include plant pathogen fungi (Harman et al., 2004). Due to the biocontrol of *Trichoderma*, many species have been studied and it is known that such fungi compete for space and nutrients, and exerts their biocontrol through antibiosis, and mycoparasitism (Harman, 2006; Kottb et al., 2015; Macías-Rodríguez et al., 2018). The fungal growth includes the production of secondary metabolites like siderophores, pyrones, terpenes, peptaibols, and hydrolytic enzymes;

which can be constitutively produced or are induced when the fungus perceives its prey (Djonović et al., 2006; El-Hasan et al., 2007; Reino et al., 2008; Contreras-Cornejo et al., 2014).

Mycoparasitism is a well-known feature of *Trichoderma* and it initiates with the recognition of a fungal prey and the subsequent attachment to and coiling around the hyphae of the plant pathogen in a mechanism that involves *Trichoderma* growth toward its host. Attachment of *Trichoderma* hyphae is regulated by the detection of lectins in the cell wall of the fungal prey, to which the *Trichoderma* hyphae bind through compatible cell wall sugars. Subsequently, the penetration occurs through the participation of hydrolytic enzymes to degrade the cell wall, whose production is induced even at previous stages of host recognition (Harman et al., 2004; Harman, 2006; Djonović et al., 2006). Dual confrontation assays *in vitro* with different plant phytopathogenic fungi showed the influence of *Trichoderma* on the growth of many fungal hosts, and such effect is enhanced under dark conditions (Speckbacher et al., 2020a).

Here, we studied the biocontrol ability of *T. atroviride* on *B. cinerea*. This necrotrophic fungus can infect at least 1400 plant species, which include more than 200 crops with economic importance causing soft rot in aerial plant parts, but also, actively grows as a saprophyte in crop debris and in organic soil matter (Williamson et al., 2007; Bardin et al., 2018). Our results show that the mechanical damage to the mycelium of *Trichoderma* reduced the biocontrol activity against *B. cinerea*. Nevertheless, the production of 6-PP with antimicrobial activity may anticipate in the antagonism to the phytopathogen, since we found that this pyrone repressed the *B. cinerea* growth in a dose-dependent manner, although its activity was more evident when the plant pathogenic fungus was grown in darkness, indicating that 6-PP may be light sensitive. Considering these findings, it will be very important to conduct future studies to determine if the mycelial injury leads to a change in the production of other metabolites or hydrolytic enzymes involved in biocontrol activity of *Trichoderma*.

4.3. Plant growth promotion: a sustained beneficial effect under unfavorable fungal growth conditions

In regard with the beneficial effects of *T. atroviride* in plants, we found that the fungus was able to emit a complex blend of VOCs and efficiently produce and release hormone-like compounds to promote the plant growth when the mycelium suffered mechanical injury. Importantly, such beneficial biochemical features in *T. atroviride* could benefit the plant growth under detrimental growth conditions. We performed experiments with two sided I-dishes where both, the plant and the fungus interacted via VOCs emission, and analyzed the direct interaction by the secretion of diffusible compounds. Detailed physiological and molecular studies revealed that in *A. thaliana*, 6-PP was responsible for the promotion of the shoot growth and root development through a mechanism involving the auxin-signaling pathway and the ethylene-response modulator *EIN2*. In this molecular interaction, 6-PP regulated the expression and distribution of the auxin transporters *PIN1* (*PIN FORMED 1*), *PIN2*, and *PIN3* in the root tip (Garnica-Vergara et al., 2016). Although the 6-PP abundance decreased with the mycelium injury, the response of the plant was maintained, confirming the efficacy of 6-PP as a plant growth promoter.

Comparable effects on plant growth were observed when *A. thaliana* roots interacted directly with the solid medium with the diffusible fungal compounds; in particular, we measured the IAA content, which increased after mycelium injury. A complementary mechanism for plant growth promotion independent of that activated by 6-PP via VOCs is the perception of soil diffusible compounds that include indolic compounds where *Trichoderma* enhances both, shoot and root biomass production in plants through auxin-dependent mechanisms (Contreras-Cornejo et al., 2009). IAA is a canonical plant growth regulator that induces shoot biomass accumulation and lateral root formation in *A. thaliana* through a molecular mechanism that involves the component AUX1-7, which is

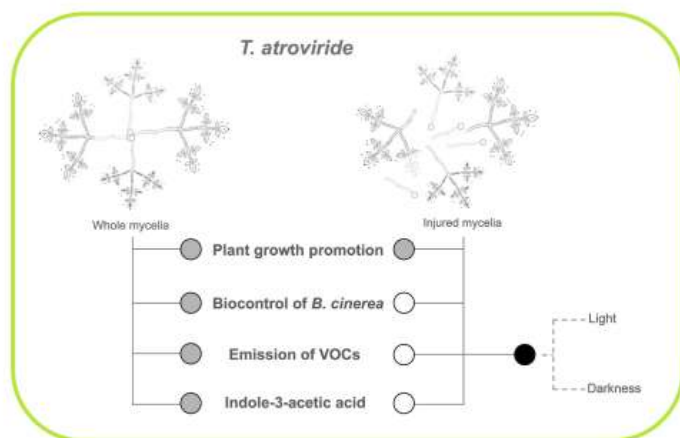


Fig. 8. Environmental stimuli can modulate different traits in *Trichoderma*. Mycelial injury reduces the biocontrol of *T. atroviride* and changes the emission of fungal VOCs and the production of IAA (open circles). In contrast, the beneficial effect of *T. atroviride* on the promotion of plant growth and development remains constant with or without mycelial injury. Gray circles indicate the unaltered effects of the fungus on the fungal performance and metabolic traits. Moreover, fungal VOCs profile changes according to light or dark conditions (black circle). The environmental growth conditions affect the integrity and the production of bioactive metabolites of *Trichoderma* and in turn the potential of the fungus for agriculture purposes.

an auxin influx that participates in both acropetal and basipetal auxin transport at the root tip (Contreras-Cornejo et al., 2009; Swarup et al., 2001). Additionally, IAA production by soil microbes is considered a major influencing plant growth and development; thus, microbial IAA has been considered as a very important signal for colonization (Spaepen et al., 2007). Our results showed that IAA production by *T. atroviride* did not decrease after mechanical damage to the mycelium but rather increased, perhaps as a signal to strengthen the symbiosis under stress conditions.

Finally, our findings show that it is important to dedicate efforts to study the ecological impact of *Trichoderma* under detrimental growth conditions since stress may affect the production of key bioactive compounds for soil health and crop performance (Fig. 8). In addition, we confirm the promising potential for 6-PP as an antifungal metabolite that could be used in field conditions, although the chemical stability of the compound in the presence of light is important to consider in the comprehensive assessment of activity during its application. Hopefully, our results provide important guidance for future research and management of plant-*Trichoderma* symbiosis in agriculture.

Contributions

H.C., J.L., and L.M. conceived and designed research. H.C., O.O., A.R. and P.G. conducted experiments. L.M. contributed new reagents and analytical tools. H.C., O.O., A.R., and L.M. analyzed data. H.C., J.L., and L.M. have been involved in drafting the manuscript. All authors reviewed the manuscript.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

We thank to Real-Santillan RO (UMSNH) for the statistical analyses. This work was financially supported by the Consejo de la Investigación Científica (UMSNH, grant number 2.24).

References

- Bardin, M., Leyronas, C., Troulet, C., Morris, C.E., 2018. Striking similarities between *Botrytis cinerea* from non-agricultural and from agricultural habitats. *Front. Plant Sci.* 9, 1820. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01820>.
- Brodhun, F., Feussner, I., 2011. Oxylipins in fungi. *FEBS J.* 278, 1047–1063. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08027.x>.
- Browse, J., 2009. Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60, 183–205.
- Carreras-Villaseñor, N., Sánchez-Arreguín, J.A., Herrera-Estrella, A.H., 2012. *Trichoderma*: sensing the environment for survival and dispersal. *Microbiology* 158, 3–16. <https://doi.org/10.1099/mic.0.052688-0>.
- Contreras-Cornejo, H.A., Macías-Rodríguez, L., Cortés-Penagos, C., López-Bucio, J., 2009. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 49, 1579–1592. <https://doi.org/10.1104/pp.108.130369>.
- Contreras-Cornejo, H.A., Macías-Rodríguez, L., Herrera-Estrella, A., López-Bucio, J., 2014. The 4-phosphopantetheinyl transferase of *Trichoderma virens* plays a role in plant protection against *Botrytis cinerea* through volatile organic compound emission. *Plant Soil* 379, 261–274. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2069-x>.
- Contreras-Cornejo, H.A., Macías-Rodríguez, L., del-Val, E., Larsen, J., 2016. Ecological functions of *Trichoderma* spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere: interactions with plants. *FEMS Microbiol. Ecol.* 92, fiv036. <https://doi.org/10.1093/fems/fiv036>.
- Crutcher, F.K., Parich, A., Schuhmacher, R., Mukherjee, P.S., Zeilinger, S., Kenerley, C.M., 2013. A putative terpene cyclase, *vt4*, is responsible for the biosynthesis of volatile terpene compounds in the biocontrol fungus *Trichoderma virens*. *Fungal Genet. Biol.* 56, 67–77. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2013.05.003>.
- Djonić, S., Pozo, M.J., Kenerley, C.M., 2006. Tyb3, α -1,6-glucanase from the biocontrol fungus *Trichoderma virens*, is involved in mycoparasitism and control of *Pythium ultimum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7661–7670. <https://doi.org/10.1128/AEM.01607-06>.
- Druzhinina, I.S., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B.A., Kenerley, C.M., Monte, E., Mukherjee, P.K., Zeilinger, S., Grigoriev, I.V., Kubicek, C.P., 2011. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 749–759. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2637>.
- El-Hasan, A., Walker, F., Schöne, J., Buchenauer, H., 2007. Antagonistic effect of 6-pentyl- α -pyrone produced by *Trichoderma harzianum* toward *Fusarium moniliforme*. *J. Plant Dis. Prot.* 114, 62–68. <http://www.jstor.org/stable/43228897>.
- Fischer, G.J., Keller, N.P., 2016. Production of cross-kingdom oxylipins by pathogenic fungi: an update on their role in development and pathogenicity. *J. Microbiol.* 54, 254–264. <https://doi.org/10.1007/s12275-016-5629-z>.
- Garnica-Vergara, A., Barrera-Ortiz, S., Muñoz-Parra, E., Raya-González, J., Méndez-Bravo, A., Macías-Rodríguez, L., Ruiz-Herrera, L.F., López-Bucio, J., 2016. The volatile 6-pentyl-2H-pyran-2-one from *Trichoderma atroviride* regulates *Arabidopsis thaliana* root morphogenesis via auxin signaling and ETHYLENE INSENSITIVE 2 functioning. *New Phytol.* 209, 1496–1512. <https://doi.org/10.1111/nph.13725>.
- Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M., 2004. *Trichoderma* species: opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 43–56. <https://doi.org/10.1038/nrmicro797>.
- Harman, G.E., 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 96, 190–194. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0190>.
- Hernández-Oñate, M.A., Esquivel-Naranjo, E.U., Mendoza-Mendoza, A., Stewart, A., Herrera-Estrella, A.H., 2012. An injury-response mechanism conserved across kingdoms determines entry of the fungus *Trichoderma atroviride* into development.

- Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am. 109, 14918–14923. <https://doi.org/10.1073/pnas.1209396109>.
- Holighaus, G., Rohlf, M., 2019. Volatile and non-volatile fungal oxylipins in fungus-invertebrate interactions. *Fungal Ecol.* 38, 28–36. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2018.09.005>.
- Kaliňák, M., Šimkovič, M., Zemla, P., Matata, M., Molnár, T., Liptaj, T., Varečka, L., Hudecová, D., 2014. Changes in metabolome and in enzyme activities during germination of *Trichoderma atroviride* conidia. *FEMS Microbiol. Lett.* 357, 201–207. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12516>.
- Kishimoto, K., Matsui, K., Ozawa, R., Takabayashi, J., 2007. Volatile 1-octen-3-ol induces a defensive response in *Arabidopsis thaliana*. *J. Gen. Plant Pathol.* 73, 35–37.
- Kottb, M., Gigolashvili, T., Großkinsky, D.K., Piechulla, B., 2015. *Trichoderma* volatiles affecting *Arabidopsis*: from inhibition to protection against phytopathogenic fungi. *Front. Microbiol.* 6, 995. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00995>.
- Macheleidt, J., Mattern, D.J., Fischer, J., Netzer, T., Weber, J., Schroeckh, V., Valiente, V., Brakhage, A.A., 2016. Regulation and role of fungal secondary metabolites. *Annu. Rev. Genet.* 50, 371–392. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet.120215-035203>.
- Maclás-Rodríguez, L., Guzmán-Gómez, A., García-Juárez, P., Contreras-Cornejo, H.A., 2018. *Trichoderma atroviride* promotes tomato development and alters the root exudation of carbohydrates, which stimulates fungal growth and the biocontrol of the phytopathogen *Phytophthora cinnamomi* in a tripartite interaction system. *FEMS Microbiol. Ecol.* 94, fy137. <https://doi.org/10.1093/femsec/fy137>.
- Medina-Castellanos, E., Villalobos-Escobedo, J.M., Riquelme, M., Read, N.D., Abreu-Goodger, C., Herrera-Estrella, A., 2018. Danger signals activate a putative innate immune system during regeneration in a filamentous fungus. *PLoS Genet.* 14, e1007390. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007390>.
- Moreno-Ruiz, D., Fuchs, A., Missbach, K., Schuhmacher, R., Zeilinger, S., 2020. Influence of different light regimes on the mycoparasitic activity and 6-pentyl- α -pyrone biosynthesis in two strains of *Trichoderma atroviride*. *Pathogens* 9, 860. <https://doi.org/10.3390/pathogens9100860>.
- Nemčović, M., Jakubíková, L., Viden, I., Farkas, V., 2008. Induction of conidiation by endogenous volatile compounds in *Trichoderma* spp. *FEMS Microbiol. Lett.* 284, 231–236. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01202.x>.
- Reino, J.L., Guerrero, R.F., Hernández-Galán, R., Collado, I.G., 2008. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochemistry Rev.* 7, 89–123. <https://doi.org/10.1007/s11101-008-9032-2>.
- Schmoll, M., Esquivel-Naranjo, E.U., Herrera-Estrella, A., 2010. *Trichoderma* in the light of day – physiology and development. *Fungal Genet. Biol.* 47, 909–916. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.04.010>.
- Serrano-Carreón, L., Flores, C., Rodríguez, B., Galindo, E., 2004. *Rhizoctonia solani*, an elicitor of 6-pentyl- α -pyrone production by *Trichoderma harzianum* in two liquid phases, extractive fermentation system. *Biotechnol. Lett.* 26, 1403–1406. <https://doi.org/10.1023/B:BILE.0000045640.71840.b5>.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., Remans, R., 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol. Rev.* 31, 425–448. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00072.x>.
- Speckbacher, V., Ruzsanyi, V., Wigger, M., Zeilinger, S., 2020a. The *Trichoderma atroviride* strains P1 and IMI 206040 differ in their light-response and VOC production. *Molecules* 25, 208. <https://doi.org/10.3390/molecules25010208>.
- Speckbacher, V., Ruzsanyi, V., Martínez-Molina, A., Hinterdobler, W., Doppler, M., Schreiner, U., Böhmendorfer, S., Beccaccioli, M., Schuhmacher, R., Reverberi, M., Schmoll, M., Zeilinger, S., 2020b. The lipoxygenase Lox 1 is involved in light- and injury-response, conidiation, and volatile organic compound biosynthesis in the mycoparasitic fungus *Trichoderma atroviride*. *Front. Microbiol.* 11, 2004.
- Steyaert, J.M., Weld, R.J., Stewart, A., 2010. Ambient pH intrinsically influences *Trichoderma* conidiation and colony morphology. *Fungal Biol.* 114, 198–208.
- Stoppacher, N., Kluger, B., Zeilinger, S., Krška, R., Schuhmacher, R., 2010. Identification and profiling of volatile metabolites of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* by HS-SPME-GC-MS. *J. Microbiol. Methods* 81, 187–193. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.03.011>.
- Swarup, R., Priml, J., Marchant, A., Ljung, K., Sandberg, G., Palme, K., Bennett, M., 2001. Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the *Arabidopsis* root apex. *Genes Dev.* 15, 2648–2653. <https://doi.org/10.1101/gad.210501>.
- Tisch, D., Schmoll, M., 2010. Light regulation of metabolic pathways in fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 1259–1277. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2320-1>.
- Tsitsiglanni, D.I., Keller, N.P., 2007. Oxylipins as developmental and host-fungal communication signals. *Trends Microbiol.* 15, 109–118. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.01.005>.
- Vicente-Hernández, A., Salgado-Garciglia, R., Valencia-Cantero, E., Ramírez-Ordorica, A., Hernández-García, A., García-Juárez, P., Maclás-Rodríguez, L., 2019. *Bacillus methylotrophicus* M4-96 stimulates the growth of strawberry (*Fragaria × ananassa* 'Aromas') plants *in vitro* and slows *Botrytis cinerea* infection by two different methods of interaction. *J. Plant Growth Regul.* 38, 765–777. <https://doi.org/10.1007/s00344-018-9888-6>.
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., Van Kan, J.A.L., 2007. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mold disease. *Mol. Plant Pathol.* 8, 561–580. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00417.x>.
- Zhang, F., Huo, Y., Cobb, A.B., Luo, G., Zhou, J., Yang, G., Wilson, G.W.T., Zhang, Y., 2018. *Trichoderma* biofertilizer links to altered soil chemistry, altered microbial communities, and improved grassland biomass. *Front. Microbiol.* 9, 848.

Chapter 4

The Role of Phytohormones in Cross-communication Between Plants and Rhizo-Microbes



Hexon Angel Contreras-Cornejo, Arturo Ramírez-Ordorica,
Mariana Álvarez-Navarrete, and Lourdes Macías-Rodríguez

Abstract Plants in their ecological niches establish multiple interactions with arthropods and rhizosphere microorganisms. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and soil-borne fungi can establish molecular dialogues with plants by producing powerful molecules such as ethylene (ET), auxins (IAA), cytokinins (CKs), and gibberellins (GAs) that activate specific molecular mechanisms that subsequently modulate specific physiological processes such as cell division, expansion, or cellular differentiation, whereas abscisic acid (ABA) or enzymatic components as the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase (ACCase) have the ability to induce resistance to different kinds of abiotic stresses as salinity and drought. The microbial root interaction might activate defense responses mediated by the phytohormones salicylic acid (SA) or jasmonic acid (JA) that result effective against the attack of plant pathogenic microorganisms (hemi- and biotrophic or necrotrophic pathogens) or chewing and piercing sucking insects. This chapter highlights the role of several microbial metabolites that impact on the molecular mechanisms modulated by phytohormones that regulate defense responses and the growth and development of plants.

Keywords Phytohormones · Plant-microbe interactions · Rhizobacteria · Secondary metabolites · Soil microbes

H. A. Contreras-Cornejo (✉) · A. Ramírez-Ordorica · L. Macías-Rodríguez
Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de
Hidalgo, Morelia, Michoacán, Mexico

M. Álvarez-Navarrete
Departamento de Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico de Morelia, Morelia,
Michoacán, Mexico

© The Author(s), under exclusive license to Springer Nature Singapore Pte Ltd. 2022
B. A. Horwitz, P. K. Mukherjee (eds.), *Microbial Cross-talk in the Rhizosphere*,
Rhizosphere Biology, https://doi.org/10.1007/978-981-16-9507-0_4

59

4.1 Introduction

Plants and microorganisms interact in practically all the ecosystems and their presence is essential to maintain life on earth due to the ecosystemic services that both provide (Herrera-Paredes and Lebeis 2016). Because plants are anchored to the soil through the roots, it is through this system that plants interact with myriads of rhizosphere microorganisms, such as bacteria, ectomycorrhizal, arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), and free-living fungi (Reboutier et al. 2002; Splivallo et al. 2009). Some microorganisms can be found associated with the seeds, stems, leaves, and fruits of plants (Romero et al. 2014; Coleman-Derr et al. 2016; Ramírez-Ordorica et al. 2020). These microorganisms induce on plants a broad range of effects that can be negative, neutral, or beneficial for the host (Newton et al. 2010; Zúniga et al. 2017). Beneficial interactions involve communication among the two organisms through signaling metabolites that are exuded by plant roots and microorganisms. These compounds subsequently are perceived by the epidermal cells of the host plant, and in turn impact on the endogenous signaling programs of the cells (Ortiz-Castro et al. 2008; Baetz and Martinoia 2014). Interactions between plants and microorganisms can be through physical contact such as root colonization or interactions without physical contact that involve the exchange of low molecular weight compounds that function as specific signals to modulate some physiological, biochemical, or molecular processes in the recipient organism (Ryu et al. 2003; Contreras-Cornejo et al. 2009; Rasmann and Turlings 2016). Rhizosphere bacteria and fungi produce a number of metabolites that when perceived in the target cell can function as phytohormones in plants (Splivallo et al. 2009; Shi et al. 2017). To date, the number of microbial metabolites identified is broad and several of them have plant growth modulatory activity that resembles the function of the canonical phytohormones but such compounds have very different chemical structure, thus the molecular mechanisms through which the plants perceive and respond to them are hot topics at this moment (Contreras-Cornejo et al. 2015a, b, c; Garnica-Vergara et al. 2016).

On the other hand, some compounds of microbial origin can also activate defense responses. Under starvation, rhizosphere microorganisms can release low molecular weight compounds or peptidic compounds that stimulate plant immunity. Such defensive priming has been found to be effective to resist the attack of plant pathogen microorganisms or even herbivorous insects (Battaglia et al. 2013; Coppola et al. 2019a, b; Contreras-Cornejo et al. 2020a, b). In order to illustrate the biological, ecological, and agricultural importance of the microorganisms in the rhizosphere, this chapter describes the most recent scientific advances that highlight some secondary metabolites of microbial origin that are perceived by plants and modulate different aspects of growth, development, and defense under different environmental conditions.

4.2 Microorganisms in the Rhizosphere

Soil microorganisms include various genera and species of bacteria, fungi, oomycetes, nematodes, and amoebae (Newton et al. 2010; van Dam and Bouwmeester 2016). The composition of the microbial communities in the rhizosphere differs between plant species (Hardoim et al. 2008; Redford et al. 2010). For example, *Arabidopsis thaliana* rhizosphere community is mainly associated with bacterial phyla Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Firmicutes, Gemmatimonadetes, and Proteobacteria (Lundberg et al. 2012). Plant root exudates, soil pH, nutrients availability, soil humidity, and other abiotic factors participate in the modulation of the microorganism populations (Kim and Lee 2020; Juan-Ovejero et al. 2020). Microorganisms have important roles for the optimal functioning of the ecosystem, for example: mobilization and stabilization of carbon, organic matter decomposition, nutrient mineralization and biocontrol of pathogenic microorganisms, and the different types of interactions with plants (Mitchell et al. 2003).

Microbial community structure is dependent on temperature variations (Manzoni et al. 2012). The depth in the soil can affect the location of microorganisms; the microbial population is found to be more in aerated soils (Liu et al. 2016). Additionally, the edaphic properties of the soil, for example, the concentrations of electron donors or acceptors in bulk soil, agricultural practices as the utilization of organic nitrogen fertilizers, and plant vegetation cover species, can largely modulate impact in microbial communities assemblage (Caradonia et al. 2019; Yuan et al. 2019). In a recent report it was shown that the microbiota of tomato (*Solanum lycopersicum*) is constituted mainly by members of Actinobacteria, Bacteroidetes, Alpha-, Beta-, Gamma-, and Deltaproteobacteria and Verrucomicrobia (Caradonia et al. 2019). However, in the peatland rhizosphere, the phyla Ascomycota and Basidiomycota are fungal communities present at 46% and 40%, respectively (Thormann et al. 2007). Otherwise, the lifestyles of the microorganisms determine if they can live freely in the rhizosphere, or if they form endophytic associations with plants (Akiyama et al. 2005; Bae et al. 2011).

4.3 Plant-Microorganism Interaction

The microorganisms in the rhizosphere may have no apparent effect on plants, be harmful if they cause disease, or can be beneficial for plants. Beneficial microorganisms can stimulate plant growth through: (1) direct mechanisms, by the production of growth regulating molecules, and processes that improve the acquisition of macronutrients (N, K, Ca, Mg, P, and S) and micronutrients (Fe, B, Mn, Zn, Cu, Mo, and Ni), and (2) indirect mechanisms, mainly by the biocontrol of phytopathogen microorganisms (Contreras-Cornejo et al. 2016; Ramakrishna et al. 2019). It has often been observed that beneficial soil microorganisms stimulate plant immunity

and promote resistance to different types of abiotic stress such as those caused by water deficit, salinity, or soil contamination by heavy metals (Martínez-Medina et al. 2019; Kim and Lee 2020).

Root exudates are an important source of compounds to enrich the rhizosphere near to the plants with nutrients, and as a consequence the microorganisms in close association with the root increase their population density and association with the plants (Zúniga et al. 2017; Sasse et al. 2018). Plant metabolites or those of microbial origin, depending on their physicochemical characteristics, can be diffused through the rhizosphere or towards the atmosphere (Tyc et al. 2017). Plants release the root compounds that are exuded through passive processes such as diffusion, channels, vesicular transport, or more complex processes as ATP-binding cassette (ABC) transporters (Baetz and Martinoia 2014). Some compounds derived from plants function as signaling molecules to attract the beneficial microorganisms towards the root, and later root colonization takes place (Akiyama et al. 2005).

In the case of associations established by AMF, host plants initiate the interaction through the production and release of stringolactones that are carotenoid-derived compounds of low molecular weight less than 500 Da (Rasmann and Turlings 2016). These metabolites, when perceived by the fungal spores, promote the growth of the hyphae towards the host plant. Specifically, root exudates from *Lotus japonicus* plants release 5-deoxy-stringol, which at concentrations of 30 pg to 100 ng is a branching factor for *Gigaspora margarita* hyphae (Akiyama et al. 2005). It is known that plants growing in phosphorus limitation are forced to increase their ratio of root exudation, which favors the exudation of agents that promote the branching of AMF hyphae (Nagahashi and Douds 2000). In the rhizosphere, there are some species of fungi that also establish associations with plants and colonize the roots without apparent participation of signaling molecules that favor interaction; such is the case of the endophytic fungus *Piriformospora indica* that colonizes the root tissue of barley (*Hordeum vulgare* L.) (Waller et al. 2008).

Soil microorganisms can perceive the components present in root exudates (De Weert et al. 2002). More recently it was shown that during plant-*Trichoderma* interactions, plants release oxylipins and carbohydrates through root exudates that are perceived by the fungus and function as chemotactic agents for the attraction of the microorganism towards the root (Lombardi et al. 2018; Macías-Rodríguez et al. 2018). In the particular case of tomato plants inoculated with *Trichoderma atroviride* IMI 206040, it was observed that before physical contact between the two organisms, the plants mainly exude the monosaccharides arabinose, xylose, glucose, myo-inositol, and fructose. Later, when *T. atroviride* grew towards the root, the levels of carbohydrate exudation were slightly reduced and the exudation of sucrose that served as a nutritional and as a carbon source for the fungus increased its levels (Macías-Rodríguez et al. 2018).

In regard with the associations of rhizobia with roots, it is known that plants release flavonoids which are chemotactic agents for nitrogen-fixing bacteria and in response such bacteria release molecules named "nod factors," which are substances structurally related to acylated chitin oligomers (Bisseling and Geurts 2020). It has been assumed that plants in the cell membrane possess a receptor for nod factors,

which is a heterodimeric receptor that in *Medicago truncatula* is composed of the kinases LYSM DOMAIN-CONTAINING RECEPTOR LIKE KINASE 3 (MTLYK3) and NOD FACTOR PERCEPTION (MtNFP) (Zipfel and Oldroyd 2017). Then, in order to activate this mechanism, bacteria approach the proximity of the root hairs, and such structures cover the bacterial cell, thus forming the nodule where the fixation of atmospheric nitrogen will occur (Oldroyd et al. 2011; Podlešáková et al. 2013).

4.3.1 Root Perception of Microbial Signals

Changes in the shape and structure of the root are often the result of the perception of microbial signals by the host plant cells (Gutiérrez-Luna et al. 2010). Table 4.1 shows the physicochemical properties of the canonical phytohormones. Some of them can be produced by rhizosphere microorganisms. Depending on the type of signal, microbial molecules can induce changes in the plasticity of the root system, which implies an increase in the formation of secondary roots and root hairs (Contreras-Cornejo et al. 2009, 2015b; Garnica-Vergara et al. 2016). These changes in the root system allow the plants a more vigorous anchoring to the soil, improved uptake of water and nutrients and a greater contact surface with the microorganisms of the rhizosphere (Ortiz-Castro et al. 2009). Figure 4.1 shows the impact of the inoculation of *Bacillus amyloliquefaciens* M496 on the growth of maize and *Medicago truncatula* plants grown in MS medium. Bacterial inoculation enhances both shoot length growth and root branching, which suggests that such strain uses an

Table 4.1 Physicochemical properties of phytohormones

Name	Molecular formula	Molecular mass (g/mol)	Density (g/cm ³)	Appearance	Class of compound
Indole-3-acetic acid (IAA)	C ₁₀ H ₉ NO ₂	175.19	1.4 ± 0.1	White solid	Indolic compound
Ethylene (ET)	C ₂ H ₂	28.05	1.138 ^a	Colorless gas	Hydrocarbon
Absciscic acid (ABA)	C ₁₅ H ₂₀ O ₄	264.32	1.2 ± 0.1	Colorless solid crystals	Isoprenoid-derived compound
Zeatin (CK)	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O	219.24	1.4 ± 0.1	Yellowish to off-white crystals	Adenine-derived compound
Jasmonic acid (JA)	C ₁₂ H ₁₈ O ₃	210.27	1.1 ± 0.1	Off-white oil	Oxylipin-derived compound
Salicylic acid (SA)	C ₇ H ₆ O ₃	138.12	1.4 ± 0.1	White solid	Phenolic compound

Partial information in this table was taken from Contreras-Cornejo et al. (2009, 2015a, b)

^aThis property is in kg/m³ at 25 °C

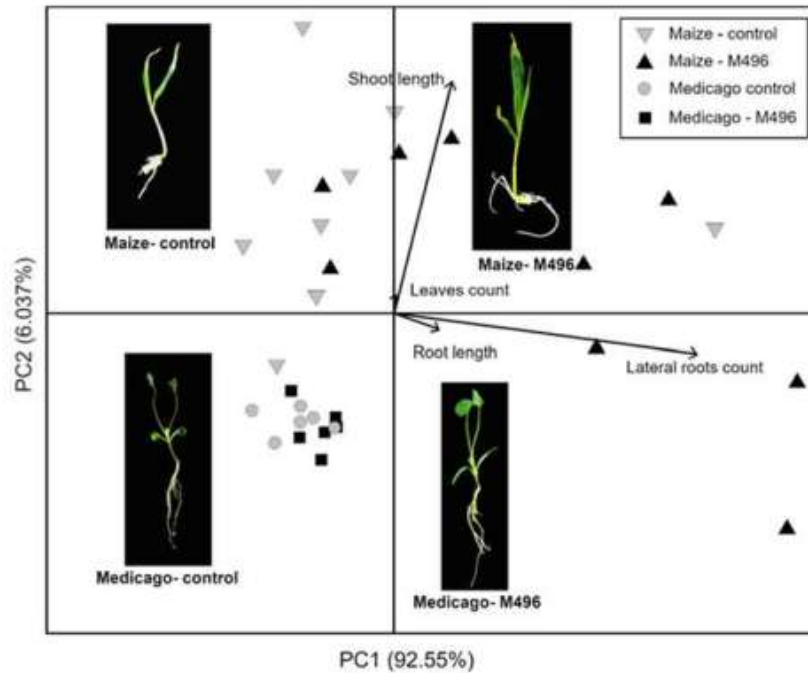


Fig. 4.1 Principal component analysis (PCA) that highlights the effects of *Bacillus amyloliquefaciens* M496 on maize and *M. truncatula* plants. Notice that the main effect of this microorganism is promoting shoot growth and lateral root formation. This pattern suggests a plant species-independent response to the same bacterial strain

efficient mechanism to induce beneficial effects on mono- and dicotyledonous plants.

Some bacteria and fungi in the rhizosphere can produce metabolites that directly impact some signaling pathways, modulated by canonical phytohormones, thus producing the typical hormonal effects at the physiological level (Splivallo et al. 2009; Contreras-Cornejo et al. 2014a, b; Garnica-Vergara et al. 2016; Gouda et al. 2018). Figure 4.2 shows the chemical structure of some phytohormones. However, there are some microbial compounds that can antagonize the effect of phytohormones (Reboutier et al. 2002). For example, the basidiomycetous fungus *Pisolithus tinctorius* that establishes ectomycorrhizas with *Eucalyptus globulus* releases an indole alkaloid metabolite called hypaphorine that reduces the root hair elongation and counteracts the activity of the auxin IAA (Ditengou and Lapeyrie 2000; Reboutier et al. 2002). Below are described some rhizospheric microorganisms, microbial metabolites, and the molecular mechanisms that are modulated in plants when both kind of organisms cointeract.

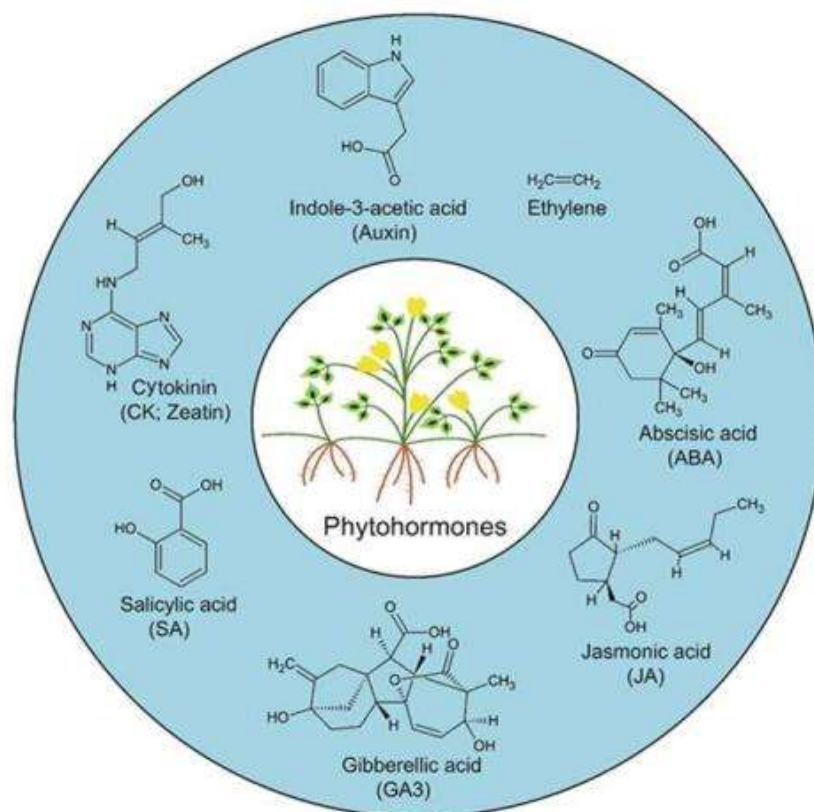


Fig. 4.2 Molecular structures of the seven canonical phytohormones. Rhizosphere microorganisms as bacteria or fungi can produce this class of compounds. To the best of our knowledge JA has not been identified in microorganisms but beneficial plant microorganisms activate its signaling mechanism. Notice differences among chemical structures

4.3.1.1 Auxins

Auxins are a group of compounds whose main chemical characteristic is that they have the indole molecule as structural base. It is known that a large number of pathogenic and beneficial soil bacteria and fungi produce auxins (Contreras-Cornejo et al. 2020b). The main auxin in plants that participates in multiple development processes is indole-3-acetic acid (IAA). The IAA biosynthesis pathway starts from chorismate from which anthranilate results, and then the amino acid tryptophan (Spaepen et al. 2007). In bacteria, several routes have been proposed for IAA biosynthesis that use the following metabolites as precursors: (1) indole-3-acetamide, (2) indole-3-pyruvate, (3) tryptamine, and/or (4) indole-3-acetonitrile

(Spaepen et al. 2007). It has been speculated that IAA released to the environment is present in its protonated form because the rhizosphere is considered a weakly acidic environment (Hinsinger et al. 2003).

The IAA signaling mechanism starts when the molecule is perceived by influx transporters (i.e., AUX1) and these internalize the phytohormone within the cell (Swarup et al. 2001). Also involved in auxin transport are the efflux transporters PIN FORMED 2 (PIN2, also named EIR1) (De Billy et al. 2001). Subsequently, IAA binds to the nuclear receptor TIR1 (a F-box protein transport inhibitor 1) (Kepinski and Leyser 2005). In *Arabidopsis thaliana*, three other auxin receptors, named AFB1, AFB2, and AFB3, have also been identified (Dharmasiri et al. 2005; Parry and Estelle 2006). TIR1 is part of the SCF^{TIR1} complex that participates in the ubiquitination of proteins that will later be degraded. When IAA binds to the TIR1 receptor, part of the SCF^{TIR1} ubiquitination molecular complex, the degradation of Aux/IAA proteins which repress the expression of auxin response genes is promoted (Spaepen et al. 2007). Auxins modulate different genes that are classified into the following families: *Gretchen Hagen 3 (GH3)*, *auxin/indole-acetic acid-inducible (AUX/IAA)*, and *small auxin up RNA (SAUR)* genes (Zhao et al. 2014). There is another family of genes different from those described above and it is named as *auxin-repressed proteins (ARP)* whose expression is also modulated by IAA (Lee et al. 2013). The modulation of the auxin signaling pathway during the plant-microorganism interaction has been shown in the case of poplar (*Populus tremula* × *Populus alba*) inoculated with the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* which induced the formation of lateral roots and increases of the auxin levels at the root tips. Treatments of plants with 1-naphthylphthalamic acid, an auxin transport blocker, affected the accumulation of auxins and the development of lateral roots. An oligoarray analysis in plants that perceived the metabolites released by the fungus revealed important changes in the expression of several genes belonging to the molecular mechanism of auxins as *PtaPIN* and *PtaAUX* of the auxin transport, *PtaGH3* involved in auxin conjugation, and *PtaIAA* genes involved in the signaling of auxins (Felten et al. 2009). In vitro assays between *Arabidopsis thaliana* and *Trichoderma virens* Gv29-8 revealed that the fungus promotes plant growth. The beneficial effect on the accumulation of foliar biomass, induction of lateral roots, and formation of root hairs was the result of the production of IAA ($13.48 \pm 0.97 \mu\text{g/L}$), indole-3-acetaldehyde ($59.40 \pm 4.47 \mu\text{g/L}$), and indole-3-ethanol ($72.33 \pm 1.41 \mu\text{g/L}$). Genetic confirmation for the participation of IAA in the foliar growth promotion of *Arabidopsis thaliana* by *T. virens* Gv29-8 was supported by the phenotype of the plant due to the reduced response on growth promotion in the mutants *aux1-7*, *eir1-1*, and *axr1-3* inoculated with the fungus (Contreras-Cornejo et al. 2009).

IAA can also interact with the ET signaling pathway and modulate plant development as evidenced by the production of this volatile hormone and its release from the truffle mycelium and due to its hormonal activity on the host plant *Cistus incanus* and non-host *Arabidopsis thaliana* (Splivallo et al. 2009). In the case of the in vitro interaction between *Trichoderma atroviride* IMI206040 and *Arabidopsis thaliana*, it has also been observed that the fungus modulates plant growth by activating the IAA

and ET pathways, with cross talk between both hormonal response pathways. This complex signaling mechanism involves the activity of the MAP kinase MPK6, which is induced after 15 min by 1 μ M of IAA and by high concentrations of indole-3-acetaldehyde and indole-3-ethanol produced by *T. atroviride* IMI206040. In this interaction, MPK6 possibly functions as a repressor element, which results in the activation of molecular events, leading to the negative regulation of the formation of lateral roots, root hairs, and the growth of the primary root (Contreras-Cornejo et al. 2015b). In the same work, it was found that the fungus activates the ET pathway through the production of this phytohormone; the developmental processes that ET regulates on the root system for the formation of lateral roots and root hairs involve the components of the ET pathway (ET RESPONSE 1) ETR1, ETHYLENE INSENSITIVE 2 (EIN2), and EIN3, probably using MPK6 and CTR1 as modulators of fungal signals between IAA and ET pathways (Contreras-Cornejo et al. 2015b). In the case of the plant-pathogen interaction a key role for *OsGH3.1* in the induction of rice resistance against *Magnaporthe grisea* was evidenced in experiments with the transformant plant overexpressing *OsGH3.1* because in such lines the resistance to the pathogenic fungus was higher (Domingo et al. 2009).

4.3.1.2 ACCase/Ethylene (ET)

Some rhizospheric microorganisms such as the bacterium *Burkholderia phytofirmans* PsJN can promote plant growth through the action of the enzyme called 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase [ACCase] (Sessitsch et al. 2005). This mechanism begins when the microorganisms that possess ACCase perceive the ACC exuded by the roots of the plants, and this organic acid is cleaved into α -ketobutyrate and ammonia (Santoyo et al. 2016). ACCase encoding gene has been identified in several microorganisms that include the yeast *Hansenula saturnus*, *Trichoderma asperellum* T203, and *Penicillium citrinum* (Minami et al. 1998; Jia et al. 1999; Viterbo et al. 2010).

It has been proposed that the amino acid L-methionine is used as a precursor for the production of α -keto- γ -(methylthio) butyric acid, and due to its photosensitive properties it releases ET (Splivallo et al. 2009). In microorganisms, there are at least two ET biosynthetic pathways involving the compounds 2-oxo-4-methylthiobutyrate (OMTB) or 2-oxoglutarate (Cristescu et al. 2002). The OMTB pathway has been found to exist in the fungi *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, and in the bacterium *Pseudomonas syringae* (Nagahama et al. 1994; Weingart et al. 1999; Cristescu et al. 2002).

ET is a gaseous molecule of very low molecular weight that coordinates different aspects of plant physiology such as development and defense (Jaroszuk-Ścisiel et al. 2019). In *Arabidopsis thaliana*, at least five receptors of ET have been detected called: ET RESPONSE 1 (ETR1), ETR2, ET RESPONSE SENSOR1 (ERS1), ERS2, and ET INSENSITIVE 4 (EIN4) (Kazan 2015). The activation of these receptors causes repression of CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE 1 (CTR1), that permits ETHYLENE INSENSITIVE 2 (EIN2) to relay the ET signal to the

transcription factors EIN3 and ETHYLENE-INSENSITIVE3-LIKE (EIL). Then, EIN3 activates ETHYLENE RESPONSE FACTOR 1 (ERF1), inducing the expression of ET-responsive genes (Huang et al. 2003; Kieber et al. 1993; Sánchez-Rodríguez et al. 2010). Nine genes encoding ACC synthetases (ACS) have been detected in *Arabidopsis thaliana* (Tsuchisaka and Theologis 2004). It is known that *Piriformospora indica* induces changes in the expression of the *ACS1* and *ACS8* genes in the tips of the roots of reporter plants that express the activity of β -glucuronidase (GUS) (Khatabi et al. 2012).

4.3.1.3 Cytokinins (CKs)

These types of compounds are derivatives of N₆-substituted adenine compounds (Wang et al. 2017). Some plant-mutualistic bacteria such as *Sinorhizobium meliloti* and *Mesorhizobium loti* have been detected to produce CKs (Lohar et al. 2004; Frugier et al. 2008). In *Streptomyces turgidiscabies*, the causal agent of potato scab, a biosynthetic pathway for this phytohormone has also been detected (Joshi and Loria 2007). For several decades, it has been known that *Agrobacterium tumefaciens* transfers to its host plants a specific fragment of DNA (transfer DNA [T-DNA]) that comes from a tumor-inducing (Ti) plasmid and among the genes that are encoded in such plasmid, a *trans*-zeatin synthesizing gene is found, which promotes the production of *trans*-zeatin in bacteria (Hwang et al. 2013).

In plants, CKs promote cell division but also participate in various processes associated with active growth, metabolism, and in modulating defense responses (Giron et al. 2013). CKs are active at the site of their synthesis, but also at distal sites where they are concentrated after being transported from other very distant parts (Zhao 2008). It has been detected in *Arabidopsis thaliana* that the transporter ABCG14 (an ATP-binding cassette) regulates the translocation of ¹⁴C-*tZ* type CK from roots to foliages through the xylem (Ko et al. 2014).

In *Medicago truncatula*, the CK signaling mechanism is triggered when the phytohormone is perceived by the extracellular cyclase/histidine kinase-associated sensing extracellular domain in the CK response 1 (CRE1) transmembrane receptor (Gonzalez-Rizzo et al. 2006; Kundu and DasGupta 2018). On the other hand, the endophytic fungus *Piriformospora indica* can promote the growth of the model plant *Arabidopsis thaliana* by activating CKs signaling; importantly, increases in the content of *cis*-CKs were detected in the roots of the plant and there is evidence that shows that the combination of the CRE1/AHK2 receptors is necessary during the signaling mechanism (Vadassery et al. 2008).

It has been identified in rice plants (*Oryza sativa*) infected with the pathogen *Magnaporthe oryzae*, that there is a space-dependent hormonal modulation between components of the signaling pathway mediated by CKs and ABA. In the early stages of the infection by *M. oryzae*, a suppression of the immune system occurs in the plant, which is partly related to the activation of the signaling pathway mediated by ABA, which leads to activation of the signaling pathway modulated by CKs and the expression of genes that code for sugar transporters (Cao et al. 2016).

In *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia-0, an interesting effect on the modulation of the components of the CKs and auxins signaling pathways has been detected during the clubroot disease caused by the obligate biotrophic *Plasmodiophora brassicae*. During this disease, genes belonging to the *GH3* family and members involved in the auxin homeostasis were upregulated. In contrast, some components involved in the CK homeostasis were downregulated (Siemens et al. 2006). It is known that in early stages of the interaction, *Plasmodiophora* provides CKs to the host plant, which causes a re-initiation of cell division in the cortex, and consequently several signaling and metabolic events occur that will allow to maintain the plant pathogen and later the gall formation (Devos et al. 2006).

4.3.1.4 Gibberellins (GAs)

These compounds act in multiple processes of plant growth such as modulation of cell division in growing tissues, stem elongation, flowering, seed germination, fruit formation, and senescence (Yamaguchi 2008; Hamayun et al. 2009). GAs are tetracyclic diterpenoid molecules (Qin et al. 2013). These types of compounds are produced by various bacteria and fungi and a little more than 130 molecules structurally related to GAs have been identified (Contreras-Cornejo et al. 2015c).

Initially, these molecules were identified in the phytopathogenic fungus *Fusarium fujikuroi* (teleomorph *Gibberella fujikuroi*) which attacks rice plants (*Oryza sativa*), but also in other microorganisms such as the phytopathogenic bacterium *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* and *Mesorhizobium loti* MAFF303099 (Nett et al. 2017). These compounds have also been identified in *Sphaceloma manihoticola*, strains of *Phaeosphaeria* sp. (MacMillan 2002; Bömke and Tudzynski 2009). The main active molecule in plants of this group of compounds is gibberellic acid 3 (GA3), although there is evidence showing that GA4 is the most active in *Arabidopsis thaliana* (Contreras-Cornejo et al. 2015c). In the signaling mechanism, bioactive GA in the plant promotes the interaction of the GA-Insensitive Dwarf 1 receptor (GID1) with DELLA proteins (Hirano et al. 2008). The signaling mechanism of GAs is finely modulated through the inactivation of bioactive GAs by modifying the molecular structure through the epoxidation of the 16, 17 double bond of GAs by the enzymatic activity of a cytochrome P450 monooxygenase, or alternatively by the methylation of the molecule by the action of GA methyl transferases (Zhu et al. 2006; Varbanova et al. 2007). In bacteria the production of GAs is modulated by a cytochrome P450 (CYP)-rich operon. This group of enzymes in turn produces *ent*-kaurene which is the predecessor intermediate product of (*E,E,E*)-geranylgeranyl diphosphate, which will be the substrate of the *ent*-copalyl diphosphate synthase and the resulting product of this reaction will be the target of the *ent*-kaurene synthase (Morrone et al. 2009; Hershey et al. 2014). The operon that regulates the production of GAs has been identified in nitrogen-fixing rhizobacteria and in phytopathogenic microorganisms. There is evidence to suggest that GA9, which is inactive in plants and which is produced by rhizobia, is converted by the plant to its active form GA4, this probably in order to block further nodulation

(Tatsukami and Ueda 2016). The signaling mechanism of these phytohormones is also key in establishing symbiotic interactions. There is evidence showing that GAs and the GID1 receptor are components involved during the interaction of *P. indica* with roots (Schäfer et al. 2009). Similarly, gibberellin DELLA proteins are components that modulate arbuscular mycorrhizal symbioses (Foo et al. 2013).

4.3.1.5 Abscisic Acid (ABA)

This phytohormone is involved in modulating various physiological processes in plants such as abscission of leaves and stomatal opening to control transpiration and gas exchange that implies the entry of CO₂ that will be used during photosynthesis (Brodribb and McAdam 2011). ABA is also involved in the modulation of lateral root development and in the activation of mechanisms of resistance or tolerance to abiotic stress caused by water deficit or salinity (Achard et al. 2006). The ABA signaling mechanism occurs in the nucleus of cells. The phytohormone has a heterodimeric receptor made up of the RCAR protein (REGULATORY COMPONENT OF ABA RECEPTOR) and the PP2C protein (PROTEIN PHOSPHATASE TYPE 2C) that includes ABI1 (ABSCISIC ACID INSENSITIVE 1 [ABI1]). PP2Cs phosphatases have been proposed to regulate the ABA pathway by repressing the activity of the SUCROSE-NONFERMENTING KINASE1-RELATED PROTEIN KINASES (SnRKs) protein kinases. However, in the presence of ABA the activity of PP2Cs is inhibited. As a consequence, the repressed protein kinases are released, remaining active to phosphorylate the respective components of the ABA pathway, such as bZIP (basic leucine zipper) transcription factors such as ABI5 (Raghavendra et al. 2010). Two mutants insensitive to ABA, *abi1* and *abi2* have been isolated in *Arabidopsis thaliana*; such mutants have the characteristic that they do not close their stomata in response to the exogenous application of ABA (Allen et al. 1999). On the other hand, ABI4 is a transcriptional factor of the APETALA 2 (AP2) type that is modulated in response to ABA during plant development or in response to salt and sugar (Arroyo et al. 2003; Finkelstein et al. 2011). In vitro experiments to study the interaction between *Arabidopsis thaliana* and *T. virens* Gv29-8 and *T. atroviride* IMI206040 showed that both fungal species modulate the opening of stomata in leaves. This effect was correlated with the modulation of leaf transpiration. Interestingly, it was found that the *abi1-1* and *abi2-1* mutants did not close their stomata in response to the fungal inoculation, suggesting that modulation of stomatal activity by *Trichoderma* involves the ABA pathway. Chemical analysis revealed that *T. virens* Gv29-8 and *T. atroviride* IMI 206040 produce ABA, and that both species modulate the expression of the reporter gene *abi4:uidA* (Contreras-Cornejo et al. 2015a).

However, other types of metabolites of bacterial and fungal origin have been identified and they are not structurally related with the typical phytohormones but can also activate growth and development processes in plants. Below are described some of such compounds and the mechanisms that they activate when communicating with plants.

4.3.1.6 Homoserine Lactones

Different Gram-negative bacteria have a self-modulation system known as “Quorum-Sensing” (QS) through a group of metabolites identified as homoserine-lactones (HSL), and themselves regulate their population density, motility, biofilm formation, and biosynthesis of both exopolysaccharides and siderophores (Chalupowicz et al. 2008; Zúñiga et al. 2017). The QS system of bacteria is key in the establishment and colonization of these microorganisms on their host plant as revealed in *Arabidopsis thaliana* and maize (*Zea mays*) (Coutinho et al. 2013; Zúñiga et al. 2013). *Paraburkholderia phytofirmans* PsJN is known to have two different QS systems named BpI.1/R.1 and BpI.2/R.2 (Bral/R-like QS system) that modulate HSL production (Zúñiga et al. 2017).

HSL have an acyl chain and when they are perceived by the roots of the plants they can be captured towards the interior of the root and modulate the root growth (Götz et al. 2007; Ortíz-Castro et al. 2008; von Rad et al. 2008). For example, it has been observed that the modulation of the growth of rice (*Oryza sativa*) plants by the *Pseudomonas aeruginosa* PUPa3 system is due in part to the regulation of QS by acyl-homoserine lactones (Steindler et al. 2009). The QS system has also been reported in the host-specific tumorigenic pathogen bacterium *Pantoea agglomerans* pv. *gypsophillae*. This microorganism mainly biosynthesizes *N*-butanoyl-L-homoserine lactone (C₄-HSL) and *N*-hexanoyl-L-homoserine lactone (C₆-HSL) in lower concentrations (Chalupowicz et al. 2009).

Interestingly, it has been observed that the modulation of galls induced by *P. agglomerans* is due to the modulation of the QS system, auxin levels, and CK (Chalupowicz et al. 2009). It is known that HSL *N*-decanoyl-homoserine lactone (C₁₀-HLS) can regulate the growth of *Arabidopsis thaliana* (Ortíz-Castro et al. 2008). Interestingly, *N*-3-oxo-hexanoyl-homoserine lactone (3OC₆-HSL) stimulates the elongation of the primary root of *Arabidopsis thaliana*. This effect on the roots was correlated with the increase in the expression of the *AtMYB44* gene that codes for a transcriptional factor involved in plant defense and saline stress. The effect of 3OC₆-HLS on root elongation was affected in the *atmyb44* mutant. It was detected that the modulation of root growth by 3OC₆-HSL was due in part to the regulation of the expression of genes *ARR15* and *ARR4* in response to CK and *IAA7*, *IAA14*, and *MAX2* in response to auxins, respectively (Zhao et al. 2016).

4.3.1.7 Polyamines

Polyamines are a class of low molecular weight compounds found in higher organisms, microorganisms, and plants. The most common are cadaverine, putrescine, spermine, and spermidine. It is known that *Azospirillum brasilense* Az30 can promote the root growth of rice plants in a mechanism partially mediated by the production of cadaverine (Cassán et al. 2009). Recently, Xie et al. (2014) reported that *Bacillus subtilis* OKB105 has the ability to promote the growth of *Nicotiana*

tabacum plants and spermidine was identified as one of the molecules responsible for regulating this phenotype in plants. The growth promotion of *N. tabacum* by *B. subtilis* involved the induction of the expression of cell expansion genes *Nt-EXPA1* and *Nt-EXP2* and the inhibition of the *Nt-ACO1* gene that encodes a 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase that participates in the biosynthesis of ethylene.

4.3.1.8 Volatile Organic Compounds

Soil microorganisms emit volatile metabolites that fulfill multiple functions in ecosystems and among the activities is the communication between the members of the microbial community and with the associated plants (Camarena-Pozoz et al. 2018). Although some rhizobacteria and rhizosphere fungi are grouped in the same genus, there may be differences at the metabolic level, and as a consequence they impact differently on the physiology of plants (Gutiérrez-Luna et al. 2010; Contreras-Cornejo et al. 2014a, b; Garnica-Vergara et al. 2016; Guo et al. 2020). Table 4.2 shows some particular cases of plant growth-promoting rhizobacteria and their chemicals that are bioactive on plants. It has been observed that volatile metabolites that alter plant growth have molecular masses of less than 300 Da and are of lipidic nature (Fincheira and Quiroz 2018; García-Gómez et al. 2019). However, there is still too much work to do on the role of microbial volatile metabolites in different interactions because ~2000 volatile compounds have been identified from 1000 microbial strains (Lemfack et al. 2018). It has been observed that the soil bacteria *Enterobacter cloacae*, *B. amyloliquefaciens*, and *B. subtilis* can promote plant growth through the emission of volatile compounds (Lugtenberg and Kamilova 2009).

In a study carried out by Gutiérrez-Luna et al. (2010) with several isolates of rhizobacteria to evaluate their effect on the growth promotion of *Arabidopsis thaliana* through the emission of volatile organic compounds, it was found that the isolates L254 and L272a, although both belong to the genus *Bacillus*, had a very different impact on the growth and development of the root system as evidenced by the different pattern of lateral root and root hair formation. When chemical analyses were performed to determine the profile of the volatiles emitted by the bacterial isolates L254, L255, L265a, L266, L270, and L272a, the following metabolites were found: 1-butanol, 6-methyl 2-heptanol, 2-nonenal, 1-octen-3-ol, benzaldehyde, butyrolactone, acetophenone, tridecanal, tetradecanal, 4-decanone, 6-undecanone, 5-tridecanone, cyclododecane, 3-tetradecanone, 2-pentadecanone, 1-tridecanol, 6,10,14-trimethyl 2-pentadecanone, 2-pentadecanol, 9-octadecanone, 4-octadecyl morpholine, cyclododecane, and 2-morpholinomethyl-1,3-diphenyl-2-propanol.

It has been determined that *T. vires* Gv29-8 releases a mixture of VOCs constituted in part by mono (C_{10})- and sesquiterpenes (C_{15}) that included camphene, 3-carene, β -myrcene, β -phellandrene, eucalyptol, *trans*- β -ocimene, β -terpinene, β -caryophyllene, τ -cadinene, δ -cadinene, α -amorphene, and τ -selinene. In experiments carried out in vitro in Petri dishes to test the effects of the *T. vires* VOCs on

Table 4.2 Microbial metabolites and their effect on plants

Strain	Chemicals	Plant	Effect	References
<i>Arthrobacter agilis</i> UMCV2	Dimethylhexadecylamine	<i>Medicago truncatula</i>	Growth promotion	Orozco-Mosqueda et al. (2013)
	Dimethylhexadecylamine	<i>Sorghum bicolor</i>	Iron uptake stimulation	Castulo-Rubio et al. (2015)
	Dimethylhexadecylamine	<i>Medicago sativa</i>	Growth promotion	Velázquez-Becerra et al. (2011)
	Pool of VOCs	<i>Medicago truncatula</i>	Iron deficiency stress response, brassinosteroid content increased	Flores-Cortez et al. (2019)
<i>Azospirillum brasilense</i> SP7	Pool of VOCs	<i>Mentha × piperita</i>	Growth promotion, monoterpene biosynthesis stimulated	Santoro et al. (2011)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> F7R42	Pool of VOCs	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Growth promotion, multiple transcriptional modifications related to stress responses	Hao et al. (2016)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strains	Pool of VOCs	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Growth promotion and phytopathogens growth inhibition	Asari et al. (2016)
<i>Bacillus megaterium</i> XTBG34	2-Pentylfuran	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Growth promotion	Zou et al. (2010)
<i>Bacillus methylotrophicus</i> M496	3-Hydroxy-2-butanone	<i>Zea mays</i>	Growth promotion	Pérez-Flores et al. (2017)
<i>Bacillus methylotrophicus</i> M4-96	3-Hydroxy-2-butanone	<i>Fragaria × ananassa</i>	Growth promotion	Vicente-Hernández et al. (2019)
<i>Bacillus</i> sp. B55	Dimethyl disulfide	<i>Nicotiana attenuata</i>	Sulfur assimilation	Meldau et al. (2013)

(continued)

Table 4.2 (continued)

Strain	Chemicals	Plant	Effect	References
<i>Bacillus</i> strains	Pool of VOCs	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Growth promotion, root architecture modifications	Gutiérrez-Luna et al. (2010)
<i>Bacillus subtilis</i> SYST2	1,3-Propanediol	<i>Solanum lycopersicum</i>	Growth promotion	Tahir et al. (2017)
<i>Bacillus subtilis</i> GB03	2,3-Butanediol	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Growth promotion	Ryu et al. (2003)
	Pool of VOCs	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Growth promotion, inflorescence development, chlorophyll content	Xie et al. (2009)
	Pool of VOCs	<i>Ocimum basilicum</i>	Growth promotion, essential oil accumulation	Banchio et al. (2009)
	Pool of VOCs	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Iron acquisition induction	Zhang et al. (2009)
	Pool of VOCs	<i>Mentha × piperita</i>	Growth promotion, monoterpene biosynthesis stimulated	Santoro et al. (2011)
<i>Bacillus vallismortis</i> EXT-1	3-Hydroxy-2-Butanone	<i>Nicotiana tabacum</i>	Growth promotion	Ann et al. (2013)
<i>Barkholderia ambifaria</i>	Dimethyl trisulfide, acetophenone, 3-hexanone	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Growth promotion, fungi growth inhibition	Groenhagen et al. (2013)
<i>Barkholderia pyrrocinia</i> LMG 21822	Indole	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Growth promotion	Blom et al. (2011)
<i>Chromobacterium violaceum</i> CV0	Indole	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Growth promotion	Blom et al. (2011)
<i>Escherichia coli</i>	Indole	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Growth promotion	Bailly et al. (2014)
<i>Paenibacillus polymyxa</i> E681	n-Tridecane	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Induced systemic response (ISR)	Lee et al. (2012)
<i>Proteus vulgaris</i> JBL5202	Indole	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Growth promotion	Bhattacharyya et al. (2015)

<i>Pseudomonas fluorescens</i> SS101	13-Tetradecadien-1-ol, 2-butanone, 2-Methyl-n-1-tridecene	<i>Nicotiana tabacum</i>	Growth promotion	Park et al. (2015)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> WCS417r	Pool of VOCs	<i>Mentha × piperita</i>	Growth promotion, monoterpene biosynthesis stimulated	Santoro et al. (2011)
<i>Pseudomonas simiae</i> AU	Pool of VOCs	<i>Glycine max</i>	Growth promotion and induced systemic tolerance (IST) to salt stress	Vaishnav et al. (2015)
<i>Streptomyces coelicolor</i>	3-Octanone	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Growth promotion	Dotson et al. (2020)

the growth of *Arabidopsis thaliana*, it was found that the blend of VOCs promoted both the shoot growth and lateral root formation (Contreras-Cornejo et al. 2014b). In other hand, although species of the phytopathogenic fungus *Verticillium* cause rot in different crops, it has been observed that natural mixtures of volatile compounds constituted in part by 2-methyl-1-propanol, 3-methyl-1-butanol, 2-methyl-1-butanol, 3-pentenol, 3-methyl-3-buten-1-ol, 3-octanone, acetoin, 1-hexanol, 4-methyl-5-hexen-2-ol, 3-octanol, 4-methyl-6-hepten-3-ol, 1-octen-3-ol, 3,5,5-trimethyl-2-hexene, 2,3-butanediol, 3-ethyl-4-methyl-3-penten-2-one, himachala-2,4-diene, β -caryophyllene, α -amorphene, azulene, and phenylethyl alcohol but their effects on plants have not been fully elucidated. Such compounds from fungi can promote the *Arabidopsis thaliana* growth and such effect is related in part with the manipulation of the auxin-mediated signaling pathway (Li et al. 2018).

However, few studies have shown that certain pure metabolites are biologically active to promote growth. Among the group of the sesquiterpenoid compounds, it is known that β -caryophyllene is a metabolite whose range of biological activity in *Lactuca sativa* plants is 25–100 μ M (Minerdi et al. 2011). Among the different volatile metabolites produced by *Laccaria bicolor* the sesquiterpenoid compound (–)-thujopsene is present, which is responsible for stimulating the formation of lateral roots in *Arabidopsis thaliana* (Ditengou et al. 2015). In experiments performed in vitro, it has been found that some species of *Trichoderma* emit the lactone 6-pentyl-2H-pyran-2-one. Applied exogenously on *Arabidopsis thaliana* at concentrations of 50–175 μ M, such metabolites are responsible for promoting the plant growth through the modulation of the auxin transporters expression (Garnica-Vergara et al. 2016).

The volatile metabolites 2,3-butanediol and 3-hydroxy-2-butanone (acetoin) are compounds produced by *Bacillus subtilis* GB03 and *Bacillus amyloliquefaciens* IN937a released in the soil and triggered towards the atmosphere by the plant growth-promoting bacteria (Ryu et al. 2003). In pharmacological tests with the pure compound 2,3-butanediol and *Arabidopsis thaliana* it was found that such volatile metabolite is active in the range of 1–100 μ g as revealed by the increased growth of the leaf area (Fincheira and Quiroz 2018).

4.3.2 Root Colonization

Microorganisms of the rhizosphere can colonize root tissues and establish eventual, facultative, or obligate associations with their host (Santoyo et al. 2016). The processes of root colonization involve the production of hydrolytic enzymes of microbial origin that are used as tools to break the layers of root cells and penetrate the root tissue (Contreras-Cornejo et al. 2016). Cellulases and xylanases are fungal enzymes that degrade specific plant tissue constituents, and most likely are components involved in the root colonization process (Henrissat et al. 1985; Payne et al. 2015; Estrada-Rivera et al. 2019).

There are other types of non-hydrolytic enzymes that favor the binding or adhesion of fungal hyphae to root cells. For example, swollenin (Swo) produced by *T. asperellum* and other fungal strains (Brotman et al. 2008; Meng et al. 2019). Swo possesses a cellulose-binding module, and in turn disrupts the structure of the crystalline cellulose present in the plant cell wall. It has been demonstrated that during the plant-*Trichoderma* interaction Swo facilitates the expansion of the plant cell wall in roots and root hairs (Brotman et al. 2008). Once the physical interaction between the root and the microorganism occurs, a series of physiological, biochemical, and molecular events are triggered in the host plant.

4.3.3 Plant Growth Promotion

The promotion of plant growth and development regulated by rhizosphere microorganisms can occur at different stages of the interaction (Sevilla et al. 2001; Ryu et al. 2003; Real-Santillán et al. 2019). In nature, some plants and microorganisms establish specific associations, while there are microorganisms that have the ability to promote growth without host specificity (Ray et al. 2018). Figure 4.3 shows the dynamics among phytohormones and other microbial molecules that modulate multiple process of the plant physiology. It has often been observed that soil bacteria and fungi can modulate the growth and plasticity of the root system (Contreras-Cornejo et al. 2014a, b). These effects are the result of inducing the differentiation of epidermal cells for the formation of root hairs, the activation of the cells of the primary root pericycle to induce the formation of lateral roots, and by activating the cell cycle in the cells of the tip of the primary root (López-Bucio et al. 2007).

It is important to note that the modulation of the plant growth and development by microorganisms can vary because not all microorganisms impact in the same way (Reboutier et al. 2002; Gutiérrez-Luna et al. 2010; García-Gómez et al. 2019). This effect is because there are microorganisms that produce more than one growth regulating metabolite. For example, *Burkholderia phytofirmans* PsJN and *Pseudomonas putida* W619 produce IAA and ACCase, and *Enterobacter* sp. 638 produces siderophore, IAA, acetoin, and 2,3-butanediol (Santoyo et al. 2016). Figure 4.4 shows the kind of VOCs produced by some soil fungi and the roles of such metabolites in plant physiology remain to be determined.

It has been observed that bacteria that have the same 16S rRNA gene sequence may impact differently on the phenotype of the plants with which they interact (Blakney and Patten 2011; Haney et al. 2015; Timm et al. 2015; Herrera-Paredes and Lebeis 2016). While some microorganisms can impact on the formation of lateral roots, others can do so on the formation of root hairs or the growth of the primary root (Reboutier et al. 2002; Gutiérrez-Luna et al. 2010; Garnica-Vergara et al. 2016). Even a certain microorganism can modulate the development of the host plant depending on the type of interaction that can occur without physical contact or by establishing the colonization of the root tissue (Macías-Rodríguez et al. 2018). Frequently, the aerial zone of the plants is also altered after the microbial stimulus.

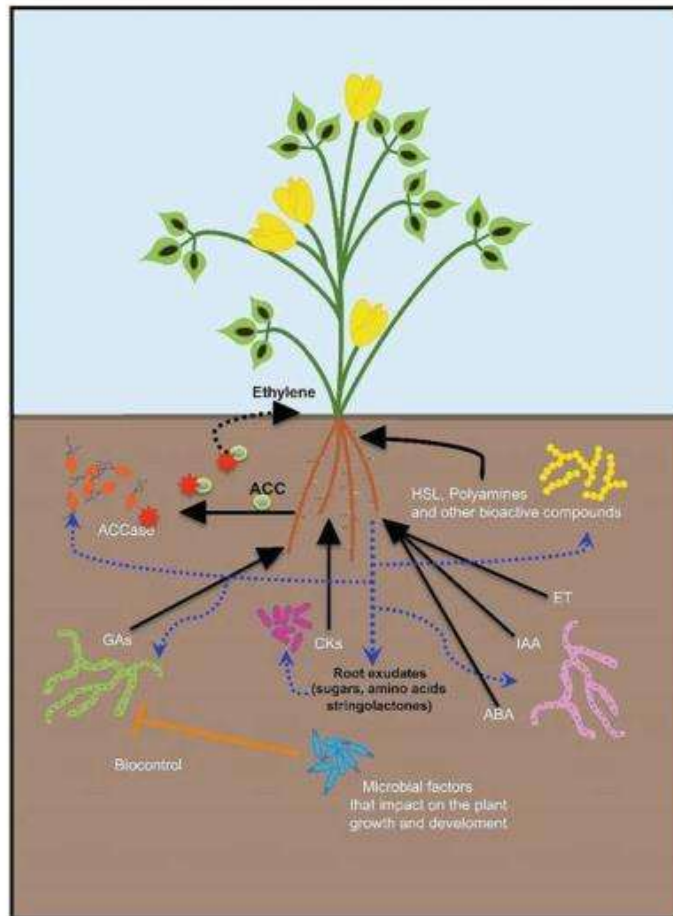


Fig. 4.3 A simplified model for a plant-microorganism interaction. In the rhizosphere detrimental or plant beneficial microorganisms produce several metabolites (black lines) with capacity to modulate the plant growth or induce defense responses. In addition, root exudates (blue lines) impact on the microbial communities and key plant-derived compounds are signaling molecules to coordinate specific interactions with rhizobia or mycorrhizal arbuscular fungi. Furthermore, sugar derived from roots can serve as nutritional source for soil microorganisms. *ABA* abscisic acid, *IAA* indole-3-acetic acid, *ET* ethylene, *CKs* cytokinins, *GAs* gibberellins, *ACCase* 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase, *ACC* 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, *HSL* homoserine-lactones

Petioles, leaf size, and accumulation of foliar biomass generally increase (Flores-Cortez et al. 2019).

The opening of foliar stomata can also be modulated, which will have an impact on the transpiration of the leaves and the exchange of gases towards the atmosphere

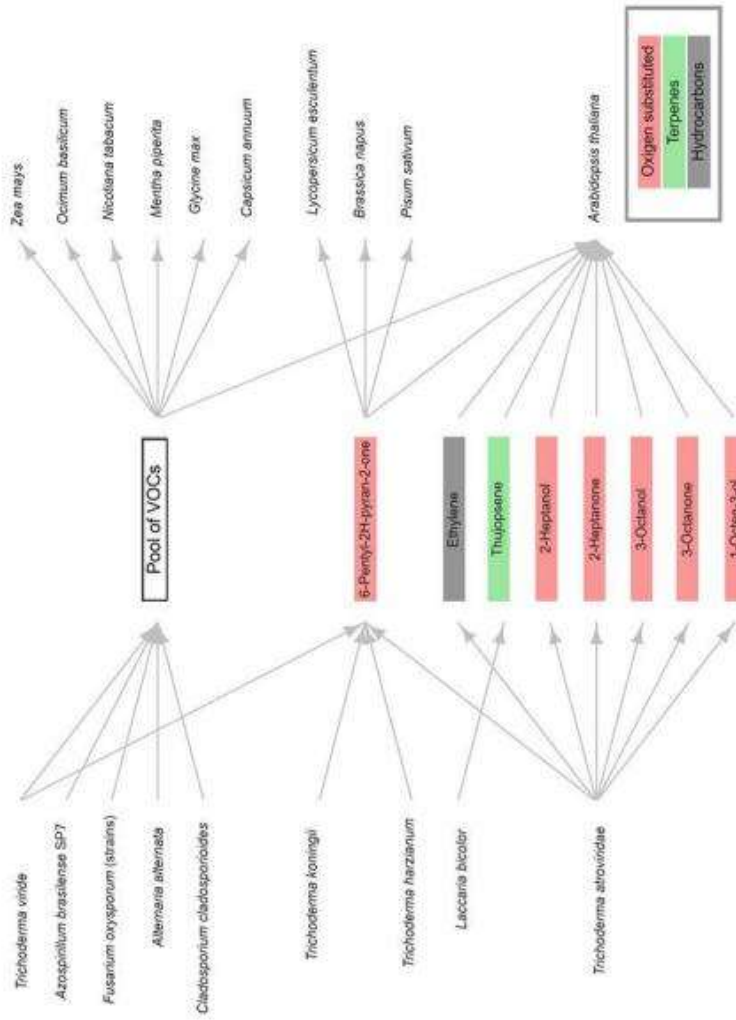


Fig. 4.4 Schematic representation of volatile compounds produced by soil fungi and plants in which have been investigated their effects

(Contreras-Cornejo et al. 2015b). The modulation of plant growth and development has been observed in different plants of agricultural interest and under different growing conditions. It has been observed that the rhizobacterium *Arthrobacter agilis* UMCV2 modulates in an organ-specific manner the expression of *FERRIC REDUCTION OXIDASE (FRO)* genes *MiFRO1*, *MiFRO2*, *MiFRO3*, *MiFRO4*, and *MiFRO5* of *Medicago truncatula* involved in iron uptake in both conditions of sufficiency and deficiency (Montejano-Ramírez et al. 2018).

Another beneficial effect for sugarcane plants cultivar SP70-1143 induced by the colonization of the diazotrophic bacterium *Acetobacter diazotrophicus* (syn. *Gluconacetobacter diazotrophicus*) is the promotion of growth and the incorporation of nitrogen as revealed by a $^{15}\text{N}_2$ incorporation bioassay (Sevilla et al. 2001). *Azospirillum brasilense* is another diazotrophic bacterium whose effects on growth promotion are mainly attributed to the production of IAA (Barbieri et al. 1991; Okon and Labandera-Gonzalez 1994). Rhizosphere microorganisms can also promote the plant growth through the production and emission of volatile organic compounds. For example, in vitro experiments with bean plants (*Phaseolus vulgaris*) and *Arabidopsis thaliana* inoculated with the rhizobacteria *Bacillus megaterium*, it was found that compared with non-inoculated plants, the microorganism promoted the growth of both types of plant as shown by the accumulation of fresh biomass and the induction of lateral roots (López-Bucio et al. 2007).

4.4 Plant Defense Responses

One of the first events that occur during the plant-microorganism interactions is the activation of local or systemic defense responses, and it will depend on the type of microorganism detected (Stringlis et al. 2018). After the perception of the microbial signals by the host plant, there are increases in the cytoplasmic Ca^{2+} content, changes in the endogenous content of reactive oxygen species (i.e., H_2O_2 , NO), and primary metabolites that include the phytohormones salicylic acid, jasmonic acid, and ethylene (Frag et al. 2013).

Defense responses can be induced after the perception of bacterial components such as low molecular compounds (AHLs), flagella, siderophores, and lipopolysaccharides (Lugtenberg and Kamilova 2009). The tomato mottle virus (ToMoV) which is transmitted by natural dynamics of viruliferous silverleaf whitefly *Bemisia argentifolii* adults. An experiment carried out in the spring of 1998 under field conditions to evaluate the effect of the inoculation of various plant growth-promoting bacteria on tomato plants infected with *Bemisia argentifolii* revealed that treatments with *Bacillus subtilis* 937b and *Bacillus pumilus* SE34 significantly reduced the rate of symptom severity (Murphy et al. 2000). Some microorganisms have the potential to control multiple plant diseases.

Liu et al. (2017) observed that the strains AP196, AP197, AP203, AP208, and AP298 of *Bacillus velezensis* showed some effectiveness in reducing postemergence damping off in pepper caused by *Rhizoctonia solani*, in cucumber caused by

Pythium ultimum, and in tomato caused by *Xanthomonas axonopodis* and *Pseudomonas syringae* pv. tomato in plants grown in controlled conditions. The rhizobacterium *Pseudomonas fluorescens* FPT9601-T5 isolated from tomato plants also induces defense responses that partially suppress the infection caused by *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 in *Arabidopsis thaliana*; these effects were related to increases in the expression of genes involved in signal transduction and metabolic processes. Among the genes that were downregulated, some are members of the family of transcriptional factors *ETHYLENE RESPONSE FACTOR* (*ERF*) and *MyB* belonging to the signaling pathway mediated by ET (Wang et al. 2005). Microorganisms that establish physical interactions with roots also often emit volatile organic compounds that can activate defense responses in plants (Farang et al. 2013).

For example, it was observed that some rhizobacteria can stimulate defense responses through the emission of VOCs (Farang et al. 2013). In an elegant work by Ryu et al. (2004) with *Arabidopsis thaliana* plants exposed to the VOCs of the bacteria *Bacillus subtilis* GB03, *Bacillus amyloliquefaciens* IN937a, and *Escherichia coli* DH5 α and infected with the pathogenic plant bacterium *Erwinia carotova*, it was found that the strains GB05 and IN937a significantly reduced the foliar attack of the pathogen. This effect was due in part to the activity of 2,3-butanediol in the concentration range of 0.2 μ g to 20 μ g. In the same work, it was found that the VOCs of the GB05 strain induced changes in the expression of the reporter line *PDF1.2::GUS* in response to JA/ET, observed as increased activity of β -glucuronidase.

It was found that VOCs released by *T. vires* also induced changes in the expression of the transgenic line *LOX2::GUS*, a JA-responsive gene. Such priming on plant defense was correlated with accumulations in the contents of JA and H₂O₂. *T. vires* Gv29-8-elicited plant immunity was effective to restrict the attack caused by the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea* on the shoot (Contreras-Cornejo et al. 2014b).

These data suggested that bacterial or fungal VOCs can modulate defense responses and confer protection against the attack of pathogenic microorganisms. On the other hand, the complex mixtures of VOCs emitted by plants in interaction with soil microorganisms generally have a strong impact on the third trophic level because they act as alarm signals, inducing indirect defense responses to attract natural enemies of herbivorous insects (Dicke et al. 2009; Schausberger et al. 2012). For example, maize plants constantly suffer the attack of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*, but in field conditions the insect is endoparasitized by female wasps of *Campoletis sonorensis* and during the maize root-*T. atroviride* association, the fungus releases in the soil 6-PP, which attracts *C. sonorensis* towards plants that are suffering herbivory. Endoparasitism is then stimulated, providing biocontrol of *S. frugiperda* at least in controlled conditions (Contreras-Cornejo et al. 2018a).

4.4.1 JA/ET Mediated Immunity

The induction of systemic resistance is a characteristic of plant beneficial microorganisms. This phenomenon was first detected in plant growth-promoting rhizobacteria and later identified in biocontrol and mycorrhizal fungi (Jaroszuk-Ścisiel et al. 2019). Such microorganisms can induce increases in the content of JA, a metabolite derived from oxylipins (Wang et al. 2020). The production of JA occurs within the cell, in the chloroplast; there in the organelle linoleic acid (18:3) and hexadecatrienoic acid (16:3) through the corresponding catalytic activity of the enzymes lipoxygenase, allene oxidase synthase, and allene oxide cyclase are converted to 12-oxophytodienoic acid (OPDA) and dinor-OPDA. Subsequently, OPDA reductase 3 (OPR3) acts on OPDA and converts it to 3-oxo-2 (2'-pentenyl)-cyclopentane-1-octanoic acid (OPC-8:0). This last compound is subjected to three cycles of β -oxidation resulting then in the production of JA (Al-Zahrani et al. 2020).

JA activates effective defense responses against necrotrophic pathogens or herbivorous chewing insects (Browse 2009). Recently, it was reported that *T. vires* Gv29-8 when associated with the roots of maize plants increases the content of 2-oxo-phytydienoic acid in the xylem (12-OPDA) and α -ketol of octadecadienoic acid (KODA); these oxylipins were shown to be key in the induction of ISR because the mutant line *lox10* of maize that is susceptible to the attack of the pathogenic fungus *Colletotrichum graminicola* and that was later transfused with sap that contained high concentrations of 12-OPDA restored the ISR in such mutant (Wang et al. 2020).

In multiple plant-microorganism interactions a cross talk can occur between phytohormones that simultaneously modulate plant growth and defense processes (Villalobos-Escobedo et al. 2020). In a more recent work, it was reported that during the interaction of *T. atroviride* with *Arabidopsis thaliana*, the fungal NADPH oxidase plays a key role in both plant growth promotion and defense responses enhanced by the fungus. In regard with the modulation of the root-system architecture by the fungus, important information was revealed by the $\Delta noxR$ mutant of *T. atroviride*. Such strain failed in modulating the developmental progress of lateral roots formation as observed with the wild-type strain. In contrast, $\Delta noxR$ efficiently activated JA-mediated plant defense, which was effective against the attack of the necrotrophic fungus *B. cinerea* (Villalobos-Escobedo et al. 2020). Modulations of the endogenous levels of JA in maize plants by *T. atroviride* IMI 206040 after 5 days of interaction with roots also resulted in an effective priming of plant defense to reduce the attack of the chewing insect *S. frugiperda* (Contreras-Cornejo et al. 2018b).

On the other hand, auxin has been shown to alter SA production and JA signaling, and ABA can act as a hormone antagonistic to ET/JA-mediated signaling (Ponzio et al. 2013). In a study carried out in tobacco plants (*Nicotiana tabacum*) infected with *Pseudomonas syringae*, it was found that resistance to the infection caused by this pathogen was due to the modulation of the ABA and kinetin (a CK) levels. In

this condition, CK decreased the ABA levels in tobacco plants. On the other hand, the decrease in ABA concentrations allowed the participation of CK to activate the resistance mechanism against *P. syringae* (Großkinsky et al. 2014).

4.4.2 SA-Mediated Immunity

It has been observed that some pathogenic bacteria and soil fungi can activate defense responses mediated by SA (Contreras-Cornejo et al. 2011). This type of defense is known as systemic acquired resistance (SAR) and is effective against biotrophic microorganisms (Vlot et al. 2009). The SA-mediated signaling mechanism results in the induction of the expression of *PATHOGENESIS-RELATED (PR)* genes and their subsequent translation into their respective defensin proteins (Barriuso et al. 2008). There is evidence, though, that the signaling routes of the JA and SA are antagonistic (Derksen et al. 2013). The activation of both routes simultaneously by some beneficial microorganisms has been reported (Contreras-Cornejo et al. 2011; Niu et al. 2011). For example, the rhizobacterium *Bacillus cereus* AR156 when inoculated in *Arabidopsis thaliana* ecotype Col-0 activates effective defense responses against the pathogenic bacterium *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. AR156 induced the expression of the *PR-1*, *PR-2*, and *PR-5* genes in response to SA and *PDF1.2* that encodes plant defensin in response to JA/ET, which suggests that the SA, JA, and ET pathways are simultaneously activated, probably involving the NPR1 component (Niu et al. 2011).

A similar effect in the activation of the JA and SA signaling pathways was found in *Arabidopsis thaliana* after the inoculation with *T. atroviride* IMI 206040 and *T. virens* Gv.29-8 because both markers *PR-1::GUS* of response to SA and *LOX2::GUS* of response to JA were activated after 6 days of inoculation when the root colonization was established. In such interactions, although both signaling pathways were activated, they were slightly primed one on the other as revealed by the activity of β -glucuronidase after GUS staining and the levels of SA and JA accumulated in shoot tissues (Contreras-Cornejo et al. 2011).

4.5 Conclusion

In the environment, plants interact with myriads of microorganisms. In the case of plant beneficial rhizobacteria or fungi, they impact on physiological responses modulating the plant growth, adaptation to resist abiotic stress caused by salinity, drought or soil contamination and the activation of defense responses. A plant-microorganism interaction can initiate with the emission of a certain metabolite derived from one of the involved organisms. Then such signaling molecule encodes a key message to coordinate and form a specific interaction; for example, arbuscular mycorrhizal associations are established after the rhizodeposition by the plant and

perception of strigolactones by the spores of the target fungus, which in turn will grow tropically towards the host root. In the case of nitrogen-fixing bacteria, plant roots release chemotactic agents to attract the rhizobia and after a complex signaling mechanism the nodule is formed.

In other interactions, microorganisms release volatile or soil diffusible signaling molecules that coordinate both plant growth and defense responses. In those cases, such plant responses are regulated after the activation of endogenous mechanisms modulated by phytohormones. For example, plant growth and development are coordinated by auxins, gibberellins, CKs, ET, and ABA. Cross talk among phytohormones can occur to efficiently coordinate some plant responses. For example, lateral root formation and root hair induction is a process that requires the participation of the MPK6, auxins, and ET. Depending on the kind of rhizosphere microorganism, plant immunity is primed by the canonical defense mediators SA, JA, and ET. This can occur due to the perception of microbial defense elicitors as peptides or flagellin or when the root colonization is established. In some interactions, plant defense involves the synergistic activity of JA and ET, but frequently antagonistic roles among JA and SA, SA and IAA, and CKs and ABA have been observed. Currently, there is a broad body of scientific literature that describes the role of rhizosphere microorganisms in plant performance. However, there is a need to investigate and generate more information about the role of unknown microbial signals that are released in the atmosphere and in the soil, and how they impact on plant performance under different changing environmental conditions or when plants are challenged simultaneously with more than one type of aggressor (i.e., pathogens and herbivores). This kind of information will be relevant to generate knowledge with potential application to manage crops in cultured lands with serious troubles of pests or disturbances caused by the climatic global change.

Acknowledgments We thank Prasun K. Mukherjee (Nuclear Agriculture and Biotechnology Division, Bhabha Atomic Research Centre, Trombay, Mumbai, India) and Benjamin A. Horwitz (Faculty of Biology Technion—Israel Institute of Technology) for kindly inviting us to contribute this book chapter. We apologize to colleagues whose relevant work we were unable to cite owing to space limitations. The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Achard P, Cheng H, De Grauwe L, Decat J, Schoutteten H, Moritz T, Van Der Straeten D, Peng J, Harberd NP (2006) Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science* 311:91–94. <https://doi.org/10.1126/science.1118642>
- Akiyama K, Matsuzaki K, Hayashi H (2005) Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 435:824–827. <https://doi.org/10.1038/nature03608>
- Allen GJ, Kuchitsu K, Chu SP, Murata Y, Schroeder JI (1999) *Arabidopsis abi1-1* and *abi2-1* phosphatase mutations reduce abscisic acid-induced cytoplasmic calcium rises in guard cells. *Plant Cell* 11:1785–1798. <https://doi.org/10.1105/tpc.11.9.1785>

- Al-Zahrani W, Bafeel SO, El-Zohri M (2020) Jasmonates mediate plant defense responses to *Spodoptera exigua* herbivory in tomato and maize foliage. *Plant Signal Behav* 15:1746898. <https://doi.org/10.1080/15592324.2020.1746898>
- Ann M, Cho Y, Ryu H, Kim H, Park K (2013) Growth promotion of tobacco plant by 3-hydroxy-2-butanone from *Bacillus vallismortis* EXTN-1. *Korean J Pestic Sci* 17:388–393. <https://doi.org/10.7585/kjps.2013.17.4.388>
- Arroyo A, Bossi F, Finkelstein RR, León P (2003) Three genes that affects sugar sensing (Abscisic acid insensitive 4, abscisic acid insensitive 5, and constitutive triple response 1) are differentially regulated by glucose in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 133:231–242. <https://doi.org/10.1104/pp.103.021089>
- Asari S, Matzén S, Petersen MA, Bejai S, Meijer J (2016) Multiple effects of *Bacillus amyloliquefaciens* volatile compounds: plant growth promotion and growth inhibition of phytopathogens. *FEMS Microbiol Ecol* 92:fiw070. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw070>
- Bae H, Roberts DP, Lim HS, Strem MD, Park SC, Ryu CM, Melnick RL, Bailey BA (2011) Endophytic *Trichoderma* isolates from tropical environments delay disease onset and induce resistance against *Phytophthora capsici* in hot pepper using multiple mechanisms. *Mol Plant-Microbe Interact* 24:336–351. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-10-0221>
- Baetz U, Martinoia E (2014) Root exudates: the hidden part of plant defense. *Trends Plant Sci* 19:90–98. <https://doi.org/10.5167/uzh-106507>
- Bailly A, Groenhagen U, Schulz S, Geisler M, Eberl L, Weisskopf L (2014) The inter-kingdom volatile signal indole promotes root development by interfering with auxin signalling. *Plant J* 80:758–771. <https://doi.org/10.1111/tpj.12666>
- Banchio E, Xie X, Zhang H, Paré PW (2009) Soil bacteria elevate essential oil accumulation and emissions in sweet basil. *J Agric Food Chem* 57:653–657. <https://doi.org/10.1021/jf8020305>
- Barbieri P, Baggio C, Bazzicalupo M, Galli E, Zanetti G, Nuti MP (1991) *Azospirillum*-graminae interaction: effect of indole-3-acetic acid. In: Nitrogen fixation, vol 48. Springer, Dordrecht, pp 161–168. https://doi.org/10.1007/978-94-011-3486-6_29
- Barriuso J, Ramos B, Gutiérrez FJ (2008) Protection against pathogen and salt stress by four plant growth-promoting rhizobacteria isolated from *Pinus* sp. on *Arabidopsis thaliana*. *Phytopathology* 98:666–672. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-98-6-0666>
- Battaglia D, Bossi S, Cascone P, Digilio MC, Duran Prieto J, Fanti P, Guerrieri E, Iodice L, Lingua G, Lorito M, Maffei ME, Massa N, Ruocco M, Sasso R, Trotta V (2013) Tomato below ground-above ground interactions: *Trichoderma longibrachiatum* affects the performance of *Macrosiphum euphorbiae* and its natural antagonists. *Mol Plant-Microbe Interact* 26:1249–1256. <https://doi.org/10.1094/MPMI-02-13-0059-R>
- Bhattacharyya D, Garladinne M, Lee YH (2015) Volatile indole produced by rhizobacterium *Proteus vulgaris* JBLS202 stimulates growth of *Arabidopsis thaliana* through auxin, cytokinin, and brassinosteroid pathways. *J Plant Growth Regul* 34:158–168. <https://doi.org/10.1007/s00344-014-9453-x>
- Bisseling T, Geurts R (2020) Specificity in legume nodule symbiosis. *Science* 369:620–621. <https://doi.org/10.1126/science.abd3857>
- Blakney AJ, Patten CL (2011) A plant growth-promoting pseudomonad is closely related to the *Pseudomonas syringae* complex of plant pathogens. *FEMS Microbiol Ecol* 77:546–557. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01136.x>
- Blom D, Fabbri C, Connor E, Schiestl F, Klausner D, Boller T, Eberl L, Weisskopf L (2011) Production of plant growth modulating volatiles is widespread among rhizosphere bacteria and strongly depends on culture conditions. *Environ Microbiol* 13:3047–3058. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02582.x>
- Bömke C, Tudzynski B (2009) Diversity, regulation, and evolution of the gibberellin biosynthetic pathway in fungi compared to plants and bacteria. *Phytochemistry* 70:1876–1893. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.05.020>
- Brodribb TJ, McAdam SAM (2011) Passive origins of stomatal control in vascular plants. *Science* 331:582–585. <https://doi.org/10.1126/science.1197985>

- Brotman Y, Briff E, Viterbo A, Chet I (2008) Role of Swollenin, an expansin-like protein from *Trichoderma*, in plant root colonization. *Plant Physiol* 147:779–789. <https://doi.org/10.1104/pp.108.116293>
- Browse J (2009) Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone. *Annu Rev Plant Biol* 60:183–205. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.043008.092007>
- Camarena-Pozoz DA, Flores-Núñez VM, López MG, López-Bucio J, Partida-Martínez LP (2018) Smells from the desert: microbial volatiles that affect plant growth and development of native and non-native plant species. *Plant Cell Environ* 42:1368–1380. <https://doi.org/10.1111/pce.13476>
- Cao J, Yang C, Li L, Jiang L, Wu Y, Wu C, Bu Q, Xia G, Liu X, Luo Y, Liu J (2016) Rice plasma membrane proteomics reveals *Magnaporthe oryzae* promotes susceptibility by sequential activation of host hormone signaling pathways. *Mol Plant-Microbe Interact* 29:902–913. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-16-0165-R>
- Caradonia F, Ronga D, Catellani M, Giaretta Azevedo CV, Alegria Terrazas R, Robertson-Albertyn S, Francia E, Bulgarelli D (2019) Nitrogen fertilizers shape the composition and predicted functions of the microbiota of field-grown tomato plants. *Phytobiomes J* 3:315–325. <https://doi.org/10.1094/PBIOMES-06-19-0028-R>
- Cassán F, Maiale S, Masciarelli O, Vidal A, Luna V, Ruiz O (2009) Cadaverine production by *Azospirillum brasilense* and its possible role in plant growth promotion and osmotic stress mitigation. *Eur J Soil Biol* 45:12–19. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2008.08.003>
- Castulo-Rubio DY, Alejandro-Ramírez NA, Orozco-Mosqueda MC, Santoyo G, Macías-Rodríguez L, Valencia-Cantero E (2015) Volatile organic compounds produced by the rhizobacterium *Arthrobacter agilis* UMCV2 modulate *Sorghum bicolor* (strategy II plant) morphogenesis and SbFRO1 transcription in vitro. *J Plant Growth Regul* 34:611–623. <https://doi.org/10.1007/s00344-015-9495-8>
- Chalupowicz L, Manulis-Sasson M, Itkin M, Sacher A, Sessa G, Barash I (2008) Quorum sensing system affects gall development incited by *Pantoea agglomerans* pv. *gypsophylae*. *Mol Plant-Microbe Interact* 21:1094–1105. <https://doi.org/10.1094/MPMI-21-8-1094>
- Chalupowicz L, Barash I, Panijel M, Sessa G, Manulis-Sasson S (2009) Regulatory interactions between quorum-sensing, auxin, cytokinin, and the Hrp regulon in relation to gall formation and epiphytic fitness of *Pantoea agglomerans* pv. *gypsophylae*. *Mol Plant-Microbe Interact* 22:849–856. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-7-0849>
- Coleman-Derr D, Desgarennes D, Fonseca-García C, Gross S, Clingenpeel G, Woyke T, North G, Visel A, Partida-Martínez LP, Tringe SG (2016) Plant compartment and biogeography affect microbiome composition in cultivated and native *Agave* species. *New Phytol* 209:798–811. <https://doi.org/10.1111/nph.13697>
- Contreras-Cornejo HA, Macías-Rodríguez L, Cortés-Penagos C, López-Bucio J (2009) *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 149:1579–1592. <https://doi.org/10.1104/pp.108.130369>
- Contreras-Cornejo HA, Macías-Rodríguez L, Beltrán-Peña E, Herrera-Estrella A, López-Bucio J (2011) *Trichoderma*-induced plant immunity likely involves both hormonal and camalexin dependent mechanisms in *Arabidopsis thaliana* and confers resistance against necrotrophic fungi *Botrytis cinerea*. *Plant Signal Behav* 6:1554–1563. <https://doi.org/10.4161/psb.6.10.17443>
- Contreras-Cornejo HA, Macías-Rodríguez LI, Alfaro-Cuevas R, López-Bucio J (2014a) *Trichoderma* improves growth of *Arabidopsis* seedlings under salt stress through enhanced root development, osmolite production and Na⁺ elimination through root exudates. *Mol Plant-Microbe Interact* 27:503–514. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-13-0265-R>
- Contreras-Cornejo HA, Macías-Rodríguez L, Herrera-Estrella A, López-Bucio J (2014b) The 4-phosphopantetheinyl transferase of *Trichoderma virens* plays a role in plant protection against *Botrytis cinerea* through volatile organic compound emission. *Plant Soil* 379:261–274. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2069-x>

- Contreras-Cornejo HA, Macías-Rodríguez L, Garnica-Vergara A, López-Bucio J (2015a) *Trichoderma* modulates stomatal aperture and leaf transpiration through an abscisic acid-dependent mechanism. *J Plant Growth Regul* 34:425–432. <https://doi.org/10.1007/s00344-014-9471-8>
- Contreras-Cornejo HA, López-Bucio JS, Méndez-Bravo A, Macías-Rodríguez L, Ramos-Vega M, Guevara-García AA, López-Bucio J (2015b) Mitogen-activated protein kinase 6 and ethylene and auxin signaling pathways are involved in *Arabidopsis* root-system architecture alterations by *Trichoderma atroviride*. *Mol Plant-Microbe Interact* 28:701–710. <https://doi.org/10.1094/MPMI-01-15-0005-R>
- Contreras-Cornejo HA, Macías-Rodríguez L, López-Bucio J (2015c) Fungal biomolecules in plant growth promotion. In: Gupta VK, Mach RL, Sreenivasaprasad S (eds) *Fungal biomolecules: sources, applications and recent developments*, Wiley, Hoboken, NJ. <https://doi.org/10.1002/9781118958308.ch23>
- Contreras-Cornejo HA, Macías-Rodríguez L, del Val E, Larsen J (2016) Ecological functions of *Trichoderma* spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere: interactions with plants. *FEMS Microbiol Ecol* 92:fiw036. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw036>
- Contreras-Cornejo HA, del Val E, Macías-Rodríguez L, Alarcón A, González-Esquivel CE, Larsen J (2018a) *Trichoderma atroviride*, a maize root associated fungus, increases the parasitism rate of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* by its natural enemy *Campoletis sonorensis*. *Soil Biol Biochem* 122:196–202. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.04.013>
- Contreras-Cornejo HA, Macías-Rodríguez L, del Val E, Larsen J (2018b) The root endophytic fungus *Trichoderma atroviride* induces foliar herbivory resistance in maize plants. *Appl Soil Ecol* 124:45–53. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.10.004>
- Contreras-Cornejo HA, Viveros-Bremauntz F, del Val E, Macías-Rodríguez L, López-Carmona DA, Alarcón A, González-Esquivel CE, Larsen J (2020a, 2020) Alterations of foliar arthropod communities in a maize agroecosystem induced by the root-associated fungus *Trichoderma harzianum*. *J Pest Sci*. <https://doi.org/10.1007/s10340-020-01261-3>
- Contreras-Cornejo HA, Macías-Rodríguez L, del Val E, Larsen J (2020b) Interactions of *Trichoderma* with plants, insects, and plant pathogen microorganisms: chemical and molecular bases. In: Mérrillon JM, Ramawat KM (eds) *Co-evolution of secondary metabolites*. Springer Nature, Switzerland AG. https://doi.org/10.1007/978-3-319-76887-8_23-1
- Coppola M, Cascone P, Di Lelio I, Woo SL, Lorito M, Rao R, Pennacchio F, Guerrieri E, Digilio MC (2019a) *Trichoderma atroviride* P1 colonization of tomato plants enhances both direct and indirect defense barriers against insects. *Front Physiol* 10:813. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00813>
- Coppola M, Diretto G, Digilio MC, Woo SL, Giuliano G, Molisso D, Pennacchio F, Lorito M, Rao R (2019b) Transcriptome and metabolome reprogramming in tomato plants by *Trichoderma harzianum* primes and enhances defense responses against aphids. *Front Physiol* 10:745
- Coutinho BG, Mitter B, Talbi C, Sessitsch A, Bedmar EJ, Halliday N, James EK, Cámara M, Venturi V (2013) Regulon studies and *in planta* role of the Brl/R quorum-sensing system in the plant-beneficial *Burkholderia* cluster. *Appl Environ Microbiol* 79:4421–4432. <https://doi.org/10.1128/AEM.00635-13>
- Cristescu SM, De Martinis D, Hekkert STL, Parker DH, Harren FJ (2002) Ethylene production by *Botrytis cinerea* in vitro and in tomatoes. *Appl Environ Microbiol* 68:5342–5350. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.11.5342-5350.2002>
- De Billy F, Grosjean C, May S, Bennett M, Cullimore JV (2001) Expression studies on *AUX1*-like genes in *Medicago truncatula* suggest that auxin is required at two steps in early nodule development. *Mol Plant-Microbe Interact* 14:267–277. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2001.14.3.267>
- De Weert S, Vermeiren H, Mulders IHM, Kuiper I, Hendrickx N, Bloemberg GV, Vanderleyden J, De Mot R, Lugtenberg BJJ (2002) Flagella-driven chemotaxis towards exudate components is an important trait for tomato colonization by *Pseudomonas fluorescens*. *Mol Plant-Microbe Interact* 15:1173–1180. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2002.15.11.1173>

- Derksen H, Rampitsch C, Daayf F (2013) Signaling cross-talk in plant disease resistance. *Plant Sci* 207:79–87. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.03.004>
- Devos S, Laukens K, Deckers P, Van Der Straeten D, Beeckman T, Inzé D, Van Onckelen HV, Witters E, Prinsen E (2006) A hormone and proteome approach to picturing the initial metabolic events during *Plasmodiophora brassicae* infection on *Arabidopsis*. *Mol Plant-Microbe Interact* 19:1431–1443. <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-1431>
- Dharmasiri N, Dharmasiri S, Estelle M (2005) The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435:441–445. <https://doi.org/10.1038/nature03543>
- Dicke M, van Loon JJA, Soler R (2009) Chemical complexity of volatiles from plants induced by multiple attack. *Nat Chem Biol* 5:317–324. <https://doi.org/10.1038/nchembio.169>
- Ditengou FA, Lapeyrie F (2000) Hypaphorine from the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* counteracts activities of indole-3-acetic acid and ethylene but not synthetic auxins in eucalypt seedlings. *Mol Plant-Microbe Interact* 13:151–158. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2000.13.2.151>
- Ditengou FA, Müller A, Rosenkranz M, Felten J, Lasok H, van Doorn MM, Legué V, Palme K, Schnitzler JP, Polle A (2015) Volatile signalling by sesquiterpenes from ectomycorrhizal fungi reprogrammes root architecture. *Nat Commun* 6:6279. <https://doi.org/10.1038/ncomms7279>
- Domingo C, Andrés F, Tharreau D, Iglesias DJ, Talón M (2009) Constitutive expression of *OsGH3.1* reduces auxin content and enhances defense response and resistance to a fungal pathogen in rice. *Mol Plant-Microbe Interact* 22:201–210. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-2-0201>
- Dotson BR, Verschut V, Flürdh K, Becher PG, Rasmusson AG (2020) The *Streptomyces* volatile 3-octanone alters auxin/cytokinin and growth in *Arabidopsis thaliana* via the gene family KISS ME DEADLY. *bioRxiv*. 2020.02.15.949685. <https://doi.org/10.1101/2020.02.15.949685>
- Estrada-Rivera M, Rebolledo-Prudencio OG, Pérez-Robles DA, Rocha-Medina MDC, González-López MDC, Casas-Flores S (2019) Trichoderma histone deacetylase HAD-2 modulates multiple responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 179:1343–1361. <https://doi.org/10.1104/pp.18.01092>
- Farag MA, Zhang H, Ryu CM (2013) Dynamic chemical communication between plants and bacteria through airborne signals: induced resistance by bacterial volatiles. *J Chem Ecol* 39:1007–1018. <https://doi.org/10.1007/s10886-013-0317-9>
- Felten J, Kohler A, Morin E, Bhalerao RP, Palme K, Martin F, Ditengou FA, Legué V (2009) The Ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* stimulates lateral root formation in Poplar and *Arabidopsis* through auxin transport and signaling. *Plant Physiol* 151:1991–2005. <https://doi.org/10.1104/pp.109.147231>
- Fincheira P, Quiroz A (2018) Microbial volatiles as plant growth inducers. *Microbiol Res* 208:63–75. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.01.002>
- Finkelstein R, Lynch T, Reeves W, Petitfils M, Mostachetti M (2011) Accumulation of the transcription factor ABA-insensitive (ABI)4 is tightly regulated post-transcriptionally. *J Exp Bot* 62:3971–3979. <https://doi.org/10.1093/jxb/err093>
- Flores-Cortez I, Winkler R, Ramírez-Ordorica A, Elizarraraz-Anaya MIC, Carrillo-Rayas MT, Valencia-Cantero E, Macías-Rodríguez L (2019) A mass spectrometry-based study shows that volatiles emitted by *Arthrobacter agilis* UMCV2 increase the content of brassinosteroids in *Medicago truncatula* in response to iron deficiency stress. *Molecules* 24:3011. <https://doi.org/10.3390/molecules24163011>
- Foo E, Ross JJ, Jones WT, Reid JB (2013) Plant hormones in arbuscular mycorrhizal symbioses: an emerging role for gibberellins. *Ann Bot* 111:769–779. <https://doi.org/10.1093/aob/mct041>
- Frugier F, Kosuta S, Murray JD, Crespi M, Szczygłowski K (2008) Cytokinin: secret agent of symbiosis. *Trends Plant Sci* 13:115–120. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.01.003>
- García-Gómez P, Almagro G, Sánchez-López AM, Bahaji A, Amezttoy K, Ricarte-Bermejo A, Baslam M, Antolín MC, Urdiain A, López-Belchi MD, López-Gómez MD, Morán JF, Garrido J, Muñoz FJ, Baroja-Fernández E, Pozueta-Romero J (2019) Volatile compounds other than CO₂ emitted by different microorganisms promote distinct posttranscriptionally

- regulated responses in plants. *Plant Cell Environ* 42:1729–1746. <https://doi.org/10.1111/pcc.13490>
- Garnica-Vergara A, Barrera-Ortiz S, Muñoz-Parra E, Raya-Gonzalez J, Méndez-Bravo A, Macías-Rodríguez L, Ruiz-Herrera LF, López-Bucio J (2016) The volatile 6-pentyl-2H-pyran-2-one from *Trichoderma atroviride* regulates *Arabidopsis thaliana* root morphogenesis via auxin signaling and *ETHYLENE INSENSITIVE 2* functioning. *New Phytol* 209:1496–1512. <https://doi.org/10.1111/nph.13725>
- Giron D, Frago E, Glevarec G, Pieterse CMJ, Dicke M (2013) Cytokinins as key regulators in plant-microbiome-insect interactions: connecting plant growth and defense. *Funct Ecol* 27:599–609. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12042>
- Gonzalez-Rizzo S, Crespi M, Frugier F (2006) The *Medicago truncatula* CRE1 cytokinin receptor regulates lateral root development and early symbiotic interaction with *Sinorhizobium meliloti*. *Plant Cell* 18:2680–2693. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.043778>
- Götz C, Fekete A, Gebeffuegi I, Forczek ST, Fuksová K, Li X, Englmann M, Gryndler M, Hartmann A, Matucha M, Schmitt-Kopplin P, Schröder P (2007) Uptake, degradation and chiral discrimination of *N*-acyl-D/L-homoserine lactones by barley (*Hordeum vulgare*) and yam bean (*Pachyrhizus erosus*) plants. *Anal Bioanal Chem* 389:1447–1457. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1579-2>
- Gouda S, Kerry RG, Das G, Paramithiotis S, Shin HS, Patra JK (2018) Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiol Res* 206:131–140. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.08.016>
- Groenhagen U, Baumgartner R, Bailly A, Gardiner A, Eberl L, Schulz S, Weiskopf L (2013) Production of bioactive volatiles by different *Burkholderia ambifaria* strains. *J Chem Ecol* 39:892–906. <https://doi.org/10.1007/s10886-013-0315-y>
- Großkinsky DK, van der Graaff E, Roitsch T (2014) Abscisic acid–cytokinin antagonism modulates resistance against *Pseudomonas syringae* in tobacco. *Phytopathology* 104:1283–1288. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-03-14-0076-R>
- Guo Y, Jud W, Ghirardo A, Antritter F, Benz JP, Schnitzler JP, Rosenkranz M (2020) Sniffing fungi-phenotyping of volatile chemical diversity in *Trichoderma* species. *New Phytol* 227:244–259. <https://doi.org/10.1111/nph.16530>
- Gutiérrez-Luna FM, López-Bucio J, Altamirano-Hernández J, Valencia-Cantero E, Reyes de la Cruz H, Macías-Rodríguez L (2010) Plant growth-promoting rhizobacteria modulate root-system architecture in *Arabidopsis thaliana* through volatile organic compound emission. *Symbiosis* 51:75–83. <https://doi.org/10.1007/s13199-010-0066-2>
- Hamayun M, Khan SA, Khan MA, Khan AL, Kang SM, Kim SK, Joo GJ, Lee IJ (2009) Gibberellin production by pure cultures of a new strain of *Aspergillus fumigatus*. *World J Microbiol Biotechnol* 25:1785–1792. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0078-3>
- Haney CH, Samuel BS, Bush J, Ausubel FM (2015) Associations with rhizosphere bacteria can confer an adaptive advantage to plants. *Nat Plants* 1:15051. <https://doi.org/10.1038/nplants.2015.51>
- Hao HT, Zhao X, Shang QH, Wang Y, Guo ZH, Zhang YB, Xie ZK, Wang RY (2016) Comparative Digital gene expression analysis of the *Arabidopsis* response to volatiles emitted by *Bacillus amyloliquefaciens*. *PLoS One* 11:e0158621. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158621>
- Hardoim PR, van Overbeek LS, Elsas JD (2008) Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends Microbiol* 16:463–471. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.07.008>
- Henrissat B, Driguez H, Viet C, Schülein M (1985) Synergism of cellulases from *Trichoderma reesei* in the degradation of cellulose. *Nat Biotechnol* 3:722–726. <https://doi.org/10.1038/nbt0885-722>
- Herrera-Paredes S, Lebeis SL (2016) Giving back to the community: microbial mechanisms of plant-soil interactions. *Funct Ecol* 30:1043–1052. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12684>

- Hershey DM, Lu X, Zi J, Peters RJ (2014) Functional conservation of the capacity for *ent*-kaurene biosynthesis and an associated operon in certain rhizobia. *J Bacteriol* 196:100–106. <https://doi.org/10.1128/JB.01031-13>
- Hinsinger P, Plassard C, Tang C, Jaillard B (2003) Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: a review. *Plant Soil* 248:43–59. <https://doi.org/10.1023/A:1022371130939>
- Hirano K, Tanaka MU, Matsuoka M (2008) GID1 mediated gibberellin signaling in plants. *Trends Plant Sci* 13:192–199. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.02.005>
- Huang Y, Li H, Hutchison CE, Lasky J, Kieber JJ (2003) Biochemical and functional analysis of CTR1, a protein kinase that negatively regulates ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Plant J* 33: 221–233. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2003.01620.x>
- Hwang HH, Yang FJ, Cheng TF, Chen YC, Lee YL, Tsai YL, Lai EM (2013) The Tzs protein and exogenous cytokinin affect virulence gene expression and bacterial growth of *Agrobacterium tumefaciens*. *Phytopathology* 103:888–899. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-13-0020-R>
- Jaroszuk-Ścisiel J, Tyśkiewicz R, Nowak A, Ozimek E, Majewska M, Hanaka A, Tyśkiewicz K, Pawlik A, Janusz G (2019) Phytohormones (auxin, gibberellin) and ACC deaminase in vitro synthesized by the mycoparasitic *Trichoderma* DEMTkZ3A0 strain and changes in the level of auxin and plant resistance markers in wheat seedlings inoculated with this strain conidia. *Int J Mol Sci* 20:4923. <https://doi.org/10.3390/ijms20194923>
- Jia YJ, Kakuta Y, Sugawara M, Igarashi T, Oki N, Kasaki M, Shoji T, Kanetuna Y, Horita T, Matsui H, Honma M (1999) Synthesis and degradation of 1 aminocyclopropane 1 carboxylic acid by *Penicillium citrinum*. *Biosci Biotechnol Biochem* 63:542–549. <https://doi.org/10.1271/bbb.63.542>
- Joshi MV, Loria R (2007) *Streptomyces turgidiscabies* possesses a functional cytokinin biosynthetic pathway and produces leafy galls. *Mol Plant-Microbe Interact* 20:751–758. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-7-0751>
- Juan-Ovejero R, Briones MJ, Öpik M (2020) Fungal diversity in peatlands and its contribution to carbon cycling. *Appl Soil Ecol* 146:103393. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.103393>
- Kazan K (2015) Diverse roles of jasmonates and ethylene in abiotic stress tolerance. *Trends Plant Sci* 20:219–229. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.02.001>
- Kepinski S, Leyser O (2005) The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435: 446–451. <https://doi.org/10.1038/nature03542>
- Khatabi B, Molitor A, Lindermayr C, Piffli S, Durner J, von Wettstein D, Kogel KH, Schäfer P (2012) Ethylene supports colonization of plant roots by the mutualistic fungus *Piriformospora indica*. *PLoS One* 7:e35502. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035502>
- Kieber JJ, Rothenberg M, Roman G, Feldmann KA, Ecker JR (1993) CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the raf family of protein kinases. *Cell* 72:427–441. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90119-b](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90119-b)
- Kim H, Lee YH (2020) The rice microbiome: a model platform for crop holobiome. *Phytobiomes J* 4:5–18. <https://doi.org/10.1094/PBIOMES-07-19-0035-RVW>
- Ko D, Kang J, Kiba T, Park J, Kojima M, Do J, Kim KY, Kwon M, Endler A, Song WY, Martinoia E, Sakakibara H, Lee Y (2014) *Arabidopsis* ABCG14 is essential for the root-to-shoot translocation of cytokinin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:7150–7155. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321519111>
- Kundu A, DasGupta M (2018) Silencing of putative cytokinin receptor histidine kinase1 inhibits both inception and differentiation of root nodules in *Arachis hypogaea*. *Mol Plant-Microbe Interact* 31:187–199. <https://doi.org/10.1094/MPMI-06-17-0144-R>
- Lee B, Farag MA, Park HB, Klopper JW, Lee SH, Ryu CM (2012) Induced resistance by a long-chain bacterial volatile: elicitation of plant systemic defense by a C13 volatile produced by *Paenibacillus polymyxa*. *PLoS One* 7:e48744. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048744>
- Lee J, Han CT, Hur Y (2013) Molecular characterization of the *Brassica rapa* auxin-repressed, superfamily genes, *BrARP1* and *BrDRM1*. *Mol Biol Rep* 40:197–209. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-2050-9>

- Lemfack MC, Gohlke BO, Toguem SMT, Preissner S, Piechulla B, Preissner R (2018) mVOC 2.0: a database of microbial volatiles. *Nucleic Acids Res* 46:D1261–D1265. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1016>
- Li N, Wang W, Bitas V, Subbarao K, Liu X, Kang S (2018) Volatile compounds emitted by diverse *Verticillium* species enhance plant growth by manipulating auxin signaling. *Mol Plant-Microbe Interact* 31:1021–1031. <https://doi.org/10.1094/MPMI-11-17-0263-R>
- Liu Y, Wang P, Pan G, Crowley D, Li L, Zheng J, Zhang X, Zheng J (2016) Functional and structural responses of bacterial and fungal communities from paddy fields following long-term rice cultivation. *J Soil Sediment* 16:1460–1471. <https://doi.org/10.1007/s11368-015-1343-8>
- Liu K, Newman M, McInroy JA, Hu CH, Kloepper JW (2017) Selection and assessment of plant growth-promoting rhizobacteria for biological control of multiple plant diseases. *Phytopathology* 107:928–936. <https://doi.org/10.1094/PHTO-02-17-0051-R>
- Lohar DP, Schaff JE, Laskey JG, Kieber JJ, Bilyeu KD, Bird DM (2004) Cytokinins play opposite roles in lateral root formation, and nematode and Rhizobial symbioses. *Plant J* 38:203–214. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2004.02038.x>
- Lombardi N, Vitale S, Turrà D, Reverberi M, Fanelli C, Vinale F, Marra R, Ruocco M, Pascale A, d'Errico G, Woo SL, Lorito M (2018) Root exudates of stressed plants stimulate and attract *Trichoderma* soil fungi. *Mol Plant-Microbe Interact* 31:982–994. <https://doi.org/10.1094/MPMI-12-17-0310-R>
- López-Bucio J, Campos-Cuevas JC, Hernández-Calderón E, Velásquez-Becerra C, Fariás-Rodríguez R, Valencia-Cantero E (2007) *Bacillus megaterium* rhizobacteria promote growth and alter root-system architecture through an auxin and ethylene independent signaling mechanism in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant-Microbe Interact* 20:207–217. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-2-0207>
- Lugtenberg B, Kamilova F (2009) Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu Rev Microbiol* 63: 541–546. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162918>
- Lundberg DS, Lebeis SL, Herrera Paredes S, Yourstone S, Gehring J, Malfatti S, Tremblay J, Engelbrektson A, Kunin V, del Río TG, Edgar RC, Eickhorst T, Ley RE, Hugenholtz P, Green S, Dangel JL (2012) Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Nature* 488:86–90. <https://doi.org/10.1038/nature11237>
- Macías-Rodríguez L, Guzmán-Gómez A, García-Juárez P, Contreras-Cornejo HA (2018) *Trichoderma atroviride* promotes tomato development and alters the root exudation of carbohydrates, which stimulates fungal growth and the biocontrol of the phytopathogen *Phytophthora cinnamomi* in a tripartite interaction system. *FEMS Microbiol Ecol* 94(9):fy137. <https://doi.org/10.1093/femsec/fy137>
- MacMillan J (2002) Occurrence of gibberellins in vascular plants, fungi, and bacteria. *J Plant Growth Regul* 20:387–442. <https://doi.org/10.1007/s003440010038>
- Manzoni S, Schimel JP, Porporato A (2012) Responses of soil microbial communities to water stress: results from a meta-analysis. *Ecology* 93:930–938. <https://doi.org/10.1890/11-0026.1>
- Martínez-Medina A, Pescador L, Fernández I, Rodríguez-Serrano M, García JM, Romero-Puertas MC, Pozo MJ (2019) Nitric oxide and phytohemoglobin PHYTOGB1 are regulatory elements in the *Solanum lycopersicum*-*Rhizophagus irregularis* mycorrhizal symbiosis. *New Phytol* 223:1560–1574. <https://doi.org/10.1111/nph.15898>
- Meldau DG, Meldau S, Hoang LH, Underberg S, Wünsche H, Baldwin IT (2013) Dimethyl disulfide produced by the naturally associated bacterium *Bacillus* sp B55 promotes *Nicotiana attenuata* growth by enhancing sulfur nutrition. *Plant Cell* 25:2731–2747. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.114744>
- Meng X, Miao Y, Liu Q, Ma L, Guo K, Liu D, Ran W, Shen Q (2019) *TgSWO* from *Trichoderma guizhouense* NJAU4742 promotes growth in cucumber plants by modifying the root morphology and the cell wall architecture. *Microb Cell Factories* 18:148. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1196-8>
- Minami R, Uchiyama K, Murakami T, Kawai J, Mikami K, Yamada T, Yokoi D, Ito H, Matsui H, Honma M (1998) Properties, sequence, and synthesis in *Escherichia coli* of

- 1 aminocyclopropane 1 carboxylate deaminase from *Hansenula saturnus*. *J Biochem* 123: 1112–1118. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022050>
- Minerdi D, Bossi S, Maffei M, Gullino M, Garibaldi A (2011) *Fusarium oxysporum* and its bacterial consortium promote lettuce growth and expansin A5 gene expression through microbial volatile organic compounds (MVOC) emission. *FEMS Microbiol Ecol* 76:342–351
- Mitchell EAD, Gilbert D, Buttler A, Amblard C, Grosvernier P, Gobat JM (2003) Structure of microbial communities in *Sphagnum* peatlands and effect of atmospheric carbon dioxide enrichment. *Microb Ecol* 46:187–199. <https://doi.org/10.1007/BF03036882>
- Montejano-Ramírez V, Martínez-Cámara R, García-Pineda E, Valencia-Cantero E (2018) Rhizobacterium *Arthrobacter agilis* UMCV2 increases organ-specific expression of *FRO* genes in conjunction with genes associated with the systemic resistance pathways of *Medicago truncatula*. *Acta Physiol Plant* 40:138. <https://doi.org/10.1007/s11738-018-2712-x>
- Morrone D, Chambers J, Lowry L, Kim G, Anterola A, Bender K, Peters RJ (2009) Gibberellin biosynthesis in bacteria: separate *ent*-copalyl diphosphate and *ent*-kaurene synthases in *Bradyrhizobium japonicum*. *FEBS Lett* 583:475–480. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.12.052>
- Murphy JF, Zehnder GW, Schuster DJ, Sikora EJ, Polston JE, Kloepper JW (2000) Plant growth-promoting rhizobacteria mediated protection in tomato against *Tomato mottle virus*. *Plant Dis* 84:779–784. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.7.779>
- Nagahama K, Yoshino K, Matsuoka M, Sato M, Tanase S, Ogawa T, Fukuda H (1994) Ethylene production by strains of the plant pathogenic bacterium *Pseudomonas syringae* depends upon the presence of indigenous plasmids carrying homologous genes for the ethylene forming enzyme. *Microbiology* 140:2309–2313. <https://doi.org/10.1099/13500872-140-9-2309>
- Nagahashi G, Douds DD (2000) Partial separation of root exudate compounds and their effects upon the growth of germinated spores of AM fungi. *Mycol Res* 104:1453–1464. <https://doi.org/10.1017/S0953756200002860>
- Nett RS, Contreras T, Peters RJ (2017) Characterization of CYP115 as a gibberellin 3-oxidase indicates that certain rhizobia can produce bioactive gibberellin A4. *ACS Chem Biol* 12:912–917. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.6b01038>
- Newton AC, Fitt BDL, Atkins SD, Walters DR, Daniel TJ (2010) Pathogenesis, parasitism and mutualism in the trophic space of microbe-plant interactions. *Trends Microbiol* 18:365–373. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2010.06.002>
- Niu DD, Liu HX, Jiang CH, Wang YP, Wang QY, Jin HL, Guo JH (2011) The plant growth-promoting rhizobacterium *Bacillus cereus* AR156 induces systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* by simultaneously activating salicylate- and jasmonate/ethylene-dependent signaling pathways. *Mol Plant-Microbe Interact* 24:533–542. <https://doi.org/10.1094/MPML-09-10-0213>
- Okon Y, Labandera-Gonzalez CA (1994) Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biol Biochem* 26:1591–1601. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(94\)90311-5](https://doi.org/10.1016/0038-0717(94)90311-5)
- Oldroyd GED, Murray JD, Poole PS, Downie JA (2011) The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annu Rev Genet* 45:119–144. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132549>
- Orozco-Mosqueda MC, Velázquez-Becerra C, Macías-Rodríguez LI, Santoyo G, Flores-Cortez I, Alfaro-Cuevas R, Valencia-Cantero E (2013) *Arthrobacter agilis* UMCV2 induces iron acquisition in *Medicago truncatula* (strategy I plant) in vitro via dimethylhexadecylamine emission. *Plant Soil* 362:51–66. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1263-y>
- Ortiz-Castro R, Martínez-Trujillo M, López-Bucio J (2008) N-acyl-L-homoserine lactones: a class of bacterial quorum-sensing signals alter post-embryonic root development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ* 31:1497–1509. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01863.x>
- Ortiz-Castro R, Contreras-Cornejo HA, Macías-Rodríguez L, López-Bucio J (2009) The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signal Behav* 4:701–712. <http://www.landesbioscience.com/journals/psb/article/9047>

- Park YS, Dutta S, Ann M, Raaijmakers JM, Park K (2015) Promotion of plant growth by *Pseudomonas fluorescens* strain SS101 via novel volatile organic compounds. *Biochem Biophys Res Commun* 461:361–365. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.04.039>
- Parry G, Estelle M (2006) Auxin receptors: a new role for F-box proteins. *Curr Opin Cell Biol* 18:152–156. <https://doi.org/10.1016/jceb.2006.02.001>
- Payne CM, Knott BC, Mayes HB, Hansson H, Himmel ME, Sandgren M, Ståhlberg J, Beckham GT (2015) Fungal cellulases. *Chem Rev* 115:1308–1448. <https://doi.org/10.1021/cr500351c>
- Pérez-Flores P, Valencia-Cantero E, Altamirano-Hernández J, Pelagio-Flores R, López-Bucio J, García-Juárez P, Macías-Rodríguez L (2017) *Bacillus methylotrophicus* M4-96 isolated from maize (*Zea mays*) rhizosphere increases growth and auxin content in *Arabidopsis thaliana* via emission of volatiles. *Protoplasma* 254:2201–2213. <https://doi.org/10.1007/s00709-017-1109-9>
- Podlešáková K, Fardoux J, Patrel D, Bonaldi K, Novák O, Strnad M, Giraud E, Spíchal L, Nouwen N (2013) Rhizobial synthesized cytokinins contribute to but are not essential for the symbiotic interaction between photosynthetic bradyrhizobia and *Aeschynomene* legumes. *Mol Plant-Microbe Interact* 26:1232–1238. <https://doi.org/10.1094/MPMI-03-13-0076-R>
- Ponzio C, Gols R, Pieterse CMJ, Dicke M (2013) Ecological and phytohormonal aspects of plant volatile emission in response to single and dual infestations with herbivores and phytopathogens. *Funct Ecol* 27:587–598. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12035>
- Qin X, Liu JH, Zhao SS, Chen XJ, Guo ZJ, Peng YL (2013) Gibberellin 20-oxidase gene *OsGA20ox3* regulates plant stature and disease development in rice. *Mol Plant-Microbe Interact* 26:227–239. <https://doi.org/10.1094/MPMI-05-12-0138-R>
- Raghavendra AS, Gonugunta VK, Christmann A, Grill E (2010) ABA perception and signalling. *Trends Plant Sci* 15:395–401. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.04.006>
- Ramakrishna W, Yadav R, Li K (2019) Plant growth promoting bacteria in agriculture: two sides of a coin. *Appl Soil Ecol* 138:10–18. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.02.019>
- Ramírez-Ordorica A, Valencia-Cantero E, Flores-Cortes I, Carrillo-Rayas MT, Elizarraraz-Anaya MIC, Montero-Vargas J, Winkler R, Macías-Rodríguez L (2020) Metabolomic effects of the colonization of *Medicago truncatula* by the facultative endophyte *Arthrobacter agilis* UMCV2 in a foliar inoculation system. *Sci Rep* 10:8426. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65314-4>
- Rasmann S, Turlings TCJ (2016) Root signals that mediate mutualistic interactions in the rhizosphere. *Curr Opin Plant Biol* 32:62–68. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.06.017>
- Ray P, Chi MH, Guo Y, Chen C, Adam C, Kuo A, LaButti K, Lipzen A, Barry KW, Grigoriev IV, Tang Y, Craven KD (2018) Genome sequence of the plant growth promoting fungus *Serendipita vermifera* subsp. *bescii*: the first native strain from North America. *Phytobiomes* 2:62–63. <https://doi.org/10.1094/PBIOMES-04-17-0017-A>
- Real-Santillán RO, del Val E, Cruz-Ortega R, Contreras-Cornejo HA, González-Esquivel CE, Larsen J (2019) Increased maize growth and P uptake promoted by arbuscular mycorrhizal fungi coincide with higher foliar herbivory and larval biomass of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. *Mycorrhiza* 29:615–622. <https://doi.org/10.1007/s00572-019-00920-3>
- Reboutier D, Bianchi M, Brault M, Roux C, Dauphin A, Rona JP, Legué V, Lapeyrie F, Bouteau F (2002) The indolic compound hypaphorine produced by ectomycorrhizal fungus interferes with auxin action and evokes early responses in nonhost *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant-Microbe Interact* 15:932–938. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2002.15.9.932>
- Redford AJ, Bowers RM, Knight R, Linhart Y, Fierer N (2010) The ecology of the phyllosphere: geographic and phylogenetic variability in the distribution of bacteria on tree leaves. *Environ Microbiol* 12:2885–2893. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02258.x>
- Romero FM, Marina M, Pieckenstein FL (2014) The communities of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) leaf endophytic bacteria, analyzed by 16S-ribosomal RNA gene pyrosequencing. *FEMS Microbiol Lett* 351:187–194. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12377>
- Ryu CM, Farag MA, Hu CH, Reddy MS, Wei HX, Paré PW, Kloepper JW (2003) Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4927–4932. <https://doi.org/10.1073/pnas.0730845100>

- Ryu CM, Farag MA, Hu CH, Reddy MS, Kloepper JW, Paré PW (2004) Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 134:1017–1026. <https://doi.org/10.1104/pp.103.026583>
- Sánchez-Rodríguez C, Rubio-Somoza I, Sibout R, Persson S (2010) Phytohormones and the cell wall in *Arabidopsis* during seedling growth. *Trends Plant Sci* 15:291–301. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.03.002>
- Santoro MV, Zygadlo J, Giordano W, Banchio E (2011) Volatile organic compounds from rhizobacteria increase biosynthesis of essential oils and growth parameters in peppermint (*Mentha piperita*). *Plant Physiol Biochem* 49:1177–1182. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.07.016>
- Santoyo G, Moreno-Hagelsieb G, Orozco-Mosqueda MC, Glick BR (2016) Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiol Res* 183:92–99. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.008>
- Sasse J, Martinoia E, Northen T (2018) Feed your friends: do plant exudates shape the root microbiome? *Trends Plant Sci* 23:25–41. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.09.003>
- Schäfer P, Piffli S, Voll LM, Zajic D, Chandler PM, Waller F, Scholz U, Kühnemann JP, Sonnwald S, Sonnwald U, Kogel KH (2009) Phytohormones in plant root *Piriformospora indica* mutualism. *Plant Signal Behav* 4:669–671. <https://doi.org/10.4161/psb.4.7.9038>
- Schausberger P, Peneder S, Jürschik S, Hoffmann D (2012) Mycorrhiza changes plant volatiles to attract spider mite enemies. *Funct Ecol* 26:441–449. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2011.01947.x>
- Sessitsch A, Coenye T, Sturz AV, Vandamme P, Barka EA, Salles JF, Van Elsas JD, Faure D, Reiter B, Glick BR, Wang-Pruski G, Nowak J (2005) *Burkholderia phytofirmans* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with plant beneficial properties. *Int J Syst Evol Microbiol* 55: 1187–1192. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63149-0>
- Sevilla M, Burris RH, Gunapala N, Kennedy C (2001) Comparison of benefit to sugarcane plant growth and 15N2 incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and Nif- mutant strains. *Mol Plant-Microbe Interact* 14:358–366. <https://doi.org/10.1094/MPML2001.14.3.358>
- Shi TQ, Peng H, Zeng SY, Ji RY, Shi K, He H, Ji XJ (2017) Microbial production of plant hormones: opportunities and challenges. *Bioengineered* 8:124–128. <https://doi.org/10.1080/21655979.2016.1212138>
- Siemens J, Keller I, Sarx J, Kunz S, Schuller A, Nagel W, Schmölling T, Parniske M, Ludwig-Müller J (2006) Transcriptome analysis of *Arabidopsis* clubroots indicate a key role for cytokinins in disease development. *Mol Plant-Microbe Interact* 19:480–494. <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-0480>
- Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R (2007) Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol Rev* 31:425–448. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00072.x>
- Splivallo R, Fischer U, Göbel C, Fewsner I, Petr K (2009) Truffles regulate root morphogenesis via the production of auxin and ethylene. *Plant Physiol* 150:2018–2019. <https://doi.org/10.1104/pp.109.141325>
- Steindler L, Bertani I, De Sordi L, Schwager S, Eberl L, Venturi V (2009) LasI/R and RhII/R quorum sensing in a strain of *Pseudomonas aeruginosa* beneficial to plants. *Appl Environ Microbiol* 75:5131–5140. <https://doi.org/10.1128/AEM.02914-08>
- Stringlis IA, Ke Y, Feussner K, de Jonge R, Van Bentum S, Van Verk MC, Berendsen RL, Bakker PAHM, Feussner I, Pieterse CMJ (2018) MYB72-dependent coumarin exudation shapes root microbiome assembly to promote plant health. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115:E5213–E5222. <https://doi.org/10.1073/pnas.1722335115>
- Swarup R, Friml J, Marchant A, Ljung K, Sandberg G, Palme K, Bennett M (2001) Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the *Arabidopsis* root apex. *Genes Dev* 15:2648–2653. <https://doi.org/10.1101/gad.210501>

- Tahir HAS, Gu Q, Wu H, Raza W, Hanif A, Wu L, Colman MV, Gao X (2017) Plant growth promotion by volatile organic compounds produced by *Bacillus subtilis* SYST2. *Front Microbiol* 8:171. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00171>
- Tatsukami Y, Ueda M (2016) Rhizobial gibberellin negatively regulates host nodule number. *Sci Rep* 6:27998. <https://doi.org/10.1038/srep27998>
- Thormann MN, Rice AV, Beilman DW (2007) Yeasts in peatlands: a review of richness and roles in peat decomposition. *Wetlands* 27:761–772. [https://doi.org/10.1672/20277-5212\(2007\)27\[761:YIPARO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1672/20277-5212(2007)27[761:YIPARO]2.0.CO;2)
- Timm CM, Campbell AG, Utturkar SM, Jun SR, Parales RE, Tan WA, Robeson MS, Lu TYS, Jawdy S, Brown SD, Ussery DW, Schadt CW, Tuskan GA, Doktycz MJ, Weston DJ, Pelletier DA (2015) Metabolic functions of *Pseudomonas fluorescens* strains from *Populus deltoides* depend on rhizosphere or endosphere isolation compartment. *Front Microbiol* 6:1118. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01118>
- Tsuchisaka A, Theologis A (2004) Unique and overlapping expression patterns among the *Arabidopsis* 1 amino cyclopropane 1 carboxylate synthase gene family members. *Plant Physiol* 136:2982–3000
- Tyc O, Song C, Dickschat JS, Vos M, Garbeva P (2017) The ecological role of volatile and soluble secondary metabolites produced by soil bacteria. *Trends Microbiol* 25:280–292. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.12.002>
- Vadassery J, Ritter C, Venus Y, Camehl I, Varma A, Shahollari B, Novák O, Strand M, Ludwig Müller J, Oelmüller R (2008) The role of auxins and cytokinins in the mutualistic interaction between *Arabidopsis* and *Piriformospora indica*. *Mol Plant-Microbe Interact* 21:1371–1383. <https://doi.org/10.1094/MPMI-21-10-1371>
- Vaishnav A, Kumari S, Jain S, Varma A, Choudhary DK (2015) Putative bacterial volatile-mediated growth in soybean (*Glycine max* L. Merrill) and expression of induced proteins under salt stress. *J Appl Microbiol* 119:539–551. <https://doi.org/10.1111/jam.12866>
- Van Dam NM, Bouwmeester HJ (2016) Metabolomics in the rhizosphere: tapping into below-ground chemical communication. *Trends Plant Sci* 21:256–265. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.008>
- Varbanova M, Yamaguchi S, Yang Y, McKelvey K, Hanada A, Borochoy R, Yu F, Jikumaru Y, Ross J, Cortes D, Ma CJ, Noel JP, Mander L, Shulaev V, Kamiya Y, Rodermeil S, Weiss D, Pichersky E (2007) Methylation of gibberellins by *Arabidopsis* GAMT1 and GAMT2. *Plant Cell* 19:32–45. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.044602>
- Velázquez-Becerra C, Macías-Rodríguez LI, López-Bucio J, Altamirano-Hernández J, Flores-Cortez I, Valencia-Cantero E (2011) A volatile organic compound analysis from *Arthrobacter agilis* identifies dimethylhexadecylamine, an amino-containing lipid modulating bacterial growth and *Medicago sativa* morphogenesis in vitro. *Plant Soil* 339:329–340. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0583-z>
- Vicente-Hernández A, Salgado-Garciglia R, Valencia-Cantero E, Ramírez-Ordorica A, Hernández-García A, García-Juárez P, Macías-Rodríguez L (2019) *Bacillus methylotrophicus* M4-96 stimulates the growth of strawberry (*Fragaria × ananassa* 'Aromas') plants in vitro and slows *Botrytis cinerea* infection by two different methods of interaction. *J Plant Growth Regul* 38:765–777. <https://doi.org/10.1007/s00344-018-9888-6>
- Villalobos-Escobedo JM, Esparza-Reynoso S, Pelagio-Flores R, López-Ramírez F, Ruiz-Herrera LF, López-Bucio J, Herrera-Estrella A (2020) The fungal NADPH oxidase is an essential element for the molecular dialog between *Trichoderma* and *Arabidopsis*. *Plant J* 103:2178–2192. <https://doi.org/10.1111/tpj.14891>
- Viterbo A, Landau U, Kim S, Chernin L, Chet I (2010) Characterization of ACC deaminase from the biocontrol and plant growth promoting agent *Trichoderma asperellum* T203. *FEMS Microbiol Lett* 305:42–48. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.01910.x>
- Vlot AC, Dempsey DA, Klessig DF (2009) Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu Rev Phytopathol* 47:177–206. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.050908.135202>

- Von Rad U, Klein I, Dobrev PI, Kottova J, Zazimalova E, Fekete A, Hartmann A, Schmitt-Kopplin P, Durner J (2008) Response of *Arabidopsis thaliana* to *N*-hexanoyl-DL-homoserine-lactone, a bacterial quorum sensing molecule produced in the rhizosphere. *Planta* 229:73–85. <https://doi.org/10.1007/s00425-008-0811-4>
- Waller F, Mukherjee K, Deshmukh SD, Achatz B, Sharma M, Schäfer P, Kogel KH (2008) Systemic and local modulation of plant responses by *Piriformospora indica* and related Sebaciales species. *Plant Physiol* 165:60–70. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.05.017>
- Wang Y, Ohara Y, Nakayashiki H, Tosa Y, Mayama S (2005) Microarray analysis of the gene expression profile induced by the endophytic plant growth-promoting rhizobacteria, *Pseudomonas fluorescens* FPT9601-T5 in *Arabidopsis*. *Mol Plant-Microbe Interact* 18:385–396. <https://doi.org/10.1094/MPMI-18-0385>
- Wang S, Wang S, Sun Q, Yang L, Zhu Y, Yuan Y, Hua J (2017) A role of cytokinin transporter in *Arabidopsis* immunity. *Mol Plant-Microbe Interact* 30:325–333. <https://doi.org/10.1094/MPMI-01-17-0011-R>
- Wang KD, Borrego EJ, Kenerley CM, Kolomiets MV (2020) Oxylinins other than jasmonic acid are xylem-resident signals regulating systemic resistance induced by *Trichoderma virens* in maize. *Plant Cell* 32:166–185. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00487>
- Weingart H, Völksch B, Ullrich MS (1999) Comparison of ethylene production by *Pseudomonas syringae* and *Ralstonia solanacearum*. *Phytopathology* 89:360–365. <https://doi.org/10.1094/PHTO.1999.89.5.360>
- Xie X, Zhang H, Paré PW (2009) Sustained growth promotion in *Arabidopsis* with long-term exposure to the beneficial soil bacterium *Bacillus subtilis* (GB03). *Plant Signal Behav* 4:948–953. <https://doi.org/10.4161/psb.4.10.9709>
- Xie SS, Wu HJ, Zang HY, Wu LM, Zhu QQ, Gao XW (2014) Plant growth promotion by spermidine-producing *Bacillus subtilis* OKB105. *Mol Plant-Microbe Interact* 27:655–663. <https://doi.org/10.1094/MPMI-01-14-0010-R>
- Yamaguchi S (2008) Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu Rev Plant Biol* 59:225–251. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092804>
- Yuan CL, Zhang LM, Wang JT, Hu HW, Shen JP, Cao P, He JZ (2019) Distributions and environmental drivers of archaea and bacteria in paddy soils. *J Soils Sediments* 19:23–37. <https://doi.org/10.1007/s11368-018-1997-0>
- Zhang H, Sun Y, Xie X, Kim MS, Dowd SE, Paré PW (2009) A soil bacterium regulates plant acquisition of iron via deficiency-inducible mechanisms. *Plant J* 58:568–577. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2009.03803.x>
- Zhao Y (2008) The role of local biosynthesis of auxin and cytokinin in plant development. *Curr Opin Plant Biol* 11:16–22. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.10.008>
- Zhao Y, Li C, Ge J, Xu M, Zhu Q, Wu T, Guo A, Xie J, Dong H (2014) Recessive mutation identifies auxin-repressed protein ARP1, which regulates growth and disease resistance in tobacco. *Mol Plant-Microbe Interact* 7:638–654. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-13-0250-R>
- Zhao Q, Li M, Jia Z, Liu F, Ma H, Huang Y, Song S (2016) AtMYB44 positively regulates the enhanced elongation of primary roots induced by *N*-3-oxo-hexanoyl-homoserine lactone in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant-Microbe Interact* 29:774–785. <https://doi.org/10.1094/MPMI-03-16-0063-R>
- Zhu Y, Nomura T, Xu Y, Zhang Y, Peng Y, Mao B, Hanada A, Zhou H, Wang R, Li P, Zhu X, Mander LN, Kamiya Y, Yamaguchi S, He Z (2006) ELONGATED UPPERMOST INTERNODE encodes a cytochrome P450 monooxygenase that epoxidizes gibberellins in a novel deactivation reaction in rice. *Plant Cell* 18:442–456. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.038455>
- Zipfel C, Oldroyd GED (2017) Plant signalling in symbiosis and immunity. *Nature* 543:328–336. <https://doi.org/10.1038/nature22009>
- Zou C, Li Z, Yu D (2010) *Bacillus megaterium* strain XTBG34 promotes plant growth by producing 2-pentylfuran. *J Microbiol* 48:460–466. <https://doi.org/10.1007/s12275-010-0068-z>
- Zúñiga A, Poupin MJ, Donoso R, Ledger T, Guiliani N, Gutiérrez RA, González B (2013) Quorum sensing and indole-3-acetic acid degradation play a role in colonization and plant growth

- promotion of *Arabidopsis thaliana* by *Burkholderia phytofirmans* PsJN. *Mol Plant-Microbe Interact* 26:546–553. <https://doi.org/10.1094/MPMI-10-12-0241-R>
- Zúniga A, Donoso RA, Ruiz D, Ruz GA, González B (2017) Quorum-sensing systems in the plant growth-promoting bacterium *Paraburkholderia phytofirmans* PsJN exhibit cross-regulation and are involved in biofilm formation. *Mol Plant-Microbe Interact* 30:557–565. <https://doi.org/10.1094/MPMI-01-17-0008-R>



OPEN

Metabolomic effects of the colonization of *Medicago truncatula* by the facultative endophyte *Arthrobacter agilis* UMCV2 in a foliar inoculation system

Arturo Ramírez-Ordorica¹, Eduardo Valencia-Cantero¹, Idolina Flores-Cortez¹,
María Teresa Carrillo-Rayas², Ma. Isabel Cristina Elizarraraz-Anaya², Josaphat Montero-Vargas²,
Robert Winkler² & Lourdes Macías-Rodríguez¹✉

Biofertilizer production and application for sustainable agriculture is already a reality. The methods for biofertilizers delivery in crop fields are diverse. Although foliar spray is gaining wide acceptance, little is known about the influence that the biochemical features of leaves have on the microbial colonization. *Arthrobacter agilis* UMCV2 is a rhizospheric and endophytic bacteria that promotes plant growth and health. In this study, we determined the capacity of the UMCV2 strain to colonize different leaves from *Medicago truncatula* in a foliar inoculation system. By using two powerful analytical methods based on mass spectrometry, we determined the chemical profile of the leaves in 15-d old plants. The metabolic signatures between the unifoliate leaf (m1) and the metamer units developing above (m2 and m3) were different, and interestingly, the highest colony forming units (CFU) was found in m1. The occurrence of the endophyte strongly affects the sugar composition in m1 and m2 leaves. Our results suggest that *A. agilis* UMCV2 colonize the leaves under a foliar inoculation system independently of the phenological age of the leaf and it is capable of modulating the carbohydrate metabolism without affecting the rest of the metabolome.

Plants live in a close relationship with different microbial communities that reside inside or outside the plant tissues. The inside colonizers are referred as endophytes (from the Greek *endon*-within and *phyton*-plant), and when they are inside the plant, they completely depend on the plant and its internal conditions for growth¹⁻⁵. A study of *Arabidopsis thaliana* grown under natural conditions showed that the bacterial community associated with the outside of the roots were more diverse than in the endophytic community, while the opposite pattern was observed in the leaves⁶. In addition, the authors found that leaves and roots shared many species of bacterial endophytes, suggesting that some root endosphere colonizers migrate and are capable of colonizing above-ground tissues; thus the microbial traits for competition and colonization influence the richness and composition of the plant endophytes^{7,8}. According to the literature, the endophytes are non-pathogenic, but some of them could act as latent pathogens that can cause disease, depending on the stressful environmental circumstances^{1,9}. Studies of the functional capacity of beneficial endophytes have revealed their potential as promoters of plant growth and health, moreover, they are free from the environmental pressure of changing soil and climate conditions experienced by their rhizospheric counterparts, so they are an excellent candidate for biofertilizers^{10,11}. The delivery methods of endophytes in agriculture include seed inoculation, soil drenching, stem injection, and foliar fertilization. Currently, there is a renewed interest in a foliar-treated plants and different studies on the effect of bacterial and fungal endophytes on the growth, crop production, nutrient uptake, and defense have appeared in the literature¹²⁻¹⁴.

¹Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edificio B3, Ciudad Universitaria, C. P. 58030, Morelia, Michoacán, México. ²Department of Biotechnology and Biochemistry, Cinvestav Unidad Irapuato. Km. 9.6 Libramiento Norte Carr. Irapuato-León. C. P. 36824, Irapuato, Guanajuato, México. ✉e-mail: lmacias@umich.mx

During the endophyte's colonization, different molecular signaling events occur in the host plant^{9,15}. With the development of more powerful analytical methods, many of the molecules involved in the colonization process have been identified. Untargeted methods based on mass spectrometry, such as direct liquid injection-electrospray ionization-mass spectrometry (DLI-ESI-MS) have increased in popularity in recent years. DLI-ESI-MS shows the broad molecular weight range of compounds present in samples and has been used successfully for metabolomics screening in plants during their interaction with microbes¹⁶ or for studying biochemical changes due to physiological state or in response to the environment^{17–19}.

Arthrobacter agilis UMCV2 is a salmon-pigmented rhizospheric and endophytic actinobacterium that systematically colonizes the leaves of its host²⁰. The bacterium has great potential as a biofertilizer, since it is capable of improving the nutritional status of plants by promoting iron acquisition processes that involve the reduction and dissolution of Fe³⁺ present in the soil^{21–23}. In addition, analyses made by gas chromatography in tandem with mass spectrometry (GC-MS) indicated that the UMCV2 strain interacts with leguminous and monocot plants through the production of volatile compounds, promoting their growth and health^{16,21–24}. A study using the DLI-ESI-MS method showed that volatiles from *A. agilis* UMCV2 induce the accumulation of different metabolites involved in the iron-adaptive processes in *Medicago truncatula*¹⁶.

Foliar inoculation could be a delivery method for introducing *A. agilis* UMCV2 into fields in order to enhance the plant growth and crop production, furthermore, it is timely to conduct a metabolomic approach to determine whether the interconnected leaf phenological age and chemical composition influence the growth of the endophytes in the leaves, and at the same time to gain insight into plant response to the endophytic colonization.

Results

Chemical signature of *M. truncatula* leaves. Control leaves were characterized using metabolic phenotyping by DLI-ESI-MS. This tool provided the broad molecular weight range of compounds in the leaves. The mass spectra obtained showed 1121 ions, but the ion intensities in the unifoliate leaf (m1) were different from those obtained in the first (m2) and second trifoliate leaves (m3) (Fig. 1a,b). The ordering analysis clearly separated the m1 from the m2 and m3 samples with a high significance ($p < 0.001$), contrasted using PERMANOVA (Fig. 1c). To determine the most important ions that distinguish m1 from m2 and m3 leaves, we constructed a Random Forest (RF) model that delivered the 30 most important ions (Fig. 2a). The PCA from the selected ions displayed a group belonging to m1 with an error of less than 1% (Fig. 2b), thus, the separation of m1 from m2 and m3 was even greater after the ion selection (Figs. 1c and 2b). In addition, the RF model did not distinguish between m2 and m3, with an error of up to 40%. These results suggest that the physiological condition of the m1 leaf has a clearly distinct metabolic identity compared to the m2 and m3 leaves, which presented the same chemical profile at the time of harvest.

The DLI-ESI-MS results of the 30 ions were compared with the SpiderMass database. Only 13 ions were putatively identified (Table 1). Precursors of phytohormones (182.07, 427.07, 497.18 m/z), protochlorophyllide (613.42 m/z), defense-related compounds (248.83, 478.29 m/z), structural components of cell membranes (756.46, 782.38, 786.91 m/z), and a soyasaponin (797.25 m/z), were positively identified. The remaining ions did not match any compounds in the database and were classified as unknown (Table 1).

The relative signal magnitude of the 182.07 m/z ion that matched to indole acetaldehyde in the database was higher in m2 and m3 leaves, whereas the magnitudes of the remaining ions were all higher in m1 leaves. Thus, the 182.07 m/z ion could be established as a metabolite marker for the phenological age of *M. truncatula* leaves (Fig. 2b).

Detection and quantification of *A. agilis* UMCV2 in internal leaf tissues. The anatomical structure and chemical features of leaves are presumed to affect the internalization, survival, and growth of the endophytes^{7,25}. In regards to the chemical landscape from different metameric units of *M. truncatula*, we determined that the chemical profile of the m1 leaf was dissimilar to those of m2 and m3; nevertheless, this difference might not influence the endophytic colonization of *A. agilis* UMCV2. The combination of FISH (Fig. 3a–c), qPCR technique, and total viable account determination (Fig. 3d) showed that the endophyte is able to colonize the m1, m2, and m3 leaves after foliar inoculation. Furthermore, m1 showed the highest colonization, while m2 and m3 showed no differences in bacterial DNA content ($p = 0.1687$) (Fig. 3d). In addition, we measured the bacterial population sizes in m1 leaves at different post-inoculation times (24, 72, and 120 h); again, no significant differences were observed in the CFUs. The inoculation experiment was repeated with the half of the cells in the inoculum but no significant differences were observed in this experiment either (Supplementary Fig. S1), showing that the size of the initial inoculation concentration did not modify the final colonization obtained, tending to stabilize to values lower than 1×10^6 CFU/leaf.

Metabolite profiling and sugar content in leaves during plant-microbe interaction. To determine if the metabolite profile changed after the inoculation, we analyzed the leaves by DLI-ESI-MS at day 5 of the interaction. As the ions obtained were the same for both the inoculated and uninoculated leaves, a heat map was constructed with the ions selected by the RF model (Fig. 4). The hierarchical clusters grouped the samples according to the leaf development and inoculation. The control m1 leaf samples clustered separately from the m2 and m3 samples, which were indistinguishable. Furthermore, it was not possible to associate the global chemical changes obtained by DLI-ESI-MS with the occurrence of the endophyte. As DLI-ESI-MS did not cover the complete metabolome, we performed a GC-MS analysis as a complementary method for the identification and quantification of monosaccharides and disaccharides in the leaves. A factorial analysis performed with the results obtained by the chromatographic determinations showed differences in sugar content between the control and inoculated leaves ($p = 1.12 \times 10^{-3}$) (Table 2). Fructose and ethyl-D-glucopyranoside accumulated more in inoculated m1 leaves compared to uninoculated controls; in contrast, glucose and myo-inositol were more

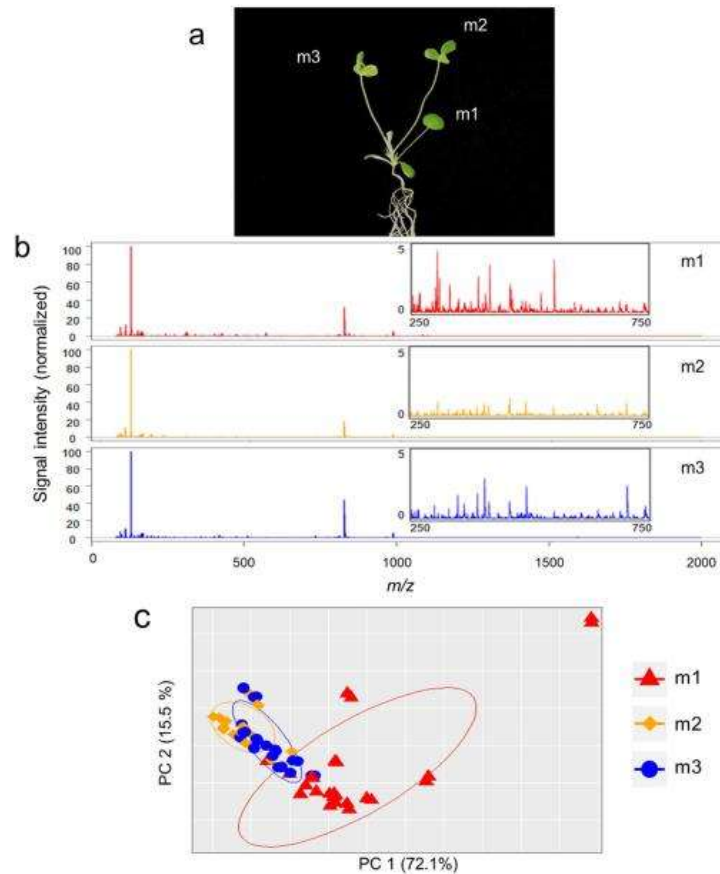


Figure 1. Metabolic phenotyping of *Medicago truncatula* leaves by DLI-ESI-MS. (a) Representative photograph of a 15-day-old *M. truncatula* plant, illustrating the numerical nomenclature used to name the three leaves as m1, m2, and m3. (b) Mass spectra from control m1, m2, and m3 leaves. Inset: expanded view of each mass spectra region at 250 to 750 m/z . (c) Principal component analysis of the metabolites obtained from DLI-ESI-MS in *M. truncatula* m1, m2, and m3 leaves ($n = 24$ for each leaf). PERMANOVA ($\alpha = 0.05$).

abundantly detected in inoculated m2 leaves. Sucrose also was identified, but no differences in levels were found between treatments. Furthermore, no statistical differences in individual or total sugar content (glucose, fructose, myo-inositol, sucrose, and ethyl-D-glucopyranoside) were found between control and inoculated m3 leaves. However, total sugars showed the highest values in the m1 leaves, which corresponded to the largest bacterial colonization.

Discussion

Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) are microorganisms that greatly influence plant growth and productivity and exert an optimal effect on plant health¹⁶; therefore, in crop fields, they are either irrigated in the rhizosphere or applied as foliar spray^{13,27,28}. Some PGPR can colonize plants and thrive inside the tissues, gaining access to the host plants via openings in the root or through stomata, wounds, and hydathodes in the shoot when they fall on the foliage either by artificial inoculation or because of the wind²¹.

The rhizobacterium *A. agilis* UMCV2 used in this study is a facultative endophyte, and has been shown to promote the growth and development of *M. truncatula* under iron-sufficient and -deficient growth conditions^{21,22,29,30}. This study was performed to determine if *A. agilis* UMCV2 was able to colonize the different metabolic units of *M. truncatula* seedlings under a foliar inoculation system. In addition, taking advantage of this

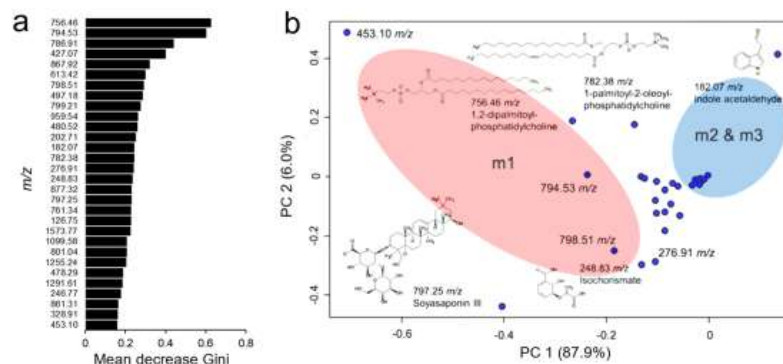


Figure 2. Ranking of ion importance using the Random Forest model (a) and the loading plot of the principal component analysis (PCA) results (b) for discrimination of the phenological age of *M. truncatula* leaves with the DLI-ESI-MS data. Colored ovals in the PCA represent a confidence interval of 95%. Some relevant ions were putatively identified using SpiderMass software and the PlantCyc database.

<i>m/z</i> (± 0.35)	Monoisotopic Mass [Da]	Ionization mode	Common name	Description
182.07	159.06842	[M + Na] ⁺	Indoleacetaldehyde	Indolic, auxin-related compound. Precursor of indole-3-acetic acid in the indole pyruvate route ^{44–46}
248.83	226.047745	[M + Na] ⁺	Isochorismate	Intermediary in the biosynthesis of salicylic acid ^{18–41}
427.07	426.386169	[M + H] ⁺	Amyrin	Intermediary in the synthesis of triterpenes ⁷
478.29	455.353058	[M + Na] ⁺	Oleolate	Intermediary in the synthesis of triterpenes and with proven antimicrobial activity ⁷
497.18	496.339996	[M + H] ⁺	26-Hydroxybrassinolide	Brassinosteroid inactivated form ⁴⁵
613.42	612.22229	[M + H] ⁺	Protochlorophyllide a	Intermediary in the biosynthesis of chlorophyll ¹⁶
756.46	733.562134	[M + Na] ⁺	1,2-Dipalmitoyl-phosphatidylcholine	Cell membrane phospholipid ^{36,37}
782.38	759.57782	[M + Na] ⁺	1-Palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylcholine	Cell membrane phospholipid ^{36,37}
786.91	785.593445	[M + H] ⁺	1-Oleoyl-2-oleoyl-phosphatidylcholine	Cell membrane phospholipid ^{36,37}
797.25	796.460938	[M + H] ⁺	Soyasaponin III	Saponin with defense effect ^{45,71}
867.92	867.131226	[M + H] ⁺	Methylmalonyl-CoA	Product of degradation of branched amino acids, possibly implicated in the biosynthesis of waxes ⁷²
877.32	854.285767	[M + Na] ⁺	Preuroporphyrinogen	Intermediary in the biosynthesis of chlorophyll ¹⁶
959.54	936.580994	[M + Na] ⁺	1,2-Dilinolenoyl-digalactosyl-diacylglycerol	Thylakoid membrane component ^{36,37}
Unknown ions (<i>m/z</i>): 126.75, 202.71, 246.77, 276.91, 328.91, 453.09, 480.52, 761.34, 794.53, 798.51, 799.21, 801.04, 861.31, 1099.58, 1255.24, 1291.61, 1573.42				

Table 1. Putative identification of the main ions obtained by DLI-ESI-MS analyses and SpiderMass software. Tolerance ± 0.35 .

form of bacterial inoculation, we performed a metabolomic profiling to determine whether the chemical composition linked to the phenological age of the leaves influences endophyte growth and colonization. First, we analyzed the metabolite profile of *M. truncatula* leaves to discern the chemical differences between them. At the time of the harvest, the seedlings had one unifoliate leaf (m1), and two trifoliate leaves (m2 and m3). Using DLI-ESI-MS and statistical models for data analysis, we determined that the metabolite profile of m1 was different from that of m2 or m3. Although the ion signals were the same, the intensities of many of them displayed higher relative abundances in m1 leaves. The m1 leaf is the first true leaf produced by the epicotyl; the meristematic region of the epicotyl then continues to grow, adding trifoliate leaves on alternate sides of the developing stem³¹. Thus, the differences in ion intensities among the leaves may correspond to the leaf phenological age^{32–35}. Some of the compounds putatively identified are part of the membranes (e.g., 1, 2-dilinolenoyl-digalactosyl-diacylglycerol).

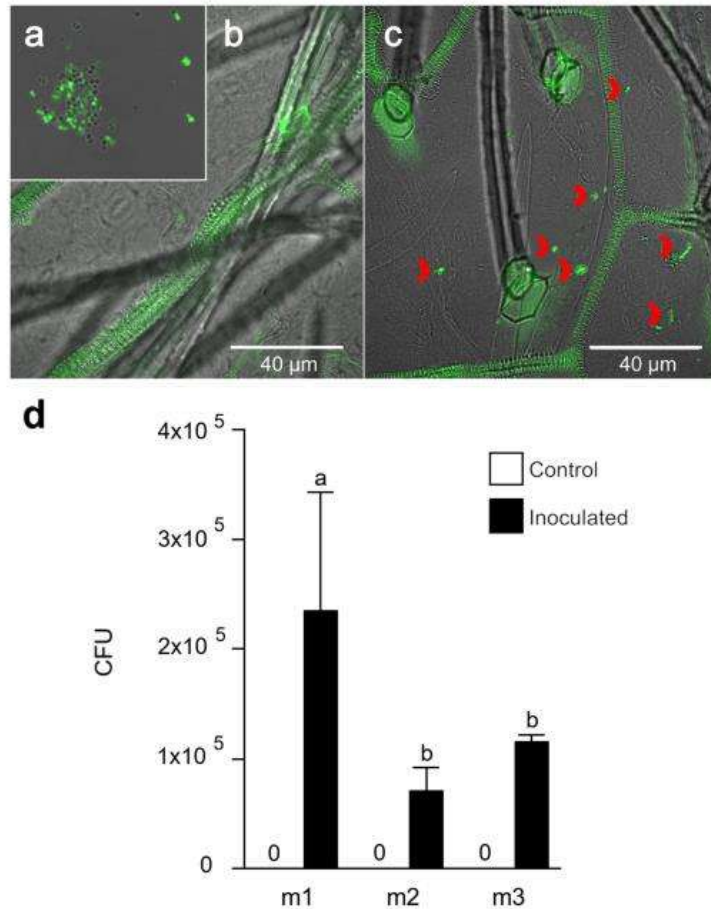


Figure 3. *Arthrobacter agilis* UMCV2 colonization in *Medicago truncatula* leaves following foliar inoculation. (a) Fluorescence *in situ* hybridization assay of the pure microbial culture. (b) Representative photograph of the control and inoculated m1 leaf (c). Arrowheads indicate the presence of microcolonies within the tissue. (d) Quantification of *A. agilis* UMCV2 in the leaf tissues 5 days after foliar inoculation. Bars represent the means \pm standard error values (n = 8). The same letter represents no significant differences between means by Tukey's post-test ($\alpha = 0.05$).

Monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) and digalactosyldiacylglycerol (DGDG) constitute 80% of the total membrane lipids of the thylakoid membranes and they act directly in several important plastid roles, particularly during photosynthesis^{36,37}. In contrast, isochlorismate is involved in plant defense responses as a precursor of salicylic acid (SA), a phenolic phytohormone widely studied for its role in activating defense responses during phytopathogen attacks³⁸. Indeed, SA accumulation in older leaves has been positively correlated with increased disease resistance compared to the youngest leaves^{39–41}. Similarly, saponins are also involved in plant defenses against herbivores and pathogens, in addition to having roles as allelopathic agents⁴².

Brassinosteroids are steroids that regulate many aspects of plant growth and development, especially in stress adaptation¹⁶. They act both independently and in conjunction with other phytohormones, controlling different plant metabolic activities. The brassinosteroid that we found in the m1 leaf is hydroxylated at C-26, leading the inactive form;⁴³ it should be noted that the most bioactive form named brassinolide was previously identified in *M. truncatula* by using a targeted analysis by GC-MS¹⁶. Additionally, we found increased levels of the auxin-related compound indole-3-acetaldehyde (182.07 m/z) in the youngest leaves (m2 and m3). This compound

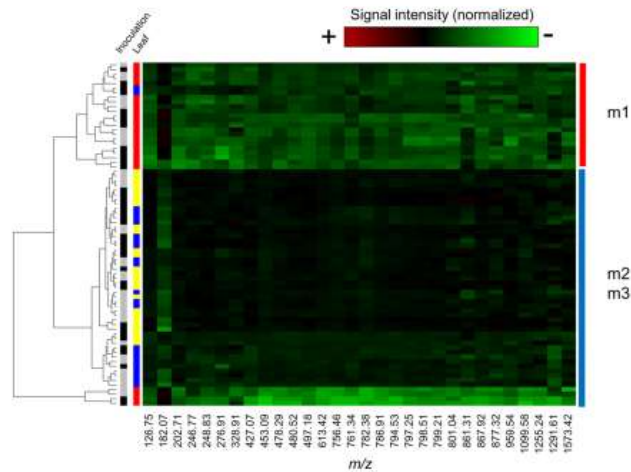


Figure 4. Metabolic heat map of the ion signal intensities selected by the Random Forest model in control and inoculated leaves of *Medicago truncatula*. The red, yellow, and blue marks correspond to m1, m2, and m3 leaves, respectively. The black and grey marks correspond to control and inoculated leaves, respectively. The control m1 leaf clearly clusters outside the m2 and m3 leaves. No differences were found between control and inoculated leaves. The heat map demonstrates the high repeatability of the measurements.

Sugars ($\mu\text{g/g FW}$)	Control			<i>A. agilis</i> UMCV2		
	m1	m2	m3	m1	m2	m3
D-Glucose	8.11 \pm 1.19 b	9.53 \pm 0.94 b	10.61 \pm 0.52 ab	12.22 \pm 0.39 ab	17.33 \pm 3.34 a	9.67 \pm 1.64 b
D-Fructose	192.96 \pm 18.72 b	96.10 \pm 12.29 b	180.87 \pm 25.40 b	407.66 \pm 107.99 a	158.04 \pm 9.99 b	115.56 \pm 21.66 b
Myo-inositol	169.85 \pm 7.00 ab	103.57 \pm 21.39 b	118.13 \pm 13.13 b	171.50 \pm 6.01 ab	209.42 \pm 9.95 a	78.61 \pm 22.79 b
Ethyl-D-glycopyranoside	661.08 \pm 81.23 b	545.18 \pm 15.30 bc	437.47 \pm 15.61 c	927.90 \pm 32.10 a	716.59 \pm 47.98 b	415.78 \pm 17.69 c
Sucrose	31.50 \pm 2.21 a	33.10 \pm 3.30 a	25.50 \pm 0.91 a	79.47 \pm 28.03 a	50.06 \pm 25.11 a	26.01 \pm 1.09 a
Total	1055.38 \pm 72.42 b	771.33 \pm 26.14 c	755.56 \pm 35.60 c	1586.53 \pm 60.83 a	1124.11 \pm 63.59 b	625.55 \pm 51.73 c

Table 2. Sugar content in control and inoculated leaves of *Medicago truncatula*. Data shown are means \pm SE for samples from 7 replicates. Control leaves were collected from 15-day-old plants. Plants were inoculated at 10 days of age, and the interaction lasted for 5 days. The same letter represents no significant differences between means by a two factors ANOVA followed by a Tukey's post-test ($p < 0.05$).

acts as storage compound for the production of indole-3-acetic acid⁴⁴. Auxins induce G1 to S (G1/S) phase transition of the cell cycle, promoting proliferation, cell wall laxity, and cell expansion^{45,46}. Thus, the presence of indole-3-acetaldehyde in m2 and m3 leaves is a biomarker of the leaf phenological age in *M. truncatula* seedlings.

With a complementary study using GC-MS, we monitored quantitative differences in soluble sugar content in the leaves (e.g., D-glucose, D-fructose, myo-inositol, ethyl D-glucopyranoside, and sucrose). These small sugars are critical for plant growth, development, and stress responses^{47,48}. Measurement of the total sugar concentration in each leaf indicated that m1 leaves accumulate more sugars than m2 and m3. According to the literature, the unifoliate leaf is a source tissue that supports the growth and development of sink tissues displaying active growth through sucrose translocation⁴⁹.

At 5-d of foliar inoculation and using a confocal microscope, we observed bacterial microcolonies in the m1, m2, and m3 leaves, indicating that *A. agilis* UMCV2 is able to internalize and colonize all the tissues independently of the physicochemical features of the leaves. The pattern of colonization followed by endophytes is typically not homogenous and it is specific of the microbial taxon and strain type and also they present affinity towards their hosts^{50–52}. Therefore, physiological parameters such as plant genotype, developmental stage, nutritional status, type of organs (leaf vs. root), leaf age, among others, are involved in the colonization process^{57,10}. The present study shows that *A. agilis* UMCV2 colonizes the leaves of *M. truncatula*, and the plant maintains the colonization independently of the metabolic differences between them. A heavy inoculation does not produce significant differences in the colonization of m1 leaves over time. Previous studies have indicated that endophytes must pass the first line of defense of the plant immune system and determine how to protect themselves from it, but at the same time, the plants have different defense strategies to keep microbial growth in control^{53,54}. Thus,

an exchange of numerous chemical signals between the plant and endophyte then allows successful colonization by the endophyte, suggesting that survival of the endophyte in the intracellular environment is likely to be a specific adaptation^{12,15}. For example, in the symbiotic interaction between *M. truncatula* and rhizobia, the *NAD1* (Nodules with Activated Defense 1) gene is expressed in the later stage of nodulation to maintain the rhizobial endosymbiosis in the nodule⁵⁵; further studies are needed to determine the molecular mechanisms by which the plant allows *A. agilis* UMCV2 to thrive inside the plant.

The classification models of the metabolite profiles obtained by DLI-ESI-MS failed to discriminate between inoculated and uninoculated leaves at 5 d of the post-inoculation time; not even in m1 leaves in which a higher colonization was observed compared to m2 and m3 leaves. This result was not completely unexpected since one characteristic of commensal and mutualistic endophytes is that they do not cause any harm to the host plant, but under specific biotic or abiotic stresses, they may induce metabolic changes in the plant. Therefore, we conducted a finer study using GC-MS and observed an increased content of sugars in the inoculated m1 and m2 leaves compared to non-inoculated controls ($p = 1.12 \times 10^{-5}$). Sugar metabolism is essential for plant growth and development, but also it works as sensing elements to environmental stimuli, so alterations in the sugar content in plants have been reported as a response to biotic and abiotic signals^{56–59}. It has been established that endophytes modulate the photosynthetic capacity of a plant which results in production of sugars that provide the basic carbon scaffolding necessary to form both plant and microbial structures⁶⁰. We also noted that the sugar content did not increase in inoculated m3 leaves. The m3 leaf is the youngest leaf and is a sink tissue; thus, the presence of the endophyte would constitute an additional sugar demand.

In summary, our study showed that rhizobacteria *A. agilis* UMCV2 is able to colonize the inner leaf tissues of *M. truncatula* when it is inoculated in the foliage, but it is likely to be more easily established in the unifoliate leaves, so the hypothesis that the interconnected phenological age and chemical composition of the leaves affects the endophytic colonization is not discarded. These findings provide a first step in understanding the complexity of the metabolic environment that microorganisms must endure in the leaves following foliar fertilization. It will be very interesting to conduct a subsequent metabolomic studies to determine if *A. agilis* UMCV2 impacts or not in the broad range of compounds formed at early stages of the colonization or during the presence of biotic or abiotic stimulus, or furthermore, if *A. agilis* UMCV2 as a facultative endophyte contributes to the production of metabolites, that help the plant to adapt to, or cope with, environmental stimuli⁶¹.

Materials and Methods

Biological material and growth conditions. *Medicago truncatula* seeds (ecotype Jemalong A17) were chemically scarified⁶² with 1 mL of concentrated sulfuric acid; the seeds were immersed in a vial containing the acid, and then agitated for 8 min. The acid was decanted, and the seeds were rinsed with five washes of sterile deionized water. For sterilization, seeds were immersed in 12% sodium hypochlorite for 2 min and rinsed with abundant sterile deionized water. Seeds were placed on vertically oriented Petri dishes containing 1% agar and 0.6% sucrose and vernalized at 4 °C for 3 days. Seeds were germinated until the main root reached a length of 2 to 3 cm. One seedling was subsequently transferred into individual glass jars containing 20 mL of Hoagland medium and 1% agar. Later, the seedlings were returned to the Percival growth chamber with a photoperiod of 16 h a day at a light intensity of $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at 22 °C for 15 days.

The *M. truncatula* leaves were named according to a standardized numerical coding system³¹ to define the phenotypic development of this legume plant. The metamer associated with the unifoliate leaf was designed as metamer 1 (m1), and the units developing above as m2 (the first trifoliate leaf), and m3. Here, the 15-day-old plants collected for chemical and molecular analysis had the unifoliate leaf (m1) and the first and second trifoliate leaves (m2 and m3, respectively; Fig. 1a). The m1 emerged on the fourth day after seed germination; at harvest, therefore, m1 was at 11 days of development, m2 at 8 days, and m3 at 6 days.

The root-associated bacteria *A. agilis* UMCV2 was isolated from lightly acid soil, as previously described²⁹. The bacterium was grown on nutrient agar (NA) at 26 °C.

Inoculation experiments. A total of 72 plants from 10-day old were inoculated with an *A. agilis* UMCV2 suspension prepared in 0.2 M phosphate buffer (pH 7.4) until obtaining the optical density of 0.2 DO₅₉₀. The other 72 uninoculated plants were brushstroked with phosphate buffer and used as controls.

The inoculation was made in one leaf per plant with a natural hair brush 3 mm in diameter. Two brushstrokes were made (approximately 2.2×10^9 colony-forming units, CFU, per brushstroke), one in the upper surface and the other under the leaf, ensuring that none of the bacterial suspension fell into the growth medium. Plants were placed in three groups of twenty-four. In the first group of plants, only the m1 leaves were inoculated; in the second group, only the m2 were inoculated; and in the third, only the m3 were inoculated. The inoculated plants were returned to the Percival growth chamber, and the interaction was allowed to proceed for 5 days, until the plants were 15 days old. Then, the leaves were harvested for mass spectrometry analyses and qPCR bacterial DNA quantification.

To determine if a smaller bacterial concentration in the inoculum lead to a greater endophytic colonization, we performed an additional inoculation experiment, in which the m1 leaves were inoculated with a bacterial solution prepared at 0.1 DO₅₉₀.

Mass spectrometry analysis of leaves. Leaves (m1, m2, and m3) from 15-day-old control and inoculated plants were harvested, immediately frozen with liquid nitrogen, and individually stored at -80°C until use. Then, the leaves were lyophilized and individually milled in a Mixer Mill (MM 400-Retsch, Verder Scientific GmbH & Co. KG; Haan, Germany) at 30 Hz for 20 s. The milled leaves were mixed with 0.5 mL of a cooled (4 °C) aqueous solution containing 75% methanol acidified with 0.1% formic acid, and later sonicated in an ultrasonic bath for 30 min¹⁷, and centrifuged at 15 000 rpm for 10 min at 4 °C. The extract was filtered through a 0.2- μm pore diameter filter for mass spectrometry analysis.

Each milled leaf was analyzed by direct liquid injection-electrospray ionization-mass spectrometry (DLI-ESI-MS)⁶³ using a ZQ-detector 2 Waters® mass spectrometer in scan mode with a range of 50 to 2000 *m/z*, programmed with a cone temperature of 135 °C, capillary voltage of 3 V, and taking 1 scan *s*⁻¹, until 1 minute of data acquisition. The aqueous solution containing 75% methanol acidified with 0.1% formic acid (blank sample) was injected at the beginning and at the end of each round of samples for washing purposes, and three technical samples were included at different days to corroborate reproducibility over time. The experiments were repeated three times.

Statistical models for data analysis. For mass spectra processing, the *MALDIquant* package in R language was used⁶⁴. The intensity of each ion signal (*m/z*) was normalized using the Statistics-sensitive Non-linear Iterative Peak-clipping (SNIP) algorithm to correct the baseline; and for ion detection, we used the absolute mean deviation (MAD) algorithm as the noise estimator with a signal-to-noise ratio of six. Finally, alignment of the detected signals was performed using a tolerance of ± 0.35 *m/z*. We used a principal component analysis (PCA) to compare the DLI-ESI-MS metabolic fingerprint data of the leaves.

To determine the contribution of every ion, we used the *rattle* package (version 5.1.0) in R to construct a Random Forest (RF) model⁶⁵. Implementation of the RF algorithm using *m/z* features, allows the creation of a large number of decision trees that classify the experimental units as belonging to any one treatment with high predictability and the characteristics that best predict it. For the model, 70% of the matrix was used to train the model, 15% for the validation step, and 15% for testing. Five hundred decision trees were built to finally obtain a predictive model that could classify samples depending on leaf age or the presence of the UMCV2 strain. Subsequently, the 30 most important ions for leaf classification were identified by the Mean Decrease Gini criterion: ions with higher values play the most important role in predicting the correct leaf samples classification. Analysis of ordination by PCA was performed again using the “classifier” ions. To validate the separation of the data obtained between treatments, a heat map was constructed in combination with a hierarchical cluster analysis using the Euclidean distance between experimental units and Ward’s algorithm for classification.

Putative metabolite identification. The most important ions were putatively identified according to the RF algorithm, using SpiderMass software⁶⁶ and a *M. truncatula* metabolite database (PlantCyc database, <https://www.plantcyc.org/>). Ion identification was based on the mass-to-charge fit with a tolerance of ± 0.35 *m/z*.

Analysis of soluble sugars. Sugars were extracted from 50 mg of controls and inoculated m1, m2, and m3 leaves with 1 mL of 80% ethanol at room temperature with continuous agitation for 12 h. Each treatment consisted of twenty composite samples of three plants. The sample was centrifuged at 15 000 rpm for 15 min and the extract was evaporated to complete dryness at 40 °C and then derivatized and analyzed using the GC-MS method according to a previous report⁶⁷. The GC-MS analysis was performed in a gas chromatograph (Agilent 6850 Series II; Agilent, Foster City, CA, USA), equipped with an Agilent MS detector, model 5973, and an HP-5 MS capillary column (5% [w/v] phenyl methyl polysiloxane, 30 m × 0.25 mm I.D., film thickness of 0.25 μm). Glucose, fructose, myo-inositol, and sucrose were identified using a combination of a NIST 2.0 mass spectra database search and a comparison with the pure standard (Sigma-Aldrich) retention times and mass spectra. For quantification, the standards were mixed (1 μg each), derivatized, and 1 μL was injected into the GC. The peak area of each standard within the mixture was correlated with the peak area of the eluted compound in the sample. The analysis was repeated three times. Data were analyzed using a two factor ANOVA (inoculum and leaf) followed by a Tukey’s post-test ($p \leq 0.05$).

In situ hybridization assay. To corroborate that bacterial DNA detected by qPCR originated from bacteria exhibiting endophytic growth, inoculated leaves were randomly collected and images of the inner planes of the clarified tissues were obtained using a confocal microscope (FV1200, Olympus Corporation, Tokyo, Japan) as previously reported²⁰. The inoculated bacteria were localized using fluorescence *in situ* hybridization, according to the FISH protocol described previously⁶⁸. Actinobacteria 5’-Rhodamine Green TM-X (NHS Ester) TAT AGT TAC CAC CGC CGT was used⁶⁹, which hybridizes with the 23 S ribosomal RNA of *A. agilis* and is visualized as green fluorescence (excitation and emission wavelengths: 502 and 527 nm, respectively).

Bacterial quantification. Leaves (m1, m2, and m3) from control and inoculated plants ($n = 8$) were superficially disinfected with 20% sodium hypochlorite for 3 min, washed three times with abundant sterile deionized water, and ground in liquid nitrogen. The method for bacterial DNA quantification by qPCR was as previously described²⁰. DNA was extracted from powdered leaves employing the methodology reported previously⁷⁰; the 2CV2F and 2CV2R primers designed to specifically amplify an amplicon in the *A. agilis* UMCV2 16S–23S inter-transcribed spacer (ITS) were used for absolute quantification of bacterial DNA in a StepOne thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A calibration curve was used from 100 ng to 20 fg with a coefficient of determination (R^2) of 0.998 and a maximum dissociation peak at 83.78 °C. In each assay, 50 ng of total DNA was used as template. Three independent analysis were done. To estimate the number of CFUs in the inoculated leaves, we performed a regression curve by using the total viable account obtained from 100 μL of five serial bacterial dilutions (0.5, 0.4, 0.3, 0.2, and 0.1 at 590 nm) and the DNA content in each solution. Serial dilutions of each bacterial suspension were plated in nutrient agar and after 5 d of incubation at 23 °C, the colonies produced were counted to calculate the CFU at each bacterial suspension. The extraction of the total bacterial DNA was made from 1 mL of each bacterial suspension as previously described⁷⁰. The amount of DNA was quantified with a Thermo Fisher NanoDrop 2000. The regressions curve produced with the data of total viable account and DNA amount of each bacterial suspension had a R^2 value of 0.9448.

Data availability

All data generated in this study are available from the corresponding author, upon reasonable request.

Received: 1 May 2019; Accepted: 10 April 2020;

Published online: 21 May 2020

References

- Rosenblueth, M. & Martínez-Romero, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *MPMI*. **19**, 827–837 (2006).
- Hardoim, P. et al. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **79**, 293–320 (2015).
- Bringel, F. & Couée, I. Pivotal roles of phyllosphere microorganisms at the interface between plant functioning and atmospheric trace gas dynamics. *Front Microbiol.* **6**, 486, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00486> (2015).
- Chaudhry, V., Sharma, S., Bansal, K. & Patil, P. B. Glimpse into the genomes of rice endophytic bacteria: diversity and distribution of firmicutes. *Front Microbiol.* **7**, 2115, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02115> (2016).
- Jambon, I., Thijs, S., Weyens, N. & Vangronsveld, J. Harnessing plant-bacteria-fungi interactions to improve plant growth and degradation of organic pollutants. *J. Plant Interact.* **13**, 119–130 (2018).
- Bodenhausen, N., Horton, M. W. & Bergelson, J. Bacterial communities associated with the leaves and the roots of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One*. **8**, e56329, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056329> (2013).
- Wagner, M. R. et al. Host genotype and age shape the leaf and root microbiomes of a wild perennial plant. *Nat Commun.* **7**, 12151, <https://doi.org/10.1038/ncomms12151> (2016).
- Lopes, L. D., Pereira, M. C. & Andreote, F. D. Bacterial abilities and adaptation toward the rhizosphere colonization. *Front Microbiol.* **7**, 1341, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01341> (2016).
- Khare, E., Mishra, J. & Kumar, N. Multifaceted interactions between endophytes and plant: developments and prospects. *Front Microbiol.* **9**, 2732, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02732> (2018).
- Compant, S., Clément, C. & Sessitsch, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biol Biochem* **42**, 669–678 (2010).
- Orozco-Mosqueda, M., Rocha-Granados, M., Glick, B. & Santoyo, G. Microbiome engineering to improve biocontrol and plant growth-promoting mechanisms. *Microbiol Res.* **208**, 25–31 (2018).
- Silva, S., Lopes, F. & Pasqualoto, L. The biostimulant manufactured using diazotrophic endophytic bacteria and humates is effective to increase sugarcane yield. *Chem. Biol. Technol. Agric.* **4**, 24, <https://doi.org/10.1186/s40538-017-0106-8> (2017).
- Canellas, L., da Silva, S., Olk, D. & Olivares, F. Foliar application of plant growth-promoting bacteria and humic acid increase maize yields. *J.F.A.E* **13**, 131–138 (2015).
- Christian, N., Herre, E. A. & Clay, K. Foliar endophytic fungi alter patterns of nitrogen uptake and distribution in *Theobroma cacao*. *New Phytol.* **222**, 1573–1583 (2019).
- Pinski, A., Betekhtin, A., Hupert-Kocurek, K., Mur, L. A. & Hasterok, R. Defining the genetic basis of plant–endophytic bacteria interactions. *Int J Mol Sci* **20**, 1947, <https://doi.org/10.3390/ijms20081947> (2019).
- Flores-Cortez, I. et al. A mass spectrometry-based study shows that volatiles emitted by *Arthrobacter agilis* UMCV2 increase the content of brassinosteroids in *Medicago truncatula* in response to iron deficiency stress. *Molecules*. **24**, 3011, <https://doi.org/10.3390/molecules24163011> (2019).
- García-Flores, M. et al. Evaluating the physiological state of maize (*Zea mays* L.) plants by direct-injection electrospray mass spectrometry (DIESI–MS). *Mol Biosyst.* **8**, 1658–1660 (2012).
- García-Flores, M. et al. Metabolic profiling of plant extracts using direct-injection electrospray ionization mass spectrometry allows for high-throughput phenotypic characterization according to genetic and environmental effects. *J Agric Food Chem* **63**, 1042–1052 (2015).
- Montero-Vargas, J. M. et al. Modulation of steroidal glycoalkaloid biosynthesis in tomato (*Solanum lycopersicum*) by jasmonic acid. *Plant Sci.* **277**, 155–165 (2018).
- Aviles-García, M., Flores-Cortez, I., Hernández-Soberano, C., Santoyo, G. & Valencia-Cantero, E. The plant growth-promoting rhizobacterium *Arthrobacter agilis* UMCV2 endophytically colonizes *Medicago truncatula*. *Rev Argent Microbiol* **48**, 342–346 (2016).
- Velázquez-Becerra, C. et al. A volatile organic compound isolated from *Arthrobacter agilis* modulates growth of *Medicago sativa* in vitro. *Plant Soil.* **339**, 329–340 (2011).
- Orozco-Mosqueda, M. et al. *Arthrobacter agilis* UMCV2 induces iron acquisition in *Medicago truncatula* (strategy I plant) in vitro via dimethylhexadecylamine emission. *Plant Soil.* **362**, 51–66 (2013).
- Castulo-Rubio, D. et al. Volatile organic compounds produced by the rhizobacterium *Arthrobacter agilis* UMCV2 modulate *Sorghum bicolor* (strategy II plant) morphogenesis and SbFRO1 transcription in vitro. *J. Plant Growth Regul.* **34**, 611–623 (2015).
- Montejano-Ramírez, V., Martínez-Cámara, R., García-Pineda, E. & Valencia-Cantero, E. Rhizobacterium *Arthrobacter agilis* UMCV2 increases organ-specific expression of FRO genes in conjunction with genes associated with the systemic resistance pathways of *Medicago truncatula*. *Acta Physiol. Plant.* **40**, 138, <https://doi.org/10.1007/s11738-018-2712-x> (2018).
- Amorim, M. P. et al. Distribution of the endophytic fungi community in leaves of *Bauhinia brevipes* (Fabaceae). *Acta Bot. Bras.* **25**, 815–821 (2011).
- Partida-Martínez, L. & Heil, M. The microbe-free plant: fact or artifact? *Front. Plant Sci.* **2**, 100, <https://doi.org/10.3389/fpls.2011.00100> (2011).
- Darsun, A., Ekinici, M. & Figen, M. Effects of foliar application of plant growth promoting bacterium on chemical contents, yield and growth of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) and cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Pak. J. Bot.* **42**, 3349–3356 (2010).
- Wu, J., Wang, Y. & Lin, X. Purple phototrophic bacterium enhances stevioside yield by *Stevia rebaudiana* Bertoni via foliar spray and rhizosphere irrigation. *PLoS One*. **8**, e67644, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067644> (2013).
- Valencia-Cantero, E. et al. Role of dissimilatory fermentative iron-reducing bacteria in Fe uptake by common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants grown in alkaline soil. *Plant Soil.* **291**, 263–273 (2007).
- Montejo-Mayo, W., Valencia-Cantero, E., López-Albarrán, P. & Velázquez-Becerra, C. Effect of *Arthrobacter agilis* UMCV2 on germination and growth of *Pinus devoniana* Lindley. *Polibotanica* **41**, 79–90 (2016).
- Bucciarelli, B., Hanan, J., Palmquist, D. & Vance, C. A standardized method for analysis of *Medicago truncatula* phenotypic development. *Plant Physiol.* **142**, 207–219 (2006).
- Kantha, S. & Erdman, I. Legume carotenoids. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **26**, 137–155 (1987).
- Gershenzon, J., Maffei, M. & Croteau, R. Biochemical and histochemical localization of monoterpene biosynthesis in the glandular trichomes of spearmint (*Mentha spicata*). *Plant Physiol.* **89**, 1351–1357 (1989).
- David, M., Coelho, D., Barrote, I. & Correia, M. Leaf age effects on photosynthetic activity and sugar accumulation in droughted and rewatered *Lupinus albus* plants. *Aust. J. Plant Physiol.* **25**, 299–306 (1998).
- Watanabe, M. et al. Comprehensive dissection of spatiotemporal metabolic shifts in primary, secondary, and lipid metabolism during developmental senescence in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **162**, 1290–1310 (2013).

36. Aronsson, H. *et al.* Monogalactosyldiacylglycerol deficiency in *Arabidopsis thaliana* affects pigment composition in the prolamellar body and impairs thylakoid membrane energization and photoprotection in leaves. *Plant Physiol.* **148**, 580–592 (2008).
37. Shimojima, M. & Ohta, H. Critical regulation of galactolipid synthesis controls membrane differentiation and remodeling in distinct plant organs and following environmental changes. *Prog. Lipid Res.* **50**, 258–266 (2011).
38. Chen, Z., Zheng, Z., Huang, J., Lai, Z. & Fan, B. Biosynthesis of salicylic acid in plants. *Plant Signal. Behav.* **4**, 493–496 (2009).
39. Xie, X. *et al.* Phytochromes regulate SA and JA signaling pathways in rice and are required for developmentally controlled resistance to *Magnaporthe oryzae*. *Mol. Plant* **4**, 688–696 (2011).
40. Zhao, S. & Qi, X. Signaling in plant disease resistance and symbiosis. *J. Integr. Plant Biol.* **50**, 799–807 (2008).
41. Carella, P., Wilson, D. & Cameron, R. Some things get better with age: differences in salicylic acid accumulation and defense signaling in young and mature *Arabidopsis*. *Front. Plant Sci.* **5**, 775, <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00775> (2015).
42. Moses, T., Papadopoulou, K. & Osbourn, A. Metabolic and functional diversity of saponins, biosynthetic intermediates and semi-synthetic derivatives. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **49**, 439–462 (2014).
43. Pharis, R., Janzena, L., Nakajimab, S., Zhu, J. & Back, T. Bioactivity of 25-hydroxy-, 26-hydroxy, 25,26-dihydroxy- and 25,26-epoxybrassinolide. *Phytochem.* **58**, 1043–1047 (2001).
44. Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Cortés-Penagos, C. & López-Bucio, I. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **149**, 1579–1592 (2009).
45. Rajagopal, R. Occurrence and metabolism of indole acetaldehyde in certain higher plant tissues under aseptic conditions. *Phytol. Plant.* **21**, 378–385 (1968).
46. Perrot-Rechenmann, C. Cellular responses to auxin: division versus expansion. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, a001446, <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001446> (2010).
47. Sami, F., Yusuf, M., Faizan, M., Faraz, A. & Hayat, S. Role of sugars under abiotic stress. *Plant Physiol. Biochem.* **109**, 54–61 (2016).
48. Loewus, F. & Murthy, P. myo-Inositol metabolism in plants. *Plant Sci.* **150**, 1–19 (2000).
49. Lemoine, R. *et al.* Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. *Front. Plant Sci.* **4**, 272, <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00272> (2013).
50. Cannon, P. F. & Simmons, C. M. Diversity and host preference of leaf endophytic fungi in the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. *Mycologia.* **94**, 210–220 (2002).
51. Duong, L. M., Jeewon, R., Lumyong, S. & Hyde, K. D. DGGGE coupled with ribosomal DNA gene phylogenies reveal uncharacterized fungal phylotypes. *Fungal Divers.* **23**, 121–138 (2006).
52. Liu, H. *et al.* Inner plant values: diversity, colonization and benefits from endophytic bacteria. *Front. Microbiol.* **8**, 2552, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02552> (2017).
53. Zamioudis, C. & Pieterse, C. Modulation of host immunity by beneficial microbes. *Mol. Plant Microbe Interact.* **25**, 139–150 (2012).
54. Deng, Y. *et al.* Endophyte *Bacillus subtilis* evade plant defense by producing lantibiotic subtilomycin to mask self-produced flagellin. *Commun. Biol.* **2**, 368, <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0614-0> (2019).
55. Wang, C. *et al.* NODULES WITH ACTIVATED DEFENSE 1 is required for maintenance of rhizobial endosymbiosis in *Medicago truncatula*. *New Phytol.* **212**, 176–191 (2016).
56. Rolland, F., Baena-Gonzalez, E. & Sheen, J. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**, 675–709 (2006).
57. Mercier, J. & Lindow, S. E. Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 369–374 (2000).
58. Morkunas, J. & Ratajczak, L. The role of sugar signaling in plant defense responses against fungal pathogens. *Acta Physiol. Plant.* **36**, 1607–1619 (2014).
59. Bezrutczyk, M. *et al.* Sugar flux and signaling in plant-microbe interactions. *Plant J.* **93**, 675–685 (2018).
60. Harman, G. E. & Uphoff, N. Symbiotic root-endophytic soil microbes improve crop productivity and provide environmental benefits. *Scientifica (Cairo)* **2019**, 9106395, <https://doi.org/10.1155/2019/9106395> (2019).
61. Ludwig-Müller, J. Plants and endophytes: equal partners in secondary metabolite production? *Biotechnol. Lett.* **37**, 1325–1334 (2015).
62. Boisson-Dernier, A. *et al.* *Agrobacterium rhizogenes*-Transformed Roots of *Medicago truncatula* for the Study of Nitrogen-Fixing and Endomycorrhizal Symbiotic Associations. *Mol. Plant Microbe Interact.* **14**, 695–700 (2001).
63. AMCTB. A periodic table of mass spectrometry instrumentation and acronyms. *Anal. Methods.* **9**, 5086–5090 (2017).
64. Gibb, S. & Strimmer, K. MALDIquant: a versatile R package for the analysis of mass spectrometry data. *Bioinformatics.* **28**, 2270–2271 (2012).
65. Tian-lu, C. & Dai, R. Metabolomic data processing based on mass spectrometry platforms. *Plant metabolomics: Methods and Applications.* 123–170 (Springer, 2015).
66. Winkler, R. SpiderMass: semantic database creation and tripartite metabolite identification strategy. *J. Mass Spectrom.* **50**, 538–541 (2015).
67. Macías-Rodríguez, L., Guzmán-Gómez, A., García-Juárez, P. & Contreras-Cornejo, H. A. *Trichoderma atroviride* promotes tomato development and alters the root exudation of carbohydrates, which stimulates fungal growth and the biocontrol of the phytopathogen *Phytophthora cinnamomi* in a tripartite interaction system. *FEMS Microbiol. Ecol.* **94**, fuy137, <https://doi.org/10.1093/femsec/fuy137> (2018).
68. Lo Piccolo, S. *et al.* Presence of endophytic bacteria in *Vitis vinifera* leaves as detected by fluorescence *in situ* hybridization. *Ann. Microbiol.* **60**, 161–167 (2010).
69. Roller, C., Wagner, M., Amann, R., Ludwig, W. & Karl-Heinz, S. *In situ* probing of Gram-positive bacteria with high DNA G + C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides. *Microbiol.* **140**, 2849–2858 (1994).
70. Mahuku, G. A simple extraction method suitable for PCR-based analysis of plant, fungal, and bacterial DNA. *Plant Mol. Biol. Rep.* **22**, 71–81 (2004).
71. Gholami, A., Geyter, N., Pollier, J., Goormachtig, S. & Goossens, A. Natural product biosynthesis in *Medicago* species. *Nat. Prod. Rep.* **31**, 356–380 (2014).
72. Von Wettstein-Knowles, P. Waxes, cutin, and suberin. Lipid metabolism in plants (ed. Moore, T.) 127–166 (CRC Press, 2018).

Acknowledgements

We are grateful to León Francisco Ruiz-Herrera (Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo), for his technical assistance with confocal microscopy. We gratefully acknowledge the financial support provided by the Coordinación de la Investigación Científica (UMSNH) (grant number 2.24), the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) Fronteras project 2015-2/814, and the bilateral grant CONACYT-DFG 2016/277850. We would like to thank Editage (www.editage.com) for English language editing. A. Ramírez-Ordorica is indebted to CONACYT for providing an MD fellowship (grant number 606864).

Author contributions

L.M., E.V., and R.W. conceived and designed research. A.R. and I.F. conducted experiments. L.M., E.V., and R.W. contributed new reagents or analytical tools. A.R., M.T.C., M.I.C.E., and J.M. analyzed data. A.R. and L.M. wrote the manuscript. All authors reviewed the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65314-4>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to L.M.-R.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.




Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020

Article

A Mass Spectrometry-Based Study Shows that Volatiles Emitted by *Arthrobacter agilis* UMCV2 Increase the Content of Brassinosteroids in *Medicago truncatula* in Response to Iron Deficiency Stress

Idolina Flores-Cortez ¹, Robert Winkler ² , Arturo Ramírez-Ordorica ¹,
Ma. Isabel Cristina Elizarraraz-Anaya ², María Teresa Carrillo-Rayas ²,
Eduardo Valencia-Cantero ¹ and Lourdes Macías-Rodríguez ^{1,*}

¹ Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edificio B3, Ciudad Universitaria, Morelia 58030, Michoacán, Mexico

² Department of Biotechnology and Biochemistry, Cinvestav Unidad Irapuato, Irapuato, Km 9.6 Libramiento Norte Carr. Irapuato-León, Guanajuato 36824, Mexico

* Correspondence: lmacias@umich.mx; Tel.: +52-443-3223500 (ext. 4237); Fax: +52-443-3265788 (ext. 103)

Received: 6 July 2019; Accepted: 10 August 2019; Published: 20 August 2019



Abstract: Iron is an essential plant micronutrient. It is a component of numerous proteins and participates in cell redox reactions; iron deficiency results in a reduction in nutritional quality and crop yields. Volatiles from the rhizobacterium *Arthrobacter agilis* UMCV2 induce iron acquisition mechanisms in plants. However, it is not known whether microbial volatiles modulate other metabolic plant stress responses to reduce the negative effect of iron deficiency. Mass spectrometry has great potential to analyze metabolite alterations in plants exposed to biotic and abiotic factors. Direct liquid introduction-electrospray-mass spectrometry was used to study the metabolite profile in *Medicago truncatula* due to iron deficiency, and in response to microbial volatiles. The putatively identified compounds belonged to different classes, including pigments, terpenes, flavonoids, and brassinosteroids, which have been associated with defense responses against abiotic stress. Notably, the levels of these compounds increased in the presence of the rhizobacterium. In particular, the analysis of brassinolide by gas chromatography in tandem with mass spectrometry showed that the phytohormone increased ten times in plants grown under iron-deficient growth conditions and exposed to microbial volatiles. In this mass spectrometry-based study, we provide new evidence on the role of *A. agilis* UMCV2 in the modulation of certain compounds involved in stress tolerance in *M. truncatula*.

Keywords: legumes; microbial volatiles; Fe deficiency; DLI-ESI-MS

1. Introduction

Mass spectrometry (MS) is gaining considerable popularity for profiling metabolites in complex biological samples. The increased applications have led to the improvement of MS technology in sample introduction, ionization source, mass analyzer, ion detection, and data acquisition and processing. Direct liquid introduction-electrospray ionization-mass spectrometry (DLI-ESI-MS, the acronym recommended by the Analytical Methods Committee [1]) is a rapid and high-throughput analytical tool that has been successfully applied in medicine and food and biological sciences [2–5]. DLI-ESI-MS does not require preliminary sample separation, and it can be applied to multiple biological

matrices. The straightforward sample introduction allows for simultaneous fingerprinting of a vast number of metabolites from different samples within a single period. In addition, different studies support the repeatability of DLI-ESI-MS data, and the quantification of the intensity of the ion signals (m/z) with a larger variance in plants because of environment, physiological state, or the genotype can also be performed [5–7]. High analytical performance (sensitivity, selectivity) allows it to be used for untargeted metabolomics screening approaches for different plant extracts; thus it offers an excellent cost-benefit ratio compared to other analytical platforms such as near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS), ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS), gas chromatography with flame ionization detection (GC-FID), and GC-MS, which are slow and expensive to use for routine plant biochemistry studies [2]. Due to the various benefits reported for DLI-ESI-MS, we decided to conduct a study to determine its usefulness in microbial ecology research, as DLI-ESI-MS provides robust chemical information, is bioinformatically easy to handle, and could help us understand the chemical response of plants to abiotic or biotic factors.

Iron (Fe) is an essential micronutrient for plant growth and crop productivity. Plants acquire Fe mainly from the rhizosphere; therefore, the mechanisms that regulate Fe acquisition and homeostasis in the plant are of interest. The role of specific metabolites such as nitric oxide, ferritin, phenolic compounds, and brassinosteroids (BRs) have been highlighted in Fe-deficient growth conditions, indicating that plants undergo significant metabolic changes during Fe-adaptive processes [8–17].

In an attempt to make agriculture a viable component of a healthy and pleasant ecosystem, the application of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) to enhance Fe uptake and transport in plants is an excellent biotechnology strategy. PGPR are soil bacteria that colonize the rhizosphere of plants, stimulating plant growth and health through different mechanisms, such as phosphorus solubilization or nitrogen-fixation, and the production of phytohormones or siderophores to capture Fe from the environment in biologically useful forms [18]. In 2003, Ryu et al. reported that some PGPR can modulate the growth and development of plants without physical contact with them. This mechanism involves the production of volatile compounds such as acetoin and 2,3-butanediol, which modulate the mechanisms of phytohormone signaling and therefore stimulate morphogenesis programs in plants [19]. Six-years later, Zhang et al. (2009) noted, that the same microbial volatiles can modulate Fe uptake in *Arabidopsis* via deficiency-inducible mechanisms [20].

The rhizobacterium *Arthrobacter agilis* UMCV2 used in this study, was isolated from the rhizosphere of maize (*Zea mays*) [21]. It emits a pool of volatiles that promotes the growth of leguminous and monocotyledonous plants with different levels of available Fe [22–24]. Notably, in *Medicago truncatula*, the UMCV2 strain increased the expression of genes involved in Fe uptake (*MtFRO1*, *MtFRO2*, *MtFRO3*, *MtFRO4*, and *MtFRO5*) under Fe-sufficient and -deficient conditions [25]. Nevertheless, those studies focused on elucidating the molecular mechanisms involved in the modulation of Fe acquisition responses. Thus, one question remaining is whether microbial volatiles modulate the production of other primary or secondary metabolites in plants to ameliorate Fe-deficiency stress.

Here, we used a DLI-ESI-MS method as an untargeted mass spectrometry strategy to study the metabolic profiles of *M. truncatula* seedlings grown under Fe-sufficient and -deficient conditions. We focused on the detection of significant differences among MS profiles to determine whether volatiles emitted by *A. agilis* UMCV2 alleviate plant stress and stimulate the accumulation of metabolites involved in abiotic stress tolerance; in addition, we used a complementary GC-MS method to confirm the identification of brassinolide, which is involved in Fe-adaptive processes in plants.

2. Results

2.1. DLI-ESI-MS in the Analysis of Fe Deficiency in *Medicago truncatula* Seedlings and Response to Bacterial Volatiles

Under conditions of Fe deficiency, plants adjust their metabolism to maintain cellular Fe homeostasis. Some visual symptoms of Fe deficiency, such as leaf yellowing (Figure 1d–f) and decreased plant size (Figure 1g) were observed in our experiments in comparison to plants grown

under Fe sufficiency (Figure 1a–c). Additionally, we studied plants exposed to volatiles from *A. agilis* UMCV2, a rhizobacterium that induces Fe acquisition in plants (Figure 1c,f), and plants exposed to volatiles from *Bacillus* sp. L264, a commensal rhizobacterium (Figure 1b,e). As we expected, volatiles from the UMCV2 strain, had a stimulatory effect on plant growth under Fe-sufficient and -deficient growth conditions (Figure 1g).

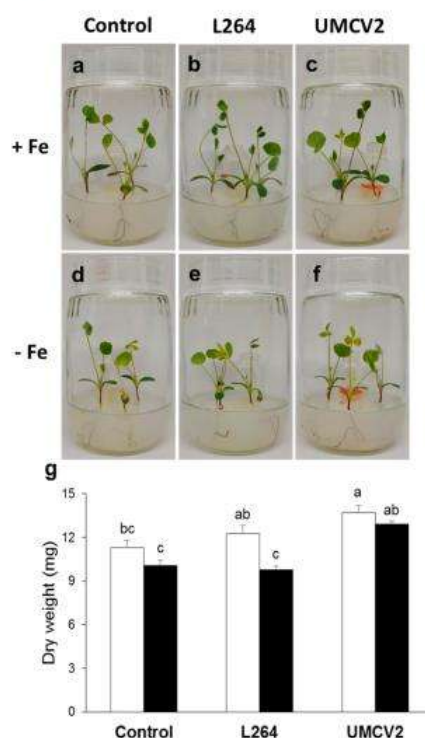


Figure 1. Interaction between *Medicago truncatula* and rhizobacteria through the emission of volatile compounds. A 4 mL glass vial with 2 mL nutritive agar medium was inserted in each system; in the control system, 20 μ L water was added into the vial instead of the bacterial inoculum. The interaction lasted for 10 days. Uninoculated 12-day-old plants grown under conditions of iron (Fe) sufficiency (a) and deficiency (d). (b) Plants were inoculated with the commensal strain *Bacillus* sp. L264 grown under Fe-sufficient and -deficient conditions (e). Inoculated plants exposed to volatiles from *A. agilis* UMCV2 and under Fe-sufficient (c) and -deficient conditions (f). (g) Dry weights of control plants and plants during interactions with bacterial volatile compounds. Data shown are means \pm standard error ($n = 15$). White and black bars indicate Fe-sufficient and -deficient growth conditions, respectively. Different letters indicate significant differences ($p \leq 0.05$) among treatments determined with two-way ANOVA and Tukey's test.

These plants were further analyzed by DLI-ESI-MS. The quadrupole analyzer allowed the collection of MS data with satisfactory spectral quality. Typical mass spectra of the broad range of molecular weights of compounds that are produced when plants undergo Fe stress, and microbial volatiles exposure are shown in Figure 2a,b, respectively. In total, 737 ions were obtained, mainly within the range 55.90–1592.52 m/z . All metabolite signals were extracted from a database with the

MALDIquant package in the RStudio interface. Following purification, alignment, and normalization, a principal component analysis (PCA) was performed (Figure 3). The PCA (highly significant results $p < 0.001$, by permutational multivariate analysis of variance, PERMANOVA) showed that control plants grown under conditions of Fe sufficiency and those exposed to volatiles from L264 had similar mass spectra, since treatments were grouped together. Similarly, plants grown under Fe-deficiency stress and those exposed to volatiles from L264 had the same metabolic fingerprinting, and both treatments presented an overlap, indicating that only the absence of Fe affected the metabolic profile of the plants. The ion profiles of plants grown under conditions of Fe sufficiency and deficiency, and following exposure to UMCV2 volatiles were similar, indicating that UMCV2 promotes metabolic changes in plants under both growing conditions.

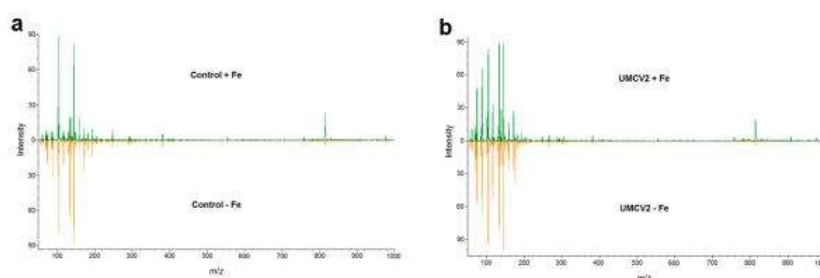


Figure 2. Non-targeted metabolomic profiling normalized from leaves of *Medicago truncatula* obtained by DLI-ESI-MS. (a) Control plants grown under Fe-sufficient (green) and -deficient conditions (orange). (b) Plants exposed to volatile compounds from *A. agilis* UMCV2 for 10 days and grown under iron-sufficient (green) and -deficient conditions (orange).

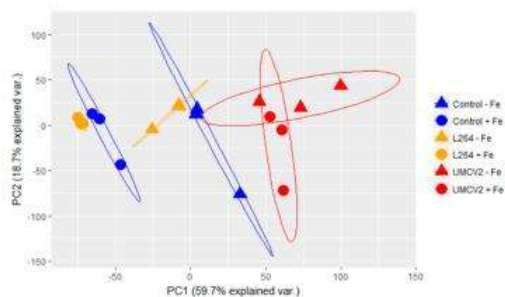


Figure 3. Principal component analysis (PCA) obtained from DLI-ESI mass spectra of *Medicago truncatula* leaves under Fe-sufficient and -deficient conditions and following exposure to microbial volatiles. Blue indicates control plants, orange represents plants exposed to volatiles emitted by L264 strain, and red shows the plants exposed to volatiles from *A. agilis* UMCV2. Circles (O) and triangles (Δ) indicate Fe sufficiency and deficiency, respectively. The ellipses represent 95% confidence intervals. Differences between groups were compared with a PERMANOVA test ($p < 0.001$).

2.2. Classification of Random Forest Model for Differentiating Plants Grown under Two Different Fe Conditions and Rhizobacterial Inoculation

In order to reduce data complexity, the Random Forest (RF) algorithm was used to generate decision trees and extract the 30 most important ions, defining whether seedling samples were Fe-sufficient or -deficient (Figure 4a). Ions with the greatest mean decrease in Gini index were putatively identified using the PlantCyc database and SpiderMass software. The m/z from each ion was

compared to the monoisotopic mass (Da) of metabolites previously reported for *M. truncatula*, which provided knowledge about participating metabolites in response to Fe-deficiency stress. Among the most important ions, we identified compounds involved in riboflavin metabolism at 185.22 *m/z* (1-deoxy-L-glycero-tetrolase 4-phosphate), 299.18 *m/z* [5-amino-6-(*p*-ribitylamino) uracil], and 808.38 *m/z* (flavin adenine dinucleotide, FAD); lipid metabolism at 797.49 *m/z* (1-18:3-2-18:3-monogalactosyldiacylglycerol), 859.98 *m/z* (butanoyl-CoA); and chlorophyll metabolism at 222.07 *m/z* (phosphonothreonine), 613.36 *m/z* (protochlorophyllide a) [11,26,27]. In addition, compounds that alleviate abiotic stresses in plants were also identified at 189.26 *m/z* (norspermine), 269.06 *m/z* ((+)-marmesin), 300.18 *m/z* ((*S*)-*N*-methylcochlorine), 314.26 *m/z* (9,10-epoxy-18-hydroxystearate), 351.23 *m/z* (crocetin), and 371.07 *m/z* (chelerythrine) (Table 1). Of these ions, 185.22, 189.26, 222.07, 269.06, 299.18, and 351.23 *m/z* (Figure 5a) were detected at a higher intensity under Fe deficiency conditions. The remaining 17 ions selected by the RF algorithm for the Fe condition could not be identified.

The RF model also helped to identify the 30 most important ions including those that differentiated uninoculated seedlings, and those inoculated with L264 or UMCV2 strains (Figure 4b). Twenty ions were identified (Table 2). Six of these, 87.41 *m/z* (3-pentanone), 88.08 *m/z* (pyruvate), 88.33 *m/z* (4-aminobutanal), 97.83 *m/z* (glycolate), 98.04 *m/z* (*N*-monomethylethanolamine), and 287.19 *m/z* (kaempferol) showed stronger detectable signal intensities under UMCV2 treatment (Figure 5b), suggesting that these ions are responsible for the discrimination between the sample groups, and revealing the associated chemical modulations made by the UMCV2 strain. Thus, DLI-ESI-MS displays great potential for determining whether volatiles emitted from other rhizobacteria are able to modulate the production of primary or secondary metabolites in plants. According to previously reported literature, the increased signals have different roles in alleviating Fe deficiency stress in plants [12,28–33]. Other identified compounds included those involved in plant primary metabolism, at 88.08 *m/z* (pyruvate), 97.83 *m/z* (glycolate), 790.06 *m/z* (coenzyme A) [34]; brassinosteroid metabolism, at 397.20 *m/z* (5-dehydroepisterol), 419.15 *m/z* (6-deoxocathasterone), and 467.07 *m/z* (6- α -hydroxycastasterone) [35–38]; compounds with antioxidant roles in plants, at 266.20 *m/z* (thiamine), 366.17 *m/z* (galactinol), and 933.53 *m/z* (notoginsenoside R1) [39–41], and some flavonoids with antioxidant capacity, which act as chemotactic signals for symbiotic nitrogen-fixing bacteria of legumes, at 275.13 *m/z* (fustin), 287.19 *m/z* (kaempferol), and 291.15 *m/z* (formononetin) [10,42–45] (Table 1).

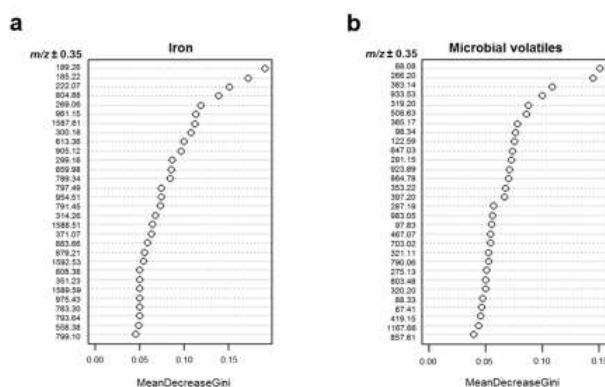


Figure 4. Ion importance ranking obtained by Random Forest model for differentiating between sample treatments with DLI-ESI mass spectra data. The thirty most important ions are shown for discriminating between Fe growth conditions (a) and the effect of microbial volatiles (b). Ntrees = 500, OOB error = 0% for Fe growth conditions and 43.75% for volatiles.

Table 1. The most important compounds detected in *Medicago truncatula* seedlings by DLI-ESI-MS and putatively identified by the SpiderMass software, which were able to differentiate between samples grown under Fe-sufficient and -deficient growth conditions.

<i>m/z</i>	Monoisotopic Mass (Da)	Ionization Mode	Compound Name	Function
189.26	188.20	[M + H] ⁺	Norspermine	Stress
185.22	184.01	[M + H] ⁺	1-Deoxy-L-glycero-tetrolase 4-phosphate	Riboflavin biosynthesis
222.07	199.03	[M + Na] ⁺	L-Histidinol-phosphate	Histidine biosynthesis
269.06	246.09	[M + Na] ⁺	(+)-Marmesin	Stress
300.18	299.15	[M + H] ⁺	(S)-N-methylcloaurine	Stress
613.36	612.22	[M + H] ⁺	Protochlorophyllide a	Chlorophyll biosynthesis
299.18	276.11	[M + Na] ⁺	5-Amino-6-(p-ribitylamino) uracil	Riboflavin biosynthesis
859.98	837.16	[M + Na] ⁺	Butanoyl-CoA	Fatty acid beta oxidation
797.49	774.53	[M + Na] ⁺	1-18:3-2-18:3-Monogalactosyldiacylglycerol	Chloroplast membrane lipid
314.26	313.24	[M + H] ⁺	9,10-Epoxy-18-hydroxystearate	Cutin biosynthesis
371.07	348.12	[M + Na] ⁺	Chelerythrine	Stress
808.38	785.16	[M + Na] ⁺	Dioleoylphosphatidylcholine	Membranes lipid
351.23	328.17	[M + Na] ⁺	Croctin	Stress

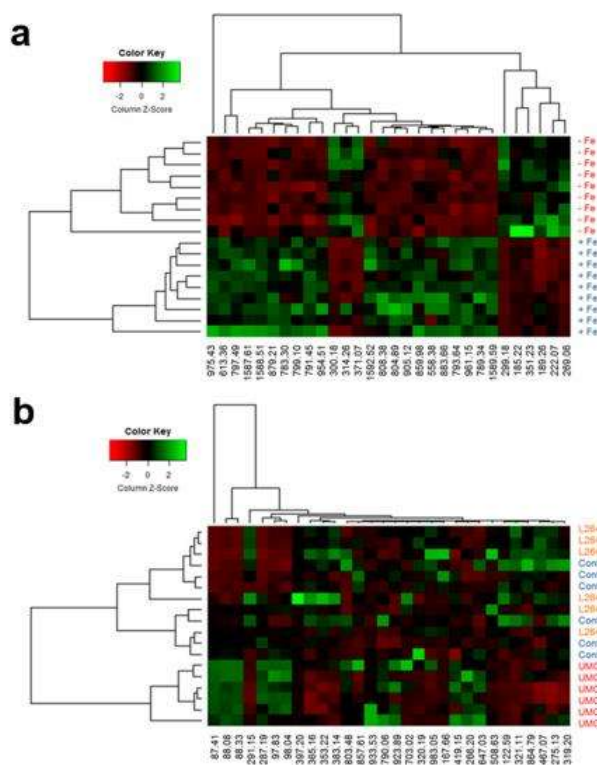


Figure 5. Metabolomic heatmap generated with the 30 most important ions detected by the Random Forest model for Fe availability (a) and bacterial volatiles (b). Heatmap combined with an analysis of cluster hierarchical using Euclidean distance between experimental units and Ward's algorithm for classification by ion (along x-axis) and by treatment (along y-axis).

Table 2. The most important compounds detected by DLI-ESI-MS in *Medicago truncatula* seedlings and putatively identified by the SpiderMass software that could differentiate between samples exposed to volatiles from L264, UMCV2 strains, and control.

<i>m/z</i>	Monoisotopic Mass (Da)	Ionization Mode	Compound Name	Function
88.08	87.01	[M + H] ⁺	Pyruvate	Energy
266.20	265.11	[M + H] ⁺	Thiamine	Stress
383.14	360.14	[M + Na] ⁺	7-Deoxyloganate	Stress
933.53	932.53	[M + H] ⁺	Notoginsenoside R1	Stress
319.20	296.31	[M + Na] ⁺	Phytol	Constituent of chlorophyll
365.17	342.12	[M + Na] ⁺	Galactinol	Stress
98.34	75.07	[M + Na] ⁺	<i>N</i> -Monomethylethanolamine	Choline biosynthesis
291.15	268.07	[M + Na] ⁺	Formononetin	Stress
353.22	352.18	[M + H] ⁺	16-Hydroxytabersonine	Indole alkaloid biosynthesis
397.20	396.34	[M + H] ⁺	5-Dehydroepisterol	Brassinosteroid biosynthesis
287.19	286.05	[M + H] ⁺	Kaempferol	Stress
97.83	75.01	[M + Na] ⁺	Glycolate	Photorespiration
467.07	466.37	[M + H] ⁺	6-Hydroxycastasterone	Brassinosteroid biosynthesis
321.11	320.09	[M + H] ⁺	4-Coumaroylshikimate	Flavonoid and phenylpropanoid biosynthesis
790.06	767.12	[M + Na] ⁺	Coenzyme A	Fatty acid beta oxidation
275.13	274.08	[M + H] ⁺	Fustin	Stress
320.20	297.24	[M + Na] ⁺	18-Hydroxyoleate	Cutin, suberin and wax biosynthesis
88.33	87.07	[M + H] ⁺	4-Aminobutanal	Stress
87.41	86.07	[M + H] ⁺	3-Pentanone	Stress
419.15	418.38	[M + H] ⁺	6-Deoxocathasterone	Brassinosteroid biosynthesis

Although DLI-ESI-MS provides the possible composition of the compounds with minimal sample preparation, the exact metabolite identification is limited by the lack of fragmentation data or device accuracy (~0.3 Da) [6]. Therefore, mass spectrometry coupled with a separation technique such as GC, can provide identification with a high level of confidence based on the comparison of the retention time with the appropriate standard, and in addition, it allows calculation of the concentration of the compounds in the sample. In our study, we observed variations in the intensity of many ions in the mass spectra obtained from plants treated with UMCV2. Three of the *m/z* ions were putatively identified as components of the BRs biosynthesis (Table 2); we observed that the signal 419.15 *m/z*, which is a direct precursor of brassinolide [37] mainly increased in plants inoculated with the UMCV2 strain. Thus, we decided to confirm by GC-SIM-MS whether the volatiles emitted by *A. agilis* UMCV2, stimulate the production of brassinolide in *M. truncatula*, as it is the most bioactive form of BRs in plants. For this, we acetylated the molecule to change the analyte properties, which improved the identification capability of brassinolide (Figure 6a–c).

BRs are endogenous plant hormones that are essential for plant growth and development. Additionally, BRs are involved in sensing and responding to mineral deficiency stress. A factorial analysis showed that Fe deficiency stress, as well as microbial volatile factors significantly increased the content of epibrassinolide in the plant ($p = 0.0039$ and $p = 0.0036$, respectively); and the interaction of both factors was also statistically significant ($p = 0.0153$). Plants grown in Fe-deficient conditions and inoculated with UMCV2 showed a ten-fold higher accumulation of brassinolide relative to controls (Figure 6d). This result suggests that *A. agilis* induce the synthesis of brassinolide in the plant as a part of the mechanism for Fe stress tolerance; thus, the quantification of this phytohormone in the plants may serve as a reference of the beneficial effects of rhizobacterium to plants.

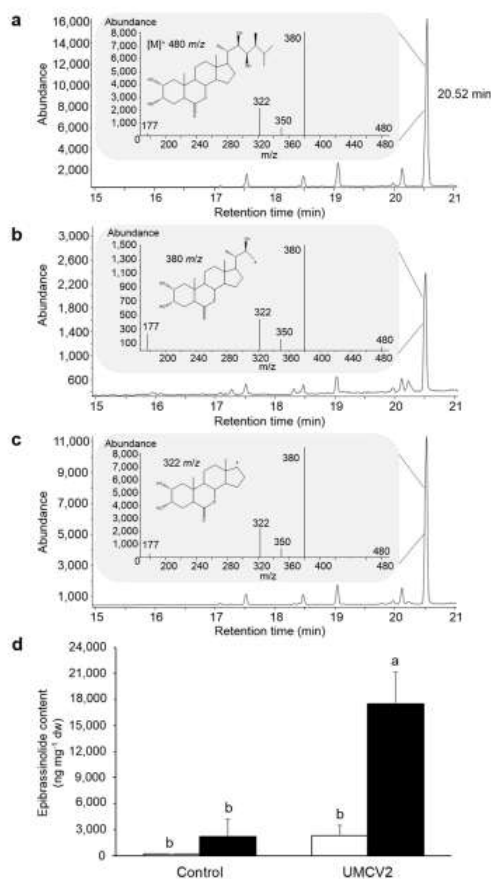


Figure 6. Identification of brassinolide in *Medicago truncatula* by GC-MS. (a) Total ion chromatogram of the epibrassinolide standard, indicating the retention time of the phytohormone and the electron impact mass spectrum during the SIM analysis. (b) Total ion chromatogram and mass spectrum obtained from the control plants grown under conditions of iron (Fe) deficiency. (c) Total ion chromatogram and mass spectrum obtained from plants grown under conditions of Fe deficiency and exposed to volatiles from *A. agilis* UMCV2. (d) Brassinolide content in plants grown under Fe-sufficient (white bars) and -deficient (black bars) growth conditions. Data shown are means \pm standard error ($n = 3$). Different letters indicate significant differences ($p \leq 0.05$) among treatments determined with two-way ANOVA followed by a Tukey's test.

To summarize the information obtained in this study, a hierarchical cluster analysis was constructed for each treatment (Figure 5a,b). The metabolic heat maps based on DLI-ESI-MS data visually displayed differences between samples in the intensity of the selected m/z ions. Remarkably, two sets of ions were identified that accumulated under conditions of Fe deficiency, one of them was composed of the following ions 299.18, 185.22, 351.23, 189.26, 222.07, and 269.06 m/z , and the other was set by 300.18, 314.26, and 371.07 m/z whereas the remaining ions on the heat map diminished (Figure 5a); therefore, these ions could be considered as biomarkers of the plants' Fe nutritional status.

Conversely, differences were observed in the metabolite profiling of plants exposed to microbial volatiles. Uninoculated plants and those inoculated with the L264 strain shared the same conglomerate, verifying that the volatiles from the commensal bacterium did not have an effect on the overall profile of plant metabolites produced in response to inoculation. Ions obtained from plants inoculated with the UMCV2 strain formed a separate conglomerate, and ions 87.41, 88.08, and 88.33 m/z presented the strongest differences, suggesting an important role during the interaction between *M. truncatula* and *A. agilis* UMCV2 (Figure 5b).

3. Discussion

Fe is an important metal in photosynthesis. Additionally, Fe is used ubiquitously in oxidation-reduction processes [13]. These important roles make Fe an essential micronutrient for plant fitness. As a consequence, Fe deficiency is a major constraint for agricultural quality and production, eventually affecting human health via the food chain [16]. Fe scarcity leads to the activation of sophisticated mechanisms to maintain cellular Fe homeostasis. Legumes are classified as Strategy I plants, which undergo biochemical changes to increase the capacity for Fe uptake via the roots and Fe solubility in the soil [11]. In this study, we used DLI-ESI-MS and putatively identified several compounds in plants that are commonly accepted to be associated with biochemical responses and adaptation strategies under Fe deficiency conditions. Furthermore, this analytical tool showed sensitivity in discriminating plants grown under Fe-sufficient or -deficient conditions, providing evidence that the plants used in the study were metabolically stressed due to a lack of Fe. For example, we found that the mass spectra from Fe-deficient plants presented decreased signals for protochlorophyllide a (613.36 m/z) compared with control plants. The lower concentration of chlorophylls caused leaf yellowing, which is an important visible symptom of Fe deficiency in plants. In addition, the signal for 1-18:3-2-18:3-monogalactosyldiacylglycerol (797.49 m/z) also decreased. Monogalactosyldiacylglycerol is a major lipid component of chloroplast membranes and acts directly in several important plastid roles, particularly during photosynthesis [26,27]. Fe deficiency decreased the signals of other lipids including, phospholipid dioleoylphosphatidylcholine (808.38 m/z), which is a component of cell membranes, and 9,10-epoxy-18-hydroxystearate (314.26 m/z), which is involved in cutin biosynthesis [46,47].

In addition, we found that six signals were increased due to Fe deficiency which, according to the heat map, could be used as biomarkers to distinguish between Fe treatments. Two of these are precursors for riboflavin biosynthesis, 1-deoxy-L-glycero-tetrolase 4-phosphate (185.22 m/z) and 5-amino-6-(ν -ribitylamino) uracil (299.18 m/z), which are subsequently transformed into FAD. Accumulation of riboflavin was observed in *M. truncatula* plants grown under Fe-deficient conditions, with or without CaCO_3 as a source of alkaline pH stress. The root protein profile showed the de novo accumulation of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase (DMRLs) and GTP cyclohydrolase II (GTPcII); these proteins are involved in riboflavin biosynthesis, suggesting that the riboflavin biosynthetic pathway is upregulated under conditions of Fe deficiency [11]. Since flavin compounds are exported and accumulate in Fe-deficient roots, different roles have been proposed for riboflavin, including as an electron donor either for enzymatic Fe (III) reduction, as a cofactor, or as a metal chelator [8,11].

Increased signaling was also observed for compounds of different families such as polyamines, coumarins, and terpenes; all of which have different roles in the adaptation of plants to the environment and for overcoming stress conditions. One signal corresponded to norspermine (189.26 m/z), a polyamine previously identified in *Medicago* plants [48], which accumulated in response to Fe deficiency, inducing ferric-chelate reductase activity and the expression of genes related to Fe uptake [49]. The coumarin (+)-marmesin (269.06 m/z) has antioxidant properties [50], as well as the tetraterpenoid crocetin (351.23 m/z) [14], which may protect plants from damage induced by oxidative stress in response to Fe deficiency [9]. Finally, the signal for the putative ion identified as L-histidinol phosphate (222.07 m/z) also increased. This compound is a precursor of histidine; however, its role in plants under stress caused by Fe deficiency has not been fully explored. The chemical properties of the imidazole side

group allow this amino acid to participate in acid-base catalysis, and in the co-ordination of metal ions [51].

PGPR application has become an increasingly common practice as part of an agricultural strategy to alleviate plant abiotic stresses in the field. The use of PGPR will help to address the challenges of producing food for a growing human population in a sustainable and environmentally friendly manner. From this perspective, we have studied the effects of volatiles from the rhizobacterium *A. agilis* UMCV2 on the growth and development of *M. truncatula* in Fe-sufficient and -deficient growth media [23]. In a previous study, we found that the UMCV2 strain induces iron acquisition mechanisms in this Strategy I plant, including rhizosphere acidification, ferric chelate reductase activity, and Fe content in plants. In the present study, using DLI-ESI-MS and the RF model, we found that volatiles from the UMCV2 strain favor the accumulation of flavonoids in leaves under conditions of Fe sufficiency and deficiency, particularly kaempferol (287.19 *m/z*). Legumes are a source of flavonoids and have a beneficial effect on human health [52]; however in plants, flavonoids have diverse roles; for example, flavonoids reduce Fe (III) to Fe (II), reduce the production of reactive oxygen species (ROS), quench ROS, have antifungal activity, chelate ions of transition metals, and quench cascades of free-radical reactions in lipid peroxidation. Besides, due to their low redox potential, they can also reduce potent free radicals (superoxides, alkyl radicals, hydroxyl radicals) [45]. Last, they are involved in plant-microbe interactions signaling, in particular, in symbiotic bacteria stimulating root colonization [10,42–44].

Besides kaempferol, five other signals, 87.41, 88.08, 88.33, 97.83, and 98.04 *m/z*, which correspond to 3-pentanone, pyruvate, 4-aminobutanal, glycolate, and *N*-monomethylethanolamine, respectively, were grouped in the same conglomerate in the heat map, indicating that these compounds are metabolite markers that are specifically produced in response to the presence of the UMCV2 strain, compared with uninoculated plants and those treated with the commensal rhizobacteria L264. These compounds have previously been reported in plants subjected to different kinds of abiotic stresses, acting as signaling molecules that regulate many cellular processes, such as plant growth/development and acclimation responses to stress [12,28–33]. Thus, these results suggest that a complex network of signaling events is activated during the interaction of *M. truncatula* with *A. agilis* UMCV2 via the emission of volatile compounds; this stimulates iron acquisition mechanisms and mediates cellular activity to alleviate plant stress.

Finally, of the 30 most important ions shown in the RF model, we identified three compounds (5-dehydroepiandrosterone, 6-deoxocathasterone, and 6-hydroxycastasterone) related to BRs synthesis [35–38]. These phytohormones regulate the growth and development of plants, and their involvement in the detection and response to Fe deficiency in plants has only recently emerged [15,17,53]. The exogenous application of BRs to stressed plants induces stress-tolerance mechanisms. Thus, it would be timely to conduct a detailed study to ascertain whether microbial volatiles can modulate BRs signaling pathways in plants grown under conditions of Fe sufficiency and deficiency, since we found that volatiles from *A. agilis* UMCV2 promote the growth and the synthesis of BRs in plants grown under Fe-sufficient and -deficient growth conditions.

In summary, our findings show the usefulness of DLI-ESI-MS for studying the metabolic disturbances induced by Fe deficiency in plants; and also, it provided an integrated view of the cellular processes that occur following inoculation with PGPR and different metabolite markers could be identified as possible subjects for further studies. The combination of both mass spectrometry techniques allowed us to show that plants effectively sense the volatiles emitted by *A. agilis* UMCV2 and reconfigure their metabolic networks accordingly. It is probable that multiple mechanisms, including brassinosteroid production, are activated during plant-microbe interactions, either simultaneously or in succession to ameliorate plant stress. Currently, we are investigating the role of volatiles from *A. agilis* UMCV2 in the protection against oxidative stress and the production of certain flavonoids and BRs to mediate Fe stress responses.

4. Materials and Methods

4.1. Biological Material and Growth Conditions

In this study, seeds of *M. truncatula* ecotype Jemalong A17 were scarified with 2 mL of concentrated sulfuric acid for 8 min and then rinsed with five washes of sterile deionized water to remove excess acid [54]. Later, seeds were superficially disinfected with 12% sodium hypochlorite for 2 min and rinsed five times with sterile deionized water. Seeds were placed on 0.6% agar plates (Phytotechnology, Shawnee Mission, KS, USA) with 0.6% sucrose and vernalized at 4 °C for 3 days. Germination was performed in a Percival growth chamber with a photoperiod of 16 h light/8 h dark, a luminous intensity of 6100 lx and a constant temperature of 22 °C.

After 3 days of germination, three seedlings were transferred to each 170 mL glass flask with 35 mL of Hoagland medium and 0.6% agar. The Hoagland base medium was supplemented with the following salts: 1020 ppm KNO₃, 492 ppm Ca(NO₃)₂ × 4H₂O, 230 ppm NH₄H₂(PO₄), 490 ppm MgSO₄ × 7H₂O, 2.80 ppm H₃BO₃, 1.81 ppm MnCl₂ × 2H₂O, 0.08 ppm CuSO₄ × 5H₂O, 0.22 ppm ZnSO₄ × 5H₂O and 0.09 ppm Na₂MoO₄ × H₂O. For the Fe-sufficient treatment, Hoagland medium was supplemented with 20 μM FeSO₄, and for the Fe-deficient treatment, no source of Fe was added.

The UMCV2 strain (CECT-7743, Spanish Type Culture Collection, Valencia, Spain) was grown on nutrient agar (3 g L⁻¹ of meat extract, 5 g L⁻¹ peptone, and 1.5% bacteriological agar) at 22 °C. Also, we used the commensal rhizobacterium *Bacillus* sp. L264 as a control [55,56]. The L264 strain was maintained under similar conditions to UMCV2.

4.2. Plant-Bacteria Interaction through the Emission of Volatiles

A system with separate compartments was used (Figure 1a–f). Two days after transferring the plants to Hoagland media, 20 μL of each rhizobacteria (0.05 D.O._{595nm}) was inoculated into a glass vial with 2 mL nutritive agar medium. For the treatment of the uninoculated plants, 20 μL of water was added instead of bacterial inoculum. Then, seedlings were allowed to grow in the growth chamber under the controlled conditions of light and temperature mentioned above. After 10 days, the seedlings were carefully removed from the medium, and the trifoliolate leaves were harvested, immediately frozen with liquid nitrogen, and maintained at –80 °C. Other plants were dried to a constant weight at 68 °C for 7 days. Dry weight was analyzed using a factorial design, comprising of two factors (Fe availability with two levels and bacterial volatiles with three levels), followed by Tukey's test ($p \leq 0.05$).

4.3. Metabolite Extraction from *M. truncatula* Leaves

Frozen leaves were lyophilized and 3 mg of dry tissue was ground in a Mixer Mill (MM 400-Retsch, Verder Scientific GmbH & Co. KG; Haan, Germany) at 30 Hz for 30 s. The extraction was carried out with 500 μL 75% methanol grade HPLC acidified with 0.5% formic acid, and samples were then sonicated for 30 min, centrifuged at 10,000 rpm for 10 min at 4 °C, and filtered with a 4 mm syringe filter sterile through a 0.22 μm pore size hydrophilic nylon membrane. The samples were directly injected into the DLI-ESI mass spectrometer without further pre-treatment.

4.4. Non-Targeted Metabolic Profiling by DLI-ESI Mass Spectrometry

The samples were analyzed on a SQ-Detector 2 spectrometer (ESI/APCI/ESCI, multimode, Waters, Milford, MA, USA) with the fabricant software MassLynx 4.1. The measurements were made with electrospray ionization in positive mode, a capillary voltage of 3 kV, a cone voltage of 30 V and an extractor voltage of 3 V, source temperature of 135 °C, desolvation temperature and flow of 250 °C and 250 L h⁻¹, respectively, and cone gas flow of 50 L h⁻¹. The RF lens was set to 2.5 V. In the analyzer section, a resolution LM and HM of 10 and 14.6, respectively, and an energy ion of –0.1 were used. The samples were injected with a flow rate of 10 μL min⁻¹. The spectra were collected within the range 50–2000 *m/z*, the duration of the run was 1 min, and one scan was obtained per second.

The spectra obtained were converted from the raw extension to mzXML using MSConvert 3.0 from the ProteoWizard Library open-source initiative (<https://proteowizard.sourceforge.net>). The software mMass version 5.5.0 [57] was used to subtract the noise from the spectra, normalize the base peak, and obtain an average mass spectrum. Using the R language (Version 3.4.1 <https://www.rstudio.com/>) and the MALDIquant package [58], a database was obtained in text format with the ions present in the mass spectra. The database was used for statistical analyses.

The chemical profiles of the leaves were compared using the hierarchical cluster analysis (HCA) approach and by generating heatmaps with the ion intensities. To determine the contribution of each ion, the Rattle packet [59] was used in the R interface to generate a Random Forest (RF) model for each variable (iron and bacterial volatiles). The RF algorithm consisted of training, validation, and test steps using m/z ions. To obtain the most important ions in the study, 500 decision trees were created using 70% of the samples; the remaining samples were used for validation (15%) and testing (15%). The importance of the ion variable was determined by measuring the mean decrease by the Gini index.

4.5. Identification of Significant Ions

The most important ions, according to the RF algorithm, were putatively identified using SpiderMass software [60] and a *M. truncatula* metabolite database (PlantCyc database, <https://www.plantcyc.org/>) with a tolerance of $\pm 0.35 m/z$.

4.6. Brassinosteroids Determination

The presence of BRs in the samples was confirmed by GC-MS (Agilent, Foster City, CA, USA) analysis. Each treatment consisted in three composed samples of three plants. The extracts were evaporated to dryness under a stream of nitrogen in a reaction vial. Then, they were treated with acetic anhydride (1.5 mL) and dichloromethane (1 mL), and heated at 75 °C for 90 min. Acetylation decreases the boiling point of the phytohormone, improves the thermal stability in the GC injection port and allows a better chromatographic separation. After cooling, the acetylated sample was diluted with chloroform (2 mL) and washed with deionized water (4 mL) three times. The organic phase was recovered, dried over anhydrous Na_2SO_4 , evaporated and re-dissolved in 50 μL chloroform for GC-selected ion monitoring-MS analysis (GC-SIM-MS). The molecular ion of the acetylated compound at 652 m/z was very weak and sometimes not observed. Thus, the fragmented ions used for the SIM-MS method were 480, 380, 350, 322, and 177 m/z . These ions have previously been reported as characteristic ions for the structural determination of brassinolide rings, which have been analyzed by electron impact MS detector [61]. In addition, the phytohormone was further confirmed by comparing the retention time in the extract to a pure epibrassinolide standard (SIGMA-ALDRICH, Saint Louis, MO, USA, catalog no. E1641). The standard was also acetylated and to estimate the amount of the compound in the sample, we constructed a calibration curve ($R^2 = 1$).

The phytohormone (2 μL) was analyzed using an Agilent 6850 Series II gas chromatograph equipped with an Agilent MS detector (model 5973) (Agilent) and a 5% phenyl methyl silicone capillary column (HP-5 MS) (30 m \times 0.25 mm I.D., 0.25 mm film thickness). The operating conditions were 1 mL min^{-1} of helium as the carrier gas, 300 °C as the detection temperature, and 270 °C as the injection temperature. The column was held for 3 min at 180 °C and programmed at 5 °C min^{-1} to reach a final temperature of 300 °C for 12 min. The ions were monitored after electron impact ionization (70 eV).

Brassinolide concentration was analyzed using a factorial design, which comprised of two factors (Fe-rich and -deficient media, and the presence and absence of volatiles from *A. agilis* UMCV2), followed by Tukey's test ($p \leq 0.05$).

Author Contributions: Conceptualization, L.M.-R., E.V.-C. and R.W.; Methodology, L.M.-R., E.V.-C. and R.W.; Validation, L.M.-R. and I.F.-C.; Formal analysis, I.F.-C., A.R.-O., M.T.C.-R. and M.I.C.E.-A.; Investigation, I.F.-C., A.R.-O., M.T.C.-R. and M.I.C.E.-A.; Resources, L.M.-R., E.V.-C. and R.W.; Writing—Original Draft Preparation, I.F.-C., A.R.-O. and L.M.-R.; Writing—Review & Editing, L.M.-R., E.V.-C. and R.W.; Supervision, L.M.-R.; Project Administration, L.M.-R. and R.W. Funding Acquisition, L.M.-R. and R.W.

Funding: This research was funded by the Fronteras project 2015-2/814, the bilateral grant CONACyT-DFG 2016/277850, and the Consejo de la Investigación Científica (UMSNH) (grant number 2.24). I. Flores-Cortez is indebted to CONACyT for providing a PhD fellowship (grant number 164395).

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Analytical Methods Committee AMCTB No. 81. A “periodic table” of mass spectrometry instrumentation and acronyms. *Anal. Methods* **2017**, *9*, 5086–5090.
2. García-Flores, M.; Juárez-Colunga, S.; García-Casarrubias, A.; Trachsel, S.; Winkler, R.; Tiessen, A. Metabolic profiling of plant extracts using direct-injection electrospray ionization mass spectrometry allows for high-throughput phenotypic characterization according to genetic and environmental effects. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 1042–1052. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Gamboa-Becerra, R.; Montero-Vargas, J.; Martínez-Jarquín, S.; Gálvez-Ponce, E.; Moreno-Pedraza, A.; Winkler, R. Rapid classification of coffee products by data mining models from direct electrospray and plasma-based mass spectrometry analyses. *Food Anal. Methods* **2016**, *10*, 1359–1368. [[CrossRef](#)]
4. González-Domínguez, R.; Sayago, A.; Fernández-Recamales, A. High-throughput mass-spectrometry based-metabolomics to characterize metabolite fingerprints associated with Alzheimer’s disease pathogenesis. *Metabolites* **2018**, *8*, 52. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Montero-Vargas, J.; Casarrubias-Castillo, K.; Martínez-Gallardo, N.; Ordaz-Ortiz, J.; Délano-Frier, J.; Winkler, R. Modulation of steroidal glycoalkaloid biosynthesis in tomato (*Solanum lycopersicum*) by jasmonic acid. *Plant. Sci.* **2018**, *277*, 155–165. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. García-Flores, M.; Juárez-Colunga, S.; Montero-Vargas, J.M.; López-Arciniega, J.A.I.; Chagolla, A.; Tiessen, A.; Winkler, R. Evaluating the physiological state of maize (*Zea mays* L.) plants by direct-injection electrospray mass spectrometry (DIESI-MS). *Mol. BioSyst.* **2012**, *8*, 1658–1660. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Rendón-Anaya, M.; Montero-Vargas, J.M.; Saburido-Álvarez, S.; Vlasova, A.; Capella-Gutierrez, S.; Ordaz-Ortiz, J.J.; Aguilar, O.M.; Vianello-Brondani, R.P.; Santalla, M.; Delaye, L.; et al. Genomic history of the origin and domestication of common bean unveils its closest sister species. *Genome Biol.* **2017**, *18*, 60. [[CrossRef](#)]
8. González-Vallejo, E.B.; Susin, S.; Abadía, A.; Abadía, J. Changes in sugar beet leaf plasma membrane Fe(III)-chelate reductase activities mediated by Fe-deficiency, assay buffer composition, anaerobiosis and the presence of flavins. *Protoplasma* **1998**, *205*, 163–168. [[CrossRef](#)]
9. Salama, Z.; El-Beltagi, H.; El-Hariri, D.M. Effect of Fe deficiency on antioxidant system in leaves of three flax cultivars. *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj.* **2009**, *37*, 122–128.
10. Jin, C.W.; Li, G.X.; Yu, X.H.; Zheng, S.J. Plant Fe status affects the composition of siderophore-secreting microbes in the rhizosphere. *Ann. Bot.* **2010**, *105*, 835–841. [[CrossRef](#)]
11. Rodríguez-Celma, J.; Lattanzio, G.; Grusak, M.A.; Abadía, A.; Abadía, J.; López-Millán, A.F. Root responses of *Medicago truncatula* plants grown in two different iron deficiency conditions: Changes in root protein profile and riboflavin biosynthesis. *J. Proteome Res.* **2011**, *10*, 2590–2601. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Fariduddin, Q.; Varshney, P.; Yusuf, M.; Ahmad, A. Polyamines: Potent modulators of plant responses to stress. *J. Plant. Interact.* **2013**, *8*, 1–16. [[CrossRef](#)]
13. Ravet, K.; Pilon, M. Copper and iron homeostasis in plants: The challenges of oxidative stress. *Antioxid Redox Signal.* **2013**, *19*, 919–932. [[CrossRef](#)]
14. Baba, S.A.; Malik, A.H.; Wani, Z.A.; Mohiuddin, T.; Shah, Z.; Abbas, N.; Ashraf, N. Phytochemical analysis and antioxidant activity of different tissue types of *Crocus sativus* and oxidative stress alleviating potential of saffron extract in plants, bacteria, and yeast. *S. Afr. J. Bot.* **2015**, *99*, 80–87. [[CrossRef](#)]
15. Wang, B.; Li, G.; Zhang, W.H. Brassinosteroids are involved in Fe homeostasis in rice (*Oryza sativa* L.). *J. Exp. Bot.* **2015**, *66*, 2749–2761. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Li, W.; Lan, P. The understanding of the plant iron deficiency responses in strategy I plants and the role of ethylene in this process by omic approaches. *Front. Plant. Sci.* **2017**, *8*, 40. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Lima, M.D.R.; Barros Junior, U.O.; Batista, B.L.; da Silva Lobato, A.K. Brassinosteroids mitigate iron deficiency improving nutritional status and photochemical efficiency in *Eucalyptus urophylla* plants. *Trees* **2018**, *32*, 1681–1694. [[CrossRef](#)]

18. Pérez-Montaño, F.; Alías-Villegas, C.; Bellogín, R.A.; del Cerro, P.; Espuny, M.R.; Jiménez-Guerrero, I.; López-Baena, F.J.; Ollero, F.J.; Cubo, T. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: From microorganism capacities to crop production. *Microbiol. Res.* **2014**, *169*, 325–336. [[CrossRef](#)]
19. Ryu, C.M.; Farag, M.A.; Hu, C.H.; Reddy, M.S.; Wei, H.X.; Pare, P.W.; Kloepper, J.W. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100*, 4927–4932. [[CrossRef](#)]
20. Zhang, H.; Sun, Y.; Xie, X.; Kim, M.S.; Dowd, S.E.; Paré, P.W. A soil bacterium regulates plant acquisition of iron via deficiency-inducible mechanisms. *Plant. J.* **2009**, *58*, 568–577. [[CrossRef](#)]
21. Valencia-Cantero, E.; Hernández-Calderón, E.; Velázquez-Becerra, C.; López-Meza, J.E.; Alfaro-Cuevas, R.; López-Bucio, J. Role of dissimilatory fermentative iron-reducing bacteria in Fe uptake by common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants grown in alkaline soil. *Plant. Soil.* **2007**, *291*, 263–273. [[CrossRef](#)]
22. Velázquez-Becerra, C.; Macías-Rodríguez, L.I.; López-Bucio, J.; Altamirano-Hernández, J.; Flores-Cortez, I.; Valencia-Cantero, E. A volatile organic compound analysis from *Arthrobacter agilis* identifies dimethylhexadecylamine, an amino-containing lipid modulating bacterial growth and *Medicago sativa* morphogenesis in vitro. *Plant. Soil.* **2011**, *339*, 329–340. [[CrossRef](#)]
23. Orozco-Mosqueda, M.C.; Velázquez-Becerra, C.; Macías-Rodríguez, L.I.; Santoyo, G.; Flores-Cortez, I.; Alfaro-Cuevas, R.; Valencia-Cantero, E. *Arthrobacter agilis* UMCV2 induces iron acquisition in *Medicago truncatula* (strategy I plant) in vitro via dimethylhexadecylamine emission. *Plant. Soil.* **2013**, *362*, 51–66. [[CrossRef](#)]
24. Castulo-Rubio, D.Y.; Alejandre-Ramírez, N.A.; Orozco-Mosqueda, M.C.; Santoyo, G.; Macías-Rodríguez, L.I.; Valencia-Cantero, E. Volatile organic compounds produced by the rhizobacterium *Arthrobacter agilis* UMCV2 modulate *Sorghum bicolor* (strategy II plant) morphogenesis and *SbFRO1* transcription in vitro. *J. Plant. Growth Regul.* **2015**, *34*, 611–623. [[CrossRef](#)]
25. Montejano-Ramírez, V.; Martínez-Cámara, R.; García-Pineda, E.; Valencia-Cantero, E. Rhizobacterium *Arthrobacter agilis* UMCV2 increases organ-specific expression of *FRO* genes in conjunction with genes associated with the systemic resistance pathways of *Medicago truncatula*. *Acta Physiol. Plant.* **2018**, *40*, 138. [[CrossRef](#)]
26. Shimojima, M.; Ohta, H. Critical regulation of galactolipid synthesis controls membrane differentiation and remodeling in distinct plant organs and following environmental changes. *Prog. Lipid Res.* **2011**, *50*, 258–266. [[CrossRef](#)]
27. Aronsson, H.; Schottler, M.A.; Kelly, A.A.; Sundqvist, C.; Dormann, P.; Karim, S.; Jarvis, P. Monogalactosyldiacylglycerol deficiency in *Arabidopsis* affects pigment composition in the prolamellar body and impairs thylakoid membrane energization and photoprotection in leaves. *Plant. Physiol.* **2008**, *148*, 580–592. [[CrossRef](#)]
28. McNeil, S.D.; Nuccio, M.L.; Ziemak, M.J.; Hanson, A.D. Enhanced synthesis of choline and glycine betaine in transgenic tobacco plants that overexpress phosphoethanolamine N-methyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, *98*, 10001–10005. [[CrossRef](#)]
29. Mohamed, A.A.; Aly, A.A. Iron Deficiency Stimulated Some Enzymes Activity, Lipid Peroxidation and free radicals production in *Borage officinalis* induced in vitro. *Int. J. Agri. Biol.* **2004**, *6*, 179–184.
30. Sperotto, R.A.; Boff, T.; Duarte, G.L.; Fett, J.P. Increased senescence-associated gene expression and lipid peroxidation induced by iron deficiency in rice roots. *Plant. Cell Rep.* **2008**, *27*, 183–195. [[CrossRef](#)]
31. Vigani, G.; Zocchi, G. The fate and the role of mitochondria in Fe-deficient roots of Strategy I plants. *Plant. Signal. Behav.* **2009**, *4*, 375–379. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Bitrián, M.; Zarza, X.; Altabella, T.; Tiburcio, A.F.; Alcázar, R. Polyamines under abiotic stress: Metabolic crossroads and hormonal crosstalks in plants. *Metabolites* **2012**, *2*, 516–528. [[CrossRef](#)]
33. Voss, I.; Sunil, B.; Scheibe, R.; Raghavendra, A.S. Emerging concept for the role of photorespiration as an important part of abiotic stress response. *Plant. Biol.* **2013**, *15*, 713–722. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Leonardi, R.; Zhang, Y.M.; Rock, C.O.; Jackowski, S. Coenzyme A: Back in action. *Prog Lipid Res.* **2005**, *44*, 125–153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Fujioka, S.; Yokota, T. Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. *Annu Rev. Plant. Biol.* **2003**, *54*, 137–164. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

36. Bishop, G.J.; Nomura, T.; Yokota, T.; Harrison, K.; Noguchi, T.; Fujioka, S.; Takatsuto, S.; Jones, J.D.G.; Kamiya, Y. The tomato DWARF enzyme catalyses C-6 oxidation in brassinosteroid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, *96*, 1761–1766. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Nomura, T.; Sato, T.; Bishop, G.J.; Kamiya, Y.; Takatsuto, S.; Yokota, T. Accumulation of 6-deoxocathasterone and 6-deoxocasterone in *Arabidopsis*, pea and tomato is suggestive of common rate limiting steps in brassinosteroid biosynthesis. *Phytochemistry* **2001**, *57*, 171–178. [[CrossRef](#)]
38. Clouse, S.D. Brassinosteroids. *Arab. Book* **2002**, *1*, 1–23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Goyer, A. Thiamine in plants: Aspects of its metabolism and functions. *Phytochemistry* **2010**, *71*, 1615–1624. [[CrossRef](#)]
40. Nishizawa, A.; Yabuta, Y.; Shigeoka, S. Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant. Physiol.* **2008**, *147*, 1251–1263. [[CrossRef](#)]
41. He, N.W.; Zhao, Y.; Guo, L.; Shang, J.; Yang, X.B. Antioxidant, antiproliferative, and pro-apoptotic activities of a saponin extract derived from the roots of *Panax notoginseng* (Burk.) F.H. Chen. *J. Med. Food.* **2012**, *15*, 350–359. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Wasson, A.P.; Pellerone, F.I.; Mathesius, U. Silencing the flavonoid pathway in *Medicago truncatula* inhibits root nodule formation and prevents auxin transport regulation by *Rhizobia*. *Plant. Cell* **2006**, *18*, 1617–1629. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Maj, D.; Wielbo, J.; Marek-Kozaczko, M.; Skorupska, A. Response to flavonoids as a factor influencing competitiveness and symbiotic activity of *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiol. Res.* **2010**, *165*, 50–60. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Abdel-Lateif, K.; Bogusz, D.; Hocher, V. The role of flavonoids in the establishment of plant roots endosymbioses with arbuscular mycorrhizal fungi, rhizobia and *Frankia* bacteria. *Plant. Signal. Behav.* **2012**, *7*, 636–641. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Mierziak, J.; Kostyn, K.; Kulma, A. Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. *Molecules* **2014**, *19*, 16240–16265. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Meyerowitz, E.M.; Somerville, C.R. *Arabidopsis*; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY, USA, 1994; p. 1270.
47. Pollard, M.; Beisson, F.; Li, Y.; Ohlogge, J.B. Building lipid barriers: Biosynthesis of cutin and suberin. *Trends Plant. Sci.* **2008**, *13*, 236–246. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Rodriguez-Garay, B.; Phillips, G.C.; Kuehn, G.D. Detection of norspermidine and norspermine in *Medicago sativa* L. (alfalfa). *Plant. Physiol.* **1989**, *89*, 525–529. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Zhu, X.F.; Wang, B.; Song, W.F.; Zheng, S.J.; Shen, R.F. Putrescine alleviates iron deficiency via NO-dependent reutilization of root cell-wall Fe in *Arabidopsis*. *Plant. Physiol.* **2016**, *170*, 558–567. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Bourgaud, F.; Hehn, A.; Larbat, R.; Doerper, S.; Gontier, E.; Kellner, S.; Matern, U. Biosynthesis of coumarins in plants: A major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes. *Phytochem. Rev.* **2006**, *5*, 293–308. [[CrossRef](#)]
51. Ingle, R.A. Histidine biosynthesis. *Arab. Book* **2011**, *9*, 1–9. [[CrossRef](#)]
52. Velazquez, E.; Silva, L.R.; Peix, A. Legumes: A healthy and ecological source of flavonoids. *Curr. Nutr. Food Sci.* **2010**, *6*, 109–144. [[CrossRef](#)]
53. Wang, B.; Li, Y.; Zhang, W.H. Brassinosteroids are involved in response of cucumber (*Cucumis sativus*) to iron deficiency. *Ann. Bot.* **2012**, *110*, 681–688. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Boisson-Dernier, A.; Andriankaja, A.; Chabaud, M.; Niebel, A.; Journet, E.P.; Barker, D.G.; de Carvalho-Niebel, F. *MIENOD11* Gene activation during rhizobial infection and mycorrhizal arbuscule development requires a common AT-rich-containing regulatory sequence. *MPMI* **2005**, *18*, 1269–1276. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Gutiérrez-Luna, F.M.; López-Bucio, J.; Altamirano-Hernández, J.; Valencia-Cantero, E.; Reyes-de la Cruz, H.; Macías-Rodríguez, L. Plant growth-promoting rhizobacteria modulate root-system architecture in *Arabidopsis thaliana* through volatile organic compound emission. *Symbiosis* **2010**, *51*, 75–83. [[CrossRef](#)]
56. Hernández-Calderón, E.; Aviles-García, M.E.; Castulo-Rubio, D.Y.; Macías-Rodríguez, L.; Montejano-Ramírez, V.; Santoyo, G.; López-Bucio, J.; Valencia-Cantero, E. Volatile compounds from beneficial or pathogenic bacteria differentially regulate root exudation, transcription of iron transporters, and defense signaling pathways in *Sorghum bicolor*. *Plant. Mol. Biol.* **2018**, *96*, 291–304. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

57. Strohaln, M.; Hassman, M.; Kořata, B.; Kodiček, M. mMass data miner: An open source alternative for mass spectrometric data analysis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2008**, *22*, 905–908. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Gibb, S.; Strimmer, K. MALDIquant: A versatile R package for the analysis of mass spectrometry data. *Bioinformatics* **2012**, *28*, 2270–2271. [[CrossRef](#)]
59. Williams, G.J. *Data Mining with Rattle and R: The Art of Excavating Data for Knowledge Discovery*; Springer: New York, NY, USA, 2011; p. 374.
60. Winkler, R. SpiderMass: Semantic database creation and tripartite metabolite identification strategy. *J. Mass Spectrom.* **2015**, *50*, 538–541. [[CrossRef](#)]
61. Ikekawa, N.; Takatsuto, S. Microanalysis of brassinosteroids in plants by gas chromatography/mass spectrometry. *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.* **1984**, *32*, 55–70. [[CrossRef](#)]

Sample Availability: Samples of the compounds are not available from the authors.



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

La tecnología computacional y la biología de sistemas

Escrito por Arturo Ramírez Ordorica y Lourdes Macías Rodríguez



El avance de la tecnología computacional

Con el advenimiento del siglo XXI, nuestra generación ha presenciado como las fronteras científicas y técnicas se han expandido a una velocidad vertiginosa. En los últimos 500 años que nos separan de la llamada Revolución Científica, hemos acumulado mucho más conocimiento que en los 5 000 años de cultura escrita y eso nos convierte en herederos orgullosos de una travesía iniciada mucho antes, con el origen del humano mismo. El desarrollo de la tecnología computacional **marcó un parteaguas** en la velocidad con que los datos generados pudieron ser clasificados y, finalmente, analizados por poderosos algoritmos con los que extraemos la mayor cantidad de información posible.

Pensemos que los principios teóricos de la computadora no son recientes. La posibilidad de construir máquinas de cálculo se puede rastrear en épocas tan anteriores como la invención del ábaco y los fundamentos del álgebra booleana (pieza fundamental de toda computadora moderna) que se publicaron en 1847 por George Boole. El concepto de la computadora moderna, con un software (instrucciones o programas) y un

hardware (la parte mecánica) bien diferenciados, **se concibió alrededor de 1820** por Charles Babbage antes de Boole. Así, el problema de la computación no fue tanto de naturaleza teórica, sino técnica. Era necesario el descubrimiento de procesos, materiales y fenómenos físicos (en concreto la electricidad) para que las ideas que ya estaban planteadas, pudieran ser llevadas a la práctica.

La tecnología computacional en la biología moderna

La biología molecular moderna no hubiera nacido sin el impulso que las capacidades de las computadoras dieron a esta área de la ciencia desde sus primeros años de desarrollo. Pongamos un ejemplo: el elucidar la forma tridimensional de las biomoléculas como los carbohidratos, las proteínas, los lípidos y los ácidos nucleicos, fue un paso decisivo para la comprensión de los mecanismos que operan a escala microscópica en las células.

La técnica por excelencia para este fin, fue la **crystalografía** por difracción de rayos X, que como su nombre lo indica, se basa en el análisis de los patrones de difracción producidos al irradiar un cristal de un compuesto de interés con un haz de rayos X. Aunque los primeros patrones de difracción se resolvieron con calculadoras mecánicas o a mano (no sin un considerable esfuerzo), el estudio de biomoléculas más complejas, como las proteínas, requirió del **uso de las primeras computadoras**.

John Kendrew, ganador del premio Nobel de química en 1962 (compartido con Max Perutz), por la resolución de la estructura de la mioglobina, utilizó la computadora EDSAC 2 en la universidad de Cambridge con una memoria de apenas 2 kilobytes, con la que se realizaron todas las operaciones requeridas en componer los llamados **mapas de densidad electrónica**, que permitieron entender la distribución tridimensional de la molécula dentro del cristal. Este científico, comprendió con una antelación casi profética, que el uso de las computadoras para la investigación en ciencias biológicas sería primordial en el futuro.

Nunca hubiéramos conocido el genoma humano sin las computadoras. Se estima que para comparar cada secuencia de ADN del genoma y para armar el rompecabezas por los métodos clásicos, hubiera tomado alrededor de 19 años de tedioso cálculo, además de que se habrían requerido 600 gigabytes de memoria RAM para completarlos. Gracias a las mejoras hechas en los primeros algoritmos de ensamblado, la labor de reconstrucción del genoma humano a partir de las secuencias tomó alrededor de una semana, con 40 computadoras trabajando en paralelo. Evidentemente, es muy difícil imaginar que semejante labor se hubiera alguna vez terminado sin el uso de la computación.





Surgimiento de la biología de sistemas

La **biología de sistemas** surgió de la inquietud por estudiar un aspecto muy particular de los seres vivos: su «complejidad». Desde el momento que negamos la existencia de una «esencia vital» que mueve a los organismos vivos, ahora sometidos a las mismas leyes físicas que gobiernan la materia inanimada, surge la pregunta ¿De qué manera se organizan sus partes y qué relación guardan con las funciones propias de lo que entendemos por vida? Uno de los primeros teóricos al respecto fue Ludwig von Bertalanffy, quien en 1968 publicó su «Teoría general de los sistemas».

Su propuesta era entender los fenómenos naturales y sociales como un conjunto de componente interactuantes y la relación que guardan entre ellos. No es casualidad que el propio Bertalanffy fuera un biólogo con una robusta formación en matemáticas, lo que le permitió abordar el problema de la complejidad con una **propuesta multidisciplinaria**. La biología de sistemas, a su vez, vive inmersa en lo que se ha llamado ciencias de sistemas; realmente es un movimiento científico surgido en la segunda mitad del siglo pasado, impulsado por diferentes contemporáneos de Bertalanffy.

Podemos imaginar a la célula como un gran número de componentes que trabajan en coordinación para llevar a cabo todas las funciones vitales. Los científicos siempre han entendido que existen muchos procesos que no pueden explicarse sencillamente como la suma de sus partes. La molécula de agua es un caso muy ilustrativo, ya que puede caracterizarse su geometría de forma bastante exacta y sus propiedades físicas. Sin embargo, hay propiedades como el flujo del agua, la tensión superficial del líquido o su capacidad como solvente, que no surgen sencillamente de una molécula individual, sino de la interacción de cada molécula con otras que la rodean.

En todos los sistemas emergen nuevas propiedades, conforme se aumenta el número de componentes que interactúan y la escala a la que los observamos. Así, no hay nada en particular en los átomos de carbono o de hidrógeno, por ejemplo, que nos permita predecir con total certeza que tipo de organización debería tener una proteína en específico, o la forma en que se deberían de establecer la comunicación entre células vecinas. Esto es lo que se conoce como «**propiedades emergentes**» y se trata de un concepto central al tratar de hablar de biología de sistemas.





Biología de sistemas y la predicción de la realidad

Una visión totalizadora del fenómeno vivo tiene implicaciones metodológicas y filosóficas muy profundas. Si los sistemas vivos no son simplemente la suma de sus componentes, entonces para comprenderlos hay que intentar obtener la imagen más completa posible del sistema y así descifrar las interrelaciones entre los componentes, siempre con una visión a gran escala de ellos. El **modelado matemático** es una herramienta fundamental para esta aproximación metodológica, gracias a que los sistemas en la realidad y nuestros modelos matemáticos comparten cierto «isomorfismo». Esto significa que la expresión mínima de los componentes y la interrelación entre ellos quedan descrita en el modelo matemático.

Estudiar un fenómeno implica siempre ubicarse en la escala adecuada para analizarlo debidamente. Esto no implica que no podamos entender el movimiento de cada componente dentro del sistema, sino que existe un grado de organización por debajo del cual sería imposible esperar la emergencia de las propiedades inherentes de lo que está vivo y, por lo tanto, no podemos obtener una comprensión adecuada de cómo opera el sistema global, si nos limitamos a ver por debajo de esta escala.



Biología de sistemas y las ciencias ómicas

El movimiento de biología de sistemas cobra fuerza cada día, ahora también con el desarrollo de las llamadas **ciencias «ómicas»**, que en su conjunto engloban tres disciplinas diferentes, pero íntimamente interconectadas: la genómica, la proteómica y la metabolómica. Estas prometen revolucionar nuestra comprensión del fenómeno vivo para entenderlo como un «sistema complejo», y con ello comienza una nueva era para la biología misma, en donde el ser humano podría dejar de ser un espectador y esclavo de su organicidad, para tomar control de los componentes que nos constituyen y sacar el mayor provecho y bienestar posible de su manipulación.

Junto a esto, también surgen una serie de problemas de carácter ético que inevitablemente tendremos que enfrentar en el futuro, tal es el caso de la privacidad de la información proveniente de nuestro genoma. Sin embargo, los beneficios que obtendremos sin lugar a dudas son mucho mayores. El ejemplo reciente más claro son las investigaciones realizadas en torno al virus SARS-CoV-2, agente causal de la pandemia de COVID-19. En buena parte, la tecnología computacional que tenemos al alcance llevó a que en tiempo récord se identificara el agente causal y a desarrollar las primeras pruebas para su detección, además de que toda la investigación a nivel mundial que se hace para encontrar una vacuna eficaz para este agente viral, depende de que tengamos la capacidad de analizar muchos datos a la vez.

Las computadoras permiten abordar estas cuestiones con una seguridad inmensa y no podemos subestimar el papel central que tienen en el día a día de la ciencia moderna. Llegará una época en que la humanidad verá el surgimiento de la era digital como nosotros vemos a los forjadores de la Edad del Bronce, con una tecnología tan absurdamente ubicua y tan integrada en su vida (a un nivel que hoy no podemos ni siquiera imaginar) que les costará creer que hubo, alguna vez, mentes pioneras que imaginaron lo que el calcular miles de millones de operaciones por segundo implicaría para las generaciones venideras.

Para Saber Más:

Arnold M. y Osorio F. (1998). «Introducción a los principios básicos de teoría general de sistemas». *Cinta de Moebio*, 1998(3):40-49.

<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=10100306>

Romanelli L. (2006). «Teoría del caos en los sistemas biológicos». *Revista Argentina de Cardiología*, 74(6):478-482. <https://www.redalyc.org/pdf/3053/305326824012.pdf>

Duarte M. (2007). «Coagulación: sistema biológico complejo». *Revista Colombiana de Filosofía de la Ciencia*, 8(16-17):83-96. <https://www.redalyc.org/pdf/414/41401707.pdf>

M. en C. Arturo Ramírez-Ordorica. Estudiante del Laboratorio de Bioquímica Ecológica en el Programa de Doctorado en Ciencias en Biología Experimental del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

arturoramord@gmail.com

D. en C. Lourdes Macías-Rodríguez. Profesor - Investigador responsable del Laboratorio de Bioquímica Ecológica en el Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

lmacias@umich.mx