



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**Efecto de la inducción del crecimiento de plantas durante la
interacción en contacto y a distancia con los hongos benéficos
Trichoderma spp. y *Metarhizium anisopliae***

Tesis que presenta
Enrique González Pérez

Para obtener el grado de
Doctor(a) en Ciencias en Biología Molecular

**Director (Codirectores) de la Tesis:
Dr. Juan francisco Jiménez Bremont**

San Luis Potosí, S.L.P., Noviembre de 2020



IPICYT

Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Efecto de la inducción del crecimiento de plantas durante la interacción en contacto y a distancia con los hongos benéficos *Trichoderma spp* y *Metarhizium anisopliae***” presentada para obtener el Grado de Doctor(a) en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por el M.C. Enrique Gonzalez Perez aprobada el 11 de Noviembre del 2020 por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont
(Director de la tesis)

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís
(Miembro del Comité Tutorial)

Dra. Martha Leticia Santos Martínez
(Miembro del Comité Tutorial)

Dr. Pablo Delgado Sánchez
(Miembro del Comité Tutorial)

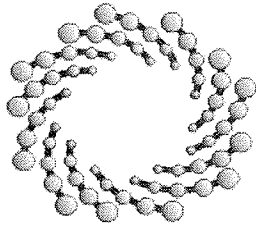


Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biología molecular de hongos y plantas de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con número de registro 494904 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

Se agradece al Proyecto titulado: Evaluación y optimización de los recursos hídricos en el nexo agricultura-sociedad-industria en tres zonas del país: árida, bajío y tropical, hacia un modelo de transferencia y política pública (FORDECYT-297525) por el financiamiento para la realización de esta tesis Doctoral.



IPICYT

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 114 del Libro Segundo de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Doctorado en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 20 días del mes de noviembre del año 2020, se reunió a las 10:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís	Presidente	IPICYT
Dra. Martha Leticia Santos Martínez	Secretaria	IPICYT
Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

Enrique González Pérez

sobre la Tesis intitulada:

Efecto de la inducción del crecimiento de plantas durante la interacción en contacto y a distancia con los hongos benéficos Trichoderma spp. y Metarhizium anisopliae.

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 13:10 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 20 días del mes de noviembre de 2020.


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado



Dedicatoria

Con mucho cariño y admiración....

A mis padres, hermanos por su apoyo incondicional en todo momento; así como a todas aquellas personas que me apoyaron directa e indirectamente para alcanzar esta meta.

Agradecimientos

Al Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont, director de esta tesis. Mi más sincero agradecimiento por brindarme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo, por su asesoría, consejos y apoyo en todo monto. Al Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís, a la Dra. Martha Leticia Santos Martínez y al Dr. Pablo Delgado Sánchez por aceptar ser parte de mi comité tutorial, por su tiempo y sus acertadas sugerencias a mi trabajo de tesis.

A la M. en C. Alicia Becerra Flora, por el apoyo técnico brindado para el desarrollo de esta tesis.

Al CONACYT por la beca N°. 494904 e IPICYT por el financiamiento y recursos para realizar este trabajo.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Resumen	viii
Abstract	ix
Introducción	1
Título del Capítulo 1	28
Título del Capítulo 2	30
Discusión	65
Conclusiones	77
Perspectivas	79
Referencias	80

Resumen

Efecto de la inducción del crecimiento de plantas durante la interacción en contacto y a distancia con los hongos benéficos *Trichoderma* spp. y *Metarhizium anisopliae*

Comprender las interacciones entre plantas y microorganismos benéficos es fundamental para la gestión sustentable de la agricultura. En esta tesis, nos enfocamos a estudiar los efectos que ejercen el hongo micoparasítico *Trichoderma* y el entomopatógeno *Metarhizium* en crecimiento de plantas. En el primer capítulo se avaluó el efecto que ejercen *T. virens* y *T. atroviride* sobre el crecimiento de la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Para ello se realizaron interacciones en contacto físico y a distancia bajo condiciones *in vitro*. Nuestros datos muestran que *Trichoderma* spp. promueve el crecimiento y desarrollo de la parte aérea y de las raíces, generando una mayor biomasa particularmente sin contacto físico. Además se encontró que *Trichoderma* es capaz de modular una respuesta dependiente de auxinas en *Arabidopsis*, la cual fue revelada a través de la línea reportera DR5:*uidA* y la mutante *rhd6* en *Arabidopsis*. La identificación de los compuestos orgánicos volátiles emitidos en la interacción *Arabidopsis*-*Trichoderma* sin contacto físico reveló que se producen principalmente sesquiterpenos. Durante la interacción sin contacto entre *Arabidopsis*-*Trichoderma* a bajas temperaturas (12 °C) observamos que *Trichoderma* mitiga el efecto negativo de la temperatura. Además, encontramos que *Trichoderma* es capaz de inducir la expresión del gen *AtERD14* en *Arabidopsis* bajo esta condición de estrés. En el segundo capítulo, se evaluó el efecto ejercido por tres cepas de *M. anisopliae* sobre *A. thaliana* en interacciones en contacto directo y a distancia. Nuestros resultados revelaron que las tres cepas de *Metarhizium* evaluadas potencian el crecimiento en *Arabidopsis*, principalmente durante las interacciones a distancia; además encontramos que *Metarhizium* incrementa el contenido de clorofila *a* en *Arabidopsis* en ambas condiciones de interacción. El análisis de compuestos orgánicos volátiles durante la interacción *Metarhizium*-*Arabidopsis* sin contacto físico mostró que principalmente se emiten β -cariofileno y *O*-cimeno. Finalmente se evaluó el co-cultivo de *M. anisopliae* con plantas de *Arabidopsis*, tomate y maíz cultivadas en macetas, en donde observamos que las tres cepas de *Metarhizium* evaluadas aumentaron la biomasa de *Arabidopsis*, tomate y maíz. Este estudio aporta evidencia sobre el efecto positivo ejercido por *Trichoderma* spp. y *M. anisopliae* sobre el crecimiento de plantas, así como el potencial de los compuestos orgánicos volátiles emitidos por estos hongos sobre el crecimiento vegetal.

PALABRAS CLAVE: *Arabidopsis thaliana*, Auxinas, Compuestos Orgánicos Volátiles, Jitomate, *Metarhizium anisoplaie*, Maíz, *Trichoderma virens*, *Trichoderma atroviride*.

Abstract

***Trichoderma spp.* and *Metarhizium anisopliae* improve plant growth under contact and distance interacti**

Understand the interactions between plants and beneficial microorganisms are essential for the sustainable management of agriculture. In the present study, we examined the effects exerted by the mycoparasitic fungus *Trichoderma* and the entomopathogen *Metarhizium* on plant growth. In the first chapter, the effect exerted by *T. virens* and *T. atroviride* on *Arabidopsis thaliana* plant growth was evaluated. For this, physical and split interactions were carried out under *in vitro* conditions. Our data show that *Trichoderma spp.* promotes the growth and development of shoots and roots of *Arabidopsis*, particularly without physical contact. Also, we found that *Trichoderma* triggers an auxin-dependent response in *Arabidopsis*, which was revealed through the *DR5:uidA* reporter line and *rhd6* mutant of *Arabidopsis*. Volatile organic compounds identification revealed that during *Arabidopsis-Trichoderma* interaction without physical contact sesquiterpenes are mainly produced. During *Arabidopsis-Trichoderma* interaction without physical contact at low temperatures (12°C), we observed that *Trichoderma* mitigates the negative effect of cold stress on *Arabidopsis*. Furthermore, we found that *Trichoderma* induced the expression of a cold-related gene (*AtERD14*) in *Arabidopsis* under this stress condition. In the second chapter, under *in vitro* assays we evaluated the effect exerted by three *M. anisopliae* strains on *A. thaliana* plant growth through physical and split interactions. Our results revealed that three *Metarhizium* strains evaluated promote *Arabidopsis* growth, mainly during split interactions. Also, we found that *Metarhizium* increases the chlorophyll *a* content in *Arabidopsis* in both interaction conditions. The analysis of volatile organic compounds revealed that β -caryophyllene and *O*-cymene were emitted during *Arabidopsis-M. anisopliae* interactions. Finally, the co-cultivation of *M. anisopliae* with *Arabidopsis*, tomato, and maize plants grown in pots was assessed. We observed that the three *Metarhizium* strains increased the biomass of *Arabidopsis*, tomato, and maize plants. This study provides evidence of positive effect exerted by *Trichoderma spp.* and *M. anisopliae* on plant growth, as well as the potential of volatile organic compounds emitted by these fungi on plant growth.

KEYWORDS: *Arabidopsis thaliana*, auxins, tomato, *Trichoderma virens*, *Trichoderma atroviride*, *Metarhizium*, Maize, Volatile Organic Compounds.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Principios de las interacciones planta-microorganismo

Las plantas son organismos autótrofos, es decir que no necesitan una fuente de carbono orgánico para lograr su crecimiento, ya que por medio de la fotosíntesis sintetizan su propia materia orgánica a través del proceso de fotosíntesis. Mediante este proceso el CO₂ capturado de la atmósfera es utilizado para la producción de carbohidratos, generalmente almidón y/o sacarosa, en menor proporción azúcares como glucosa y fructosa (Heldt y Piechulla 2010). Una parte de estos servirá como base para la biosíntesis de aminoácidos, lípidos, ácidos orgánicos, así como de moléculas más complejas como proteínas y membranas, necesarios para el crecimiento y desarrollo de las plantas. El resto de estos productos sintetizados se almacenarán en tallos, hojas semillas y raíces en forma de reservas (Alberts *et al.*, 2002). Sin embargo, una fracción de los compuestos sintetizados a través de la fotosíntesis no serán utilizados directamente por la planta para su propio crecimiento, sino que serán transportados a las raíces y liberados en la rizósfera como rizodeposiciones (Nguyen 2003). Las rizodeposiciones están constituidas por compuestos de exudados de raíces que incluyen azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, hormonas, vitaminas, secreciones de mucílago células senescentes de la raíz y al final cuando la planta muere la raíz se puede considerar como parte de estas deposiciones (Nguyen 2003; Paterson *et al.*, 2007). El suelo alberga una infinita cantidad de especies de microorganismos los cuales son heterótrofos, es decir que necesitan una fuente de carbono orgánico para lograr su crecimiento. La liberación de compuestos ricos en carbono en la rizósfera es una fuente importante de nutrientes para estos microorganismos heterotróficos del suelo que los metabolizará y así encontrará la fuente de energía necesaria para su crecimiento. Se ha reportado en distintas especies de plantas que alrededor del 20% del carbono fijado durante el proceso de fotosíntesis es liberado al suelo a través de la rizodeposición (Hütsch *et al.*, 2002; Nguyen 2003); es decir, esta cantidad de

compuestos exudados no son utilizados por las plantas para su desarrollo, lo cual representa un gasto energético para la planta (Hütsch *et al.*, 2002; Nguyen 2003). En cambio, estos compuestos son utilizados por los microorganismos colonizadores de la rizósfera como fuente de energía. Si este proceso de rizodeposición representa un gasto energético para las plantas y aparentemente solo los microorganismos heterótrofos que colonizan la rizósfera se benefician, se abre la siguiente pregunta ¿cómo es que este proceso se ha mantenido durante la evolución de las plantas?; de hecho, no sucede así, sino que los compuestos liberados al suelo son parte de un intercambio trófico (Morgan *et al.*, 2005; Van Der Heijden *et al* 2008). Por su parte, los microorganismos del suelo participan en la descomposición dinámica de la materia orgánica, solubilizan minerales mediante la producción de ácidos orgánicos, además algunos producen fitohormonas o precursores de éstas que son necesarias para el crecimiento de las plantas (Jacoby *et al.*, 2017). De esta manera las plantas obtienen diversos beneficios de los microorganismos que dependen de la rizodeposición como fuente de energía; por lo tanto, existe un equilibrio entre el gasto energético y beneficios obtenidos. Sin embargo, este aparente equilibrio depende de factores ambientales, así como de las especies de microorganismos presentes en el suelo lo que determinará si la interacción será positiva, negativa o neutral (Da *et el.*, 2004).

Es así como, de manera imperceptible a simple vista, las asociaciones entre las plantas y los microorganismos se llevan a cabo en todos los nichos ecológicos, siendo las plantas los hospederos de grandes comunidades de microorganismos de todo tipo, como bacterias, hongos, nematodos y protistas. Estos microorganismos pueden encontrarse sobre la superficie de las plantas (epifitos) o colonizando tejidos internos de estas (endófitos) (Tadych *et al.*, 2009). Las plantas proveen tres nichos distintos para los microorganismos, los cuales son: la filósfera, la endosfera y la rizósfera. La filósfera corresponde al área foliar de las plantas, se considera relativamente pobre en nutrientes en comparación con la rizósfera; no obstante, esta alberga una gran cantidad de insectos y microorganismos (Turner *et al.*, 2013). Por otra parte, la endósfera

es considerada la parte interior de los tejidos de la planta (hojas, tallos y raíces). Se ha reportado que la endósfera solo es colonizada por microorganismos endófitos; sin embargo, algunos patógenos latentes pueden comportarse como endófitos y según las condiciones ambientales y/o el genotipo del hospedero pueden causar síntomas de enfermedad (Jamesand Olivares 1998). La rizósfera es el área del suelo inmediata a las raíces vivas de las plantas, en donde se llevan a cabo la mayoría de las interacciones planta-microorganismo debido a que en esta área las plantas liberan las rhizodeposiciones (Turner *et al.*, 2013). Si bien muchos de estos microorganismos encontrados en la rizósfera son patógenos, una proporción significativa de estos son capaces de promover el crecimiento y desarrollo de las plantas mediante distintos mecanismos tales como solubilización de fosfatos, fijación de nitrógeno, producción de fitohormonas, supresión de patógenos e inducción de la resistencia a diferentes tipos de estrés biótico y abiótico (Meena *et al.*, 2017). En este sentido, el microbioma del suelo es considerado un recurso biológico cada vez más valioso ya que dentro de estas comunidades se encuentran microorganismos considerados como benéficos ya que son capaces de mejorar el rendimiento en los cultivos de muchas especies de plantas de interés agronómico (Gopal y Gupta 2016).

1.2 Respuestas de las plantas ante la interacción con microorganismos

En la naturaleza las plantas están en contacto con una infinidad de microorganismos diferentes tanto benéficos como patógenos, por lo tanto, a través de su evolución las plantas han desarrollado la capacidad integrar las diferentes señales que perciben del entorno ante una posible infección o colonización por microorganismos (Gust *et al.*, 2012). Este proceso es mediado por dos vías; la primera es el reconocimiento de moléculas específicas conservadas en muchos microorganismos. Estas moléculas son conocidas como patrones moleculares asociados a microorganismos ó a patógenos PAMP o MAMP (Pathogen-associated molecular pattern or Microbe-Associated Molecular Patterns). Estas moléculas se encuentran altamente

conservadas tanto en microorganismos patógenos, benéficos y comensales. Las PAMP ó MAMP son reconocidas por proteínas receptoras de reconocimiento de patrones PRR (pattern recognition receptors), que se localizan en la superficie de las células vegetales. La percepción de estos elicitores generales desencadenan una amplia gama de reacciones, que culminan en la activación de la llamada resistencia basal o inmunidad activada por PAMP (PAMP-Triggered Immunity) PTI o MAMP (MAMP Triggered Immunity Microbial) MTI (Jones y Dangl, 2006; Nicaise *et al.*, 2009). La segunda línea de defensa esta mediada por el reconocimiento directo o indirecto de un efector dado a través de las proteínas de resistencia a enfermedades (proteínas R) que reconocen las DAMPs (patrones moleculares asociadas a peligro) (Mazzotta y Kemmerling, 2011), las cuales resultan en inmunidad activada por efectores ETI (effector-triggered immunity) (Jones y Dangl 2006). La respuesta ETI es generalmente una respuesta MTI acelerada y amplificada, que da como resultado una respuesta de defensa efectiva (resistencia) que en la mayoría de los casos conduce a una muerte celular localizada, conocida como respuesta hipersensible (HR). Ambas respuestas de defensa desencadenan cascadas de señalización que involucran MAP cinasas, factores de transcripción, microRNA (miRNA), especies reactivas de oxígeno (ROS), proteínas de choque térmico (HSPs), canales iónicos (Nejat y Mantri 2017), así como también algunas fitohormonas tales como el ácido jasmónico (JA), etileno (ET), ácido abscísico (ABA), ácido salicílico (SA), y en menor proporción citoquininas, brasinoesteroides y auxinas (Han y Kahmann 2019).

1.3 Microorganismos colonizadores de la rizósfera

La colonización de la rizósfera es el resultado de un complejo intercambio de señales entre las plantas y los microorganismos, las cuales determinan el tipo de relaciones que se serán establecidas, dando lugar a interacciones benéficas, neutrales o perjudiciales para las plantas. En este sentido los microorganismos que interactúan con las plantas pueden ser clasificados en tres grupos: patógenos, comensales y benéficos (Thrall *et al.*, 2007). Los

patógenos limitan severamente la producción de diversos cultivos de interés agronómico en todo el planeta. Los comensales o neutros por definición son aquellos que no dañan, pero tampoco aportan algún beneficio a las plantas; sin embargo, algunos estudios sugieren que las comunidades de estos son moldeadas por las plantas (Compant *et al.*, 2019). Por su parte, los microorganismos considerados como benéficos son aquellos que mediante diferentes mecanismos son capaces de ejercer un efecto positivo sobre el desarrollo de las plantas y se les conoce colectivamente como microorganismos promotores del crecimiento de plantas (PGPM por sus siglas en inglés). A su vez los PGPM se pueden clasificar en varios grupos: 1) microorganismos bioestimulantes, los que producen fitohormonas o metabolitos precursores similares; 2) microorganismos biocontroladores o bioprotectores, los que son capaces de antagonizar los patógenos de las plantas; 3) microorganismos solubilizadores, son capaces de movilizar o solubilizar nutrientes minerales como el fósforo que no está químicamente disponible para las plantas o fijar nitrógeno atmosférico; y 4) los microorganismos bioelicitors, que son capaces de activar los sistemas de defensa de la planta (Rajput *et al.*, 2019). Además, existen microorganismos entomopatógenos, los cuales actúan como bioinsecticidas capaces de biocontrolar a los insectos que se alimentan de hojas y raíces (Kupferschmied *et al.* 2013; Mantzoukas y Eliopoulos 2020). Sin embargo, existe evidencia que un mismo microorganismo puede exhibir varios de estos rasgos simultáneamente (bioestimulantes, biocontrol, solubilizadores y bioelicitors) (Woo and Pepe *et al.*, 2018).

1.3.1 Microorganismos endófitos

Dentro de las comunidades de microorganismos considerados como benéficos se encuentran los endófitos, los cuales son capaces de establecer relaciones simbióticas con las plantas. Se consideran endófitos a todos los organismos que están en interacción con las plantas y que en alguna etapa de su ciclo de vida pueden colonizar tejidos vegetales internos sin causar daño aparente a su huésped. (Petrini 1991). Los microorganismos endófitos se encuentran

ampliamente distribuidos en todos los ecosistemas y la manera de cómo llegan a colonizar las plantas es a través de dos vías; transferencia vertical y horizontal. En la transferencia vertical se da cuando las plantas ya colonizadas por el endófito generan semilla, y los endófitos presentes en la semilla se transfieren a la siguiente generación, lo que permite la transmisión los microorganismos endófitos entre la planta huésped y la descendencia (Hodgson *et al.*, 2014). La vía horizontal de transferencia de los endófitos es a través de esporas y/o fragmentación de hifas en el caso de hongos, también por agentes de dispersión bióticos (insectos) o abióticos (viento y lluvia) de una planta a otra, logrando así la transmisión de endófitos entre diferentes especies plantas (Frank *et al.*, 2017; Yan *et al.*, 2019). La asociación planta-endófito no sucede de manera aleatoria, si no que se rige por muchos factores tales como la especie vegetal, tipo de suelo, temperatura, comunidades de microorganismos que compiten por colonizar la rizósfera entre otros (Toju *et al.*, 2013; Bonito *et al.* 2014; Lê Van *et al.*, 2017). En este sentido, se ha descrito que los microorganismos endófitos estimulan el desarrollo de las plantas huéspedes a través de la producción de fitohormonas, además promueven la absorción de nutrientes mediante la modificación del sistema radicular, protegen a las plantas en contra de fitopatógenos activando el sistema de defensa de las plantas, así como la producción de compuestos antimicrobianos (Nair y Padmavathy 2014; White *et al.*, 2019).

1.4 Mecanismos de acción en plantas de los microorganismos promotores del crecimiento

La promoción del crecimiento de las plantas mediado PGPM puede atribuirse a efectos directos o indirectos. La promoción directa del crecimiento puede ser mediada por una mejor adquisición de nutrientes como la fijación de nitrógeno (N) por los microorganismos denominados "diazotrofos", así como la liberación de fosforo orgánico e inorgánico por microorganismos solubilizadores de fosforo (PSMs). Los PSM utilizan varios mecanismos para hacer que el fósforo sea accesible y lo absorban. Estos incluyen acidificación del suelo, quelación,

mineralización y la producción de enzimas como fosfatasas y sintasas (Wuest *et al.*, 2009; Kalayu *et al.*, 2019). También, los PGPM son capaces de aumentar la disponibilidad de Fe mediante la producción de sideróforos (Neumann y Römheld 2007). Además de la movilización de nutrientes, los PGPM también pueden estimular directamente el crecimiento de las plantas mediante la producción de compuestos orgánicos volátiles (VOCs), y de fitohormonas tales como ácido indolacético (IAA), citoquininas y giberelinas; otros mecanismos que se han reportado es la producción de enzimas por ejemplo la ACC desaminasa que al inhibir la síntesis del etileno promueve el crecimiento de las raíces, y moléculas como las N-acyl-homoserina lactonas que activan el quórum sensing y también promueven el crecimiento vegetal (Contreras-Cornejo *et al.*, 2009 Zúñiga *et al.*, 2013; Glick 2014; Fincheira y Quiroz, 2018; Lubna *et al.*, 2018; Nieto-Jacobo *et al.*; 2018; Jaroszuik-Ścisiel *et al.*, 2019; Pazarlar *et al.*, 2020). La promoción indirecta del crecimiento en plantas por PGPM, incluyen los efectos de metabolitos secundarios como antibióticos que inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos en la rizósfera, además de ciertas moléculas como péptidos y proteínas que son producidas por estos microorganismos que funcionan como elicitores que inducen el sistema de defensa adquirida y la resistencia sistémica inducida ante diferentes tipos de estrés biótico y abiótico (Sriram *et al.*, 2009; Kumar y Verma 2018).

1.4 Mecanismos de acción de los hongos promotores del crecimiento vegetal

Los hongos promotores del crecimiento vegetal (Plant growth-promoting fungi PGPF) conocidos colectivamente como hongos benéficos, son un grupo filogenéticamente diverso de microorganismos que tienen la capacidad de detener el crecimiento de fitopatógenos, y/o tienen la capacidad de producir compuestos bioactivos que potencian el crecimiento de diversas especies vegetales (Beneduzi *et al.*, 2012; Hossain y Sultana 2020). El efecto de los hongos benéficos sobre las plantas puede variar según el huésped (genotipo de la planta), el estado fisiológico del huésped, la disponibilidad de nutrientes,

las condiciones ambientales y la interacción con el microbioma (Cheng *et al.*, 2019). Los hongos benéficos contribuyen en la protección de la planta huésped contra los diferentes tipos de estrés biótico y abiótico mediante tres mecanismos:

a) Directos: a través de enzimas y/o metabolitos secundarios producidos por los hongos benéficos como antibióticos los cuales tienen efectos en contra de otros hongos o microorganismos que compiten por la colonización de la rizósfera.

b) Indirectos: Se dan mediante el incremento o inducción de los mecanismos de defensa de la planta huésped.

c) Ecológicos: se llevan a cabo mediante la competencia por nicho ecológico, parasitismo y predación.

En este sentido estudios recientes han demostrado que muchas especies de hongos que solo se les había estudiado por llevar a cabo una función en específica, hoy se sabe que algunas especies son capaces de desempeñar más de un papel biológico. Un ejemplo de estos hongos son algunas especies del género *Trichoderma* las cuales son capaces de suprimir hongos patógenos, estimular el crecimiento y desarrollo vegetal, e incrementar la resistencia al estrés biótico y la tolerancia al estrés abiótico (Hermosa *et al.*, 2012; Brotman *et al.*, 2013). En este sentido, se han reportado significativos aumentos en el rendimiento de cultivos de interés comercial después de la inoculación con hongos del género *Trichoderma*, como *T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. harzianum*, *T. virens* y *T. viride*, y hongos micorrizicos arbusculares AMF (Arbuscular mycorrhizal fungi) (Bagyaraj y Ashwin 2017). Otras especies de hongos que también han sido ampliamente estudiados y utilizados como una alternativa amigable con el medio ambiente en el control de plagas agrícolas y vectores de enfermedades son los hongos entomopatógenos (Zhao *et al.*, 2016). Además de infectar insectos, estudios recientes han revelado que algunas especies de hongos entomopatógenos tales como *Beauveria bassiana*, *Lecanicillium* spp., *Purpureocillium lilacinum* y *Metarhizium* spp. tienen la capacidad de colonizar las raíces de diferentes especies de plantas como

endófitos, también actúan como antagonistas de microorganismos patógenos, y promueven el crecimiento vegetal (Greenfield et al. 2016; Ownley et al. 2010; López y Sword 2015; Sasan y Bidochka 2012). Debido a la multifuncionalidad que han presentado algunos de los hongos benéficos en la agricultura se han desarrollado diferentes formulaciones que se comercializan principalmente como productos bioestimulantes y de biocontrol (Du 2015).

1.6 Metabolitos secundarios producidos por hongos promotores del crecimiento vegetal y su efecto en plantas

Los hongos producen una gran cantidad de compuestos que no están involucrados directamente en su crecimiento, desarrollo o reproducción, a estos compuestos se le conoce como metabolitos secundarios. Dichos compuestos les permiten colonizar con éxito un nicho ecológico al conferir la capacidad de competir por nutrientes, disuadir a los depredadores y comunicarse con otros organismos en el medio ambiente (Gershenson y Dudareva 2007). Los metabolitos secundarios producidos por hongos pueden ser clasificados en cuatro grupos principales: policétidos, terpenoides, compuestos derivados del ácido shikimico y péptidos no ribosomales (Pusztahelyi *et al.*, 2015). Además, los hongos son capaces de producir metabolitos híbridos tales como los meroterpenoides, los cuales son fusiones entre terpenos y policétidos (Geris y Simpson 2009). Dependiendo del tipo de compuesto y de la cantidad pueden generar diferentes efectos sobre otros organismos, por ejemplo, algunos policétidos producidos por especies de *Trichoderma*, *Bacillus*, *Aspergillus* y *Penicillium* tienen efecto de antibiósisis sobre otros organismos como bacterias, nematodos y hongos (Jakubczyk y Dussart 2020). Hongos pertenecientes al filum Ascomycota y Basidiomycota son productores prolíficos de compuestos terpenoides estructuralmente diversos. Las clases de terpenoides identificados en hongos incluyen sesqui-di- y triterpenos (Quin *et al.*, 2014). Por otra parte, los compuestos derivados del ácido shikimico producidos por hongos son los aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina, triptófano, indoles, derivados de indoles, alcaloides, y otros metabolitos aromáticos. En este sentido se he

reportado que algunos de estos compuestos, tales como índoles, triptofano y algunos compuestos aromáticos, promueven el crecimiento de plantas (Sattar *et al.*, 1987; Contreras-Cornejo *et al.*, 2009; Zou y Yu 2010; Liao *et al.*, 2017). Por otra parte, los péptidos no ribosomales que están formados por un rango de 2 a 20 residuos de aminoácidos son una clase de metabolitos secundarios producidos por bacterias y hongos con una gran diversidad estructural. La biosíntesis es catalizada por enzimas llamadas no ribosomal péptido sintasas (NRPSs). Estas enzimas pueden producir diferentes variantes de un péptido el cual puede tener la misma estructura, pero con monómeros diferentes en determinadas posiciones lo que puede dar lugar a una actividad biológica diferente (Caboche *et al.*, 2007). La mayoría de los peptaiboles han sido identificados y aislados en hongos. En particular el género *Trichoderma* produce una gran cantidad de peptaiboles, los cuales se pueden clasificar en tres clases de acuerdo su longitud en las secuencias de aminoácidos las cuales son: peptaiboles de secuencia larga 18-20 residuos de aminoácidos, peptaiboles de secuencia corta con 11-16 residuos y lipopeptaiboles con 6 a 10 residuos (Daniel y Rodrigues 2007). Los peptaiboles son compuestos anfipáticos lo que les permite formar canales iónicos dependientes del voltaje en las membranas lipídicas (Chugh y Wallace, 2001), lo cual podría ser la base para sus diferentes actividades biológicas tales como antimicrobianos, antitumorales, así como la capacidad de inducir la defensa de la planta (Szekeres *et al.*, 2005; Leitgeb *et al.*, 2007; Kredics *et al.*, 2013). Uno de los peptaiboles más estudiados es la Alameticina producida por algunas especies de *Trichoderma*, y se ha demostrado que es capaz de estimular el sistema de defensa de las plantas (Kredics *et al.*, 2013); sin embargo, puede llegar a ser tóxico para las células vegetales a concentraciones elevadas (Rippa *et al.*, 2010). Otro ejemplo de un peptaibol con actividad sobre plantas es la Trichokonin VI (TK VI) producido por *T. longibrachiatum*, el cual se ha reportado que inhibe el crecimiento de la raíz principal al suprimir la división y el alargamiento celular esto debido a una interrupción en los gradientes de auxinas en las puntas de las raíces principales (Shi *et al.*, 2016). Otra clase de

compuestos producidos por hongos son los meroterpenoides, los cuales son un grupo extenso de metabolitos secundarios de origen biosintético mixto policetidos-terpenoides (Matsuda y Abe 2016). Los meroterpenoides están ampliamente distribuidos en la naturaleza, éstos han sido aislados de plantas terrestres, invertebrados marinos y microorganismos como hongos y bacterias (Matsuda y Abe 2016). Los hongos son los productores más prolíficos de meroterpenoides, estos compuestos tienen una enorme diversidad estructural, que surge de modificaciones sucesivas tales como alquilación, condensación, oxidación y reducción confiriéndoles una amplia gama de actividades biológicas y farmacológicas (Geris y Simpson 2009; Matsuda and y 2016). Muchos de los metabolitos secundarios producidos por los hongos durante la interacción con plantas son compuestos volátiles orgánicos (Volatile Organic Compounds, VOCs). Diversos VOCs tienen la capacidad de promover el crecimiento y desarrollo de las plantas, así como de la activación de genes de la planta relacionados a la tolerancia frente a diferentes tipos de estrés biótico y abiótico (Jalali *et al.*, 2017; González-Pérez *et al.*, 2018).

1.7 Características del género *Trichoderma*

Trichoderma es un género de hongos que se reproducen sexual y asexualmente, y se encuentra comúnmente en el suelo y colonizando las raíces de las plantas de la mayoría de los ecosistemas. Las especies de *Trichoderma* son invasoras oportunistas, de rápido crecimiento y productores prolíficos de metabolitos secundarios con capacidad de inhibir o suprimir diferentes especies de microorganismos; estas propiedades hacen a *Trichoderma* una especie ecológicamente dominante (Harman *et al.*, 2004). Debido a la capacidad que presenta *Trichoderma* spp. de micoparasitar y suprimir diferentes hongos fitopatógenos, algunas especies de *Trichoderma* han sido utilizadas ampliamente en la agricultura como agentes de control biológico (Mukherjee *et al.*, 2013). *Trichoderma* es capaz de antagonizar microorganismos fitopatógenos indirectamente mediante antibiosis, competencia por espacio y nutrientes ó directamente mediante el

micoparasitismo (Sharma y Gothwal 2017). Además de actuar como agente de biocontrol, muchas especies de *Trichoderma* son capaces de colonizar externa e internamente las raíces de diferentes especies de plantas logrando establecer simbiosis (Mukherjee *et al.*, 2012). Algunas especies de *Trichoderma* han sido ampliamente estudiadas y caracterizadas, ya que tienen la capacidad de estimular el crecimiento e incrementar producción de plantas de interés agronómico mediante diferentes mecanismos. Estos mecanismos incluyen la solubilización de nutrientes mediante la producción de sideróforos, producción de fitohormonas o precursores de estas, así como la emisión de VOCs, lo que impacta en el incremento de la tasa de germinación, en la biomasa, así como en la tolerancia a diferentes tipos de estrés biótico y abiótico (Xiong y Zhu *et al.*, 2001; Contreras-Cornejo *et al.*, 2009; Delgado-Sánchez *et al.*, 2010; Sáenz-Mata y Jiménez-Bremont 2010; Salazar-Badillo *et al.*, 2015). Además, *Trichoderma* tiene la capacidad de suprimir una gran cantidad de microorganismos fitopatógenos mediante micoparasitismo y/o antibiosis (Harman 2006).

1.7.1 Establecimiento de la interacción *Trichoderma* con plantas

Las interacciones de *Trichoderma* spp. con varias especies vegetales han sido estudiadas desde diferentes enfoques tales como: agronómicos, medioambientales, fisiológicos, bioquímicos y moleculares. Los exudados radiculares son una fuente rica de carbono y de energía para la mayoría de los microorganismos que habitan la rizósfera. Para *Trichoderma* no es la excepción, por lo que a través de la evolución diferentes especies de este género han desarrollado la capacidad de colonizar las raíces de plantas logrando establecer una simbiosis. La colonización implica la capacidad de adherirse a las raíces y resistir los metabolitos tóxicos producidos por la planta en respuesta a la penetración (Harman y Shores 2007). En *Trichoderma* la resistencia a compuestos tóxicos se ha relacionado con el sistema de transportadores ABC, los cuales son un complejo sistema de bombas de membrana que participan en la detoxificación cuando micoparasita otros

hongos (Ruocco *et al.*, 2009). Estos sistemas de transportadores podrían estar funcionando también en el proceso de la colonización de las raíces de las plantas. Además, se ha reportado que *Trichoderma* tiene la capacidad de degradar rápidamente aleloquímicos como los ácidos fenólicos, que se acumulan en las plantas como respuesta a la colonización de las raíces (Chen *et al.*, 2011). Adicionalmente, *Trichoderma* tiene la capacidad de inhibir la producción de fitoalexinas (Masunaka *et al.*, 2011). La colonización de la raíz se ve favorecida debido a que el hongo produce compuestos tipo auxina que promueven el crecimiento de la raíz, aumentando así el área de superficie disponible de interacción con el hongo (Contreras-Cornejo *et al.*, 2009; Mukherjee *et al.*, 2012).

Una vez que *Trichoderma* se adhiere a las raíces forma estructuras tipo apresorios los cuales se enrollan alrededor de las raíces mediante las hidrofibrinas, las cuales son pequeñas moléculas hidrofóbicas que recubren las superficies celulares del hongo; también *Trichoderma spp.* secreta proteínas de tipo expansina con módulos de unión a celulosa y poligalacturonasa para facilitar la penetración de la raíz (Brotman *et al.*, 2008; Morán-Diez *et al.*, 2009). Se ha reportado que en un periodo de 72 horas después de la colonización de las raíces por *Trichoderma*, este ha penetrado las primeras capas de las células corticales y epidermales de la raíz, en respuesta la planta realiza un reforzamiento de las paredes celulares mediante la deposición de grandes cantidades de callosa (Chacón *et al.*, 2007). Estos depósitos de callosa impiden a *Trichoderma* la entrada a los haces vasculares remitiendo la colonización solo a las primeras capas de las raíces (Yedidia *et al.* 1999). Una vez dentro de las raíces, *Trichoderma* puede crecer intercelularmente donde el crecimiento se limita principalmente al apoplasto, la epidermis y las primeras capas de células corticales (Hermosa *et al.*, 2012). Aunque se ha reportado que ciertas especies de *Trichoderma* han sido aislados como endófitos, algunas de estas especies son: *Trichoderma martiale*, *Trichoderma hamatum*, *Trichoderma amazonicum* y *Trichoderma asperellum* (Hanada *et al.*, 2008; Bae *et al.*, 2009; Chaverri *et al.*, 2011; Rosmana *et al.*, 2018). Además, se ha reportado que *Trichoderma*

produce fitohormonas, lo cual facilitaría la colonización de las raíces (Mukherjee *et al.*, 2012). Mediante estudios transcripcionales, se ha observado que en las primeras horas de interacción de *Trichoderma* con la planta se lleva a cabo una disminución en la expresión de genes de defensa relacionados con las rutas de señalización de ácido salicílico (SA) y ácido jasmónico (JA) / etileno (ET), permitiéndole al hongo colonizar las raíces (Morán-Diez *et al.*, 2012). En este sentido, se ha reportado que la modulación de las rutas de señalización SA y JA/ET en *Arabidopsis* son influenciadas por los factores de transcripción WRKYs durante la exposición planta hongo. Sáenz-Mata y colaboradores (2014) reportaron que durante las primeras horas de la interacción *Arabidopsis-T. atroviride* se induce la expresión de factores de transcripción AtWRKY8, AtWRKY33, AtWRKY38, AtWRKY42 y AtWRKY60, los cuales se han reportado como reguladores positivos de la ruta de señalización del JA. En este mismo estudio se observó que los factores de transcripción AtWRKY70 y AtWRKY54, los cuales son marcadores de la señalización del SA, se inducen durante la interacción tardía *Arabidopsis-Trichoderma* (Sáenz-Mata *et al.*, 2014). La señalización de las rutas hormonales esta finamente regulada en plantas durante la interacción con microorganismos, por ejemplo se ha reportado que plantas de *Arabidopsis* con mutación en el gen *ICS1* (*isocorismato sintasa*), el cual es clave para la síntesis de SA, son incapaces de formar depósitos de callosa en las paredes celulares de las raíces durante la interacción con *T. harzianum*; como consecuencia *Trichoderma* fue capaz de colonizar los haces vasculares de las plantas y llegar hasta el área foliar (Alonso-Ramírez *et al.*, 2014).

La interacción *Trichoderma*-planta es un proceso dinámico en el que, según la especie de *Trichoderma* utilizada, concentración del inóculo aplicado, tipo de especie vegetal, el estado de desarrollo de la planta, y el tiempo de la interacción se pueden traslapar las cascadas de señalización mediadas por las rutas de JA/ET y/o SA (Hermosa *et al.*, 2012; Sáenz-Mata *et al.*, 2014; Mendoza-Mendoza *et al.*, 2018). Además, el diálogo molecular entre la planta y

el hongo no se puede separar de las respuestas de la planta contra estrés abiótico, lo que conlleva a formar una red interconectada en que las fitohormonas como el ácido indol-acético, ácido abscísico y las giberelinas desempeñan también un papel importante durante la colonización (Pieterse *et al.*, 2009; Hermosa *et al.*, 2013).

1.7.2 Efecto de Trichoderma en plantas

Como se mencionó anteriormente, se ha reportado que especies del genero Trichoderma son capaces de estimular el crecimiento vegetal (Baker 1989; Kleifeld, y Chet 1992; Near *et al.*, 1994). Recientemente el efecto positivo de Trichoderma sobre la promoción del crecimiento en varias especies vegetales ha sido estudiado utilizando sistemas *in vitro*. Con base a estos estudios se han propuesto diversos mecanismos mediante los cuales Trichoderma es capaz de estimular el crecimiento vegetal, incluyendo la producción de fitohormonas, sideróforos, y compuestos orgánicos volátiles (VOCs) (Harman *et al.*, 2004; Vinale *et al.*, 2008; Hung *et al* 2013; Nieto-Jacobo *et al.*, 2017). La colonización de la raíz mediante un mecanismo dependiente de auxinas ha sido reportada por varios autores, se ha demostrado que especies de Trichoderma tienen la capacidad de producir fitohormonas, así como la capacidad de inducir la biosíntesis de estas en plantas durante la interacción (Björkman 2004; Contreras-Cornejo *et al.*, 2009; Nieto-Jacobo *et al.*, 2017). En interacciones *in vitro* de Trichoderma con la planta modelo *Arabidopsis thaliana* se ha reportado que el hongo modifica la arquitectura radicular inhibiendo la elongación de la raíz principal y generando un mayor número de raíces laterales en la planta; se ha propuesto que esto se debe a una redistribución de auxinas hacia las raíces laterales provocado por ciertos metabolitos secundarios como los peptaiboles secretados por el hongo, los cuales podrían acumularse en espacios reducidos como la placa de Petri provocando este fenómeno en las raíces (Shi *et al.*, 2016). También, se ha reportado que Trichoderma acidifica el medio del cultivo provocando la inhibición de la raíz principal y una redistribución de auxinas (Pelagio-Flores *et al*; 2017). Otro mecanismo mediante el cual Trichoderma

promueve el crecimiento de plantas es por medio de la producción de sideróforos, estos metabolitos hacen posible que ciertos minerales como el Fe^{+3} sean biodisponibles para las plantas (Vinale *et al.*, 2013). El crecimiento de plantas mediado por VOCs producidos por *Trichoderma* también ha sido documentado recientemente, estos compuestos se abordarán en el siguiente apartado de este trabajo de tesis.

Por otra parte, ha sido documentado que la colonización de raíces por ciertas cepas de *Trichoderma* incrementa la resistencia a diferentes tipos de patógenos en diversas especies de plantas (Yedidia *et al.*, 2003; Harman *et al.*, 2004; Chacón *et al.*, 2007; Yuan *et al.*, 2019). Se ha reportado que la colonización de *Trichoderma* confiere un “priming” a la planta mediante la activación del sistema de defensa inducido (ISR) y la resistencia sistémica adquirida (SAR), las cuales son activadas por MAMPs, por proteínas con actividad no enzimática como Sm1, y el peptaibols18 mer (Hanson and Howell, 2004; Djonović *et al.*, 2007; Viterbo *et al.*, 2007). Asimismo, se ha reportado que las vías de señalización del ácido jasmónico, salicílico y etileno son activadas por *Trichoderma*, las cuales están asociadas a la resistencia sistémica en plantas (Lorito *et al.*, 2010; Bae *et al.*, 2011; Hermosa *et al.*, 2012).

Por otra parte, se ha reportado que *Trichoderma* induce tolerancia contra diferentes tipos de estrés abiótico. En este sentido se ha reportado que plantas en co-cultivo con *T. harzianum* bajo estrés salino incrementaron el contenido de prolina, así como fenoles y flavonoides, además de un incremento en el contenido de clorofilas (Mona *et al.*, 2017). En otro estudio donde se evaluó el efecto ejercido por la cepa T6 de *T. longibrachiatum* durante el co-cultivo con plantas de trigo sometidas a estrés salino, se encontró que las plantas inoculadas con el hongo aumentaron biomasa, el contenido de clorofila y prolina. Además, los autores reportaron que *T. longibrachiatum* activa el sistema antioxidante bajo estrés salino, ya que el contenido de malondialdehído disminuyó considerablemente y la actividad de las enzimas antioxidantes como

la superóxido dismutasa (SOD), la peroxidasa (POD) y la catalasa (CAT) incrementaron notablemente en comparación con plantas no inoculadas con la cepa T6 (Zhang *et al.*, 2016). El incremento en la tolerancia al estrés por frío mediado por *Trichoderma* también ha sido reportado. Plantas de tomate inoculadas con la cepa AK20G de *T. harzianum* desarrollaron una mayor eficiencia fotosintética además un aumento en el contenido de prolina, mientras que la tasa de peroxidación de lípidos y la fuga de electrolitos disminuyó bajo estrés por frío a (8 °C) (Ghorbanpour *et al.*, 2018). También, se ha reportado que *Trichoderma* mitiga el estrés causado por metales pesados y metaloides como aluminio, arsenico y cobre, y en plantas, en donde se atribuye que *Trichoderma* impacta incrementando la biomasa radicular, mejorando la disponibilidad de nutrientes, e induciendo la hiper-acumulación de metales en los tejidos vegetales y la actividad de enzimas antioxidantes (Revisado por Tripathi *et al.*, 2013).

1.7.3 Compuestos orgánicos volátiles (VOCs) producidos por *Trichoderma*

Las especies de *Trichoderma* son prolíficas productoras de una gran cantidad de metabolitos de los cuales algunos tienen importancia biotecnológica (Mathivanan *et al.*, 2008; Mukherjee *et al.*, 2012). Entre los metabolitos secundarios producidos por *Trichoderma* están los compuestos orgánicos volátiles (VOCs); los cuales son compuestos de bajo peso molecular con una presión de vapor lo suficientemente alta como para vaporizarse y entrar en fase gaseosa a temperaturas y presiones atmosféricas normales (> 0,01 kPa) (Insam y Seewald 2010). La propiedad de difusión los VOCs en el aire, en líquidos y en suelos porosos permite que los VOCs producidos por *Trichoderma* jueguen un papel importante en la comunicación química entre organismos, tanto a corta como a larga distancia (Schulz-Bohm *et al.*, 2017). Se ha reportado que, cuando plantas, bacterias, e incluso otros hongos son expuestos a las mezclas de VOCs producidos por *Trichoderma* presentan diferentes respuestas, como la estimulación o inhibición del crecimiento

(Schmidt *et al.*, 2015; Ditengou *et al.*, 2015; de Boer *et al.*, 2019. Guo *et al.*, 2019). En este sentido, se ha reportado el potencial de los VOCs emitidos por *Trichoderma* como agentes de control biológico en la protección de las plantas contra bacterias y hongos fitopatógenos (Kanchiswamy *et al.*, 2015; Schalchli *et al.*, 2016). Por ejemplo *T. harzianum* que ha sido ampliamente utilizado en la agricultura como agente de biocontrol produce una gran cantidad de VOCs (Siddiquee *et al.*, 2012). Dentro de estos compuestos identificados se encuentran pironas, las cuales se ha reportado que suprimen el crecimiento del hongo fitopatógeno *Gaeumannomyces graminis* (Ghisalberti *et al.*, 1990). Además, se ha descrito que VOCs producidos por *T. harzianum* inhiben el crecimiento *Aspergillus flavus*, y se ha propuesto como una alternativa de control biológico para evitar la acumulación de aflatoxinas durante el almacenamiento de granos de maíz (Agüero *et al.*, 2008). También, se ha estudiado el efecto fungicida de VOCs identificados en otras especies de *Trichoderma*, por ejemplo 2-propanona, 2- methyl-1-butanol, y heptanal producidos por *T. viride* inhiben el desarrollo de hongos degradadores de la madera (Humphris *et al.*, 2001).

1.7.4 Compuestos orgánicos volátiles producidos durante la interacción de *Trichoderma*-planta

Se ha demostrado que las plantas responden activamente a los VOCs emitidos por *Trichoderma*, y estas respuestas han despertado el interés en las áreas de ecología y agronomía, debido a que se ha reportado que ciertos VOCs producidos por especies de *Trichoderma* mejoran el crecimiento de las plantas y las protegen contra el estrés biótico y abiótico (Jalali *et al.*, 2017). La mayor parte de estas investigaciones se ha realizado en sistemas *in vitro* utilizando la planta modelo *A. thaliana* para investigar el efecto que ejercen los volátiles producidos por *Trichoderma*. El efecto de VOCs identificados en *Trichoderma* sobre plantas fue reportado inicialmente aplicando los compuestos de manera exógena en los cuales se observó que estos compuestos eran capaces de modular algunos procesos fisiológicos. En este sentido, uno de los primeros

VOCs identificados en *T. atroviride* fue el 6-pentyl-2H-pyran-2-one (6-PP) (Collins y Halim, 1972). El uso principal de este compuesto fue en la industria alimentaria como aditivo debido a su característico olor a coco. El primer reporte de los efectos del 6PP en plantas fue realizado en 1986 por Cutler y colaboradores. Este se probó aplicándolo exógenamente en coleóptilos etiolados de trigo. Los autores reportaron que 6-PP inhibió totalmente el crecimiento de los coleóptilos (Cutler *et al.*, 1986). En un estudio posterior se reportó que el 6PP aplicado de manera exógena fue capaz de incrementar la biomasa y modificar la arquitectura radicular en plantas de tomate, así como incrementar la resistencia contra patógenos, los autores reportan que el efecto fue dependiente de la concentración de 6PP suministrada (Vinale *et al.*, 2008). Respecto a este mismo compuesto, en un estudio reciente se observó que la aplicación de bajas concentraciones de 6PP a plántulas *A. thaliana* promueven el crecimiento de las plantas y altera la arquitectura de las raíces, inhibiendo el crecimiento de las raíces primarias e induciendo la formación de raíces laterales (Garnica-Vergara *et al.*, 2016). Respecto a este mismo compuesto (6PP) se reportó que durante la interacción de *T. asperellum* IsmT5 (una cepa egipcia) con *A. thaliana* sin contacto físico se identificó al 6PP como predominante, observando una inhibición del crecimiento de las plantas (Kottb *et al.*, 2015).

En este sentido se ha reportado que otros VOCs emitidos por Trichoderma además del 6PP tienen un efecto sobre el desarrollo de plantas. Lee y colaboradores (2019) reportaron el efecto que ejercen 26 estándares de VOCs identificados en Trichoderma sobre el crecimiento de plantas. Estos 26 compuestos fueron probados individualmente aplicándolos de manera exógena en Arabidopsis. Como resultado se reportó que solo 8 de los 26 compuestos probados promovieron el crecimiento e incrementaron el contenido de clorofila en Arabidopsis; estos compuestos fueron 2-methyl-1-propanol, 2-methyl-1-butanol, 3-methyl-1-butanol, 2-heptanone, ácido octanoico, limoneno, 1-decano y 2-heptylfuran (Lee, *et al.*, 2019).

Además, se han identificado los perfiles de VOCs emitidos durante la interacción de algunas especies de *Trichoderma* con plantas sin contacto físico. Durante la interacción *Arabidopsis-T. virens* sin contacto físico fueron identificados 51 compuestos diferentes. Las plantas expuestas a estos VOCs acumularon una mayor biomasa, generaron más raíces laterales, acumularon una mayor cantidad de clorofila y florecieron antes con respecto a las plantas sin interacción. También, se reportó que entre los 51 compuestos identificados el alcohol isobutílico, alcohol isopentílico y el 3-metilbutanal fueron los compuestos más abundantes (Hung *et al.*, 2013). En otro estudio Lee y colaboradores (2016) realizaron la identificación de los VOCs producidos por 20 cepas de *Trichoderma* pertenecientes a 11 especies durante la interacción con *A. thaliana*. En este análisis se identificaron 147 diferentes VOCs donde la mayoría de estos fueron sesquiterpenos, diterpenos y tetraterpenos. En ese estudio se reportó que las respuestas mediadas por volátiles de *Trichoderma* en *Arabidopsis* fueron específicas de la cepa y la especie (Lee *et al.*, 2016). Otro estudio reportó que plantas de *Arabidopsis* expuestas a interacción sin contacto físico a cuatro cepas de *Trichoderma* pertenecientes a tres especies diferentes (*T. virens*, *T. atroviride*, *T. “atroviride B”* LU132 y *T. asperellum*) tuvieron mayor biomasa, raíces laterales y clorofila. El análisis realizado por los autores reveló que los perfiles de VOCs varían dependiendo de cada especie, donde *T. virens* fue la especie que más VOCs emitió siendo la mayoría de estos sesquiterpenos (Nieto-Jacobo *et al.*, 2017).

Adicionalmente, se ha reportado que los VOCs producidos por *Trichoderma* tienen la capacidad de incrementar la tolerancia a estrés abiótico en plantas. Jalali y colaboradores (2017) evaluaron individualmente el efecto de los VOCs producidas por 13 especies de *Trichoderma* (*T. orientalis*, *T. asperellum*, *T. atroviride* 1, *T. atroviride* 2, *T. brevicompactum*, *T. citrinoviride*, *T. cressum*, *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. koningiopsis*, *T. longibrachiatum*, *T. viride*, *T. viridescens*) en interacción con *A. thaliana* bajo estrés salino. Se reportó que

las mezclas de volátiles producidas por nueve de las cepas evaluadas (*T. orientalis*, *T. atroviride*, *T. citrinoviride*, *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. koningiopsis*, *T. longibrachiatum*, *T. viride*, *T. viridescens*) promueven la ganancia de biomasa y contenido de clorofila en plantas sin estrés. En cambio, cuando la interacción se realizó bajo la presencia de sal solo tres de esas cepas promovieron la ganancia de biomasa en *Arabidopsis* (*T. orientalis*, *T. koningii* y *T. viridescens*). Además, en ese mismo trabajo se reportó que plantas en presencia de sal expuestas a los VOCs producidos por *T. koningii* producen menos peróxido de hidrogeno (H_2O_2) (Jalali, *et al.*, 2017). La resistencia al estrés biótico mediada por VOCs producidos por *Trichoderma* durante la interacción con plantas también ha sido reportada en plantas de interés agronómico. Por ejemplo, VOCs producidos por *T. asperellum* T1 inhibieron el crecimiento de los hongos fitopatógenos *Corynespora cassiicola* y *Curvularia aeria* en plantas de lechuga infectadas; además las plantas expuestas a los VOCs de *T. asperellum* T1 aumentaron la actividad de las enzimas degradadoras de quitinasa y β -1,3-glucanasa (Wonglom *et al.*, 2020).

1.8 El hongo entomopatógeno *Metarhizium* spp.

El género de ascomicetos *Metarhizium* (*Hypocreales: Clavicipitaceae*) se compone principalmente de especies entomopatógenas, que en su mayoría producen conidios verdes en los insectos que infectan, por lo cual se les conoce comúnmente como “muscardina verde” (Kepler *et al.*, 2014). Existe evidencia que *Metarhizium* spp. tiene la capacidad de infectar más de 200 especies de insectos y ácaros (Roberts *et al.*, 2004; Zimmermann *et al.*, 2007), por lo cual han sido utilizados ampliamente como agentes de control biológico en todo el mundo. Los procesos de infección son similares al de otros hongos patógenos de insectos, que incluyen adhesión, germinación, formación de apresorios, penetración, colonización de la hemolinfa y esporulación (Santi *et al.*, 2010; Ment *et al.*, 2010; Sanjaya *et al.* 2013; Aw y Hue 2017). *Metarhizium* ha sido considerado como un organismo saprófito con un ciclo dual de vida

tanto como habitante del suelo como patógeno de insectos (Roberts y Humber 1981). Sin embargo, en estudios recientes se ha demostrado que ciertas especies de *Metarhizium* desempeñan otras funciones en la naturaleza como colonizadores de la rizósfera, como endófitos y como agentes promotores del crecimiento vegetal (Wyrebek *et al.*, 2011; Liao *et al.*, 2014; Greenfield *et al.*, 2016; Jaber y Ownley 2018).

1.8.1 Interacción de *Metarhizium* spp. con la rizósfera

La aglomeración de hongos en la rizósfera es un fenómeno ampliamente estudiado ya que en esta área las plantas liberan una gran cantidad de compuestos ricos en carbono (Nguyen 2003). La interacción entre *Metarhizium* y las raíces de las plantas fue demostrada por Hu y St. Leger (2002). Para ello se utilizó la cepa de *M. anisopliae* AR8EF 1080 que sobre-expresa la proteína reportera GFP (Green Fluorescence Protein). Se encontró que *Metarhizium* no se distribuye aleatoriamente en el suelo, sino que presenta preferencias con la rizósfera, en la que fue más abundante en comparación a otras áreas circundantes de la rizósfera, lo que sugiere que *Metarhizium* además de parasitar insectos compete por las rhizodeposiciones liberadas por las plantas (Hu y Leger 2002). En este sentido, se ha reportado que cuando *Metarhizium* se encuentra colonizando la rizósfera presenta una mayor actividad de biocontrol (Bruck 2005).

Otro estudio que aporta evidencia de que *Metarhizium* tiene una estrecha relación con las plantas es el reportado por Fang y St. Leger (2010), en donde identificaron un transportador de oligosacáridos el MRT (*Metarhizium* Raffinose Transporter) que es indispensable para el crecimiento de estos hongos en sustratos cuya única fuente de carbono son oligosacáridos. Este transportador MRT solo se ha identificado en los hongos filamentosos de las familias de los Ascomicetos y Basidiomicetos. La mutación del gen MRT en *M. robertsii* no presentó cambios en la capacidad de infectar insectos, pero si en su capacidad de colonizar la rizósfera (Fang y St. Leger 2010).

Por otro lado, se ha reportado que *M. anisopliae* se adhiere a insectos y plantas usando dos proteínas relacionadas a la adhesión como MAD1 y MAD2, en donde MAD1 se expresa en la hemolinfa de insectos, mientras MAD2 en exudados de raíces de plantas (Wang y St. Leger, 2007). La mutante de MAD1 retrasa la germinación de esporas, reduce la formación de blastosporas y la virulencia contra insectos; mientras que la mutante de MAD2 impide la adhesión de *M. anisopliae* a la epidermis de las plantas, pero no esta afectada en la germinación de esporas, en la formación de blastosporas ni en la entomopatogenicidad (Wang y St. Leger, 2007). La función de MAD2 indica que *Metarhizium* ha logrado establecer relaciones estrechas con las plantas a través de la evolución. En este sentido, un estudio de transcriptómica comparativa, mostró que *Metarhizium* comparte >16% de identidad genética con hongos patógenos particularmente de plantas, lo que sugiere que *Metarhizium* ha evolucionado con la capacidad para establecer interacciones estrechas con plantas (Gao *et al.*, 2011).

1.8.2 Efecto de la inoculación de *Metarhizium* spp. en plantas

En la última década han sido publicados varios trabajos en los cuales se reportan la interacción de hongos entomopatógenos con plantas y el efecto que ejercen sobre estas. En particular se ha reportado que especies pertenecientes al género *Metarhizium* son capaces de colonizar la rizósfera de varias especies vegetales, incluso algunas de estas especies han sido aisladas como endófitas de plantas (Sasan y Bidochka 2012; Jaber y Enkerli 2016). El efecto sobre el crecimiento vegetal a partir de la inoculación de cepas de *Metarhizium* también ha sido reportado recientemente en varias especies vegetales de interés agronómico tales como maíz, tomate, algodón, haba, frijol y yuca (Kabaluk y Ericsson 2007; Elena *et al.*, 2011; Akutse *et al.*, 2013; Lopez *et al.*, 2015; Greenfield *et al.*, 2016). Los mecanismos mediante los cuales *Metarhizium* promueve el crecimiento vegetal se desconocen casi por completo. Sin embargo, se ha reportado que *Metarhizium robertsii* es capaz de producir ácido

indol-3-acético (IAA). Utilizando la línea reportera para auxinas *BA::GUS* y la línea mutante *rhd6* de *Arabidopsis*, Liao y colaboradores (2017) proponen que *M. robertsii* promueve el crecimiento en *A. thaliana* mediante un mecanismo dependiente de auxinas.

También, ha sido reportado que *Metarhizium* spp. es capaz de mitigar algunos tipos de estrés abiótico en plantas. En este sentido, plantas de soya sometidas a estrés salino que fueron co-cultivadas con la cepa LHLo7 de *M. anisopliae* mostraron una mayor tolerancia al estrés, lo cual se reflejó mediante la acumulación de biomasa, con el aumento del contenido de clorofilas, de prolina, de la superóxido dismutasa y de la tasa fotosintética en comparación con plantas no inoculadas (Khan *et al.*, 2012). La deficiencia de nutrientes es otro tipo de estrés abiótico que afecta a las plantas, respecto a este se ha reportado que *M. brunneum* tiene la capacidad de mitigar clorosis causada por deficiencia de hierro en plantas de altramuz, sorgo, trigo y girasol crecidas en suelos calcáreos (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2016).

1.9 *Arabidopsis thaliana* como modelo de estudio

Arabidopsis thaliana es una planta anual perteneciente a la familia de las mostazas (*Brassicáceas*). Genéticamente esta planta posee uno de los genomas más pequeños de plantas secuenciados hasta el momento, con alrededor de 125 Mb organizado en cinco cromosomas y un número aproximado de 29,454 genes. *Arabidopsis* tiene un ciclo de vida corto (aproximadamente de seis semanas), sus flores se autopolinizan naturalmente produciendo una gran cantidad de semillas (alrededor de 5000 por planta). El tamaño de estas plantas oscila entre 15-20 cm lo que es posible crecerlas en espacios reducidos. Debido a estas características *Arabidopsis* ha convertido en modelo para la investigación dentro en el área de biología molecular enfocada a plantas. Para esto, se han desarrollado diferentes técnicas por medio de las cuales es posible realizar en estas plantas mutagénesis insercional o química, métodos para realizar cruza y retrocruza, así como la inserción de ADN mediante transformación genética mediada por

Agrobacterium. Además, se han creado extensas colecciones de mutantes insercionales, así como de líneas sobreexpresantes de un gran número de genes. También, se han desarrollado bases de datos en las cuales es posible consultar información de genes, proteínas y su relación con el fenotipo tales como TAIR, BAR University of Toronto, entre otras (Meinke 1998; Koornneef y Meinke 2010; Holland y Jez 2018).

II. Justificación

La variabilidad en el clima derivada del calentamiento global, la sobre explotación de suelos y el uso indiscriminado de agroquímicos son los principales problemas que enfrenta la agricultura mundial, además del enorme reto de incrementar la producción agrícola para una población en crecimiento exponencial sin afectar los equilibrios ecológicos de los ecosistemas. Por lo que, es necesario implementar estrategias que permitan desarrollar una agricultura sustentable. Una posible forma de lograr la intensificación de la agricultura sin comprometer el equilibrio ecológico es la explotación del potencial biológico de microorganismos presentes en el suelo, los cuales a través de la evolución han desarrollado la capacidad de establecer asociaciones benéficas con plantas ayudándolas a resistir con mayor eficiencia diferentes tipos de estrés. En este sentido se ha demostrado que la utilización de estos microorganismos aumenta la productividad agrícola manteniendo la sostenibilidad, sustituyendo a los agroquímicos que dañan el medio ambiente. Los mecanismos mediante los cuales los microorganismos llegan a colonizar la rizósfera y establecer simbiosis con las plantas están lejos de ser esclarecidos. Con el fin de aportar evidencia sobre la interacción planta-microorganismo, en la presente tesis nos enfocamos a estudiar los efectos que ejercen los hongos micoparasíticos *Trichoderma atroviride* y *Trichoderma virens*, así como el entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* en el crecimiento de plantas mediante ensayos *in vitro* y en sustrato.

III. Objetivo general

Evaluar el efecto que ejercen *Trichoderma* spp. y *Metarhizium anisopliae* sobre la inducción del crecimiento de plantas mediante interacciones en contacto directo y a distancia.

Objetivos específicos:

- Evaluar el efecto ejercido por *T. atroviride* y *T. virens* sobre el crecimiento de *A. thaliana* durante la interacción a distancia cuando los hongos son crecidos en medio MS o PDA.
- Analizar la respuesta dependiente auxinas utilizando la línea reportera *DR5:uidA* y la mutante *rdh6* en *Arabidopsis* durante la interacción a distancia cuando *Trichoderma* spp. es crecido en medio MS y PDA.
- Identificar el perfil de Compuestos Orgánicos Volátiles producidos en la interacción *Arabidopsis*-*Trichoderma* a distancia cuando los hongos son crecidos en medio MS y PDA.
- Evaluar el efecto ejercido por *Trichoderma* sobre *Arabidopsis* durante la interacción en contacto físico y a distancia bajo estrés por frío.
- Evaluar el efecto ejercido por tres cepas de *M. anisopliae* sobre el crecimiento de *A. thaliana* mediante interacciones en contacto directo y a distancia.
- Evaluar el contenido de clorofilas en la interacción *Arabidopsis*-*Metarhizium* en contacto físico y a distancia.
- Identificar el perfil de Compuestos Orgánicos Volátiles producidos durante la interacción a distancia con las tres cepas de *M. anisopliae*.
- Evaluar la ganancia de biomasa en plantas de *Arabidopsis*, tomate y maíz crecidas en sustrato en co-cultivo con las tres cepas de *M. anisopliae*.

Capítulo 1

“La interacción Arabidopsis-Trichoderma revela que el medio en el cual son crecidos los hongos durante la interacción es un factor importante en la inducción del crecimiento en las plantas”

Previamente, en nuestro grupo de investigación se reportó que los hongos *T. virens* y *T. atroviride* potencian el desarrollo de plantas de Arabidopsis (Salazar-Badillo et al., 2015). Particularmente, se reportó que la promoción del crecimiento es mayor cuando la interacción se lleva a cabo sin contacto físico. En ese reporte, los hongos fueron crecidos en el mismo medio de crecimiento utilizado para plantas Murashige-Skoog (MS).

Como parte de este trabajo de doctorado se evaluó la interacción de *A. thaliana* con las cepas de *T. virens* y *T. atroviride* en contacto directo y separados utilizando un sistema dividido. El objetivo fue evaluar el efecto ejercido por las cepas de Trichoderma sobre Arabidopsis, cuando los hongos son crecidos en un medio rico en nutrientes como el medio papa dextrosa agar (PDA) comparado cuando el hongo es crecido en medio MS tanto en contacto directo como a distancia. Para ello, se evaluaron parámetros morfométricos como peso fresco, longitud de raíz principal y número de raíces laterales. Además, se evaluó la respuesta a auxinas mediada por las cepas de Trichoderma utilizando la línea reportera *DR5:uidA* y mutante *rdh6* en Arabidopsis. Estos experimentos revelaron que las cepas de Trichoderma cuando son crecidas en medio PDA tienen un mayor efecto sobre Arabidopsis lo cual se reflejó en mayor acumulación de biomasa y en la generación de un mayor número de raíces laterales; estos resultados correlacionaron con una mayor acumulación de auxinas, la cual fue revelada por la línea reportera *DR5:uidA* y el restablecimiento del fenotipo de la mutante *rdh6* de Arabidopsis. Además, identificamos los perfiles de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) emitidos por *T. atroviride* y *T. virens* crecidos en medio MS y PDA durante la interacción a distancia con Arabidopsis. Finalmente, se evaluó el efecto de estas dos

cepas de Trichoderma cuando Arabidopsis crece a baja temperatura. Estos datos nos permitieron la publicación del artículo “The Arabidopsis-Trichoderma interaction reveals that the fungal growth medium is an important factor in plant growth induction” <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34500-w> en la revista Scientific Reports. Este trabajo constituye el primer reporte sobre la identificación de los perfiles de VOCs emitidos por dos especies de Trichoderma en interacción con Arabidopsis cuando los hongos son crecidos en dos medios distintos.

Capítulo 2

El hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* potencia el crecimiento vegetal de *Arabidopsis*, tomate y maíz

Los sistemas de producción agrícolas actuales requieren de grandes cantidades de fertilizantes y productos químicos para el control de plagas y enfermedades, lo cual impacta negativamente los ecosistemas. Por lo tanto, es necesario el establecimiento de prácticas agrícolas más amigables con el medio ambiente. Una alternativa a estos problemas es el uso de microorganismos benéficos los cuales tienen la capacidad de promover el crecimiento de las plantas, suprimir patógenos e inducir una mayor tolerancia al estrés biótico y abiótico. En este sentido uno de los microorganismos que ha sido ampliamente utilizado en el control biológico de insectos son los hongos pertenecientes al género *Metarhizium*. Se ha reportado que especies del género *Metarhizium* son capaces de colonizar la rizósfera y colonizar las raíces de plantas como endófitos (Wyrebek *et al.*, 2011; Sasan y Bidochka 2012). También se ha reportado que la inoculación de *Metarhizium* modifica la arquitectura radicular y estimula la ganancia de biomasa en algunas especies de plantas de interés agronómico (Kabaluk y Ericsson 2007; Elena *et al.*, 2011; Akutse *et al.*, 2013; Lopez *et al.*, 2015; Greenfield *et al.*, 2016). Sin embargo, el efecto sobre el crecimiento vegetal ejercido por *Metarhizium* aún sigue siendo poco explorado. Es por ello que, como parte de esta tesis de doctorado se evaluó el efecto ejercido por tres cepas del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (Ma-20, Ma-25 y Ma-28) en el crecimiento de plantas. Para ello se realizaron interacciones *Arabidopsis*-*Metarhizium* en contacto directo y a distancia bajo condiciones *in vitro*. Al final de dicha interacción nuestro experimento reveló que las tres cepas de *Metarhizium* promueven el crecimiento de *Arabidopsis* en ambas condiciones de interacción. En particular observamos que durante la interacción sin contacto físico el efecto sobre el crecimiento fue mayor. También, evaluamos si el efecto de estas cepas de *Metarhizium* influyen en el

contenido de clorofila en Arabidopsis. Respecto al contenido de clorofilas encontramos que las plantas en interacción con las tres cepas de *Metarhizium* incrementan notablemente el contenido de clorofila *a*. Dado que encontramos que el efecto sobre el crecimiento en Arabidopsis fue mayor durante las interacciones a distancia en un siguiente experimento identificamos los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) que se producen durante esta interacción. El análisis de los perfiles de VOCs emitidos reveló que se producen relativamente pocos compuestos en comparación a los perfiles reportados en interacciones de otras especies de hongos con plantas por ejemplo especies del género *Trichoderma*. Finalmente, realizamos un ensayo para evaluar si el efecto sobre el crecimiento encontrado en Arabidopsis bajo condiciones *in vitro* podría replicarse cuando la interacción se lleva a cabo en sustrato. Para ello se evaluó el co-cultivo en macetas de estas tres cepas de *Metarhizium* en plantas de Arabidopsis, tomate y maíz. Nuestro experimento mostró que las tres cepas de *Metarhizium* promueven el crecimiento vegetal lo cual se reflejó una mayor ganancia de biomasa en las plantas de Arabidopsis, tomate y maíz inoculadas con las cepas *Metarhizium*. Con los datos obtenidos de los ensayos mencionados anteriormente está en revisión el siguiente manuscrito: **“The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* enhances plant growth of Arabidopsis, tomato and maize”** el cual ha sido sometido en la revista *Plant and Soil* para su publicación.

The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* enhances plant growth of Arabidopsis, tomato and maize

González-Pérez Enrique¹, Ortega-Amaro María Azucena¹, Bautista Elihú², Delgado-Sánchez Pablo³, and Jiménez-Bremont Juan Francisco^{1*}

¹Laboratorio de Biotecnología Molecular de Plantas, División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A. C., San Luis Potosí, SLP., México.

²CONACYT-Consorcio de Investigación, Innovación y Desarrollo para las Zonas Áridas (CIIDZA), Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A. C., San Luis Potosí, SLP., México.

³Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Soledad de Graciano Sánchez, SLP., México.

Correspondence and requests for materials should be addressed to J.F.J.-B. (email: jbremont@ipicyt.edu.mx).

ABSTRACT

Entomopathogenic fungi are used worldwide for the biocontrol of agricultural pests, and recently other beneficial properties have been reported such as their role as endophytes and plant growth promoters. Herein, the effect of the three *Metarhizium anisopliae* strains on the growth of *Arabidopsis thaliana* was evaluated *in vitro* under direct and split interactions. *Arabidopsis* fresh weight and total chlorophyll content were significantly increased 7-days post-inoculation with the three *Metarhizium* strains. The main root length was promoted by all fungal strains assessed in split interaction, whereas in direct contact it caused inhibition. Volatile organic compounds produced during the *Arabidopsis-Metarhizium* interaction were identified after 10dpi in a shared atmosphere in the split system. Terpenes such as β -caryophyllene, *O*-cymene and *P*-cymene were detected during the *Metarhizium-Arabidopsis* interaction. The promoting plant growth effect by *Metarhizium anisopliae* strains was also achieved in *Arabidopsis*, tomato and maize plants grown in soil. These results open promising perspectives for field production, with the advantages of insect biocontrol and plant growth promotion by this species of fungus.

Keywords: Entomopathogenic fungus; *Metarhizium anisopliae*; Plant growth promoter; Plant-fungus interaction; Volatile Organic Compounds.

1. INTRODUCTION

Global intensive use of fertilizers and pesticides for the agricultural activities in order to improve yield and to control pests is increasing (Aktar et al. 2009). Soil biodiversity is being severely affected by the excessive use of agrochemical agents (Mahmood et al. 2016). There is a need to develop new alternatives for crop production that decrease the use of pesticides, resulting in products that are safe for human consumption and mitigate adverse effects on the environment. An attractive alternative has been the use of beneficial microorganisms such as bacteria and fungi, when interacting with plants have the ability to enhance the germination rate and plant biomass, and also confer plant stress tolerance through the production of phytohormones, organic acids, proline, polyamines, and volatile organic compounds (VOCs), among others (Delgado-Sánchez et al. 2010; Ghosh et al., 2017; Ghosh et al., 2019; González-Pérez et al. 2018; Gravel et al. 2007; Kanchiswamy et al. 2015; Lee et al. 2015; Sen et al., 2018).

With the bacteria, fungi are the most common group of microorganisms present in soil (Ananyeva et al. 2006), and many species of them are able to establish beneficial interactions with plants (Guo and Narisawa 2018). In this sense, some species of entomopathogenic fungi such as *Beauveria bassiana*, *Lecanicillium* spp., *Purpureocillium lilacinum*, and *Metarhizium* spp. have complex relationships with plants acting as endophytes, antagonists against plant pathogenic microorganisms, rhizosphere colonizers and plant growth promoters (Greenfield et al. 2016; Lopez and Sword 2015; Ownley et al. 2010; Sasan and Bidochka 2012). *Metarhizium* species have been widely studied and used as a sustainable mycoinsecticide for the biological control of a wide range of insect pests (Meyling and Eilenberg 2007; Zimmermann 2007). It has been reported that some *Metarhizium* species not only participate in the control of insect pests, but they are also capable of colonizing the plant rhizosphere (Sasan and Bidochka 2012; Wyrebek et al. 2011). In switchgrass (*Panicum*

virgatum) and haricot beans (*Phaseolus vulgaris*) the root hair development and lateral root formation was stimulated by *M. robertsii* (Sasan and Bidochka 2012). Other studies have shown that plant interaction with *M. anisopliae* generates tolerance to salt stress in soybean, and *M. brunneum* improves nutrient deficiency in potato plants (Khan et al. 2012; Krell et al. 2018).

Hence, evaluating the inoculation of *Metarhizium anisopliae* in diverse plant species, and understanding how the fungus impacts plant growth is important as integral solution in agricultural programs. In the present study, the plant growth-promoting effect of three entomopathogenic *Metarhizium anisopliae* fungal strains was assessed. These *M. anisopliae* strains have been widely used as biocontrol control agents in crops (Villegas-Rodríguez et al. 2014). The *in vitro* assays were made with *Arabidopsis thaliana* plantlets in direct contact, and split interaction that avoids plant-fungal physical contact. *Arabidopsis* plantlets with *M. anisopliae* strains showed a significant increase in fresh weight and total chlorophyll content. Volatile organic compounds produced in *Arabidopsis*-*Metarhizium* interaction were identified. In addition, the *M. anisopliae* inoculations in crop plants such as tomato and maize achieved a greater fresh weight. It was found that these *M. anisopliae* strains could be effective agents for the use in the field crop production, both for plant growth promotion and as their already reported use as pest control.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Plant material and fungal strains

Seeds of *Arabidopsis thaliana* ecotype Col-0, commercial *Solanum lycopersicum* (var. Rio Grande®) and *Zea mays* (var. San Luis) were used for the experiments. Seeds sterilization protocol consisted of 5 min in 20% (v/v) chlorine solution and six washes in sterile distilled water. Agar plates containing 0.2x Murashige and Skoog (MS) medium (Phyto Technology Laboratories®) at pH 7.0, 0.5% (w/v) sucrose and 0.8% (w/v) agar, were used to germinate and

grow stratified seeds (4°C for two days). Afterwards, MS plates were incubated in a growth chamber with a photoperiod of 16 h of light ($120\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)/8 h of darkness, and a temperature of $22 \pm 1^\circ\text{C}$ for the time required in each experiment described below. Three *Metarhizium anisopliae* strains from Mexico were used in the experiments (Villegas-Rodríguez et al. 2014). Ma-20 and Ma-28 are commercial strains registered as METARSIL® (Biotecnología Agroindustrial, S.A. de C.V) and Meta-Bichs® (BIO-BICH DE MÉXICO, S.A. de C.V.), respectively. Ma-25 strain was obtained from the Laboratory of Beneficial Organisms Reproduction, which belongs to the Committee for Plant Health of Guanajuato, Mexico (CESAVEG). In soil assays, a strain of *Trichoderma virens* (GV29.8) was used as a reference, since this strain has been reported as a plant growth promoter agent. For inoculation assays, all fungal strains were grown on potato dextrose agar (PDA) medium (BD Difco™) at 28°C for 14 days. Total conidia were collected in sterile distilled water and quantified in a Neubauer chamber under 40x magnification under a Motic model BA-300 microscope.

2.2 *Metarhizium-Arabidopsis* interaction under direct and split system

The effect of *Metarhizium anisopliae* Ma-20, Ma-25, and Ma-28 strains on the growth of *Arabidopsis* was evaluated using two spore concentrations at 1×10^6 and 3×10^6 spores/ μL . For each treatment, five divided Petri dishes (9.0 x 1.5 cm) were used with 0.2x MS medium containing three *Arabidopsis* plants each one. Three conditions of interaction were evaluated: i) seedlings without inoculum as control, ii) seedlings inoculated directly at the bottom of the left side of the split plates (At-Ma), and iii) seedlings in split interaction, where the fungus growth on the right side of the split plates (At/Ma). The interaction experiments were incubated in a growth chamber with the photoperiod and temperature conditions previously described. Physiological parameters such as fresh weight of whole plantlets measured in five groups of three plantlets using an analytical scale ($n=5$), and main root length was quantified in 15 plantlets ($n=15$)

(measured using the IMAGE J software, <http://rsb.info.nih.gov>) were assessed on plants inoculated with 1×10^6 spores after 7-day post inoculation (dpi). Additionally, the fresh weight on plants inoculated with higher spore concentration (3×10^6 spores) was measured in five groups of three plantlets ($n=5$) at 10 dpi. All assays were repeated at least three times, and similar results were obtained.

2.3 Measurement of chlorophyll content

Total chlorophyll extraction was done by incubating the plantlets coming from the interactions mentioned above in 750 μL of *N,N*-dimethylformamide (DMF) for 24 h in the dark and under continuous agitation. Afterward, 100 μL supernatants were used for a spectrophotometric estimation of chlorophyll at 645 nm (chlorophyll *b*) and 663 nm (chlorophyll *a*). Chlorophyll *a*, *b* and total (*a* + *b*) were reported as $\mu\text{g/gFW}$, as calculated by Suzuki and Ishimaru (1990). Five biological replicates were analyzed ($n=5$), consisting of a pool of three plantlets per treatment. Experiments were repeated at least twice with similar results.

2.4. Trapping CO₂ assays

Trapping CO₂ assays were carried out using the plate-within-a-plate system in a similar way to that reported by Lee et al (2016). Arabidopsis seedlings of seven days old were transferred on split plates (9.0 x 1.5 cm) with 0.2x MS medium (three seedlings per petri dish). Next, plant interaction with the three strains of *M. anisopliae* (Ma-20, Ma-25 and Ma28) was performed. The condition evaluated were: i) seedlings without inoculum were used as a control, ii) seedlings inoculated directly at the bottom of the left side of the split plates (At-Ma), iii) seedlings in split interaction, where the fungus growth on the right side of the split plates (At/Ma), in a quintuplicate manner. After, the split Petri dishes were placed inside of larger sterile plates (15 x 2.0 cm) with a sterile cotton ball containing 3 ml of 0.1 M KOH, in such a way that CO₂ emitted by fungus can

come into contact with KOH, and after converted to K_2CO_3 . After, plates were placed under the same growth condition described above for a period of ten days. At the end of the exposure period, plantlets were photographed, and fresh weight of whole plantlets in five groups of three plantlets was measured using an analytical scale ($n=5$).

2.5 Inoculation of Arabidopsis, tomato and maize plants with *Metarhizium* and *Trichoderma* strains in soil

Experimental design for all plant species analyzed included five conditions: plants grown in pots inoculated with each *M. anisopliae* strain (Ma-20, Ma-25, Ma-28), or inoculated with *T. virens* strain (Tv-GV29.8), and control (non-inoculated plants). Assays were carried out in pots that were maintained in the growth chamber with controlled conditions (16 h light/8 h darkness, light intensity of $120 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ and temperature of $22 \pm 1^\circ\text{C}$), and irrigated every three days until the data were collected. Seven-days-old Arabidopsis and tomato seedlings were transplanted in soil pots (10 x 15 cm) containing a commercial substrate (Sunshine mix #3, vermiculite, and perlite, in 3:1:1 proportion). When Arabidopsis and tomato plantlets were 14 days-old, they were inoculated separately with 2.5×10^6 spores per mL of each strain (Ma-20, Ma-25, Ma-28, and Tv-GV29.8). The pots were photographed after 14 dpi, next plants were removed from the pots to obtain fresh weight of whole plants. Each treatment included 12 plants ($n=12$), one plant per pot. In the case of *Metarhizium*-maize interaction, seven-days-old maize sprouts were transplanted in soil pots (10 x 15 cm) containing a commercial substrate (Sunshine mix #3, vermiculite, and perlite, in 3:1:1 proportion). After, sprouts were inoculated separately with 2.5×10^6 spores of each fungal strain (Ma-20, Ma-25, Ma-28, and Tv-GV29.8). After 7 dpi pots were photographed, next plants were removed from the pots to obtain fresh weight of whole plants. Each treatment included 9 plants ($n=9$), one plant per pot. All experiments were repeated at least twice with similar results.

2.6 Collection and analysis of fungal-plant volatile organic compounds (VOCs)

To profile the VOCs emitted by three *Metarhizium anisopliae* Ma-20, Ma-25, and Ma-28 strains, a split interaction system with *Arabidopsis* was used, and the following conditions were analyzed: i) the background of VOCs produced by culture media (MS medium), ii) VOCs produced by un-inoculated *Arabidopsis* plantlets grown in MS, iii) VOCs produced by three *Metarhizium* strains in interaction with *A. thaliana*, and iv) VOCs produced only by three *Metarhizium* strains without interaction (split system). Before the addition of the MS medium, a small hole was made in each Petri dish (1.5 mm diameter) to allow the solid-phase microextraction (SPME) fiber entrance. In each condition four Petri plates ($n=4$) were analyzed. Three plantlets per plate of 7 day-old were placed on the side where the hole was made and were inoculated with 1×10^6 spores of *Metarhizium* strains. Then, the plates were carefully sealed with parafilm paper to prevent the loss of the VOCs and were incubated at 22°C for 10 days. VOCs analysis was performed according to Stoppacher et al. (2010) with some adjustments. An SPME fiber assembly polydimethylsiloxane/divinylbenzene 65 mm (Supelco Analytical Bellafonte, PA, USA) was utilized to extract the VOCs. A gas chromatograph GC-7890b (Agilent technologies, Santa Clara, CAL, USA) coupled to a mass spectrophotometer EM-5977A (Agilent Technologies, Santa Clara, CAL, USA) fitted with a HP-Innowax Polyethylene glycol phase capillary GC Column (30.0 m \times 0.320 mm i.d. \times 0.25 μ m, Agilent technologies, Santa Clara, CAL, USA) was used to identify the VOCs. The SPME fiber was introduced in the small hole of the Petri dishes and exposed for 1 h. After injection, the compounds were desorbed for 20 min in a splitless injector at 200°C. The oven temperature was held at 40°C for 10 min, then the temperature increased at the rate of 3°C per minute to reach 180°C, which was then held for 10 min. Helium was used as carrier gas at a constant flux of 1.5 mL/min. The compounds were identified by deconvolution using the W10N11

database (Wiley10Nist11) and based on the linear retention index values (Van den Dool 1963), which were calculated after analyzing C6 and C25 n-alkanes.

2.7 Statistical analysis

Data were analyzed by One-Way and Two-Way ANOVA through a multiple comparison Tukey's test at $P \leq 0.05$ in the GraphPad Prism version 5.0 software (GraphPad Software, San Diego, CAL, USA). Significant differences between means (\pm SE) were represented with different letters.

3. RESULTS

3.1 Growth and chlorophyll content of Arabidopsis during the *Metarhizium anisopliae* interactions

In order to evaluate the effect of *Metarhizium anisopliae* on Arabidopsis development, 7-day-old Col-0 seedlings were inoculated with three *M. anisopliae* strains (1×10^6 spores per each strain). The experiments were designed to determine whether the effect of plant growth promotion by *Metarhizium* strains (Ma-20, Ma-25, and Ma-28) is dependent on physical interaction between the plant and the fungus, or if *Metarhizium* strains are also able to promote plant growth under split interaction. Parameters at seven days post inoculation (dpi), such as fresh weight, principal root length, and chlorophyll content, were analyzed to evaluate the effect of *M. anisopliae* strains on Arabidopsis growth (Figure 1). The Arabidopsis-*Metarhizium* interaction resulted in the improvement of Arabidopsis growth, which was demonstrated by greater development of the aerial part and roots (Figure 1A). Increments in the Arabidopsis fresh weight were noticed when *Metarhizium* strains were grown in contact and split interactions; however, the highest increase of more than 2.3 times was achieved when the fungal strains were grown in split interaction in comparison to un-inoculated plantlets (Figure 1B). The interactions in direct

contact with all *M. anisopliae* strains caused inhibition of main root growth, whereas the split interactions generated longer roots than the un-inoculated control (Figure 1A-C). It has been reported that some beneficial microorganisms are able to increase the efficiency of photosynthesis and chlorophyll content in plants (Nieto-Jacobo et al. 2017; Zhang et al. 2008). We quantified the chlorophyll *a*, *b*, and total (*a* + *b*) levels in order to determine the effect of *Metarhizium* strains on the photosynthetic pigments in *Arabidopsis* plantlets (Figure 1D). We observed that chlorophyll *a* increased more than twice in plantlets co-cultivated in contact and in split systems compared to the uninoculated plantlets; whereas, the levels of chlorophyll *b* were lower in the interaction with the fungus (Figure 1D). As a result, the total chlorophyll (*a* + *b*) contents increased due to the interaction with the fungus, both in contact and in the split system (Figure 1D).

In order to determine if volatile-mediated plant growth effects are due to the CO₂ generated by the fungus, we carried out an experiment to capture CO₂ using KOH (Suppl. Fig. 1). Seven days-old *Arabidopsis* seedlings were co-cultivated with three *M. anisopliae* strains under physical and split interactions in presence of 0.1M KOH for 10 days. Trapping *Metarhizium*-derived CO₂ treatments did not suppress the detected volatile-induced plant growth in both interactions (contact and split), wherein we did not observe significant statistical differences between the fresh weight of plantlets treated with or without KOH under *Metarhizium* interaction (Suppl. Fig. 1).

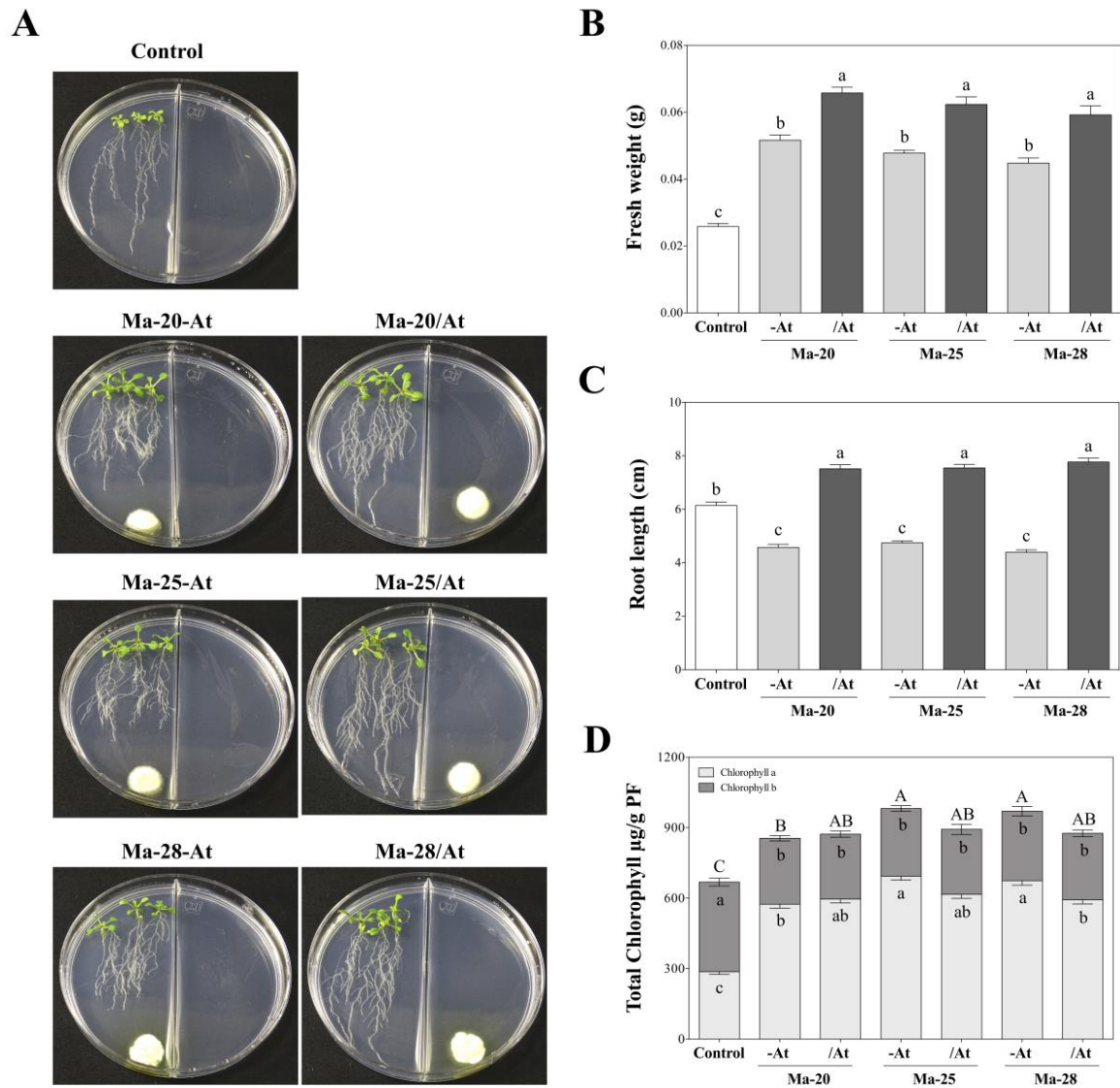


Figure 1

Figure 1. Influence of *M. anisopliae* inoculation on *Arabidopsis* growth using an *in vitro* system. (A) Representative images of the plant phenotypes in co-culture with *M. anisopliae* strains (Ma-20, Ma-25, and Ma-28) for 7 days. Metarhizium strains were inoculated under direct interaction (At-Metarhizium) and split interaction (At/Metarhizium). (B) Fresh weight, (C) primary root length, (D) Chlorophylls *a*, *b* and total Chlorophyll content. Values shown represent of five groups of three plantlets. Primary root length was quantified for 15 plantlets. Values are means and bars indicate \pm SE ($n=15$). Different letters indicate significant difference ($P \leq 0.05$). Different letters indicate means that differ significantly ($P < 0.05$). In the chlorophyll graph the capital letters denote the significant differences of the total chlorophyll ($a + b$) content.

Finally, the effect of an increased amount of inoculum of Ma-20, Ma-25, and Ma-28 strains (3×10^6 spores) on the *Arabidopsis* fresh weight was assessed at 10 dpi (Suppl. Fig. 2). Similar results as in the experiment using 1×10^6 spores were obtained; the major effects on plant growth was also observed in the split system, with an increase of more than three times in *Arabidopsis* fresh weight in comparison to the control (Suppl. Fig. 2).

3.2 Identification of Volatile Organic Compounds (VOCs) produced in *Arabidopsis*-*Metarhizium* interactions

The VOCs generated from three *M. anisopliae* strains during the interaction with *Arabidopsis* were identified. Seven-day-old *Arabidopsis* plantlets were exposed to *M. anisopliae* Ma-20, Ma-25, and Ma-28 strains in an *in vitro* split system during 10 days. As controls, the VOCs secreted for 10 days were identified under the following conditions: culture medium (MS), un-inoculated *Arabidopsis* plantlets grown on MS, and *Metarhizium* strains grown on MS. The headspace VOCs were collected for 1h and analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). During *Arabidopsis*-*M. anisopliae* interaction, it was found that two *Metarhizium* strains (Ma-20 and Ma-25) only produced a sesquiterpene (SQT), β -caryophyllene. *Arabidopsis* plantlets with Ma-28 strain emitted mostly the monoterpene P-cymene (95.59 ± 1.02 %), and a low proportion of O-cymene (2.27 ± 1.02 %) and β -caryophyllene (2.13 ± 1.02 %) (Table 1).

Table1. Volatile organic compounds (VOCs) produced in *Metarhizium-Arabidopsis* interaction under split system

Ma-20/<i>A. thaliana</i>				
No.	Class	Compound	LRI	Normalized amount of volatile compound (%)
1	Sesquiterpene (C15)	β -caryophyllene	1604	24.10 \pm 19.99
Ma-25/ <i>A. thaliana</i>				
No.	Class	Compound	LRI	Normalized amount of volatile compound (%)
1	Sesquiterpene (C15)	β -Caryophyllene	1604	52.30 \pm 4.42
Ma-28/ <i>A. thaliana</i>				
No.	Class	Compound	LRI	Normalized amount of volatile compound (%)
1	Monoterpene (C10)	<i>O</i> -Cymene	1004	95.59 \pm 1.02
2	Monoterpene (C10)	<i>P</i> -Cymene	1286	2.27 \pm 1.02
3	Sesquiterpene (C15)	β -Caryophyllene	1604	2.13 \pm 1.02

Three terpenes and one alcohol were identified when the strains of the *M. anisopliae* grew without the plants (Table 2); among terpenes are β -caryophyllene and *o*-cymene that were also found during the *Arabidopsis-Metarhizium* interactions (Table 1). Particularly, Ma-20 strain emitted a higher amount of *o*-cymene, and in smaller amounts β -caryophyllene and another SQT, such as eremophyllene (Table 2). Ma-25 and Ma-28 strains also emitted β -caryophyllene and eremophyllene, and in smaller amounts 2-ethylhexanol (Table 2). In the case of MS medium, or *Arabidopsis* plantlets without fungal inoculation, the production of SQTs was not identified (data no shown).

Table2. Volatile organic compounds (VOCs) by *Metarhizium* strains growth in MS medium

Ma-20				
No.	Class	Compound	LRI	Normalized amount of volatile compound (%)
1	Monoterpene (C10)	O-Cymene	1004	56.14 ± 28.49
2	Sesquiterpene (C15)	β-caryophyllene	1604	24.10 ± 19.99
3	Sesquiterpene (C15)	Eremophyllene	1637	19.77 ± 9.46
Ma-25				
No.	Class	Compound	LRI	Normalized amount of volatile compound (%)
1	Alcohol	2-Ethylhexanol	1279	10.31 ± 1.78
2	Sesquiterpene (C15)	β-Caryophyllene	1604	52.30± 4.42
3	Sesquiterpene (C15)	Eremophyllene	1637	37.34± 2.68
Ma-28				
No.	Class	Compound	LRI	Normalized amount of volatile compound (%)
1	Alcohol	2-Ethylhexanol	1279	8.12 ±5.86
2	Sesquiterpene (C15)	β-Caryophyllene	1604	49.15 ±7.03
3	Sesquiterpene (C15)	Eremophyllene	1637	42.73 ± 7.03

3.3 Effect of *Metarhizium anisopliae* inoculation on Arabidopsis plants growth in soil

The Arabidopsis-*Metarhizium* interaction under *in vitro* assays showed that *M. anisopliae* strains enhance plant growth. Based on these results, the inoculation effect of these three *M. anisopliae* strains on Arabidopsis, tomato and maize plants was evaluated in pots. For this purpose, 14 days-old Arabidopsis plantlets grown in soil were inoculated with 2.5×10^6 spores of *M. anisopliae* strains for 14 days. In addition, *Trichoderma virens* GV29.8 was included in order to compare plant growth, since the effect of plant growth promotion by *T. virens* has been previously reported (González-Pérez et al. 2018). As shown in Figure 2, the three *Metarhizium* strains (Ma-20, Ma-25, and Ma-28) significantly

promoted *Arabidopsis* growth. After 14 dpi, *Arabidopsis* plants inoculated with *M. anisopliae* Ma-20 and Ma-28 strains reached double of the fresh weight, while the Ma-25 strain achieved 1.5 times more fresh weight than the uninoculated control plants (Figure 2C). It was observed that *Arabidopsis* plants in the interaction with *T. virens* achieved similar fresh weights to Ma-20 and Ma-28 strains (Figure 2C). Moreover, *Arabidopsis* plants inoculated with *M. anisopliae* or *T. virens* strains exhibited more robust and larger leaves, and a larger root area in comparison with non-inoculated plants (Figure 2A-B).

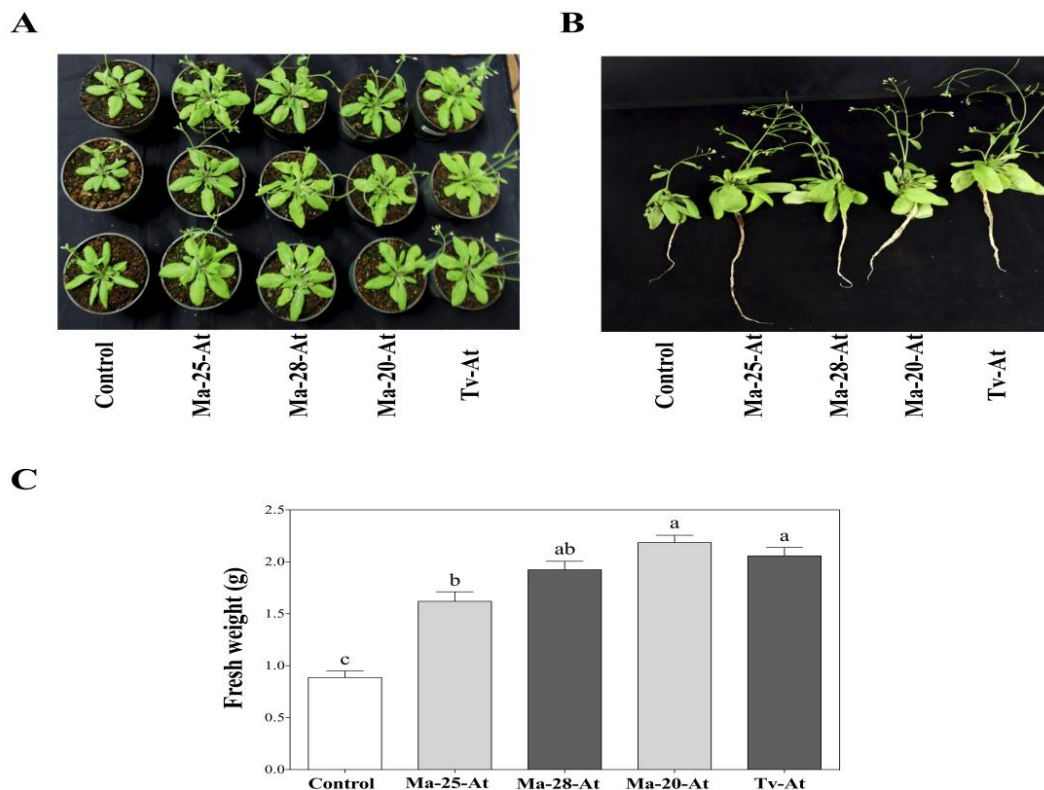


Figure 2

Figure 2. Effect of *M. anisopliae* and *T. virens* inoculation on the fresh weight of *Arabidopsis* plants grown in soil. (A-B) Representative photographs of the phenotype of *Arabidopsis* plants in co-culture with *M. anisopliae* strains (Ma-20, Ma-25, and Ma-28) or *T. virens* GV29.8 (Tv) after 14 dpi. **(C)** Fresh weight of *A. thaliana* plants after 14 dpi with *M. anisopliae* and *T. virens*. Values are means and bars indicate \pm SE ($n=12$). Different letters indicate means that differ significantly ($P<0.05$).

3.4 Inoculation of *Metarhizium anisopliae* in tomato improves plant grown in soil

The effect of the three *M. anisopliae* strains on the development of crop plants was examined. Tomato (*Solanum lycopersicum*, SI) plantlets (14 day-old) grown in pots were inoculated with 2.5×10^6 spores of *Metarhizium* strains (Ma-20, Ma-25, and Ma-28). After 14 days of inoculation with fungus, tomato plants grew larger and were more vigorous (Figure 3). In particular, tomato plants inoculated with three *M. anisopliae* strains reached more than 1.9 times of fresh weight in comparison with the plants without inoculation (Figure 3C). As observed in the *Arabidopsis* assays (Figure 2), the treatment of tomato plants with *T. virens* reached fresh weight like those obtained from *Metarhizium* strains (Figure 3C).

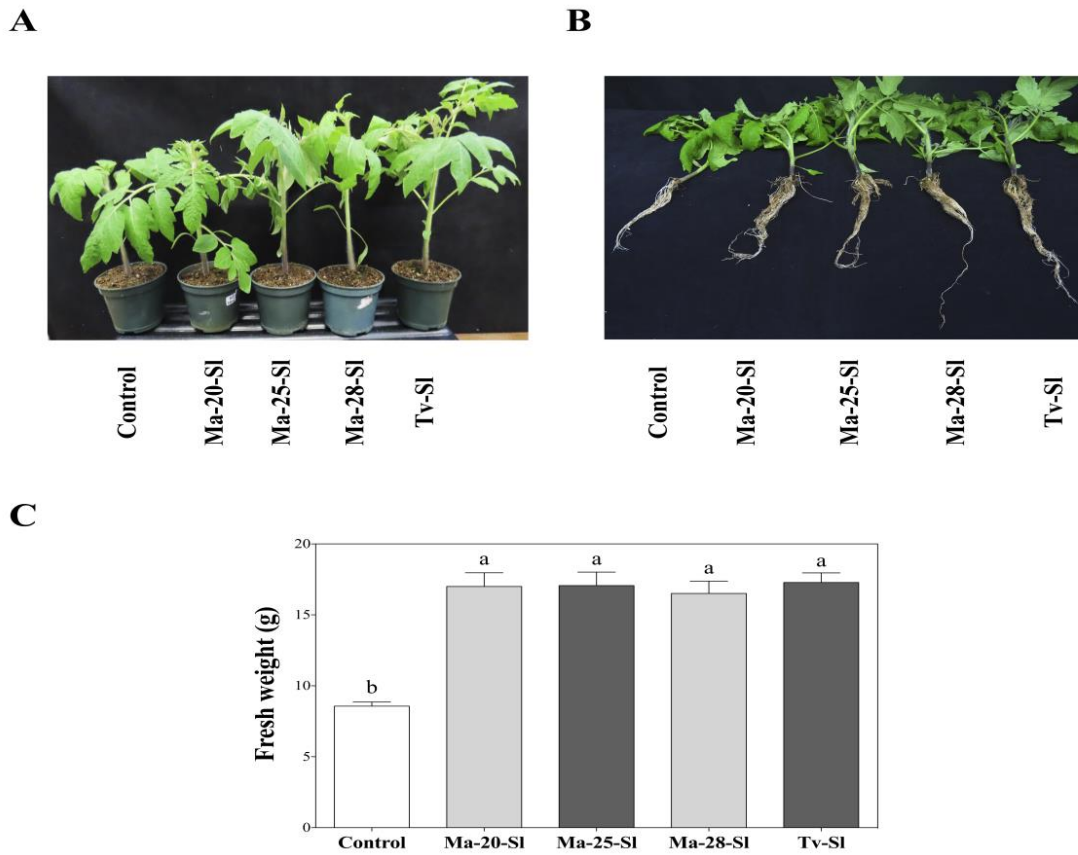


Figure 3

Figure 3. Effect of *M. anisopliae* and *T. virens* inoculation on the fresh weight of tomato plants grown in soil. (A-B) Representative photographs of the phenotype of tomato plants in co-culture with *M. anisopliae* strains (Ma-20, Ma-25, and Ma-28) or *T. virens* GV29.8 (Tv) after 14 dpi. **(C)** Fresh weight of tomato plants after 14 dpi with *M. anisopliae* and *T. virens*. Values are means and bars indicate \pm SE ($n=12$). Different letters indicate means that differ significantly ($P<0.05$).

3.5 Inoculation of *Metarhizium anisopliae* strains in maize plantlets grown in soil

Seven-day-old plantlets of maize in pots were inoculated with the three *Metarhizium anisopliae* strains during seven-days. As shown in Figure 4, maize plants inoculated with either *Metarhizium* or *Trichoderma* exhibited a positive effect on plant development, achieving plants with larger stem size and abundant root area. According to the above, a significant increase in fresh weight was obtained for the plants inoculated with the three *Metarhizium* strains (Ma-20, Ma-25, and Ma-28), compared with un-inoculated plants (Figure 4C).

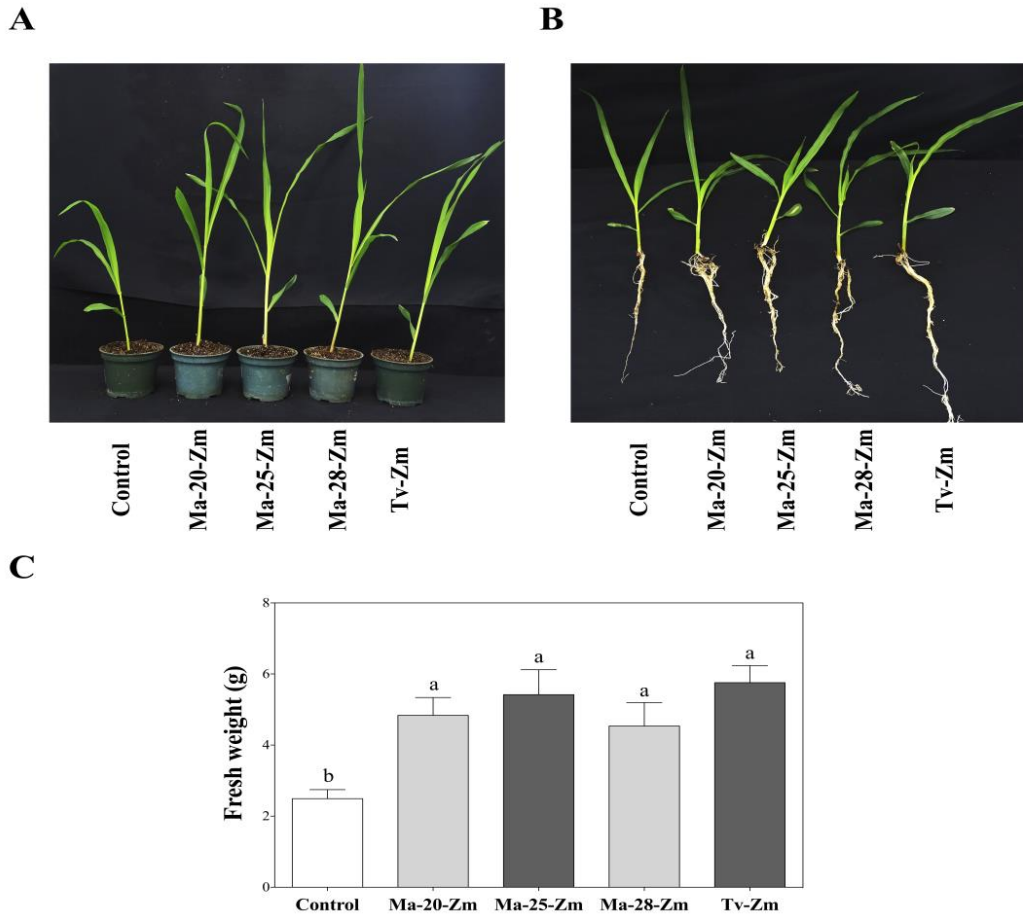


Figure 4

Figure 4. Effect of *M. anisopliae* and *T. virens* inoculation on the fresh weight of maize plants grown in soil. (A-B) Representative photographs of the phenotype of maize plants in co-culture with *M. anisopliae* strains (Ma-20, Ma-25, and Ma-28) or *T. virens* GV29.8 (Tv) after 14 dpi. (C) Fresh weight of maize plants after 14 dpi with *M. anisopliae* and *T. virens*. Values are means and bars indicate \pm SE ($n=9$). Different letters indicate means that differ significantly ($P<0.05$).

4. DISCUSSION

Throughout evolution, fungi have developed different mechanisms to interact with diverse communities, including the plant kingdom. The classification as endophytes of distinct genera of fungal entomopathogens has been reported (Vega 2008). These two properties of entomopathogenic fungi, as endophytes and biocontrol agents, could offer several benefits to the host plant such as

plant growth promotion and protection from pathogens. Little is known about the *Metarhizium* spp. as plant growth promoters. Herein, data show that inoculation with three *M. anisopliae* strains modify growth of *Arabidopsis*. *In vitro* assays, including contact and split plant-*Metarhizium* interactions, higher fresh weight, and chlorophyll *a* and total (*a* + *b*) content were observed in comparison to the un-inoculated plantlets. The observed increase in total chlorophyll content when plants interacted with *M. anisopliae* strains correlates with increase in their biomass, generating more vigorous plants. It has been described that in several plants, the chlorophyll content increased during the interaction with beneficial microorganisms such as *Trichoderma* species, arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth promoting rhizobacteria (Chirino-Valle et al. 2016; Rai et al. 2008; Stefan et al. 2013; Suzuki et al. 2014).

When *M. anisopliae* strains were inoculated in direct contact on *Arabidopsis* plants, an inhibition of growth in *Arabidopsis* main roots was observed. This phenotype has been previously reported during the interaction of *Arabidopsis* with *Trichoderma* species when they were grown in direct contact *in vitro* (González-Pérez et al. 2018; Shi et al. 2016). The inhibition of primary root growth observed during *Arabidopsis*-*Metarhizium* interactions could be attributed to secondary metabolites secreted by the fungus as reported in *T. longibrachiatum* (Shi et al. 2016). *T. longibrachiatum* during the interaction with *A. thaliana* produces a peptaibol called Trichokonin VI (TK VI). This peptaibol inhibited root growth by suppressing cell division and cell elongation, and also increased auxin content and disrupted auxin response gradients in root tips (Shi et al. 2016).

Some reports describe a chemical dialog between microorganisms and plants by the exchange of diffusible and Volatile Organic Compounds, VOCs (Junior and Andrade 2015; Liu et al. 2016, Rybakova et al. 2017). The *Arabidopsis*-*Metarhizium* split interaction had a higher effect on the development of *Arabidopsis* plantlets, in comparison with the direct contact interaction.

Therefore, the VOCs produced by the fungus and during the plant-fungus interaction were determined. Plants respond actively to VOCs produced by microorganisms, but due to the high complexity and structural diversity of VOCs, elucidating their specific mode of action in plants has been a challenge. However, it has been reported that VOCs from some beneficial microorganisms such as *Trichoderma* spp., arbuscular mycorrhizal, and *Bacillus subtilis* have several effects on plants. Among the effects observed are higher levels of chlorophyll content, alteration of root architecture, for example plants generate high number of lateral roots, greater plant growth and development, and activation of the plant defense against pathogens (Ditengou et al. 2015; González-Pérez et al. 2018; Hernández-Calderón et al. 2018; Lee et al. 2016; Tahir et al. 2017). It has been reported that during the microbe-plant co-cultivation in sealed containers, some microorganisms increase CO₂ levels that could contribute to plant growth promotion (Groenhagen et al., 2013; Kai and Piechulla 2009); however, trapping *M. anisopliae*-generated CO₂ by absorption in the plate-within-a-plate system did not reduce the *Arabidopsis* growth promotion generated by the fungus.

During *Arabidopsis*-*Metarhizium* split interaction only terpenes were identified. In particular, SQT β -caryophyllene was only detected when Ma-20 and Ma-25 strains were exposed to *Arabidopsis* in the split system, whereas with M-28 strain low proportions of the β -caryophyllene and *P*-cymene were identified, and the rest of the mixture was the monoterpene *o*-cymene. These terpenes might have contributed to the enhanced growth of *Arabidopsis* plantlets during the plant-*M. anisopliae* interaction. Many terpenes including β -caryophyllene and *O*-cymene develop important chemo-ecological roles in plants, such as phytoalexins in direct plant defense, or as signals in indirect defense responses against herbivores and their natural enemies (Block et al. 2019; Cheng et al. 2007; Bustos-Segura and Foley 2018). It has been reported that during *Brassica campestris*-*Talaromyces wortmannii* FS2 interaction, the β -caryophyllene promotes plant growth and induces resistance in *Brassica*

campestris (Yamagiwa et al. 2011). Therefore, terpenes identified here in *Metarhizium*-*Arabidopsis* interactions under split system could be the responsible for the positive effect on *Arabidopsis* growth. Several studies have indicated that beneficial fungi emit SQTs during interaction with plants, for example in *Trichoderma* species (González-Pérez et al. 2018; Lee et al. 2016; Nieto-Jacobo et al. 2017). Previously, our group reported that in *A. thaliana* with *T. virens* and *T. atroviride* split interaction, the SQTs production was dependent on the strain, where *T. virens* emitted an 86.9% of SQTs of the total mixture, in comparison with *T. atroviride* that generate 50% of SQTs (González-Pérez et al. 2018). Ditengou et al. (2015) observed that the majority of the VOCs identify were SQTs during the interaction of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* with *Arabidopsis* and *Populus*. They demonstrated that SQTs generated by *L. bicolor* were the active compounds that triggered lateral root formation in *Arabidopsis* and *Populus*. Herein, four different VOCs generated by three *Metarhizium* strains (Ma-20, Ma-25, and Ma-28) without interaction with *Arabidopsis* were identified. Ma-25 and Ma-28 strains emitted two SQTs β -caryophyllene and Eremophyllene, and in smaller amount 2-ethylhexanol. The Ma-20 strain produced *o*-cymene and in smaller proportion β -caryophyllene and Eremophyllene. These data suggest that the interaction of the plant with *M. anisopliae* fungus causes each strain of *Metarhizium* to change its profile of emitted VOCs, and that these VOCs could generate the positive growth effect in *Arabidopsis* plants.

Finally, when the effect exerted by the three *Metarhizium* strains on *Arabidopsis*, tomato and maize plants grown in soil was evaluated, larger and more vigorous plants were obtained. According our data, some studies have reported that certain *Metarhizium* species are able to stimulate plant growth. Jaber and Enkerli (2017) reported that *Beauveria bassiana* and *M. brunneum* are able to colonize leaves, stems, and roots, causing a better plant growth when applied the fungus in *V. faba* seeds. Inoculation of conidia of *M. anisopliae* strain F52 in corn seeds resulted in a significant increase in yield of

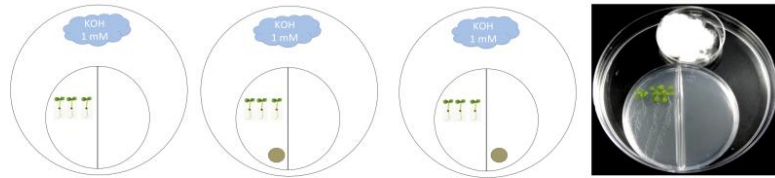
maize plants in fields (Kabaluk and Erickson 2007). We found that the inoculation of *M. anisopliae* strains (Ma-20, Ma-25, and Ma-28) in Arabidopsis, tomato and maize plantlets reached fresh weights similar to the *Trichoderma* inoculation. This data is interesting since *Trichoderma* species have been reported as plant growth promoters, even the *T. virens* GV29.8 strain has been the subject of studies on its effect on plant growth (González-Pérez et al. 2018; Kamaruzzaman et al. 2016; Nieto-Jacobo et al. 2017; Salazar-Badillo et al. 2015).

3 CONCLUSIONS

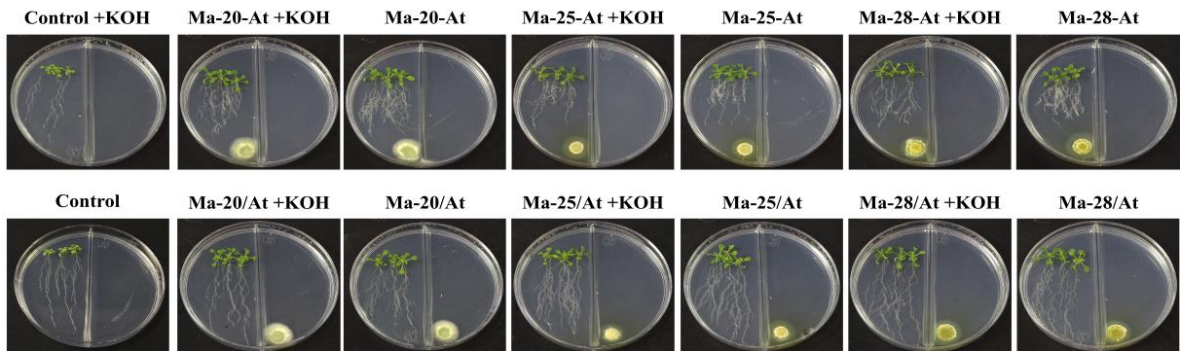
In this study, it has found that the *Metarhizium anisopliae* Ma-20, Ma-25, and Ma-28 strains have a potential to stimulate growth in Arabidopsis, tomato and maize plants, which makes this fungus a more attractive beneficial microorganism due to its bi-functional effect, as a plant growth promoter and biocontrol agent.

Supplementary material

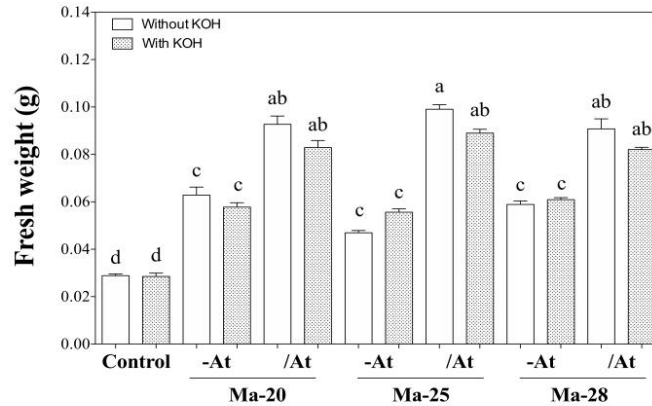
A



B

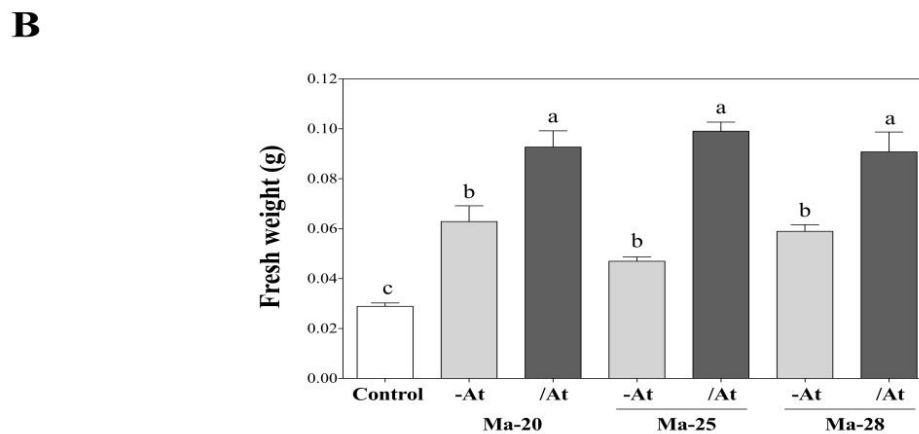
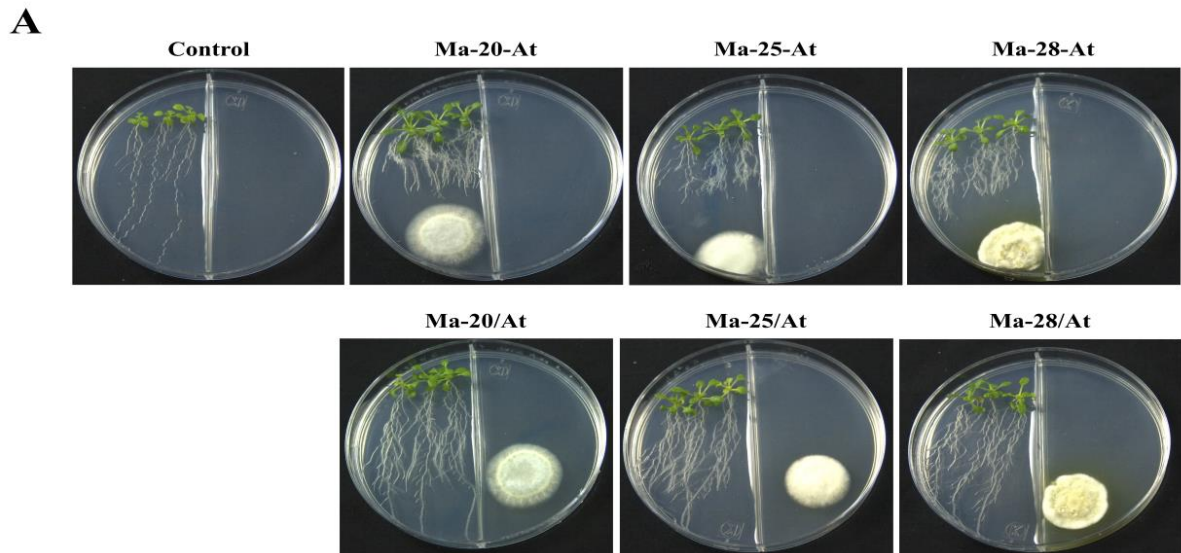


C



Suppl. Figure 1

Supplementary Figure 1. Effect of higher spore concentration of *Metarhizium anisopliae* strains on *Arabidopsis* development. Representative images of *Arabidopsis* plantlets inoculated with 3×10^6 spores *M. anisopliae* strains Ma-20, Ma-25, and Ma-28 after 14 dpi. *Metarhizium* strains were inoculated under direct interaction (At-*Metarhizium*) and split interaction without physical contact (At/*Metarhizium*). **B)** Fresh weight. Values shown represent of five groups of three plantlets. Values are means and bars indicate \pm SE ($n=5$). Different letters indicate means that differ significantly ($P < 0.05$).



Suppl. Figure 2

Supplementary Figure 2. Effect of inoculation of *M. anisopliae* strains on the fresh weight of *Arabidopsis* in presence of KOH. A) Schematic representation of the system in which the *A. thaliana* seedlings and *Metarhizium* strains were co-cultivated using a plate-within-a-plate sealed system in presence of 0.1M KOH. **B)** Representative images of *Arabidopsis* in interaction with *M. anisopliae* strains (Ma-20, Ma-25, and Ma-28) for 10 days with 0 or 0.1M KOH. *Metarhizium* strains were inoculated under direct interaction (At-*Metarhizium*) and split interaction without physical contact (At/*Metarhizium*). **C)** Fresh weight of *Arabidopsis* plants in interaction with *Metarhizium* strains in presence or absence of KOH. Values shown represent of five groups of three plantlets. Values are means and bars indicate \pm SE ($n=5$). Different letters indicate means that differ significantly ($P<0.05$).

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was financed by CONACYT (FORDECYT-297525). The authors thank to Ms. Alicia Becerra Flora from IPICYT for her technical assistance, and Dr. Steffen Graether for his grammatical review.

REFERENCES

Aktar, W., Sengupta, D., & Chowdhury, A. 2009. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary toxicology*, 2(1), 1-12. <https://doi.org/10.2478/v10102-009-0001-7>

Ananyeva, N. D., Susyan, E. A., Chernova, O. V., Chernov, I. Y., and Makarova, O. L. 2006. The ratio of fungi and bacteria in the biomass of different types of soil determined by selective inhibition. *Microbiology* 75, 702–707. <https://doi.org/10.1134/S0026261706060130>

Block, A. K., Vaughan, M. M., Schmelz, E. A., & Christensen, S. A. 2019. Biosynthesis and function of terpenoid defense compounds in maize (*Zea mays*). *Planta*, 249(1), 21-30. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2999-2>

Bustos-Segura, C., & Foley, W. J. 2018. Foliar terpene chemotypes and herbivory determine variation in plant volatile emissions. *Journal of chemical ecology*, 44(1), 51-61. <https://doi.org/10.1007/s10886-017-0919-8>

Cheng, A. X., Lou, Y. G., Mao, Y. B., Lu, S., Wang, L. J., & Chen, X. Y. (2007). Plant terpenoids: biosynthesis and ecological functions. *Journal of Integrative Plant Biology*, 49(2), 179-186. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2007.00395.x>

Chirino-Valle, I., Kandula, D., Littlejohn, C., Hill, R., Walker, M., Shields, M., ... & Wratten, S. 2016. Potential of the beneficial fungus *Trichoderma* to enhance

ecosystem-service provision in the biofuel grass *Miscanthus x giganteus* in agriculture. *Scientific reports*, 6, 25109. <https://doi.org/10.1038/srep25109>

Delgado-Sánchez, P., Ortega-Amaro, M. A., Rodríguez-Hernández, A. A., Jiménez-Bremont, J. F., & Flores, J. 2010. Further evidence from the effect of fungi on breaking *Opuntia* seed dormancy. *Plant signaling & behavior*, 5(10), 1229-1230. <https://doi.org/10.4161/psb.5.10.12835>

Ditengou, F. A., Müller, A., Rosenkranz, M., Felten, J., Lasok, H., Van Doorn, M. M., ... & Polle, A. 2015. Volatile signalling by sesquiterpenes from ectomycorrhizal fungi reprogrammes root architecture. *Nature communications*, 6, 6279. <https://doi.org/10.1038/ncomms7279>

Ghosh, D., Gupta, A., & Mohapatra, S. (2019). Dynamics of endogenous hormone regulation in plants by phytohormone secreting rhizobacteria under water-stress. *Symbiosis*, 77(3), 265-278. <https://doi.org/10.1007/s13199-018-00589-w>

Ghosh, D., Sen, S., & Mohapatra, S. (2017). Modulation of proline metabolic gene expression in *Arabidopsis thaliana* under water-stressed conditions by a drought-mitigating *Pseudomonas putida* strain. *Annals of Microbiology*, 67(10), 655-668. <https://doi.org/10.1007/s13213-017-1294-y>

Gravel, V., Antoun, H., & Tweddell, R. J. 2007. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biology and Biochemistry*, 39(8), 1968-1977. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.02.015>

Greenfield, M., Gómez-Jiménez, M. I., Ortiz, V., Vega, F. E., Kramer, M., & Parsa, S. 2016. *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* endophytically colonize cassava roots following soil drench inoculation. *Biological control*, 95, 40-48. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.01.002>

Groenhagen, U., Baumgartner, R., Bailly, A., Gardiner, A., Eberl, L., Schulz, S., & Weiskopf, L. (2013). Production of bioactive volatiles by different *Burkholderia ambifaria* strains. *Journal of chemical ecology*, 39(7), 892-906. <https://doi.org/10.1007/s10886-013-0315-y>

Guo Y, Narisawa K. 2018. Fungus-Bacterium Symbionts Promote Plant Health and Performance. *Microbes Environ*, 33, 239-241. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME3303rh>

Hernández-Calderón, E., Aviles-Garcia, M. E., Castulo-Rubio, D. Y., Macías-Rodríguez, L., Ramírez, V. M., Santoyo, G., ... & Valencia-Cantero, E. 2018. Volatile compounds from beneficial or pathogenic bacteria differentially regulate root exudation, transcription of iron transporters, and defense signaling pathways in *Sorghum bicolor*. *Plant molecular biology*, 96(3), 291-304. <https://doi.org/10.1007/s11103-017-0694-5>

Jaber, L. R., & Enkerli, J. 2017. Fungal entomopathogens as endophytes: can they promote plant growth?. *Biocontrol science and technology*, 27(1), 28-41. <https://doi.org/10.1080/09583157.2016.1243227>

Junior, L., & Andrade, M. 2015. Legume-rhizobia signal exchange: promiscuity and environmental effects. *Frontiers in microbiology*, 6, 945. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00945>

Kabaluk, J. T., & Ericsson, J. D. 2007. *Metarhizium anisopliae* seed treatment increases yield of field corn when applied for wireworm control. *Agronomy Journal*, 99(5), 1377-1381. <https://doi.org/10.2134/agronj2007.0017N>

Kai, M., & Piechulla, B. (2009). Plant growth promotion due to rhizobacterial volatiles—An effect of CO₂?. *FEBS letters*, 583(21), 3473-3477. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.09.053>

Kamaruzzaman, M., Rahman, M. M., Islam, M. S., & Ahmad, M. U. 2016. Efficacy of four selective *Trichoderma* isolates as plant growth promoters in two peanut varieties. <https://doi.org/10.14419/ijbr.v4i2.6468>

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, 151. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00151>

Khan, A. L., Hamayun, M., Khan, S. A., Kang, S. M., Shinwari, Z. K., Kamran, M., ... & Lee, I. J. 2012. Pure culture of *Metarhizium anisopliae* LHL07 reprograms soybean to higher growth and mitigates salt stress. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1483-1494. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0950-9>

Krell, V., Unger, S., Jakobs-Schoenwandt, D., & Patel, A. V. (2018). Endophytic *Metarhizium brunneum* mitigates nutrient deficits in potato and improves plant productivity and vitality. *Fungal ecology*, 34, 43-49. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2018.04.002>

Lee, S., Hung, R., Yap, M., & Bennett, J. W. 2015. Age matters: the effects of volatile organic compounds emitted by *Trichoderma atroviride* on plant

growth. *Archives of microbiology*, 197(5), 723-727.
<https://doi.org/10.1007/s00203-015-1104-5>

Lee, S., Yap, M., Behringer, G., Hung, R., & Bennett, J. W. 2016. Volatile organic compounds emitted by *Trichoderma* species mediate plant growth. *Fungal biology and biotechnology*, 3(1), 7.
<https://doi.org/10.1186/s40694-016-0025-7>

Liu, Y., Chen, L., Zhang, N., Li, Z., Zhang, G., Xu, Y., ... & Zhang, R. 2016. Plant-microbe communication enhances auxin biosynthesis by a root-associated bacterium, *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 29(4), 324-330. <https://doi.org/10.1094/MPMI-10-15-0239-R>

Lopez, D. C., & Sword, G. A. 2015. The endophytic fungal entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Purpureocillium lilacinum* enhance the growth of cultivated cotton (*Gossypium hirsutum*) and negatively affect survival of the cotton bollworm (*Helicoverpa zea*). *Biological Control*, 89, 53-60.
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.03.010>

Mahmood, I., Imadi, S. R., Shazadi, K., Gul, A., & Hakeem, K. R. 2016. Effects of pesticides on environment. In *Plant, soil and microbes* (pp. 253-269). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-27455-3_13

Meyling, N. V., Eilenberg, J. 2007. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: potential for conservation biological control. *Biological control*, 43(2), 145-155.
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.07.007>

Nieto-Jacobo, M. F., Steyaert, J. M., Salazar-Badillo, F. B., Nguyen, D. V., Rostás, M., Braithwaite, M., ... & Mendoza-Mendoza, A. 2017. Environmental

growth conditions of *Trichoderma* spp. affects indole acetic acid derivatives, volatile organic compounds, and plant growth promotion. *Frontiers in plant science*, 8, 102. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00102>

Ownley, B. H., Gwinn, K. D., & Vega, F. E. 2010. Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. *BioControl*, 55(1), 113-128. https://doi.org/10.1007/978-90-481-3966-8_9

Rai, M. K., Shende, S., & Strasser, R. J. 2008. JIP test for fast fluorescence transients as a rapid and sensitive technique in assessing the effectiveness of arbuscular mycorrhizal fungi in *Zea mays*: Analysis of chlorophyll *a* fluorescence. *Plant Biosystems*, 142(2), 191-198. <https://doi.org/10.1080/11263500802150225>

Rybakova, D., Rack-Wetzlinger, U., Cernava, T., Schaefer, A., Schmuck, M., & Berg, G. 2017. Aerial warfare: a volatile dialogue between the plant pathogen *Verticillium longisporum* and its antagonist *Paenibacillus polymyxa*. *Frontiers in plant science*, 8, 1294. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01294>

Salazar-Badillo, F. B., Sánchez-Rangel, D., Becerra-Flora, A., López-Gómez, M., Nieto-Jacobo, F., Mendoza-Mendoza, A., & Jiménez-Bremont, J. F. 2015. *Arabidopsis thaliana* polyamine content is modified by the interaction with different *Trichoderma* species. *Plant Physiology and Biochemistry*, 95, 49-56. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.07.003>

Sasan, R. K., & Bidochka, M. J. 2012. The insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* (*Clavicipitaceae*) is also an endophyte that stimulates plant root development. *American journal of botany*, 99(1), 101-107. <https://doi.org/10.3732/ajb.1100136>

Sen, S., Ghosh, D., & Mohapatra, S. (2018). Modulation of polyamine biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* by a drought mitigating *Pseudomonas putida* strain. *Plant Physiology and Biochemistry*, 129, 180-188. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.05.034>

Shi, W. L., Chen, X. L., Wang, L. X., Gong, Z. T., Li, S., Li, C. L., ... & Zhang, Y. Z. 2016. Cellular and molecular insight into the inhibition of primary root growth of *Arabidopsis* induced by peptaibols, a class of linear peptide antibiotics mainly produced by *Trichoderma spp.* *Journal of experimental botany*, 67(8), 2191-2205. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw023>

Stefan, M., Munteanu, N., Stoleru, V., Mihasan, M., & Hritcu, L. 2013. Seed inoculation with plant growth promoting rhizobacteria enhances photosynthesis and yield of runner bean (*Phaseolus coccineus* L.). *Scientia Horticulturae*, 151, 22-29. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.12.006>

Stoppacher, N., Kluger, B., Zeilinger, S., Krska, R., & Schuhmacher, R. 2010. Identification and profiling of volatile metabolites of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* by HS-SPME-GC-MS. *Journal of Microbiological Methods*, 81(2), 187-193. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.03.011>

Suzuki, R., & Ishimaru, T. 1990. An improved method for the determination of phytoplankton chlorophyll using N, N-dimethylformamide. *Journal of the Oceanographical Society of Japan*, 46(4), 190-194. <https://doi.org/10.1007/BF02125580>

Suzuki, W., Sugawara, M., Miwa, K., & Morikawa, M. 2014. Plant growth-promoting bacterium *Acinetobacter calcoaceticus* P23 increases the chlorophyll content of the monocot *Lemna minor* (duckweed) and the dicot *Lactuca sativa*

(lettuce). *Journal of bioscience and bioengineering*, 118(1), 41-44.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.12.007>

Tahir, H. A., Gu, Q., Wu, H., Raza, W., Hanif, A., Wu, L., ... & Gao, X. 2017. Plant growth promotion by volatile organic compounds produced by *Bacillus subtilis* SYST2. *Frontiers in Microbiology*, 8, 171.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00171>

Van Den Dool, H., & Kratz, P. D. (1963). A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography (No. RESEARCH). [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(01\)80947-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(01)80947-x)

Vega, F. E. 2008. Insect pathology and fungal endophytes. *Journal of invertebrate pathology*, 98(3), 277-279. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.01.008>

Villegas-Rodríguez, F., Marín-Sánchez, J., Delgado-Sánchez, P., Torres-Castillo, J. A., & Alvarado-Gómez, O. G. 2014. Management of *Bactericera cockerelli* (Sulc) (Hemiptera: Triozidae) in greenhouses with entomopathogenic fungi (Hypocreales). *Southwestern Entomologist*, 39(3), 613-624.
<https://doi.org/10.3958/059.039.0320>

Wyrebek, M., Huber, C., Sasan, R. K., & Bidochka, M. J. 2011. Three sympatrically occurring species of *Metarhizium* show plant rhizosphere specificity. *Microbiology*, 157(10), 2904-2911.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.051102-0>

Yamagiwa, Y., Inagaki, Y., Ichinose, Y., Toyoda, K., Hyakumachi, M., & Shiraishi, T. 2011. *Talaromyces wortmannii* FS2 emits β -caryophyllene, which promotes plant growth and induces resistance. *Journal of General Plant Pathology*, 77(6), 336-341. <https://doi.org/10.1007/s10327-011-0340-z>

Zhang, H., Xie, X., Kim, M. S., Kornyejev, D. A., Holaday, S., & Paré, P. W. (2008). Soil bacteria augment Arabidopsis photosynthesis by decreasing glucose sensing and abscisic acid levels in planta. *The Plant Journal*, 56(2), 264-273. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03593.x>

Zimmermann, G. 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Science and Technology*, 17(9), 879-920. <https://doi.org/10.1080/09583150701593963>

IV. Discusión

Las plantas y los microorganismos han co-evolucionado durante cientos de millones de años. Durante este tiempo han logrado desarrollar sistemas complejos de comunicación, los cuales determinarían el tipo de relación que será establecida, siendo éstas relaciones benéficas, neutrales u hostiles (Thrall *et al.*, 2007; Goh *et al.*, 2013). En su mayoría las interacciones planta-microorganismo son llevadas a cabo en la rizófera, ya que en esta área las plantas liberan una gran cantidad de compuestos sintetizados a través de la fotosíntesis (Nguyen 2003). Algunas especies de microorganismos son capaces de establecer simbiosis con las plantas, a estas especies simbiotes de plantas son consideradas como microorganismos benéficos (Coats y Rumpho 2014). Se ha reportado que los microorganismos benéficos tienen la capacidad de promover el crecimiento de las plantas huésped a través de mecanismos directos e indirectos (Contreras-Cornejo *et al.*, 2009; Glick 2014; Fincheira y Quiroz, 2018; Nieto-Jacobo *et al.*; 2018; Sriram *et al.*, 2009; Kumar y Verma 2018). Dentro de las especies de microorganismos benéficos se encuentran las pertenecientes al género *Trichoderma* las cuales han sido ampliamente utilizadas en la agricultura como agentes de control biológico de distintos hongos fitopatógenos, así como promotores del crecimiento vegetal. Sin embargo, los mecanismos mediante los cuales *Trichoderma* promueve el crecimiento vegetal no han sido esclarecidos por completo.

En estudios recientes se ha reportado que ciertas especies de *Trichoderma* tienen la capacidad de promover el crecimiento vegetal durante interacciones sin contacto físico bajo ensayos *in vitro* (Hung *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2016; Nieto-Jacobo *et al.*, 2017). Previamente, Salazar-Badillo y colaboradores (2015) reportaron que durante las interacciones *in vitro* entre *Arabidopsis*-*Trichoderma* en placas Petri divididas el efecto sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas de *Arabidopsis* es fue mayor que cuando la interacción se realizó en contacto físico con las plantas. Tanto las interacciones en contacto físico

como a distancia fueron llevadas acabo creciendo a Trichoderma en medio MS (Murashige y Skoog), el cual es un medio especifico para el crecimiento de plantas, y este no contiene los nutrientes necesarios para organismos heterótrofos como lo es Trichoderma.

En el primer capítulo de esta tesis doctoral, a través ensayos *in vitro* se evaluó el efecto ejercido por dos especies de Trichoderma (*Trichoderma atroviride* y *Trichoderma virens*) sobre el crecimiento y desarrollo de *Arabidopsis thaliana* cuando el hongo fue crecido en el medio papa dextrosa agar (PDA), el cual es un medio rico en nutrientes. Nosotros encontramos que ambas especies de Trichoderma cuando fueron crecidas en medio PDA promueven un mayor crecimiento y desarrollo en Arabidopsis en comparación con el control y las otras interacciones en las cuales los hongos fueron crecidos en medio MS. Particularmente las plantas de Arabidopsis generaron un mayor número de raíces laterales durante la interacción con Trichoderma cuando fue crecido en medio PDA.

Se ha reportado que las especies de Trichoderma producen una gran cantidad de metabolitos secundarios, entre ellos se encuentran algunas fitohormonas como las giberelinas y el ácido indolacético AIA (Gravel *et al.*, 2007; Kamalo *et al.*, 2018). Además, mediante el uso de líneas marcadoras de auxinas en la planta modelo *A. thaliana* se ha reportado que Trichoderma es capaz de inducir la producción de esta fitohormona en Arabidopsis durante la interacción en contacto físico (Contreras-Cornejo *et al.*, 2009). No obstante, se ha reportado que la promoción del crecimiento en plantas mediado por Trichoderma no se limita a las interacciones en contacto físico (Hung *et al.*, 2013; Salazar-Badillo *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2016; Nieto-Jacobo *et al.*, 2017).

Para evaluar sí Trichoderma es capaz de desencadenar una señalización dependiente de auxinas en Arabidopsis durante las interacciones a distancia utilizamos la línea Arabidopsis *DR5:uidA*, para ello analizamos tanto las interacciones en contacto físico como a distancia. En la interacción en contacto

físico, encontramos que ambas especies de *Trichoderma* abaten la señal GUS en las puntas de las raíces principales. Este efecto podría ser atribuido a algunos metabolitos secundarios producidos por *Trichoderma*, los cuales se estarían acumulando en grandes cantidades cuando la interacción es llevada a cabo en sistemas herméticos en un espacio reducido. Un ejemplo de estos metabolitos es el peptaibol Trichokonina VI (TK VI) producido por *T. longibrachiatum* que se ha reportado que inhibe el crecimiento de la raíz principal al suprimir la división y el alargamiento celular, esto debido a una interrupción en los gradientes de auxinas en las puntas de las raíces principales (Shi *et al.*, 2016). También, se ha reportado que la producción de ciertos metabolitos producidos por *Trichoderma* tales como las H⁺-ATPasas acidifican el medio del cultivo provocando la inhibición de la raíz principal y una redistribución de auxinas (Pelagio-Flores *et al.*; 2017). En este estudio, para demostrar que la disrupción en la acumulación de auxinas en la punta de las raíces principales durante la interacción en contacto físico es dependiente de la distancia a la cual es colocado el inóculo del hongo, nosotros llevamos a cabo interacciones con la línea reportera *DR5:uidA* en *Arabidopsis* con *Trichoderma* en placas Petri de mayor tamaño en la cual el inóculo fue colocado a una mayor distancia de las puntas de las raíces principales. La tinción histoquímica de la línea *DR5:uidA* después de 5 días de interacción con *Trichoderma* reveló que la señal de Gus no fue suprimida indicando que la inhibición en el crecimiento de la raíz principal sería dependiente de la distancia por ende de la concentración de los metabolitos producidos por el hongo.

Durante las interacciones a distancia de la línea reportera *DR5:uidA* con las dos especies de *Trichoderma* encontramos que la señal de Gus en las puntas de las raíces principales no es abatida, al contrario, cuando los hongos fueron crecidos en medio PDA observamos que la señal aumenta significativamente, lo cual sugiere que el medio en el cual son crecidos los hongos durante la interacción influye en la producción de ciertos metabolitos producidos por *Trichoderma*, como los Compuestos Orgánicos Volátiles (VOCs) que podrían

ser los responsables de desencadenar una respuesta dependiente de Auxinas en *Arabidopsis*. Además, nosotros analizamos si el fenotipo defectuoso en la formación de pelos radiculares en la mutante *rhd6* es revertido durante la interacción con *Trichoderma*, ya que ha sido reportado que dicho fenotipo es revertido mediante la adición exógena de auxinas o etileno, así como derivados de auxinas tales como IAAld y *let* que produce *T. virens* (Masucci y Schiefelbein 1991; Contreras-Cornejo *et al.*, 2009). Como resultado nosotros encontramos que tanto en las interacciones en contacto físico como a distancia ambas cepas de *Trichoderma* fueron capaces de curar el fenotipo defectuoso en la formación de pelos radiculares en el mutante *rhd6*, por lo que por primera vez nosotros demostramos que a distancia *Trichoderma* cura el fenotipo *rhd6*, por lo que la emisión de VOCs y/o etileno por parte del hongo generaría un reajuste en los niveles de auxinas y/o etileno que generaría pelos radiculares en dicho línea mutante. Como dato relevante, cuando *T. virens* fue crecido en la interacción a distancia con la línea mutante *rhd6*, las plantas generaron una mayor densidad de pelos radiculares.

Las especies de *Trichoderma* son prolíficas productoras de una gran cantidad de metabolitos secundarios, dentro de estos metabolitos están los Compuestos Orgánicos Volátiles (VOCs), los cuales son producidos como mezclas complejas de diferentes tipos de compuestos. La producción de estas mezclas varía según la especie del hongo, temperatura y el sustrato en el cual son crecidos los hongos (Hung *et al.*, 2015). La mayoría de los VOCs producidos por *Trichoderma* tienen funciones desconocidas tanto en *Trichoderma* como en otros organismos. Sin embargo, se ha reportado que algunos de los VOCs producidos por algunas especies de *Trichoderma* tiene la capacidad de desencadenar diferentes respuestas en plantas entre ellas está la promoción del crecimiento (Cutler *et al.*, 1986; Vinale *et al.*, 2008; Hung *et al.*, 2013; Nieto-Jacobo *et al.*, 2017 Lee *et al.*, 2019). En este trabajo de tesis durante la interacción de *Arabidopsis*-*Trichoderma* sin contacto físico identificamos 41 VOCs, de los cuales el 50% fueron sesquiterpenos en la interacción

Arabidopsis-*T. atroviride*, y 87% Arabidopsis-*T. virens*. Cuando analizamos los VOCs producidos por la planta sin el hongo, no encontramos la presencia de sesquiterpenos lo que sugiere que este tipo de compuestos son producidos por las especies de Trichoderma. Para comprobar esta hipótesis analizamos los VOCs producidos por cada una de las especies de Trichoderma crecidas solas en medio MS y PDA. Este análisis permitió la identificación de 49 VOCs cuando los hongos fueron crecidos en ambos medios, en donde el 79% de los VOCs producidos por *T. virens* fueron sesquiterpenos en comparación con *T. atroviride* que solo genero un 44% de este tipo de compuestos. Cuando nosotros realizamos la comparación entre los compuestos que se producen en común tanto en las interacciones Arabidopsis-Trichoderma (cuando los hongos fueron crecidos en medio MS o PDA) así como cuando los hongos fueron crecidos solos (ya sea en medio MS o PDA) encontramos que el perfil de compuestos cambia drásticamente. En *T. virens* solo 43.4% de los VOCs identificados se producen en común (tanto en interacción con Arabidopsis como cuando el hongo es crecido solo), de los cuales todos fueron sesquiterpenos. En contraste se encontró que *T. atroviride* produce el 68.1% de compuestos en común (tanto en interacción con Arabidopsis como si se crece solo), de los cuales más de la mitad fueron sesquiterpenos. Estos resultados muestran la diferencia en las redes metabólicas que han desarrollado estas dos especies de Trichoderma a través de la evolución, en donde *T.virens* probablemente ha tenido una mayor ganancia genética lo cual le permite cambiar el patrón de metabolitos producidos de acuerdo a las condiciones nutricionales y de interacción con otros organismos.

Respecto a los sesquiterpenos, Ditengou y colaboradores (2015) reportaron que durante la interacción con el hongo ectomicorrízico *Laccaria bicolor* con plantas de Arabidopsis y de Populus la mayoría de los VOCs identificados fueron sesquiterpenos; además reportaron que estos compuestos promueven la formación de raíces laterales en Arabidopsis y Populus, demostrando de esta manera que este tipo de compuestos son biológicamente activos (Ditengou et

al., 2015). La variación en el perfil de VOCs producidos por *Trichoderma* durante la interacción con otros microorganismos también ha sido reportada (Guo *et al.*, 2019). La identificación de los VOCs durante la interacción de tres especies de *Trichoderma* (*T. harzianum*, *T. Hamatum*, y *T. velutinum*) con el hongo *L. bicolor* reveló que los perfiles de VOCs emitidos durante la interacción cambian drásticamente en comparación a los perfiles producidos cuando los hongos son crecidos individualmente (Guo *et al.*, 2019). En el presente estudio observamos un cambio en los perfiles de VOCs producidos por *Trichoderma* durante la interacción con *Arabidopsis* en comparación cuando los hongos son crecidos individualmente, lo que sugiere que estos cambios podrían estar implicados en la comunicación temprana planta-*Trichoderma* previo a la colonización de las raíces por parte de *Trichoderma*. En este estudio, entre los compuestos identificados durante la interacción *Arabidopsis-T. atroviride* encontramos que el 6-pentil-2H-piran-2-ona (6-PP) se produjo en gran cantidad (30,06%) cuando *T. atroviride* fue crecido en medio PDA en comparación a cuando el hongo fue crecido en medio MS en donde solo se produjo en un 1,41% del total de la mezcla de VOCs. En ensayos *in vitro* se ha reportado que la adición exógena de 6PP en bajas concentraciones promueve el crecimiento de las plantas y regula la arquitectura de las raíces, inhibiendo el crecimiento de las raíces primarias e induciendo la formación de raíces laterales (Garnica-Vergara *et al.*, 2016). Esto coincide con nuestros resultados obtenidos a los 5 días de interacción entre *Arabidopsis-T. atroviride* cuando el hongo fue crecido en medio PDA en donde observamos una inhibición en la raíz principal en comparación a cuando el hongo fue crecido bajo esta misma condición en medio MS. Esto se podría deber a que cuando *T. atroviride* es crecido en medio PDA produce una mayor cantidad de 6-PP siendo este compuesto el responsable de dicha inhibición. Los cambios en la cantidad de ciertos metabolitos producidos por *Trichoderma* podrían estar relacionados con el sustrato en el cual son crecidos los hongos (Ahamed y Vermette 2009). En este sentido se ha reportado que *T. virens* aumenta los niveles de ácido indolacético (AIA) cuando se añade el aminoácido triptófano al medio de cultivo (Ahamed y

Vermette 2009; Contreras-Cornejo *et al.*, 2009). El análisis de los perfiles de VOCs emitidos por *T. virens* y *T. atroviride* durante la interacción con *Arabidopsis* mostró que solo 4 de los 41 VOCs identificados en este estudio, se producen en común en ambas cepas de *Trichoderma*; estos fueron el 2-pentylfuran, α -bergamoteno, isocembreno, y α -elemene. La emisión de 2-pentylfuran ha sido reportada en la cepa XTBg34 de *Bacillus megaterium* (Zou *et al.*, 2010). Cuando el estándar comercial de este compuesto fue aplicado de manera exógena en plantas de *A. thaliana* a una concentración de 10 μ g se reportó que este compuesto tiene un efecto positivo sobre el crecimiento de *Arabidopsis* (Zou *et al.*, 2010). En este trabajo encontramos que el 2-pentylfuran fue producido por *T. virens* y la planta *Arabidopsis* en ambos medios de cultivo, y que solo se produjo cuando el hongo *T. virens* fue crecido en medio PDA. También la producción del α -bergamoteno ha sido identificada en otras especies de *Trichoderma* y hongos micorrízicos (Fontana *et al.*, 2009; Garnica-Vergara *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2016; Nieto-Jacobo *et al.*, 2017). En este estudio el α -bergamoteno fue identificado en ambas cepas cuando fueron crecidas en medio MS y PDA durante la interacción con *Arabidopsis*. A la fecha no existen reportes sobre el efecto ejercido por este compuesto en el crecimiento de plantas, lo cual lo convierte en un candidato para ser probado aplicándolo de manera exógena en plantas.

En este trabajo encontramos que *T. atroviride* y *T. virens* ejercen un mayor efecto sobre el crecimiento y desarrollo de *A. thaliana* cuando la interacción se realizó a distancia, en particular cuando los hongos fueron crecidos en medio PDA. De acuerdo a nuestros resultados esto podría deberse a que ciertos VOCs se generan en mayor cantidad cuando los hongos están en condiciones óptimas de crecimiento con el medio PDA, en comparación a cuando crecen en medio MS.

Cuando realizamos la interacción *Arabidopsis*-*Trichoderma* bajo estrés por frío (12 °C), observamos que *Trichoderma* promueve el crecimiento en las plantas

de *Arabidopsis* en la interacción sin contacto físico cuando fue crecido tanto en medio MS como PDA. Particularmente *T. virens* fue la única especie que promovió el crecimiento de *Arabidopsis* durante la interacción a 12°C. Se ha descrito que el nivel de expresión del gen *ERD14* en *Arabidopsis* aumenta cuando las plantas son sometidas a estrés por frío (Kovacs *et al.*, 2008); en este trabajo cuantificamos los niveles de transcripción del gen *ERD14* mediante qRT-PCR en *Arabidopsis* durante la interacción en contacto físico y a distancia con *T. virens* y *T. atroviride* a 12°C. Encontramos una inducción del gen *ERD14* en ambas condiciones de interacción, en particular la expresión de *ERD14* fue mayor en las plantas sometidas a interacción a distancia con *T. virens*. Esto sugiere algunos de los VOCs emitidos por esta especie de *Trichoderma* tienen la capacidad de desencadenar una mayor expresión de este gen de respuesta a estrés por frío en plantas de *Arabidopsis*, lo cual se reflejó directamente en una mayor tolerancia a este tipo de estrés. La mitigación del estrés causado por bajas temperaturas en plantas también ha sido reportada en otras especies de *Trichoderma*. En este sentido se reportó que plantas de tomate sometidas a estrés por frío (8°C) en interacción con la cepa AK20G de *T. harzianum* desarrollaron una mayor eficiencia fotosintética además de un aumento en el contenido de prolina, mientras que la tasa de peroxidación de lípidos y la fuga de electrolitos disminuyó bajo estrés por frío (Ghorbanpour *et al.*, 2018). Además, en ese mismo estudio los autores reportaron que las plantas de tomate en co-cultivo con *T. harzianum* bajo estrés por frío incrementan los niveles de expresión del gen que codifica para la dehidrina *TAS14* (Ghorbanpour *et al.*, 2018).

En el presente estudio, encontramos que los perfiles de VOCs identificados son altamente dependientes de cada especie de *Trichoderma*. *T. virens* fue la especie que más variación mostró en los patrones de VOCs emitidos en las interacciones con *Arabidopsis* cuando fue crecido en medio MS y PDA. También, encontramos que *T. virens* fue la especie que promovió un mayor

crecimiento y desarrollo en *Arabidopsis* cuando el hongo fue crecido en medio PDA.

Con la finalidad de aportar evidencia sobre el potencial biotecnológico que ofrecen ciertos hongos benéficos y sus posibles usos en la agricultura en el segundo capítulo de esta tesis de doctorado nos enfocamos a evaluar el efecto ejercido por tres cepas pertenecientes a la especie del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* sobre el crecimiento de plantas. Los hongos pertenecientes al género *Metarhizium* se encuentran entre las especies de hongos entomopatógenos más utilizados en el manejo integral de plagas, de las cuales *M. anisopliae* ha sido una de las más utilizadas para este propósito dado que tiene la capacidad de micoparasitar más de 200 especies de insectos y ácaros (Roberts *et al.*, 2004; Zimmermann *et al.*, 2007. *Metarhizium* había sido considerado como un organismo saprófito con un dual ciclo de vida, tanto como habitante del suelo como patógeno de insectos (Roberts y Humber 1981). Sin embargo, estudios recientes han demostrado que algunas especies de *Metarhizium* tienen la capacidad de interactuar y competir por la colonización de la rizósfera llegando a establecerse como endófitos de plantas (Pava-Ripoll *et al.*, 201; Jaber y Ownley 2018). Además, se ha reportado que ciertas especies *Metarhizium* promueven el crecimiento y desarrollo de plantas (Liao *et al.*, 2014; Greenfield *et al.*, 2016). Sin embargo, esta parte de la promoción en el crecimiento de plantas mediada por *Metarhizium* ha sido poco estudiada.

En la primera etapa de este trabajo nos enfocamos a evaluar el efecto que ejercen tres cepas de *M. anisopliae* (Ma-20, Ma- 25 y Ma-28) en el crecimiento de la planta modelo *A. thaliana* mediante interacciones *in vitro*. Estas interacciones fueron llevadas a cabo en contacto directo y distancia en placas Petri divididas. Después de siete días post inoculación encontramos que las plantas en interacción física con las tres cepas de *Methazium* incrementaron casi el doble su contenido de biomasa, también observamos que bajo esta interacción las cepas de *Metarhizium* causaron la inhibición en el crecimiento de la raíz principal. Este fenotipo también lo encontramos durante la interacción

de *Arabidopsis* con especies de *Trichoderma* en el capítulo anterior cuando realizamos las interacciones *Arabidopsis*-*Trichoderma* en contacto físico bajo condiciones *in vitro*. La inhibición del crecimiento de la raíz primaria observada durante las interacciones *Arabidopsis*-*Metarhizium* podría atribuirse a ciertos metabolitos secundarios secretados por el hongo de manera similar a lo descrito en *T. longibrachiatum* (Shi et al. 2016) en donde se encontró que durante la interacción de *T. longibrachiatum* con *A. thaliana* el hongo produce un peptaibol llamado Trichokonin VI (TK VI), el cual inhibe el crecimiento de las raíces principales al suprimir la división celular y el alargamiento celular debido a una interrupción en los gradientes de auxinas (Shi et al., 2016). El fenotipo de la inhibición de la raíz principal durante la interacción de *Arabidopsis*-*Trichoderma* también fue reportado por Pelagio-Flores y colaboradores (2017) en donde se encontró que *Trichoderma* acidifica el medio a través de un proceso mediado por H⁺-ATPasas. Los autores reportaron que la acidificación del medio provoca la redistribución de auxinas dentro de las células de la columella en la cofia de la raíz principal de *Arabidopsis*, lo que provoca que se doble la punta de la raíz (fenotipo de gancho) inhibiendo el crecimiento (Pelagio-Flores et al., 2017).

Además, en este trabajo nosotros encontramos que el efecto positivo en el crecimiento de *Arabidopsis* ejercido por las tres cepas de *Metarhizium* no se limita a la interacción en contacto físico. De hecho, durante la interacción a distancia de *Arabidopsis* con las tres cepas de *Metarhizium*, las plantas incrementaron el doble de peso fresco en comparación a la condición control. Respecto al fenotipo de inhibición encontrado durante las interacciones en contacto físico, en la interacción a distancia las raíces principales fueron de mayor longitud. La promoción del crecimiento en plantas durante las interacciones con microorganismos sin contacto físico también ha sido descrita en otras especies de microorganismos benéficos (Salazar-Badillo et al., 2015; lee et al., 2016; Nieto-Jacobo et al., 2017; Tahir et al., 2017). Además de la promoción del crecimiento vegetal, se ha reportado que durante la interacción de microorganismos benéficos con las plantas el contenido de clorofila

aumenta (Rai et al. 2008; Stefan et al., 2013; Suzuki et al., 2014; Chirino-Valle et al., 2016). En este trabajo encontramos que las tres cepas de *M. anisopliae* incrementan el contenido de clorofila *a* en *Arabidopsis* en ambas condiciones de interacción.

Se ha descrito que la promoción del crecimiento en plantas durante las interacciones con microorganismos a distancia es mediada por compuestos orgánicos volátiles (VOCs) emitidos por los microorganismos (Hung et al., 2013; Lee et al., 2016; Nieto-Jacobo et al., 2017). Sin embargo, debido a la alta complejidad y diversidad estructural de los VOCs emitidos por los microorganismos, elucidar los mecanismos de acción específicos en las plantas está aún lejos de lograrse. En la interacción a distancia *Arabidopsis*-*Metarhizium* observamos un mayor desarrollo en las plantas de *Arabidopsis* en comparación con la interacción en contacto físico. Por lo cual nos enfocamos a identificar los VOCs que se generan de estas cepas de *Metarhizium* durante la interacción sin contacto físico con *Arabidopsis*, además identificamos los volátiles emitidos por estos hongos cuando son crecidos solos en medio MS. Nosotros encontramos que durante la interacción *Metarhizium*-*Arabidopsis* solo se producen terpenos. En particular solo se identificó como compuesto único la producción β -Cariofileno durante la interacción de las cepas Ma-20 y Ma-25 con *Arabidopsis*. Mientras que en la interacción de Ma-28-*Arabidopsis* se identificó una baja proporción de β -Cariofileno y *O*-Cymeno, y como compuesto mayoritario el *P*-Cymeno. Estos volátiles podrían estar implicados en el crecimiento de las plántulas de *Arabidopsis* durante las interacciones sin contacto físico. Se ha reportado que algunos terpenos incluidos el β -cariofileno y el *O*-cimeno, desarrollan funciones quimio-ecológicas importantes en las plantas tales como atrayentes de polinizadores y enemigos naturales de ciertos patógenos, o como fitoalexinas implicadas en la defensa contra los herbívoros (Cheng et al. 2007; Bustos-Segura y Foley 2018; Block et al., 2019). Se ha descrito que durante la interacción de la cepa FS2 de *Talaromyces wortmannii* produce varios terpenos incluido el β -cariofileno (Yamagiwa et al., 2011). En ese mismo estudio los autores reportaron que la interacción del β -cariofileno

(adquirido como estándar comercial) con plantas de *Brassica campestris*, el β -cariofileno promueve el crecimiento de las plantas e induce resistencia contra *C. higginsianum* (Yamagiwa *et al.*, 2011). Por lo tanto, es posible que los terpenos identificados en las interacciones *Metarhizium*-*Arabidopsis* en las interacciones a distancia podrían ser los responsables del crecimiento observado en *Arabidopsis*. Adicionalmente, en este estudio realizamos la identificación de los VOCs producidos por las tres cepas de *M. anisopliae* (Ma-20, Ma-25 y Ma-28) sin interacción con *Arabidopsis*. En donde encontramos que la cepa Ma-20 produjo mayoritariamente *O*-cimeno, y menor proporción β -cariofileno y eremofileno. Para las cepas Ma-25 y Ma-28 encontramos que los hongos emitieron β -cariofileno y eremofileno, y en menor cantidad 2-etilhexanol. Estos resultados sugieren que *Metarhizium* cambia el perfil de VOCs cuando está en interacción con las plantas los cuales podrían estar implicados en la comunicación planta-hongo.

Finalmente, cuando se evaluó el efecto ejercido por las tres cepas de *Metarhizium* en el crecimiento de plantas de *Arabidopsis*, tomate y maíz crecidas en macetas. Como resultado encontramos que las tres cepas promovieron significativamente la ganancia de biomasa en las plantas de *Arabidopsis*, tomate y maíz. En este sentido se ha reportado que algunas especies de *Metarhizium* son capaces de promover el crecimiento de plantas. Jaber y Enkerli (2017) publicaron que *Beauveria bassiana* y *M. brunneum* son capaces de establecerse como endófitos en plantas de *Vicia faba* estimulando el crecimiento de las plantas. También fue descrito que la inoculación de semillas de maíz con la cepa F52 de *M. anisopliae* resultó en un aumento significativo en el crecimiento de plantas de maíz cultivadas en campo (Kabaluk y Erickson 2007). Este trabajo sería el primer reporte en donde se demuestra que los VOCs producidos por *M. anisopliae* promueven el crecimiento de plantas sin interacción física, además de la identificación de los VOCs emitidos por *M. anisopliae* tanto en interacción con *Arabidopsis* como cuando el hongo crece solo.

V. Conclusiones

- *Trichoderma* spp. promueve el crecimiento y desarrollo en *Arabidopsis* particularmente en las interacciones sin contacto físico.
- La inhibición de la raíz principal en *Arabidopsis* durante la interacción en contacto físico con *Trichoderma* es dependiente de la distancia a la cual es colocado el inóculo del hongo, ya que la inoculación corta a la raíz durante la interacción en un sistema con espacio reducido algunos metabolitos podrían estarse acumulando en altas concentraciones provocando inhibición en la raíz principal
- *Trichoderma* tuvo mayor impacto en el crecimiento y desarrollo de *Arabidopsis* cuando el hongo creció en medio PDA lo que podría correlacionar con el perfil de VOCs identificados cuando el hongo fue crecido en PDA.
- *Trichoderma* modula una respuesta dependiente de auxinas en *Arabidopsis* tanto en interacciones en contacto físico como a distancia.
- *Trichoderma* es capaz de inducir la tolerancia al estrés por frío en *Arabidopsis* durante la interacción a distancia.
- Los VOCs producidos durante la interacción *Arabidopsis-Trichoderma* spp. sin contacto físico son principalmente sesquiterpenos, donde la proporción y el tipo de estos son dependientes de la cepa y el medio en el cual son crecidos los hongos.
- El perfil de VOCs producidos por *Trichoderma virens* y *Trichoderma atroviride* cambia en gran medida cuando estos son crecidos solos en medio MS o PDA en comparación cuando están en interacción con *Arabidopsis*.
- *Metarhizium anisopliae* promueve el crecimiento y desarrollo en *Arabidopsis* particularmente en las interacciones sin contacto físico.

- *Arabidopsis thaliana* incrementa el contenido de clorofila a cuando es sometida a interacción con *Metarhizium anisopliae*.
- Los VOCs producidos durante la interacción *Arabidopsis-Metarhizium anisopliae* sin contacto físico podrían promover el crecimiento de *Arabidopsis*
- El co-cultivo de *Metarhizium anisopliae* con plantas de *Arabidopsis*, Tomate y Maíz resulta en un incremento de biomasa en las plantas, lo cual convierte a este hongo entomopatógeno en un modelo atractivo como agente de biocontrol y promotor del crecimiento vegetal.

VI. Perspectivas

- Probar el efecto individual de estándares comerciales de los VOCs identificados en *Trichoderma* y *Metarhizium* sobre el crecimiento de plantas.
- Determinar si los estándares comerciales de los VOCs identificados en *Trichoderma* y *Metarhizium* desencadenan cascadas de señalización dependientes de auxinas mediante el uso de líneas reporteras en *Arabidopsis*.
- Determinar si los estándares comerciales de los VOCs identificados en *Trichoderma* y *Metarhizium* regulan la expresión genes involucrados en la respuesta a estrés biótico y abiótico mediante qRT-PCR.
- Identificar los perfiles de VOCs producidos por *Trichoderma* y *Metarhizium* durante la interacción en contacto físico con *A. thaliana*.

VII. REFERENCIAS

Agüero, L. E. M., Alvarado, R., Martínez, A., & Dorta, B. (2008). Inhibition of *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin b1 production in stored maize grains exposed to volatile compounds of *Trichoderma harzianum* Rifai. *Interciência*, 33(3), 219-222.

Ahamed, A., & Vermette, P. (2009). Effect of culture medium composition on *Trichoderma reesei's* morphology and cellulase production. *Bioresource Technology*, 100(23), 5979-5987.

Akutse, K. S., Maniania, N. K., Fiaboe, K. K. M., Van den Berg, J., & Ekesi, S. (2013). Endophytic colonization of *Vicia faba* and *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae) by fungal pathogens and their effects on the life-history parameters of *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae). *fungal ecology*, 6(4), 293-301.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). How cells obtain energy from food. In *Molecular Biology of the Cell. 4th edition*. Garland Science.

Alonso-Ramírez, A., Poveda, J., Martín, I., Hermosa, R., Monte, E., & Nicolás, C. (2014). Salicylic acid prevents *Trichoderma harzianum* from entering the vascular system of roots. *Molecular plant pathology*, 15(8), 823-831.

Aw, K. M. 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.

Bae, H., Roberts, D. P., Lim, H. S., Strem, M. D., Park, S. C., Ryu, C. M., ... & Bailey, B. A. (2011). Endophytic *Trichoderma* isolates from tropical environments delay disease onset and induce resistance against *Phytophthora capsici* in hot pepper using multiple mechanisms. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24(3), 336-351.

Bagyaraj, D. J., and Ashwin, R. (2017). Soil biodiversity: role in sustainable horticulture. *Biodivers. Hortic. Crops* 5, 1–18. doi: 10.1016/j.jenvman.2017.08.001.

Baker, R. (1989). Improved *Trichoderma* spp. for promoting crop productivity. *Trends in Biotechnology*, 7(2), 34-38.

Beneduzi, A., Ambrosini, A., & Passaglia, L. M. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and molecular biology*, 35(4), 1044-1051.

Björkman, T. (2004). Effect of *Trichoderma* colonization on auxin-mediated regulation of root elongation. *Plant Growth Regulation*, 43(1), 89-92.

Block, A. K., Vaughan, M. M., Schmelz, E. A., & Christensen, S. A. 2019. Biosynthesis and function of terpenoid defense compounds in maize (*Zea mays*). *Planta*, 249(1), 21-30.

Bonito, G., Reynolds, H., Robeson, M. S., Nelson, J., Hodkinson, B. P., Tuskan, G., ... & Vilgalys, R. (2014). Plant host and soil origin influence fungal and bacterial assemblages in the roots of woody plants. *Molecular ecology*, 23(13), 3356-3370.

Brotman, Y., Briff, E., Viterbo, A., & Chet, I. (2008). Role of swollenin, an expansin-like protein from *Trichoderma*, in plant root colonization. *Plant physiology*, 147(2), 779-789.

Brotman, Y., Landau, U., Cuadros-Inostroza, Á., Takayuki, T., Fernie, A. R., Chet, I., ... & Willmitzer, L. (2013). *Trichoderma*-plant root colonization: escaping early plant defense responses and activation of the antioxidant machinery for saline stress tolerance. *PLoS Pathog*, 9(3), e1003221.

Bruck, D. J. (2005). Ecology of *Metarhizium anisopliae* in soilless potting media and the rhizosphere: implications for pest management. *Biological control*, 32(1), 155-163.

Bustos-Segura, C., & Foley, W. J. 2018. Foliar terpene chemotypes and herbivory determine variation in plant volatile emissions. *Journal of chemical ecology*, 44(1), 51-61.

Caboche, S., Pupin, M., Leclère, V., Fontaine, A., Jacques, P., & Kucherov, G. (2007). NORINE: a database of nonribosomal peptides. *Nucleic acids research*, 36(suppl_1), D326-D331.

Chacón, M. R., Rodríguez Galán, O., Benítez Fernández, C. T., Sousa, S., Rey, M., Llobell González, A., & Delgado Jarana, J. (2007). Microscopic and transcriptome analyses of early colonization of tomato roots by "*Trichoderma harzianum*". *International microbiology: official journal of the Spanish Society for Microbiology*, 10 (1), 19-27.

Chaverri, P., Gazis, R. O., & Samuels, G. J. (2011). *Trichoderma amazonicum*, a new endophytic species on *Hevea brasiliensis* and *H. guianensis* from the Amazon basin. *Mycologia*, 103(1), 139-151.

Chen, L., Yang, X., Raza, W., Li, J., Liu, Y., Qiu, M., ... & Shen, Q. (2011). *Trichoderma harzianum* SQR-T037 rapidly degrades allelochemicals in rhizospheres of continuously cropped cucumbers. *Applied microbiology and biotechnology*, 89(5), 1653-1663.

Cheng, A. X., Lou, Y. G., Mao, Y. B., Lu, S., Wang, L. J., & Chen, X. Y. (2007). Plant terpenoids: biosynthesis and ecological functions. *Journal of Integrative Plant Biology*, 49(2), 179-186.

Cheng, Y. T., Zhang, L., & He, S. Y. (2019). Plant-microbe interactions facing environmental challenge. *Cell host & microbe*, 26(2), 183-192.

Chirino-Valle, I., Kandula, D., Littlejohn, C., Hill, R., Walker, M., Shields, M., ... & Wratten, S. 2016. Potential of the beneficial fungus *Trichoderma* to enhance ecosystem-service provision in the biofuel grass *Miscanthus x giganteus* in agriculture. *Scientific reports*, 6, 25109.

Chugh, J. K., & Wallace, B. A. (2001). Peptaibols: models for ion channels.

Coats, V. C., & Rumpfo, M. E. (2014). The rhizosphere microbiota of plant invaders: an overview of recent advances in the microbiomics of invasive plants. *Frontiers in Microbiology*, 5, 368.

Collins, R. P., & Halim, A. F. (1972). Characterization of the major aroma constituent of the fungus *Trichoderma viride*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 20(2), 437-438.

Compant, S., Samad, A., Faist, H., & Sessitsch, A. (2019). A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application. *Journal of advanced research*, 19, 29-37.

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 physiology*, 149(3), 1579-1592.

Cutler, H.G., Cox, R.H., Crumley, F.G., Cole, P.D., 1986. 6-Pentyl-alpha-pyrone from *Trichoderma harzianum*: its plant growth inhibitory and antimicrobial properties. *Agric. Biol. Chem.* 50, 2943–2945.

Da, W., Bardgett, R. D., Klironomos, J. N., Setälä, H., van der Putten, W. H., & Wall, D. H. (2004). Ecological linkages between aboveground and belowground biota. *Science*, 304(5677), 1629-1633.

Daniel, J. F. D. S., & Rodrigues Filho, E. (2007). Peptaibols of *Trichoderma*. *Natural product reports*, 24(5), 1128-1141.

de Boer, W., Li, X., Meisner, A., & Garbeva, P. (2019). Pathogen suppression by microbial volatile organic compounds in soils. *FEMS microbiology ecology*, 95(8), fiz105.

Delgado-Sánchez, P., Ortega-Amaro, M. A., Rodríguez-Hernández, A. A., Jiménez-Bremont, J. F., & Flores, J. Further evidence from the effect of fungi on breaking *Opuntia* seed dormancy. *Plant Signal Behav.* 5 (10), 1229-1230 (2010).

Ditengou, F. A., Müller, A., Rosenkranz, M., Felten, J., Lasok, H., Van Doorn, M. M., ... & Polle, A. (2015). Volatile signalling by sesquiterpenes from ectomycorrhizal fungi reprogrammes root architecture. *Nature communications*, 6(1), 1-9.

Djonović, S., Vargas, W. A., Kolomiets, M. V., Horndeski, M., Wiest, A., & Kenerley, C. M. (2007). A proteinaceous elicitor Sm1 from the beneficial fungus *Trichoderma virens* is required for induced systemic resistance in maize. *Plant physiology*, 145(3), 875-889.

Du Jardin, P. (2015). Plant biostimulants: definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*, 196, 3-14.

Elena, G. J., Beatriz, P. J., Alejandro, P., & Lecuona, R. E. (2011). *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin promotes growth and has endophytic activity in tomato plants. *Adv Biol Res*, 5(1), 22-27.

Fang, W., & Leger, R. J. S. (2010). Mrt, a gene unique to fungi, encodes an oligosaccharide transporter and facilitates rhizosphere competency in *Metarhizium robertsii*. *Plant physiology*, 154(3), 1549-1557.

Fincheira, P., & Quiroz, A. (2018). Microbial volatiles as plant growth inducers. *Microbiological research*, 208, 63-75.

Fontana, A., Reichelt, M., Hempel, S., Gershenzon, J., & Unsicker, S. B. (2009). The effects of arbuscular mycorrhizal fungi on direct and indirect defense metabolites of *Plantago lanceolata* L. *Journal of Chemical Ecology*, 35(7), 833-843.

Frank, A. C., Saldierna Guzmán, J. P., & Shay, J. E. (2017). Transmission of bacterial endophytes. *Microorganisms*, 5(4), 70.

Gao, Q., Jin, K., Ying, S. H., Zhang, Y., Xiao, G.,

Garnica-Vergara, A., Barrera-Ortiz, S., Muñoz-Parra, E., Raya-González, J., Méndez-Bravo, A., Macías-Rodríguez, L., ... & 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 Phytologist*, 209(4), 1496-1512.

Geris, R., & Simpson, T. J. (2009). Meroterpenoids produced by fungi. *Natural product reports*, 26(8), 1063-1094.

Gershenzon, J., & Dudareva, N. (2007). The function of terpene natural products in the natural world. *Nature chemical biology*, 3(7), 408.

Ghisalberti, E. L., Narbey, M. J., Dewan, M. M., & Sivasithamparam, K. (1990). Variability among strains of *Trichoderma harzianum* in their ability to reduce take-all and to produce pyrones. *Plant and Soil*, 121(2), 287-291.

Ghorbanpour, A., Salimi, A., Ghanbary, M. A. T., Pirdashti, H., & Dehestani, A. (2018). The effect of *Trichoderma harzianum* in mitigating low temperature stress in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants. *Scientia horticulturae*, 230, 134-141.

Glick, B. R. (2014). Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological research*, 169(1), 30-39.

Goh, C. H., Vallejos, D. F. V., Nicotra, A. B., & Mathesius, U. (2013). The impact of beneficial plant-associated microbes on plant phenotypic plasticity. *Journal of chemical ecology*, 39(7), 826-839.

González-Pérez, E., Ortega-Amaro, M. A., Salazar-Badillo, F. B., Bautista, E., Douterlungne, D., & Jiménez-Bremont, J. F. (2018). The Arabidopsis-Trichoderma interaction reveals that the fungal growth medium is an important factor in plant growth induction. *Scientific reports*, 8(1), 1-14.

Gopal, M., & Gupta, A. (2016). Microbiome selection could spur next-generation plant breeding strategies. *Frontiers in microbiology*, 7, 1971.

Gravel, V., Antoun, H., & Tweddell, R. J. (2007). Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biology and Biochemistry*, 39(8), 1968-1977.

Greenfield, M., Gómez-Jiménez, M. I., Ortiz, V., Vega, F. E., Kramer, M., & Parsa, S. (2016). *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* endophytically colonize cassava roots following soil drench inoculation. *Biological Control*, 95, 40-48.

Guo, Y., Ghirardo, A., Weber, B., Schnitzler, J. P., Benz, J. P., & Rosenkranz, M. (2019). Trichoderma species differ in their volatile profiles and in antagonism toward ectomycorrhiza *Laccaria bicolor*. *Frontiers in microbiology*, 10, 891.

Gust A., Willmann R., Desaki Y., Grabherr H.M., Nürnberger T. 2012. Plant LysM proteins: modules mediating symbiosis and immunity. *Trends in Plant Science*. (In press).

Han, X., & Kahmann, R. (2019). Manipulation of phytohormone pathways by effectors of filamentous plant pathogens. *Frontiers in plant science*, 10, 822.

Hanada, R. E., de Jorge Souza, T., Pomella, A. W., Hebbar, K. P., Pereira, J. O., Ismaiel, A., & Samuels, G. J. (2008). *Trichoderma martiale* sp. nov., a new endophyte from sapwood of *Theobroma cacao* with a potential for biological control. *mycological research*, 112(11), 1335-1343.

Hanson, L. E., & Howell, C. R. (2004). Elicitors of plant defense responses from biocontrol strains of *Trichoderma viren*. *Phytopathology*, 94(2), 171-176.

Harman, G. E. (2006). Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma spp.* *Phytopathology*, 96(2), 190-194.

Harman, G. E., & Shores, M. (2007). The mechanisms and applications of symbiotic opportunistic plant symbionts. In *Novel biotechnologies for biocontrol agent enhancement and management* (pp. 131-155). Springer, Dordrecht.

Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature reviews microbiology*, 2(1), 43-56.

Heldt, H. W., & Piechulla, B. (2010). *Plant biochemistry*. Academic Press.

Hermosa, R., Rubio, M. B., Cardoza, R. E., Nicolás, C., Monte, E., & Gutiérrez, S. (2013). The contribution of *Trichoderma* to balancing the costs of plant growth and defense. *Int. Microbiol*, 16(2), 69-80.

Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I., & Monte, E. (2012). Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology*, *158*(1), 17-25.

Hodgson, S., de Cates, C., Hodgson, J., Morley, N. J., Sutton, B. C., & Gange, A. C. (2014). Vertical transmission of fungal endophytes is widespread in forbs. *Ecology and evolution*, *4*(8), 1199-1208.

Holland, C. K., & Jez, J. M. (2018). Arabidopsis: the original plant chassis organism. *Plant cell reports*, *37*(10), 1359-1366.

Hossain, M. M., & Sultana, F. (2020). Application and Mechanisms of Plant Growth Promoting Fungi (PGPF) for Phytostimulation. In *Organic Agriculture*. Intech Open.

Hu, G., & Leger, R. J. S. (2002). Field studies using a recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*(12), 6383-6387.

Humphris, S. N., Wheatley, R. E., & Bruce, A. (2001). The effects of specific volatile organic compounds produced by *Trichoderma spp.* on the growth of wood decay basidiomycetes. *Holzforschung*, *55*(3), 233-237.

Hung, R., Lee, S., & Bennett, J. W. (2013). Arabidopsis thaliana as a model system for testing the effect of *Trichoderma* volatile organic compounds. *Fungal ecology*, *6*(1), 19-26.

Hung, R., Lee, S., & Bennett, J. W. (2015). Fungal volatile organic compounds and their role in ecosystems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *99*(8), 3395-3405.

Hütsch, B. W., Augustin, J., & Merbach, W. (2002). Plant rhizodeposition—an important source for carbon turnover in soils. *Journal of plant nutrition and soil science*, 165(4), 397-407.

Insam, H., & Seewald, M. S. (2010). Volatile organic compounds (VOCs) in soils. *Biology and fertility of soils*, 46(3), 199-213.

Jaber, L. R., & Enkerli, J. (2016). Effect of seed treatment duration on growth and colonization of *Vicia faba* by endophytic *Beauveria bassiana* and *Metarhizium brunneum*. *Biological Control*, 103, 187-195.

Jaber, L. R., & Enkerli, J. (2017). Fungal entomopathogens as endophytes: can they promote plant growth?. *Biocontrol science and technology*, 27(1), 28-41.

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.

Jacoby, R., Peukert, M., Succurro, A., Koprivova, A., & Kopriva, S. (2017). The role of soil microorganisms in plant mineral nutrition—current knowledge and future directions. *Frontiers in plant science*, 8, 1617.

Jakubczyk, D., & Dussart, F. (2020). Selected Fungal Natural Products with Antimicrobial Properties. *Molecules*, 25(4), 911.

Jalali, F., Zafari, D., & Salari, H. (2017). Volatile organic compounds of some *Trichoderma spp.* increase growth and induce salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Fungal ecology*, 29, 67-75.

James, E. K., & Olivares, F. L. (1998). Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 17(1), 77-119.

Jaroszuk-Ściśeł, J., Tyśkiewicz, R., Nowak, A., Ozimek, E., Majewska, M., Hanaka, 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. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(19), 4923.

Jones, J. D., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *nature*, 444(7117), 323-329.

Kabaluk, J. T., & Ericsson, J. D. (2007). *Metarhizium anisopliae* seed treatment increases yield of field corn when applied for wireworm control. *Agronomy Journal*, 99(5), 1377-1381.

Kalayu, G. (2019). Phosphate solubilizing microorganisms: promising approach as biofertilizers. *International Journal of Agronomy*, 2019.

Kamalov, L. S., Turgunov, K. K., Aripova, S. F., & Abdilalimov, O. (2018). Gibberillin A-3 from the Microscopic Fungus *Trichoderma harzianum*. *Chemistry of Natural Compounds*, 54(2), 421-422.

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, 151.

Kepler, R. M., Humber, R. A., Bischoff, J. F., & Rehner, S. A. (2014). Clarification of generic and species boundaries for *Metarhizium* and related fungi through multigene phylogenetics. *Mycologia*, 106(4), 811-829.

Khan, A. L., Hamayun, M., Khan, S. A., Kang, S. M., Shinwari, Z. K., Kamran, M., ... & Lee, I. J. (2012). Pure culture of *Metarhizium anisopliae* LHL07 reprograms

soybean to higher growth and mitigates salt stress. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1483-1494.

Kleifeld, O., & Chet, I. (1992). *Trichoderma harzianum*—interaction with plants and effect on growth response. *Plant and soil*, 144(2), 267-272.

Koornneef, M., & Meinke, D. (2010). The development of Arabidopsis as a model plant. *The Plant Journal*, 61(6), 909-921.

Kottb, M., Gigolashvili, T., Großkinsky, D. K., & Piechulla, B. (2015). Trichoderma volatiles effecting Arabidopsis: from inhibition to protection against phytopathogenic fungi. *Frontiers in microbiology*, 6, 995.

Kovacs, D., Kalmar, E., Torok, Z., & Tompa, P. (2008). Chaperone activity of *ERD10* and *ERD14*, two disordered stress-related plant proteins. *Plant physiology*, 147(1), 381-390.

Kredics, L., Szekeres, A., Czifra, D., Vagvoelgyi, C., & Leitgeb, B. (2013). Recent results in alamethicin research. *Chemistry & biodiversity*, 10(5), 744-771.

Kumar, A., & Verma, J. P. (2018). Does plant—microbe interaction confer stress tolerance in plants: a review?. *Microbiological research*, 207, 41-52.

Kupferschmied, P., Maurhofer, M., & Keel, C. (2013). Promise for plant pest control: root-associated pseudomonads with insecticidal activities. *Frontiers in plant science*, 4, 287.

Lê Van, A., Quaiser, A., Duhamel, M., Michon-Coudouel, S., Dufresne, A., & Vandenkoornhuysse, P. (2017). Ecophylogeny of the endospheric root fungal microbiome of co-occurring *Agrostis stolonifera*. *PeerJ*, 5, e3454.

Lee, S., Behringer, G., Hung, R., & Bennett, J. (2019). Effects of fungal volatile organic compounds on *Arabidopsis thaliana* growth and gene expression. *Fungal Ecology*, 37, 1-9.

Lee, S., Yap, M., Behringer, G., Hung, R., & Bennett, J. W. (2016). Volatile organic compounds emitted by *Trichoderma* species mediate plant growth. *Fungal biology and biotechnology*, 3(1), 7.

Leitgeb, B., Szekeres, A., Manczinger, L., Vágvölgyi, C., & Kredics, L. (2007). The history of alamethicin: a review of the most extensively studied peptaibol. *Chemistry & biodiversity*, 4(6), 1027-1051.

Liao, X., Lovett, B., Fang, W., & St Leger, R. J. (2017). *Metarhizium robertsii* produces indole-3-acetic acid, which promotes root growth in *Arabidopsis* and enhances virulence to insects. *Microbiology*, 163(7), 980-991.

Liao, X., O'Brien, T. R., Fang, W., & Leger, R. J. S. (2014). The plant beneficial effects of *Metarhizium* species correlate with their association with roots. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(16), 7089-7096.

Lopez, D. C., & Sword, G. A. (2015). The endophytic fungal entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Purpureocillium lilacinum* enhance the growth of cultivated cotton (*Gossypium hirsutum*) and negatively affect survival of the cotton bollworm (*Helicoverpa zea*). *Biological Control*, 89, 53-60.

Lopez, D. C., & Sword, G. A. 2015. The endophytic fungal entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Purpureocillium lilacinum* enhance the growth of cultivated cotton (*Gossypium hirsutum*) and negatively affect survival of the cotton bollworm (*Helicoverpa zea*). *Biological Control*, 89, 53-60.

Lorito, M., Woo, S. L., Harman, G. E., & Monte, E. (2010). Translational research on Trichoderma: from omics to the field. *Annual review of phytopathology*, 48, 395-417.

Lubna, Asaf, S., Hamayun, M., Gul, H., Lee, I. J., & Hussain, A. (2018). *Aspergillus niger* CSR3 regulates plant endogenous hormones and secondary metabolites by producing gibberellins and indoleacetic acid. *Journal of Plant Interactions*, 13(1), 100-111.

Mantzoukas, S., & Eliopoulos, P. A. (2020). Endophytic Entomopathogenic Fungi: A Valuable Biological Control Tool against Plant Pests. *Applied Sciences*, 10(1), 360.

Masucci, J. D., & Schiefelbein, J. W. (1994). The *rhd6* mutation of *Arabidopsis thaliana* alters root-hair initiation through an auxin- and ethylene-associated process. *Plant physiology*, 106(4), 1335-1346.

Masunaka, A., Hyakumachi, M., & Takenaka, S. (2009). Plant growth-promoting fungus, *Trichoderma koningi* suppresses isoflavonoid phytoalexin vestitol production for colonization on/in the roots of *Lotus japonicus*. *Microbes and environments*, 1102230277-1102230277.

Mathivanan, N., Prabavathy, V. R., & Vijayanandraj, V. R. (2008). The effect of fungal secondary metabolites on bacterial and fungal pathogens. In *Secondary Metabolites in Soil Ecology* (pp. 129-140). Springer, Berlin, Heidelberg.

Matsuda, Y., & Abe, I. (2016). Biosynthesis of fungal meroterpenoids. *Natural product reports*, 33(1), 26-53.

Mazzotta, S., & Kemmerling, B. (2011). Pattern recognition in plant innate immunity. *Journal of Plant Pathology*, 7-17.

Meena, M., Swapnil, P., Zehra, A., Aamir, M., Dubey, M. K., Goutam, J., & Upadhyay, R. S. (2017). Beneficial microbes for disease suppression and plant growth promotion. In *Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological Perspectives* (pp. 395-432). Springer, Singapore.

Meinke, D. W., Cherry, J. M., Dean, C., Rounsley, S. D., & Koornneef, M. (1998). *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science*, 282(5389), 662-682.

Mendoza-Mendoza, A., Zaid, R., Lawry, R., Hermosa, R., Monte, E., Horwitz, B. A., & Mukherjee, P. K. (2018). Molecular dialogues between *Trichoderma* and roots: role of the fungal secretome. *Fungal Biology Reviews*, 32(2), 62-85.

Ment, D., Gindin, G., Soroker, V., Glazer, I., Rot, A., & Samish, M. (2010). *Metarhizium anisopliae* conidial responses to lipids from tick cuticle and tick mammalian host surface. *Journal of invertebrate pathology*, 103(2), 132-139.

Mona, S. A., Hashem, A., Abd_Allah, E. F., Alqarawi, A. A., Soliman, D. W. K., Wirth, S., & Egamberdieva, D. (2017). Increased resistance of drought by *Trichoderma harzianum* fungal treatment correlates with increased secondary metabolites and proline content. *Journal of integrative agriculture*, 16(8), 1751-1757.

Morán-Diez, E., Hermosa, R., Ambrosino, P., Cardoza, R. E., Gutiérrez, S., Lorito, M., & Monte, E. (2009). The ThPG1 endopolygalacturonase is required for the *Trichoderma harzianum*-plant beneficial interaction. *Molecular plant-microbe interactions*, 22(8), 1021-1031.

Morán-Diez, E., Rubio, B., Domínguez, S., Hermosa, R., Monte, E., & Nicolás, C. (2012). Transcriptomic response of *Arabidopsis thaliana* after 24 h incubation with

the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. *Journal of plant physiology*, 169(6), 614-620.

Morgan, J. A. W., Bending, G. D., & White, P. J. (2005). Biological costs and benefits to plant–microbe interactions in the rhizosphere. *Journal of experimental botany*, 56(417), 1729-1739.

Mukherjee, M., Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A., Zachow, C., Berg, G., & Zeilinger, S. (2012). *Trichoderma*–plant–pathogen interactions: advances in genetics of biological control. *Indian journal of microbiology*, 52(4), 522-529.

Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A., & Kenerley, C. M. (2012). Secondary metabolism in *Trichoderma*—a genomic perspective. *Microbiology*, 158(1), 35-45.

Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A., Singh, U. S., Mukherjee, M., & Schmoll, M. (2013). *Trichoderma* in agriculture, industry and medicine: an overview. *Trichoderma biology and applications*. Boston: CAB International, 1-9.

Nair, D. N., & Padmavathy, S. (2014). Impact of endophytic microorganisms on plants, environment and humans. *The Scientific World Journal*, 2014.

Near, J., Abramsky, M., Cohen, D., & Chet, I. (1994). Plant growth enhancement and disease control by *Trichoderma harzianum* in vegetable seedlings grown under commercial conditions. *European journal of plant pathology*.

Nejat, N., & Mantri, N. (2017). Plant immune system: crosstalk between responses to biotic and abiotic stresses the missing link in understanding plant defence. *Signal*, 2, O2.

Neumann, G., & Römheld, V. (2007). The release of root exudates as affected by the plant physiological status. *The Rhizosphere: Biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*, 2, 23-72.

Nguyen, C. (2003). Rhizodeposition of organic C by plants: mechanisms and controls.

Nicaise, V., Roux, M., & Zipfel, C. (2009). Recent advances in PAMP-triggered immunity against bacteria: pattern recognition receptors watch over and raise the alarm. *Plant physiology*, 150(4), 1638-1647.

Nieto-Jacobo, M. F., Steyaert, J. M., Salazar-Badillo, F. B., Nguyen, D. V., Rostás, M., Braithwaite, M., ... & Mendoza-Mendoza, A. (2017). Environmental growth conditions of *Trichoderma spp.* affects indole acetic acid derivatives, volatile organic compounds, and plant growth promotion. *Frontiers in plant science*, 8, 102.

Ownley, B. H., Gwinn, K. D., & Vega, F. E. 2010. Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. *BioControl*, 55(1), 113-128.

Paterson, E., Gebbing, T., Abel, C., Sim, A., & Telfer, G. (2007). Rhizodeposition shapes rhizosphere microbial community structure in organic soil. *New Phytologist*, 173(3), 600-610.

Pava-Ripoll, M., Angelini, C., Fang, W., Wang, S., Posada, F. J., & St Leger, R. (2011). The rhizosphere-competent entomopathogen *Metarhizium anisopliae* expresses a specific subset of genes in plant root exudate. *Microbiology*, 157(1), 47-55.

Pazarlar, S., Cetinkaya, N., Bor, M., & Kara, R. S. (2020). N-acyl homoserine lactone-mediated modulation of plant growth and defense against *Pseudoperonospora cubensis* in cucumber. *Journal of Experimental Botany*.

Pelagio-Flores, R., Esparza-Reynoso, S., Garnica-Vergara, A., López-Bucio, J., & Herrera-Estrella, A. (2017). Trichoderma-induced acidification is an early trigger for

changes in *Arabidopsis* root growth and determines fungal phytostimulation. *Frontiers in Plant Science*, 8, 822.

Petrini, O. (1991). Fungal endophytes of tree leaves. In *Microbial ecology of leaves* (pp. 179-197). Springer, New York, NY.

Pieterse, C. M., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., & Van Wees, S. C. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature chemical biology*, 5(5), 308-316.

Pusztahelyi, T., Holb, I. J., & Pócsi, I. (2015). Secondary metabolites in fungus-plant interactions. *Frontiers in plant science*, 6, 573.

Quin, M. B., Flynn, C. M., & Schmidt-Dannert, C. (2014). Traversing the fungal terpenome. *Natural product reports*, 31(10), 1449-1473.

Rai, M. K., Shende, S., & Strasser, R. J. 2008. JIP test for fast fluorescence transients as a rapid and sensitive technique in assessing the effectiveness of arbuscular mycorrhizal fungi in *Zea mays*: Analysis of chlorophyll *a* fluorescence. *Plant Biosystems*, 142(2), 191-198.

Rajput, R. S., Ram, R. M., Vaishnav, A., & Singh, H. B. (2019). Microbe-based novel biostimulants for sustainable crop production. In *Microbial Diversity in Ecosystem Sustainability and Biotechnological Applications* (pp. 109-144). Springer, Singapore.

Rippa, S., Eid, M., Formaggio, F., Toniolo, C., & Béven, L. (2010). Hypersensitive-Like Response to the Pore-Former Peptaibol Alamethicin in *Arabidopsis Thaliana*. *ChemBioChem*, 11(14), 2042-2049.

Roberts, D. W., & St Leger, R. J. (2004). *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect-pathogenic fungi: mycological aspects. *Advances in applied microbiology*, 54(1), 1-70.

Roberts, Donald W., and Richard A. Humber. "Entomogenous fungi." *Biology of conidial fungi* 2.201 (1981): e236.

Rosmana, A., Sjam, S., Asman, A., Jayanti, N. J., Satriana, S., Padang, A. T., & Hakkar, A. A. (2018). Systemic Deployment of *Trichoderma asperellum* in *Theobroma cacao* Regulates Co-occurring Dominant Fungal Endophytes Colonization. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 12(3), 1071-1084.

Ruocco, M., Lanzuise, S., Vinale, F., Marra, R., Turrà, D., Woo, S. L., & Lorito, M. (2009). Identification of a new biocontrol gene in *Trichoderma atroviride*: the role of an ABC transporter membrane pump in the interaction with different plant-pathogenic fungi. *Molecular plant-microbe interactions*, 22(3), 291-301.

Sáenz-Mata, J., & Jiménez-Bremont, J. F. *HR4* gene is induced in the *Arabidopsis-Trichoderma atroviride* beneficial interaction. *Int. J. Mol. Sci.* 13 (7), 9110-9128 (2012).

Sáenz-Mata, J., Salazar-Badillo, F. B., & Jiménez-Bremont, J. F. (2014). Transcriptional regulation of *Arabidopsis thaliana* *WRKY* genes under interaction with beneficial fungus *Trichoderma atroviride*. *Acta physiologiae plantarum*, 36(5), 1085-1093.

Salazar-Badillo, F. B., Sánchez-Rangel, D., Becerra-Flora, A., López-Gómez, M., Nieto-Jacobo, F., Mendoza-Mendoza, A., & Jiménez-Bremont, J. F. (2015). *Arabidopsis thaliana* polyamine content is modified by the interaction with different *Trichoderma* species. *Plant Physiology and Biochemistry*, 95, 49-56.

Sánchez-Rodríguez, A. R., Barrón, V., Del Campillo, M. C., & Quesada-Moraga, E. (2016). The entomopathogenic fungus *Metarhizium brunneum*: a tool for alleviating Fe chlorosis. *Plant and Soil*, 406(1-2), 295-310.

Sanjaya, Y., Ocampo, V. R., & Caoili, B. L. (2013). Infection Process Of Entomopathogenic Fungi *Metarhizium Anisopliae* In The Tetranychus Kanzawai (Kishida) (Tetranychidae: Acarina). *AGRIVITA, Journal of Agricultural Science*, 35(1), 64-72.

Santi, L., Silva, W. O., Pinto, A. F., Schrank, A., & Vainstein, M. H. (2010). *Metarhizium anisopliae* host–pathogen interaction: differential immunoproteomics reveals proteins involved in the infection process of arthropods. *Fungal Biology*, 114(4), 312-319.

Sasan, R. K., & Bidochka, M. J. (2012). The insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* (*Clavicipitaceae*) is also an endophyte that stimulates plant root development. *American journal of botany*, 99(1), 101-107.

Sattar, M. A., & Gaur, A. C. (1987). Production of auxins and gibberellins by phosphate-dissolving microorganisms. *Zentralblatt für Mikrobiologie*, 142(5), 393-395.

Schalchli H., Tortella G.R., Rubilar O., Parra L., Hormazabal E. & Quiroz A., 2016. Fungal volatiles: an environmentally friendly tool to control pathogenic microorganisms in plants. *Crit. Rev. Biotechnol.* 36(1), 144–152.

Schmidt, R., Cordovez, V., De Boer, W., Raaijmakers, J., & Garbeva, P. (2015). Volatile affairs in microbial interactions. *The ISME journal*, 9(11), 2329-2335.

Schulz-Bohm, K., Martín-Sánchez, L., & Garbeva, P. (2017). Microbial volatiles: small molecules with an important role in intra-and inter-kingdom interactions. *Frontiers in microbiology*, 8, 2484.

Shang, Y., ... & Peng, G. (2011). Genome sequencing and comparative transcriptomics of the model entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum*. *PLoS Genet*, 7(1), e1001264.

Sharma, P. K., & Gothalwal, R. (2017). Trichoderma: a potent fungus as biological control agent. In *Agro-environmental sustainability* (pp. 113-125). Springer, Cham.

Shi, W. L. et al. Cellular and molecular insight into the inhibition of primary root growth of *Arabidopsis* induced by peptaibols, a class of linear peptide antibiotics mainly produced by *Trichoderma* spp. *J. Exp. Bot.* erw 023 (2016).

Siddiquee, S., Cheong, B. E., Taslima, K., Kausar, H., & Hasan, M. M. (2012). Separation and identification of volatile compounds from liquid cultures of *Trichoderma harzianum* by GC-MS using three different capillary columns. *Journal of chromatographic science*, 50(4), 358-367.

Sriram, S., Manasa, S. B., & Savitha, M. J. (2009). Potential use of elicitors from *Trichoderma* in induced systemic resistance for the management of *Phytophthora capsici* in red pepper. *J. Biol. Control*, 23(4), 449-456.

Stefan, M., Munteanu, N., Stoleru, V., Mihasan, M., & Hritcu, L. 2013. Seed inoculation with plant growth promoting rhizobacteria enhances photosynthesis and yield of runner bean (*Phaseolus coccineus* L.). *Scientia Horticulturae*, 151, 22-29. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.12.006>.

Suzuki, W., Sugawara, M., Miwa, K., & Morikawa, M. 2014. Plant growth-promoting bacterium *Acinetobacter calcoaceticus* P23 increases the chlorophyll content of the monocot *Lemna minor* (duckweed) and the dicot *Lactuca sativa* (lettuce). *Journal of bioscience and bioengineering*, 118(1), 41-44.

Szekeres, A., Leitgeb, B., Kredics, L., Antal, Z., Hatvani, L., Manczinger, L., & Vágvölgyi, C. (2005). Peptaibols and related peptaibiotics of *Trichoderma*. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 52(2), 137-168.

Tadych, M., White, J. F., & Moselio, S. (2009). Endophytic microbes. *Encyclopedia of Microbiology*. ed. M. Schaechter, 431-442.

Tahir, H. A., Gu, Q., Wu, H., Raza, W., Hanif, A., Wu, L., ... & Gao, X. (2017). Plant growth promotion by volatile organic compounds produced by *Bacillus subtilis* SYST2. *Frontiers in Microbiology*, 8, 171.

Thrall, P. H., Hochberg, M. E., Burdon, J. J., & Bever, J. D. (2007). Coevolution of symbiotic mutualists and parasites in a community context. *Trends in Ecology & Evolution*, 22(3), 120-126.

Toju, H., Yamamoto, S., Sato, H., & Tanabe, A. S. (2013). Sharing of diverse mycorrhizal and root-endophytic fungi among plant species in an oak-dominated cool-temperate forest. *PloS one*, 8(10), e78248.

Tripathi, P., Singh, P. C., Mishra, A., Chauhan, P. S., Dwivedi, S., Bais, R. T., & Tripathi, R. D. (2013). *Trichoderma*: a potential bioremediator for environmental clean up. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 15(4), 541-550.

Turner, T. R., James, E. K., & Poole, P. S. (2013). The plant microbiome. *Genome biology*, 14(6), 1-10.

Van Der Heijden, M. G., Klironomos, J. N., Ursic, M., Moutoglis, P., Streitwolf-Engel, R., Boller, T., ... & Sanders, I. R. (1998). Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature*, 396(6706), 69-72.

Vinale, F., Nigro, M., Sivasithamparam, K., Flematti, G., Ghisalberti, E. L., Ruocco, M., ... & Woo, S. L. (2013). Harzianic acid: a novel siderophore from *Trichoderma harzianum*. *FEMS microbiology letters*, 347(2), 123-129.

Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Barbetti, M. J., Li, H., ... & Lorito, M. (2008). A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. *Physiological and molecular plant pathology*, 72(1-3), 80-86.

Viterbo, A. D. A., Wiest, A. R. I. C., Brotman, Y., Chet, I. L. A. N., & Kenerley, C. (2007). The 18mer peptaibols from *Trichoderma virens* elicit plant defence responses. *Molecular Plant Pathology*, 8(6), 737-746.

Wang, C., & St Leger, R. J. (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.

White, J. F., Kingsley, K. L., Zhang, Q., Verma, R., Obi, N., Dvinskikh, S., ... & Kowalski, K. P. (2019). Endophytic microbes and their potential applications in crop management. *Pest management science*, 75(10), 2558-2565.

Wonglom, P., Ito, S. I., & Sunpapao, A. (2020). Volatile organic compounds emitted from endophytic fungus *Trichoderma asperellum* T1 mediate antifungal activity, defense response and promote plant growth in lettuce (*Lactuca sativa*). *Fungal Ecology*, 43, 100867.

Woo, S. L., & Pepe, O. (2018). Microbial consortia: promising probiotics as plant biostimulants for sustainable agriculture. *Frontiers in plant science*, 9, 1801.

Wuest, W. M., Sattely, E. S., & Walsh, C. T. (2009). Three siderophores from one bacterial enzymatic assembly line. *Journal of the American Chemical Society*, 131(14), 5056-5057.

Wyrebek, M., Huber, C., Sasan, R. K., & Bidochka, M. J. (2011). Three sympatrically occurring species of *Metarhizium* show plant rhizosphere specificity. *Microbiology*, 157(10), 2904-2911.

Xiong, L., & Zhu, J. K. Abiotic stress signal transduction in plants: molecular and genetic perspectives. *Physiol. Plant.* 112(2), 152-166 (2001).

Yamagiwa, Y., Inagaki, Y., Ichinose, Y., Toyoda, K., Hyakumachi, M., & Shiraishi, T. (2011). *Talaromyces wortmannii* FS2 emits β -caryophyllene, which promotes plant growth and induces resistance. *Journal of General Plant Pathology*, 77(6), 336-341.

Yan, L., Zhu, J., Zhao, X., Shi, J., Jiang, C., & Shao, D. (2019). Beneficial effects of endophytic fungi colonization on plants. *Applied microbiology and biotechnology*, 103(8), 3327-3340.

Yedidia, I., Benhamou, N., & Chet, I. (1999). Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied and environmental microbiology*, 65(3), 1061-1070.

Yedidia, I., Shoshitashvili, M., Kerem, Z., Benhamou, N., Kapulnik, Y., & Chet, I. (2003). Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. lachrymans in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and accumulation of phytoalexins. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(12), 7343-7353.

Yuan, M., Huang, Y., Ge, W., Jia, Z., Song, S., Zhang, L., & Huang, Y. (2019). Involvement of jasmonic acid, ethylene and salicylic acid signaling pathways behind the systemic resistance induced by *Trichoderma longibrachiatum* H9 in cucumber. *BMC genomics*, 20(1), 144.

Zhang, S., Gan, Y., & Xu, B. (2016). Application of plant-growth-promoting fungi *Trichoderma longibrachiatum* T6 enhances tolerance of wheat to salt stress through improvement of antioxidative defense system and gene expression. *Frontiers in plant science*, 7, 1405.

Zhao, H., Lovett, B., & Fang, W. (2016). Genetically engineering entomopathogenic fungi. In *Advances in genetics* (Vol. 94, pp. 137-163). Academic Press.

Zimmermann, Gisbert. "Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*." *Biocontrol Science and Technology* 17.9 (2007): 879-920.

Zou, C., Li, Z., & Yu, D. (2010). *Bacillus megaterium* strain XTBG34 promotes plant growth by producing 2-pentylfuran. *The Journal of Microbiology*, 48(4), 460-466.

Zúñiga, A., Poupin, M. J., Donoso, R., Ledger, T., Guiliani, N., Gutiérrez, R. A., & 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. *Molecular plant-microbe interactions*, 26(5), 546-553.

