



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Instituto de Investigaciones Químico Biológicas

Estudio químico y fisiológico de la interacción

***Zea mays – Trichoderma atroviride* durante el ataque foliar**

por *Spodoptera frugiperda*

TESIS

**Que como requisito parcial para obtener el título
profesional de**

Maestra en Ciencias de Biología Experimental

Presenta

Q.F.B. Sandra Goretti Adame Garnica

Asesora: D. C. Lourdes Iveth Macías Rodríguez

Coasesor: D. C. Hexon Ángel Contreras Cornejo

Morelia, Michoacán, Mayo de 2021



El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Bioquímica Ecológica del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, dependiente de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la dirección de la D.C. Lourdes Iveth Macías Rodríguez y el D.C. Hexon Ángel Contreras Cornejo.

Índice

Resumen	5
Abstract.....	6
1. Introducción	7
2. Antecedentes	8
2.1 “Comunicación química” de la planta con su entorno	8
2.2 El maíz (<i>Z. mays</i>) como cultivo de importancia económica.....	11
2.3 Herbívoros y su reconocimiento hacia la planta huésped	16
2.4 El gusano cogollero del maíz, <i>S. frugiperda</i> y daño en la planta huésped..	17
2.5 Respuesta vegetal ante daño mecánico versus herbivoría	20
2.6 Sistemas de defensa vegetal activados por herbívoros	22
2.6.1 Respuestas de defensa directas	23
2.6.2 Respuestas de defensa indirectas	25
2.7 <i>Trichoderma atroviride</i> en la agricultura orgánica	26
2.7.1 <i>Trichoderma</i> como agente de control biológico.....	28
2.7.2 <i>Trichoderma</i> y su interacción con las plantas	29
2.8 Impacto de <i>Trichoderma</i> en el cultivo del maíz y en la ocurrencia de artrópodos foliares	31
3. Justificación	33
4. Hipótesis	34
5. Objetivo general	34
6. Materiales y métodos	34
6.1 Estrategia general de trabajo	34
6.2 Material biológico	35
6.3 Métodos	36
6.3.1 Establecimiento del sistema <i>in vitro</i> de <i>Zea mays</i>	36
6.3.2 Sistema de interacción <i>in vitro</i> de <i>Z. mays</i> - <i>S. frugiperda</i>	37
6.3.3 Determinación del porcentaje de herbivoría	38
6.3.4 Determinación de pH en los exudados radiculares de maíz	38
6.3.5 Efecto de los exudados radiculares de maíz sobre el crecimiento de <i>Trichoderma atroviride</i>	38
6.3.6 Procesamiento de las muestras y análisis químico por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-SM)	39

6.3.7 Evaluación del crecimiento colonial y esporulación de <i>T. atroviride</i> a diferentes concentraciones de carbohidratos y 6-metoxi-benzoxazolin-2-ona (MBOA)	42
6.3.8 Análisis estadístico.....	43
7. Resultados	44
7.1 Sistema de interacción <i>Zea mays</i> - <i>Spodoptera frugiperda</i>	44
7.2 Daño ocasionado por <i>S. frugiperda</i> en las plantas de <i>Z. mays</i>	45
7.3 El daño mecánico en el follaje y la herbivoría inducen la acidificación del medio de cultivo.....	48
7.4 Los exudados de las plantas expuestas a un daño mecánico en las hojas o al ataque del herbívoro <i>S. frugiperda</i> alteran el crecimiento y esporulación de <i>Trichoderma</i>	50
7.5 La herbivoría foliar causada por <i>S. frugiperda</i> afecta la exudación de carbohidratos en plantas de maíz	53
7.6 La concentración de carbohidratos influye en el crecimiento y esporulación de <i>T. atroviride</i>	57
7.7 La exudación radicular del benzoxazinoide MBOA en las plantas de maíz se incrementa en respuesta a la secreción oral y a la presencia del herbívoro	59
7.8 El compuesto de defensa MBOA no inhibe el crecimiento de <i>T. atroviride</i> ..	62
8. Discusión	64
9. Conclusión.....	77
10. Referencias	78
11. Adenda	98

Resumen

El maíz (*Zea mays*) es un cultivo de gran importancia económica. *Spodoptera frugiperda* es un artrópodo defoliador que en su etapa larvaria puede causar pérdidas económicas muy importantes en el cultivo del maíz. Los hongos del género *Trichoderma* son ampliamente utilizados en la agricultura sustentable por sus efectos benéficos sobre las plantas y el control biológico de fitopatógenos. Recientemente, se reportó que la especie *T. atroviride* influye sobre la respuesta defensiva de las plantas contra el ataque de herbívoros, los hábitos conductuales de *S. frugiperda* y en la atracción de sus enemigos naturales. Sin embargo, se desconoce cuál es el impacto de los exudados radiculares de la planta durante la relación planta-herbívoro sobre el crecimiento de *Trichoderma*. El objetivo de este estudio fue determinar si el ataque foliar de *S. frugiperda* en el maíz modula la exudación radicular de metabolitos primarios y secundarios y por consiguiente el crecimiento y desarrollo reproductivo de *T. atroviride*. Los resultados obtenidos mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas muestran que la composición química de los exudados radiculares del maíz difiere en respuesta a la secreción oral del insecto aplicada en el tejido dañado y al número de artrópodos por planta. Particularmente, la exudación de carbohidratos se redujo significativamente tras la presencia de 4 larvas, lo que afectó el crecimiento del hongo, mientras que con 2 larvas se observó una acidificación y un aumento en la exudación de carbohidratos lo que estimuló el crecimiento y la esporulación de *T. atroviride*. Además, se observó un incremento en la exudación radicular del metabolito 6-metoxi-benzoxazolin-2-ona (MBOA), un benzoxazinoide que participa en la defensa vegetal durante el ataque por insectos herbívoros; aunque el MBOA no afectó el crecimiento del hongo. Los resultados de este estudio mostraron que la relación *Z. mays* - *S. frugiperda* puede afectar el crecimiento y desarrollo reproductivo *T. atroviride*.

Palabra clave: biocontrol, exudados radiculares, herbivoría, defensa, metabolitos

Abstract

Maize (*Zea mays*) is a crop of great economic importance. *Spodoptera frugiperda* is a defoliator arthropod that in its larval stage can cause very important economic losses in the cultivation of maize. Fungi of the genus *Trichoderma* are widely used in sustainable agriculture for their beneficial effects on plants and the biological control of phytopathogens. Recently, it was reported that the species *T. atroviride* influences the defensive response of plants against the attack of herbivores, the behavioral habits of *S. frugiperda* and the attraction of its natural enemies. However, the impact of plant root exudates during the plant-herbivore relationship on *Trichoderma* growth is unknown. The objective of this study was to determine if the foliar attack of *S. frugiperda* in corn modulates the root exudation of primary and secondary metabolites and therefore the growth and reproductive development of *T. atroviride*. The results obtained by gas chromatography coupled to mass spectrometry show that the chemical composition of the root exudates of corn differs in response to the oral secretion of the insect applied to the damaged tissue and to the number of arthropods per plant. In particular, carbohydrate exudation was significantly reduced after the presence of 4 larvae, which affected the growth of the fungus, while with 2 larvae acidification and an increase in carbohydrate exudation was observed, which stimulated growth and sporulation of *T. atroviride*. In addition, an increase in root exudation of the metabolite 6-methoxy-benzoxazolin-2-one (MBOA) was observed, a benzoxazinoid that participates in plant defense during attack by herbivorous insects; although the MBOA did not affect the growth of the fungus. The results of this study showed that the relationship *Z. mays* - *S. frugiperda* can affect growth and reproductive development of *T. atroviride*.

1. Introducción

El maíz (*Zea mays*) es de los cultivos con mayor producción a nivel mundial y se considera como uno de los cereales primarios debido a su gran demanda (FAO, 2017). México es el quinto país productor en el mundo. Sin embargo, este cultivo se ve expuesto a diferentes plagas, una de ellas y de interés económico por las pérdidas que causa es por la forma larvaria del lepidóptero *Spodoptera frugiperda*, también conocido como el “gusano cogollero del maíz”. Este insecto herbívoro ataca el follaje y ocasiona grandes pérdidas productivas (Galarza, 1996). Como consecuencia el productor debe recurrir a métodos para su control y convencionalmente recurre al uso de insecticidas químicos.

El uso indiscriminado de agroquímicos en los campos de producción alimentaria es un problema constante que contamina los suelos y los mantos acuíferos causando serios daños al ambiente. Los plaguicidas son productos químicos industriales ampliamente utilizados en la sociedad moderna. En México en el año 2018 la producción total de plaguicidas fue de 81 mil toneladas de acuerdo a la Encuesta Mensual de la Industria Manufacturera (EMIM) del Instituto Nacional de Estadística y Geografía, lo que posiciona a México en el tercer lugar en producción mundial (EMIN, 2019). Por estas situaciones en los campos cultivables, se buscan estrategias ecológicas y sustentables como el control biológico de microorganismos e insectos plaga.

El género de hongos *Trichoderma* es ampliamente reconocido por su acción en el control de microorganismos fitopatógenos y por la promoción del crecimiento y desarrollo vegetal (Contreras *et al.*, 2009; Suchster y Schmoll, 2010, Macías *et al.*, 2020). Recientemente, se ha establecido la importancia de *Trichoderma* spp. a distintos niveles tróficos; tal es el caso de un estudio en plantas de maíz inoculadas con la especie *T. atroviride* en la que el hongo modificó el patrón de herbivoría de *S. frugiperda* (Contreras *et al.*, 2018a) y estimuló la atracción de su enemigo natural, la avispa endoparásitoide *Campeletis sonorensis* (Contreras *et al.*, 2018b).

Los exudados radiculares contienen fuentes de carbono que permite el crecimiento microbiano y la colonización. Sin embargo, cuando las plantas se encuentran expuestas a algún tipo de estrés, pueden modificar la composición o la concentración de los metabolitos presentes en los exudados en respuesta al estímulo percibido, provocando cambios en la microbiota cercana a la raíz y también sobre las características fisicoquímicas del suelo. De ahí es que surgen las siguientes interrogantes. Si gran parte de los compuestos orgánicos exudados por las raíces son producidos en el follaje de las plantas (Schultz et al., 2013). Entonces: ¿Qué ocurre en los exudados radiculares cuando las plantas de maíz son atacadas en el follaje por insectos herbívoros masticadores como *S. frugiperda* que remueve grandes porciones de tejido foliar? ¿Se afectará la interacción de *Trichoderma* con las raíces de las plantas? y finalmente ¿Cuál es el efecto de los exudados radiculares de las plantas que sufren herbivoría foliar sobre el crecimiento del hongo? Esta tesis se centra en el estudio de la respuesta bioquímica de la planta *Z. mays* al ataque del herbívoro *S. frugiperda* y su efecto sobre el crecimiento del hongo benéfico *T. atroviride*.

2. Antecedentes

2.1 “Comunicación química” de la planta con su entorno

Las plantas como parte de un ecosistema, se consideran organismos sésiles que responden a cambios ambientales modificando su fenotipo, fisiología, metabolismo y mecanismos de señalización endógena (Hancock *et al.*, 2015). Cuando una planta recibe estímulos abióticos como la luz, temperatura, humedad, o bien estímulos bióticos como una agresión por la mordida de un herbívoro chupador de savia o masticador, o la presencia de un microorganismo patógeno, la planta modifica su fisiología empleando señales químicas específicas (biomoléculas como portadores de un mensaje) que le permiten adaptarse y eventualmente reproducirse y terminar su ciclo de vida asegurando así su supervivencia en ese ambiente (Huerta, 2020).

Las señales químicas que las plantas producen en respuesta a cualquier estímulo suelen afectar a otros organismos vecinos. En este contexto, se especula que las plantas actúan como mediadoras de las interacciones multitróficas entre los miembros de las comunidades que habitan arriba y abajo del suelo (Pineda *et al.*, 2010). Hay compuestos que son liberados hacia la rizósfera (volumen de suelo influenciado por las raíces) en forma de exudados radiculares que modulan el crecimiento de las comunidades microbianas; o bien son expulsados hacia la atmósfera como compuestos orgánicos volátiles (COVs) que permiten la atracción de polinizadores o de los enemigos naturales de los herbívoros que actúan en la defensa contra plagas y enfermedades (Hancock *et al.*, 2015).

La naturaleza química de los metabolitos secundarios que las plantas exudan por las raíces es muy diversa y se pueden encontrar compuestos de alto o bajo peso molecular como; azúcares sencillos, polisacáridos, aminoácidos, ácidos orgánicos, ácidos grasos, esteroides, fitohormonas, enzimas, flavonoides, vitaminas, iones, compuestos volátiles y otros diversos grupos de compuestos; mientras que las señales químicas volátiles que producen se encuentran mezclas de terpenos, derivados de ácidos grasos y compuestos aromáticos (Loaiza, 2007). En particular, la importancia de los COVs de plantas radica en que, debido a su naturaleza gaseosa, estos compuestos penetran las membranas actuando de forma rápida y desencadenando diversos procesos bioquímicos y fisiológicos en los organismos que los perciben; así pues, mediante la exudación de compuestos difusibles hacia la rizósfera y la producción de COVs, la planta establece un “diálogo” o “comunicación” química entre los organismos de diferentes niveles tróficos (Tabla 1). De esta forma, se especula que cualquier cambio, alteración o actividad en el área foliar impactará en el área de la rizósfera y viceversa (Burdman *et al.*, 1998).

Tabla 1. Función biológica de algunos compuestos producidos por las plantas durante diversas interacciones ecológicas.			
Clase de compuesto	Ejemplos	Interacciones ecológicas	Referencia
Azúcares	Glucosa Sacarosa	Fuente de carbono para microorganismos en el área de la rizósfera	(Macías-Rodríguez <i>et al.</i> , 2018)
Aminoácidos	Alanina. Leucina	Fuente de carbono y nitrógeno para microorganismos en el área de la rizósfera	(Carvalhais., 2011)
Ácidos orgánicos	Ac. Cítrico Ac. Málico	Fuente de carbono para microorganismos en el área de la rizósfera	(Carvalhais <i>et al.</i> , 2011.)
Terpenos	Pineno Mirceno	Señalización: atracción de enemigos naturales de plagas	(Contreras-Cornejo <i>et al.</i> , 2018a)
Alcaloides	Nicotina	Compuestos de defensa: fitotóxicos para el herbívoro <i>Manduca sexta</i>	Aniszewski, T. (2015)
Flavonoides	Flavonas	Señalización: promover simbiosis	de Rijke, E. <i>et al.</i> , (2006)

Debido a la importancia alimentaria del maíz, es de interés agrícola el conocer como las plantas “perciben e interpretan” los compuestos que producen

otros organismos con los que interactúa y como los convierte en señales internas para generar una respuesta bioquímica ante cada estímulo en particular, ya sea de crecimiento, defensa, alerta a plantas vecinas o de atracción para los enemigos de los insectos herbívoros (Fig. 1).

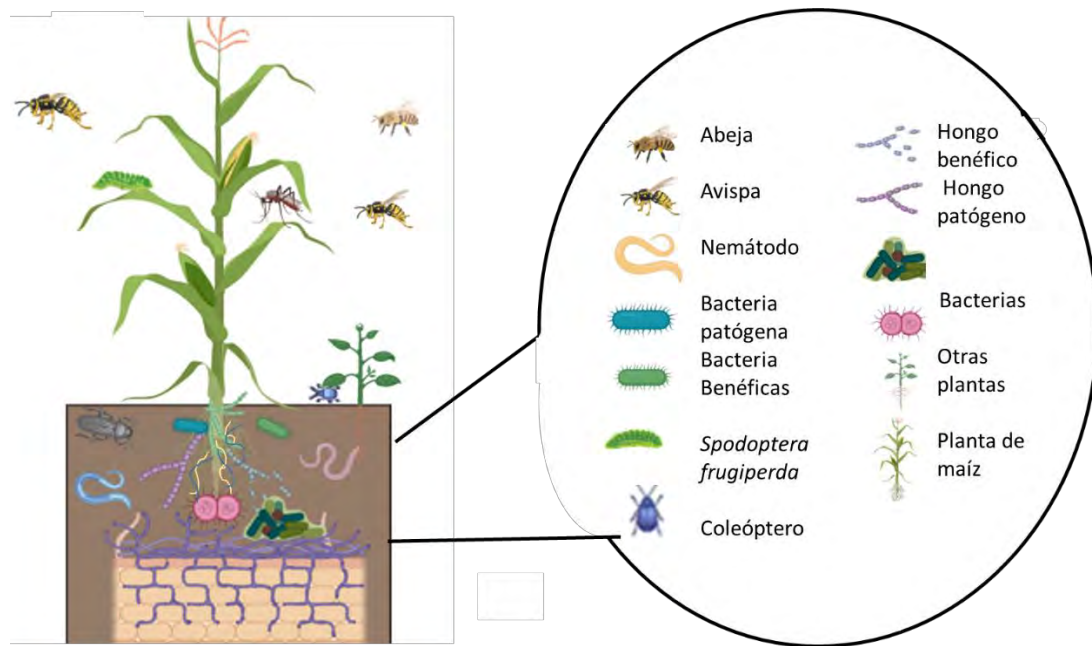


Fig. 1 El maíz en constante interacción con organismos de diferentes niveles tróficos, en el área foliar y área de la rizósfera.

2.2 El maíz (*Z. mays*) como cultivo de importancia económica

El maíz, junto con el trigo y el arroz son cereales muy importantes a nivel mundial, suministran elementos nutritivos a los seres humanos y a los animales, es una materia prima básica de la industria de transformación, con la que se producen almidón, aceite y proteínas, bebidas alcohólicas, edulcorantes alimenticios y, desde hace poco, combustible (Estrada, 1989, FAO, 2017). La planta tierna, empleada como forraje, se ha utilizado con gran éxito en las industrias lácteas y cárnicas, tras la recolección del grano, las hojas secas y la parte superior, incluidas las flores, aún

se utilizan hoy en día como forraje de calidad relativamente buena para alimentar a los rumiantes de muchos agricultores a pequeña escala de los países en desarrollo. Los tallos erectos, que en algunas variedades son resistentes, se utilizan para construir cercas y muros duraderos (FAO, 2017).

Los países en desarrollo dedican más tierras al cultivo del maíz que los países desarrollados. Así, por ejemplo, el rendimiento por hectárea de los Estados Unidos ha aumentado considerablemente desde 1961, en tanto que los de México, Guatemala y Nigeria, países en los que la ingesta de maíz por los habitantes es elevada especialmente en los dos primeros, sólo se ha incrementado ligeramente desde esa fecha. Mientras que la mayor parte de la producción de los países en desarrollo se dedica al consumo humano, la del mundo desarrollado sirve fundamentalmente para la elaboración industrial. En Norte y Centro América, los elevados rendimientos de maíz por hectárea registrado en las estadísticas se deben sobre todo a los Estados Unidos, que producen más que países como México en los que el maíz es el cereal básico más importante (FAO, 2017).

El maíz es uno de los granos alimenticios más antiguos que se conocen, pertenece a la familia de las *Poaceas* (Gramíneas). El maíz se originó mediante un proceso de domesticación que llevaron a cabo los antiguos habitantes de Mesoamérica hace aproximadamente 10, 000 años, a partir de los “teocintles”, gramíneas muy similares al maíz, que crecen de manera natural en México y en parte de Centroamérica. El maíz creció y se adaptó en una parte restringida de México y los tipos más desarrollados se dispersaron posteriormente hacia otros sitios de América. Una de las razas más productivas es el maíz chalqueño. Se caracteriza por sus plantas de porte alto, mazorcas grandes y cónicas con alto número de hileras. Presenta alto vigor de germinación y emergencia, ciclo largo y resistencia a la sequía en etapas medias de crecimiento, producen gran cantidad de biomasa debido a sus plantas vigorosas y mazorcas grandes. Es uno de los cultivos con mayor producción en el centro de México (Cruz, 2020).

El maíz es una planta anual, sus tallos pueden alcanzar de 0,75 a 2,00 m de altura, 3 a 4 cm de grosor, tiene un promedio de 12 a 18 hojas, con una longitud

entre 30 y 150 cm. El sistema radicular es fasciculado y su misión es la de aportar un perfecto anclaje a la planta. En algunos casos sobresalen unos nudos de las raíces a nivel del suelo y en ellos suelen ocurrir raíces secundarias o adventicias. Es en los pelos radiculares del maíz donde se presentará el máximo de absorción del agua y de los nutrientes contenidos en el suelo (Gudiel, 1997).

Para su adecuado desarrollo vegetativo, el maíz requiere abundante agua especialmente en las etapas de su crecimiento inicial (Torregrosa, 1997). La raíz del maíz muestra una estructura radicular compleja comparada con el sistema radicular más simple de otras plantas. En el primer caso, las raíces se forman endógenamente en el embrión y consisten en la raíz primaria y de las raíces escutelares que aparecen durante la germinación. Las raíces escutelares seminales son una parte importante para la captación inicial de agua, nutrientes y para el establecimiento de la plántula en el suelo. Las raíces post-embrionarias se forman después de la germinación y continúan creciendo hasta formar un sistema radicular altamente ramificado en las plantas adultas. El sistema radicular post-embrionario está formado por raíces de corona o nodales (RC) y de raíces aéreas (RA) que surgen tardíamente en los nodos del tallo (Hochholdinger y Feix, 1998; Singh *et al.*, 2010). Las raíces laterales (RL) emergen de los diferentes tipos de raíces (Hochholdinger *et al.*, 2004b). Las raíces escutelares y las raíces de corona forman la estructura de anclaje de la raíz, mientras que las raíces laterales aumentan el área de absorción en el suelo (Grzesiak, 2009).

Las raíces además del anclaje y obtención de nutrimentos también poseen otras funciones que le confieren una importancia vital para la supervivencia y ecología de la planta, por ser además un sitio con una alta actividad fisiológica, dando origen a la síntesis, acumulación y liberación de compuestos, que interfieren en los patrones poblacionales intra e inter especie (Prikryl *et al.*, 1980); a este conjunto de compuestos se denominan exudados radiculares. El sistema radicular en conjunto posee, de manera diferencial, una resaltante habilidad para secretar compuestos de gran diversidad estructural a la rizósfera como una respuesta al estrés o a fluctuaciones de tipo bióticas y abióticas donde estas se encuentran

(Juszczuk *et al.*, 2004). Como consecuencia, la rizósfera es una zona rica en fuente de carbono que abarca desde la superficie de la raíz hasta 2 mm de distancia de ésta donde ocurre una interacción única y dinámica con los microorganismos del suelo.

Ante ciertas situaciones de estrés ambiental, por ejemplo, el crecimiento en suelos con deficiencia en nutrientes, toxicidad por metales pesados, algunas plantas pueden presentar una respuesta fisiológica liberando compuestos que pueden modificar el pH del suelo (protones, bicarbonatos, ácidos orgánicos) o pueden reaccionar exudando ligandos orgánicos (ácidos orgánicos) para solubilizar los nutrientes necesarios para su desarrollo (Sterckeman, 2005; Neumann, 2007). Estos procesos, los cuales son altamente específicos de acuerdo con las especies vegetales, el estatus nutricional de la planta y las condiciones del suelo, pueden modificar la solubilidad y la disponibilidad de elementos traza en el suelo (Evangelou *et al.*, 2006).

La exudación de las plantas de maíz varía dependiendo de las condiciones a las que se enfrenten las plantas, como por ejemplo en situaciones de deficiencia de nutrientes y en suelos contaminados por metales pesados se incrementan la exudación de ácidos orgánicos tal como ácido oxálico, málico, cítrico, fumárico, maléico, succínico, tartárico y acético; y también se reportan fluctuaciones en el contenido de aminoácidos y carbohidratos (Carvalhais *et al.*, 2011; Ibarra, 2011) (Fig. 2).

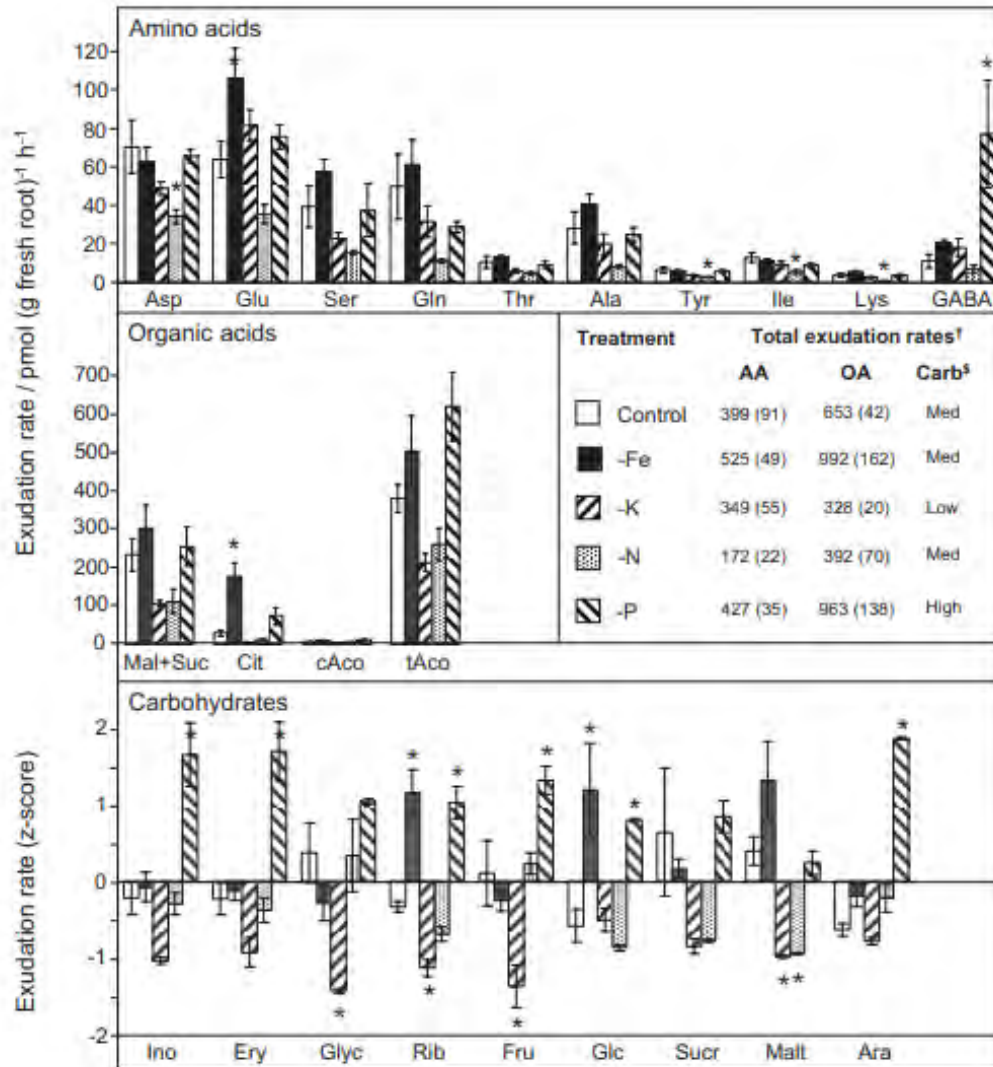


Fig.2 Tasas de exudación de aminoácidos, ácidos orgánicos y carbohidratos liberados por la raíz del maíz bajo deficiencia de hierro (-Fe), potasio (-K), nitrógeno (-N) o fósforo (-P). Para mayor claridad, Asn, His + Gly, Arg, Val, Phe y Leu no se mostraron porque no diferían entre los tratamientos; * denota tratamientos que son significativamente diferentes al control ($p < 5.0\%$ en Tukey HSD prueba). AA denota aminoácidos; OA, ácidos orgánicos; Carb, carbohidratos. † Las tasas de exudación total se muestran en $\text{pmol (g raíz fresca)}^{-1} \text{h}^{-1}$. Las tasas de exudación total de carbohidratos se muestran como puntajes z. Las barras representan medias \pm errores estándar; $n = 4$ (Carvalhais *et al.*, 2011).

El cambio climático en las áreas agrícolas impone la necesidad de generar medidas de adaptación a las nuevas condiciones agroclimáticas que trae consigo este fenómeno. La formación de nuevas variedades de maíz constituye una de las

medidas de adaptación más adecuadas; ya que a través de la selección se solucionan varios problemas que el cambio climático impone sobre el sistema de producción tales como: estrés hídrico y térmico, baja viabilidad del polen, aceleración de la fenología de la planta, baja productividad e incremento en la ocurrencia de plagas, enfermedades y malezas. Entre las plagas que presenta el cultivo de maíz son las siguientes: gusano cogollero (*S. frugiperda*) considerada la plaga de mayor importancia por el gran nivel de daño que provoca, el gusano trozador (*Agrotis ipsilon*) y la chicharrita (*Dalbulus maidis*) (Santana, 2019).

2.3 Herbívoros y su reconocimiento hacia la planta huésped

Las plantas producen una gran cantidad de metabolitos secundarios, principalmente COVs, que afectan el comportamiento de los insectos receptores, entre ellos los insectos fitófagos. En términos generales, los insectos fitófagos requieren alimentarse, ovopositar y refugiarse, por lo que este proceso se da en cuatro fases; las dos primeras son la atrayente y la arrestante y son de carácter olfativo y visual, entonces el insecto busca y es atraído hacia las plantas más susceptibles; las últimas dos fases son la incitante y estimulante que son de carácter gustativo y táctil, en la que el insecto prueba y se establece (Dicke, 1999).

Además, los insectos cuentan con sistemas quimiosensoriales que facilitan la detección de olores químicos en su entorno, para el reconocimiento de sitios de oviposición, fuentes de alimento y para evitar enemigos o daños. La detección de estímulos químicos implica sistemas de detección periféricos para el reconocimiento de compuestos y sistemas centrales de procesamiento para traducir en última instancia la información química en comportamiento (Leal 2013; Grabe y Sachse 2017). Esto comenzó con el descubrimiento de los receptores olfativos (OR) (Vosshall *et al.*, 1999), los receptores gustativos (GR) (Clyne *et al.*, 2000) y los receptores ionotrópicos (IR) (Benton *et al.*, 2009) como proteínas quimiorreceptoras alojadas en las membranas dendríticas de las neuronas sensoriales olfativas (OSN). Se revelo por circuitos olfativos varios cambios en los

niveles periférico y central dando una mayor sensibilidad y atracción de *Drosophila sechellia*, por la fruta *Morinda citrifolia* (Dekker *et al.*, 2006).

De hecho, se ha estudiado que los mosquitos dependen de huellas químicas volátiles, incluidos terpenos, bencenoides y aldehídos, para evaluar la idoneidad de una planta como recurso potencial. Se ha reportado que las hembras como los machos del gusano de la hoja del algodón egipcio - *Spodoptera littoralis* - (Lepidoptera: Noctuidae), utilizan mezclas de compuestos volátiles como el acetato de hexenilo, ocimeno y limoneno para localizar su planta huésped, el algodón- *Gossypium hirsutum* - (Malvales: Malvaceae) (Borrero *et al.*, 2015).

Además de los compuestos volátiles se ha estudiado que las hembras de *S. frugiperda* prefieren ovipositar en áreas ranuradas y picadas en lugar de superficies lisas. La textura de la superficie, además de otras señales, influye en la oviposición de muchas especies de polillas. Dependiendo de las características de sus plantas hospedantes o de la condición óptima dependiente de la especie para la supervivencia de los huevos eligiendo así su planta hospedante (Renwick, 1994).

2.4 El gusano cogollero del maíz, *S. frugiperda* y daño en la planta huésped

El gusano cogollero es una plaga polífaga o generalista, es decir que se alimenta de varios huéspedes, contando con más de 80 especies hospederas. Se cree que este artrópodo es originario de las regiones tropicales del hemisferio occidental, donde es muy conocido por su capacidad de causar severos daños a los cultivos y grandes pérdidas económicas.

El gusano cogollero es considerado como una de las plagas más importantes del maíz en las regiones tropicales y subtropicales nativa de América. En 2016, se detectó *S. frugiperda* por primera vez en África occidental (Goergen *et al.*, 2016) y desde entonces esta plaga se ha extendido rápidamente por todo el continente hasta llegar al continente asiático. Los daños más serios corresponden a las zonas temporales de regiones tropicales y subtropicales (Day *et al.*, 2017).

Las larvas de *S. frugiperda* consumen las estructuras vegetativas y reproductivas de las plantas. Los tejidos epidérmicos de las hojas son preferidos principalmente por las larvas jóvenes y hacen agujeros en las hojas, que es el síntoma de daño peculiar del insecto. Las larvas en etapas más maduras suelen estar presentes en los espirales de las plantas más viejas y pueden alimentarse de mazorcas o granos de maíz, reduciendo el rendimiento y la calidad (Abrahams *et al.*, 2017; Capinera, 2017).

En condiciones ambientales favorables la fecundidad de la plaga es constante (Goergen *et al.*, 2016). Su ciclo biológico comienza cuando la hembra oviposita un promedio de 600 a 1500 huevos a lo largo de su vida, agrupados en masas que promedian los 100 a 150 huevos cada una (Murúa y Virla, 2004a; Murúa *et al.*, 2008). Posteriormente emergen como larvas neonatas que irán creciendo y el período larval dura un promedio de 25 días, pasando generalmente por seis estadios antes de ser prepupas y pupas (Artigas, 1994; Murúa *et al.*, 2003; Murúa y Virla, 2004a; Murúa *et al.*, 2004b). Para completar su desarrollo, las larvas consumen un promedio total de 179,7 cm² de superficie foliar de hojas de maíz y dejan de alimentarse justo antes de alcanzar el último estadio larval (VI). Durante su estadio larval es un insecto masticador con hábito defoliador, las larvas pasan inadvertidas hasta que alcanzan 20 a 25 mm, cuando son detectadas por sus daños, expresados en hojas que ya están perforadas al momento de desplegarse. Para pupar, se entierran en el suelo, entre 3 y 5 cm de profundidad, donde forman una cámara pupal, en la cual permanecen por 10 días aproximadamente, para posteriormente emerger como adultos presentando dimorfismo sexual (Fig. 3) (Murúa y Virla, 2004b).

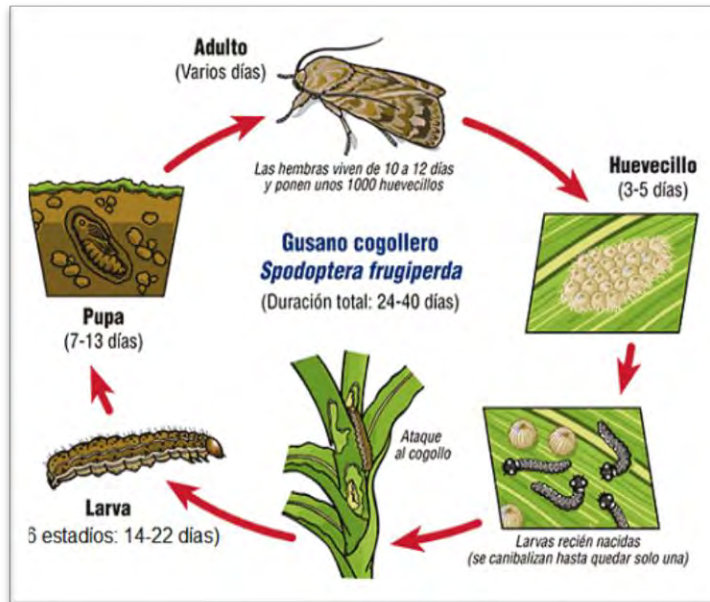


Fig. 3 Desarrollo y duración del ciclo biológico de *Spodoptera frugiperda* (INTAGRI, 2013).

El maíz y otros cultivos alimenticios económicamente importantes como el trigo, sorgo, arroz, alfalfa y algodón, algunas leguminosas como frijol, soya y cacahuate y cultivos hortícolas como papa, cebolla, pepino, col y camote son gravemente dañados por las larvas de *S. frugiperda* (Day *et al.*, 2017), causando grandes pérdidas productivas, económicas y amenazando la seguridad alimentaria.

El cultivo de maíz es afectado en todos sus estados fenológicos, sin embargo, existe una marcada preferencia de las larvas por las plantas más jóvenes (Willink *et al.*, 1993; Murúa *et al.*, 2006). El cogollero hace raspaduras sobre las partes tiernas de las hojas, que posteriormente aparecen como pequeñas áreas translúcidas; una vez que la larva alcanza cierto desarrollo, empieza a comer follaje perfectamente en el cogollo que, al desplegarse, las hojas muestran una hilera regular de perforaciones a través de la lámina o bien áreas alargadas comidas. En esta fase es característico observar los excrementos de la larva en forma de aserrín (Ortiz, 2010).

2.5 Respuesta vegetal ante daño mecánico versus herbivoría

Son múltiples los estímulos que han sido asociados al ataque de herbívoros que colectivamente generan una respuesta en las plantas (Waterman *et al.*, 2019). Si bien toda la herbivoría produce daño en el tejido de la planta, la ruptura del tejido *per se* no siempre es un indicador confiable del ataque de insectos. Por lo tanto, para evitar el gasto de recursos de defensa, las plantas deben diferenciar entre la alimentación del insecto y el daño mecánico simple, como el que causa el viento en condiciones naturales. Existen dos teorías principales para explicar cómo las plantas discriminan la herbivoría por insectos del daño mecánico. La primera es que los insectos causan un daño masivo en el tejido con sus mandíbulas durante la masticación y depositan pistas como la secreción oral (SO), feromonas, heces fecales y secreciones de ovoposición que las plantas reconocen. Esto se apoya en la identificación de varias sustancias del insecto que inducen respuestas de defensa cuando son aplicadas a heridas artificiales como ácidos grasos conjugados con aminoácidos (FACs) (p. ej., volicitina), ácidos grasos sulfatados (p. ej., caeliferinas), los péptidos derivados de plantas llamados inceptinas y enzimas salivales como la β -glucosidasa, glucosa oxidasa (GOX) y varias ATPasas (Schmelz 2006, Buenaventura *et al.*, 2011, Appel *et al.*, 2014). La segunda es que las plantas pueden diferenciar entre heridas mecánicas y herbivoría a través del uso de mecanismos todavía desconocidos que evalúan la cantidad y calidad de tejido dañado (Camarena, 2009), en la que como parte de la complejidad de la respuesta participan elicitores químicos que son clasificados como patrones moleculares asociados al daño (DAMPs) y patrones moleculares asociados a herbívoros (HAMPs) (Acevedo *et al.*, 2015; Waterman *et al.*, 2019).

Por lo tanto, estudios de la relación planta–insecto han demostrado que la alimentación del insecto o la aplicación de SO en los sitios de la herida inducen una respuesta diferente o más intensa en cuanto a la producción de COVs de defensa que el estímulo por daño mecánico (Arimura *et al.*, 2004). Durante la herbivoría, las plantas pueden beneficiarse de la producción específica de COVs que pueden tener diferentes efectos: repelentes de herbívoros, atracción de depredadores de insectos

herbívoros, eventos de señales dentro de la planta que preparan un tejido no infestado para una inducción más rápida de defensa. Debido a la facilidad relativa de la colección de COVs y la naturaleza no destructiva del ensayo, la producción inducida de COVs ha sido utilizada para identificar inductores derivados de insectos de las respuestas de defensa de la planta. Por ejemplo, la volicitina (*N*-17-hidroxinolenoil-L-glutamina), identificada en la SO de *S. exigua* tiene la capacidad de inducir la liberación de COVs de defensa en las plantas de maíz. Este compuesto fue el primer ejemplo de lo que parece ser una amplia producción de FACs por larvas de lepidópteros (Halitschke *et al.*, 2001). Así mismo, se ha utilizado a *Nicotiana attenuata* para estudiar el efecto de los FACs, observándose cambios importantes en el metabolismo de la planta; la que produce inhibidores de proteasa, cambia la expresión de genes y aumenta la producción de nicotina. De hecho, la unión selectiva de volicitina a preparaciones de membrana plasmática de maíz sugiere la existencia de un receptor FAC (Schmelz *et al.*, 2006).

En la familia Solanaceae se han identificado varios componentes involucrados en la transducción de las señales de las heridas causadas por la mordida de un insecto, siendo muchas moléculas con estructuras químicas diferentes las que participan de esta regulación de señales, tal como el oligopéptido sistemina (Pearce *et al.*, 1991), oligosacáridos de la pared celular de las células dañadas (Bishop *et al.*, 1981) y moléculas con actividad hormonal como derivados del ácido jasmónico (AJ) (Farmer y Ryan, 1990), etileno (O'Donnell *et al.*, 1996) y ácido abscísico (Peña-Cortés *et al.*, 1989). La producción de AJ lidera el sistema de defensa contra insectos herbívoros y desempeña un papel central en la acumulación de transcritos que son distintos de los obtenidos por daño mecánico (Vivanco *et al.*, 2005).

Debido a que los insectos masticadores albergan microbios en su saliva, tracto digestivo y en su exoesqueleto, ciertas respuestas pueden ser inducidas únicamente por microbios y, por lo tanto, independientes de compuestos derivados de insectos, estimulación mecánica y heridas. Por ejemplo, los simbiontes bacterianos en la SO del escarabajo de la patata de Colorado (*Leptinotarsa*

decemlineata) y la lombriz del maíz (*Elicoverpa zea*) pueden disminuir las defensas que responden al AJ, incluida la actividad polifenol oxidasa, en comparación con la SO con cantidades menores de bacterias (Wang *et al.*, 2017)

2.6 Sistemas de defensa vegetal activados por herbívoros

Las respuestas de defensa de las plantas de manera general ante el ataque de insectos herbívoros pueden ser constitutivas (que están activas todo el tiempo), o inducidas (se activan tras recibir un ataque o bien al percibir la SO del insecto o un estímulo táctil que requiera de defensa). Las defensas constitutivas incluyen la formación de pelos glandulares (tricomas) y espinas y la producción de metabolitos secundarios conocidos como aleloquímicos que pueden actuar como repelentes, antialimentarios o toxinas. Sin embargo, cuando las plantas no son atacadas por herbívoros, invertir en defensas puede resultar en un evento metabólico muy costoso, ya que los recursos empleados en defensas de este tipo podrían ser utilizados para otras funciones vitales como el crecimiento y la reproducción (Zabala. 2010). Así pues, las plantas para protegerse del ataque por insectos, han desarrollado múltiples mecanismos defensivos que se pueden agrupar en dos estrategias principales (Hunter, 2003). i) Respuestas de defensa directa que actúan sobre el herbívoro mediante la inadecuación nutricional, disuasión o toxicidad de compuestos que son producidos por la planta durante el ataque y ii) respuestas de defensa indirecta que implica la emisión de COVs que, si bien no afectan directamente a los atacantes, atraen a los enemigos naturales del herbívoro (depredadores y parasitoides), como se muestra en los ejemplos citados en la Tabla 2 (Campbell y Duffey, 1979; Zavala, 2010).

Tabla 2. Artrópodos que atacan el follaje de plantas de maíz y sus enemigos naturales.

Herbívoro	Enemigo natural	Signos y síntomas	Referencia
<i>Agrotis ipsilon</i>	<i>Phoenoserpus pallipes</i>	Destruyen las raíces y el tallo en plántulas	(Landeró <i>et al.</i> , 1997)
<i>Plutella xylostella</i>	<i>Diadegma insulare</i>	Masticadora del área foliar	(Shelton <i>et al.</i> , 1995)
<i>Brevicoryne brassicae</i>	<i>Diaretiella rapae</i>	Succión de savia en hojas y como consecuencia se produce un enrollamiento hacia arriba de las hojas	(Matínez <i>et al.</i> , 2006)
<i>Spodoptera frugiperda</i>	<i>Campoletis sonorensis</i>	Masticador del área foliar.	(García <i>et al.</i> , 2012)

2.6.1 Respuestas de defensa directas

El primer nivel de respuesta en las plantas ante el ataque de un insecto herbívoro es local y los efectos posteriores son sistémicos, se manifiestan a distancia y preparan a tejidos y órganos elevando las defensas constitutivas (Vivanco *et al.*, 2005). Como parte de la primera línea de defensa, se encuentran las defensas físicas (estructurales) que están presentes en la pared celular como celulosa, lignina y otros polisacáridos complejos y se consideran como disuasivas. Por ejemplo, las altas concentraciones de lignina se han correlacionado con una mayor resistencia contra el barrenador europeo del maíz y gusano cogollero (Hedin *et al.*, 1996).

Cuando la planta percibe el ataque, se activan varias cascadas de señalización de forma local y sistémica que resultan en la activación de la defensa vegetal, incluyendo la producción de especies reactivas de oxígeno, Ca^{+2} , defensa hormonal y producción de metabolitos especializados (Waterman *et al.*, 2019). Las fitohormonas son elementos muy importantes en la modulación de las defensas vegetales (Pieterse *et al.*, 2012). Está bien establecido que las respuestas de las plantas al estrés biótico, como el ataque de herbívoros y patógenos, están reguladas

principalmente por fitohormonas como lo son el ácido jasmónico (AJ) y el ácido salicílico (AS). La vía dependiente de AS es inducida por (y principalmente efectiva contra) patógenos biotróficos e insectos que se alimentan de floema, mientras que la vía dependiente de AJ es inducida principalmente por patógenos necrotrofos e insectos masticadores (Walling, 2000; Glazebrook, 2005; Pozo *et al.*, 2005; de Vos *et al.*, 2005; Pieterse *et al.*, 2012).

Una de las defensas contra insectos reguladas por el AJ es la inducción local y sistémica de inhibidores de proteasas digestivas. Estas proteínas inhibidoras, al ser ingeridas por los insectos, inhiben la actividad de las enzimas (proteasas) encargadas de digerir las proteínas y disminuyen la asimilación de amino ácidos por parte del insecto afectando la supervivencia, la tasa de crecimiento y la fecundidad de las larvas (Blanco-Labra, *et al.*, 2002).

Además de las defensas físicas, las plantas utilizan metabolitos secundarios como parte de las defensas químicas contra los ataques de herbívoros, por ejemplo, los benzoxazinoides (BX) que son compuestos de defensa derivados del indol y son producidos por un pequeño número de cultivos de gramíneas (Poaceae) relevantes en la agricultura, como el maíz, trigo y centeno (Frey *et al.*, 1997; Niemeyer, 2009), y en especies dicotiledóneas dispersas. Estos metabolitos se acumulan principalmente en tejidos vegetales intactos como glucósidos. Los BX poseen bajo peso molecular y sus glucósidos correspondientes se almacenan biológicamente inactivos en el tejido intacto, y luego se activan enzimáticamente por una β -glucosidasa para formar compuestos tóxicos bioactivos después del daño del tejido por un herbívoro atacante (Halkier y Gershenzon, 2006; Morant *et al.*, 2008). La aglicona resultante es típicamente más reactiva que el glucósido original y, en consecuencia, presenta una mayor toxicidad. Además, su polaridad más baja facilita la difusión a través de las membranas celulares y la penetración en las células herbívoras donde a menudo se ejerce la toxicidad. Para evitar la activación incontrolada e innecesaria, los dos componentes del sistema defensivo (la protoxina glucosilada y la β -glucosidasa activadora) se mantienen separados espacialmente dentro de la célula vegetal y tras la pérdida de la integridad del tejido

por causa del herbívoro, estas moléculas se encuentran y dan lugar a la liberación de benzoxacinoides activos (Halkier *et al.*, 2006; Morant *et al.*, 2008).

2.6.2 Respuestas de defensa indirectas

Como parte de las defensas indirectas de las plantas, se incluye la emisión de COVs que es utilizada para la atracción de enemigos naturales de los artrópodos herbívoros (Schoonhoven. *et al.*, 2005). Estos COVs son en su mayoría terpenos, compuestos orgánicos que provienen del isopreno, que es un hidrocarburo con cinco átomos de carbono. Su precursor principal es el ácido mevalónico, a su vez proveniente del acetyl coenzima A. Estos compuestos tienen funciones primordiales en las plantas como pigmentos fotosintéticos (carotenoides), acarreadores de electrones (ubiquinona y plastoquinona), fitohormonas o reguladores de crecimiento y desarrollo (giberelinas), en la glicosilación de proteínas (dolicol) o como elementos estructurales y funcionales de la membrana celular, también se han encontrado como compuestos claves de comunicación durante la herbivoría como defensa en las plantas (Shrader y Bohlman, 2015).

Es interesante destacar que el AJ regula la activación no solo de las defensas directas, sino también las indirectas como la emisión de COVs coordinando la defensa contra los insectos herbívoros. Tanto los insectos depredadores como los parasitoides tienen receptores que pueden detectar los diferentes COVs que emiten las plantas (Zavala *et al.*, 2004). El AJ, moléculas relacionadas y sus derivados, son llamados colectivamente jasmonatos (AJs), y son moléculas de origen lipídico de estructura molecular similar a la de las prostaglandinas animales (Farmer, 2003; Howe, 2004). Los AJs actúan como moléculas señal de las respuestas de las plantas a diversas situaciones de estrés y participan en diversos procesos del crecimiento y desarrollo (Avanci *et al.*, 2010; Ting, 2014). Los AJs son formados a partir del ácido graso no saturado linoleico y linolénico que se liberan desde los fosfolípidos de las membranas celulares por la acción de lipasas, mecanismo que ocurre principalmente en las hojas de las plantas (Jordán y Casaretto, 2006). El AJ es producido por la planta después del daño

producido por un microorganismo patógeno o por un insecto y da como resultado un incremento de la producción de compuestos de resistencia, como el AS y etileno (Chávez *et al.*, 2012).

2.7 *Trichoderma atroviride* en la agricultura orgánica

La agricultura orgánica es un sistema que trata de evitar el uso directo o rutinario de plaguicidas químicos muy solubles y todo tipo de biocidas, sean o no de origen natural o imitación de los naturales. En el caso de hacerse necesario el uso de dichos materiales o sustancias, se utilizan los que tengan un menor impacto ambiental a todos los niveles (Lampkin, 1998). El suelo es una fuente importante de microorganismos que han sido ampliamente estudiados para procesos biotecnológicos, contándose entre estos el control biológico de enfermedades en plantas (Fravel, 2005). Los productos de biocontrol se clasifican en cuatro clases principales, que incluyen macroorganismos, microorganismos, productos semioquímicos y sustancias naturales procedentes de plantas, algas, microorganismos, fuentes animales o minerales (Ravensberg *et al.*, 2015) que se encargan de mantener un equilibrio entre las poblaciones de las diferentes especies en un ambiente determinado.

Entre los microorganismos nativos del suelo, *Trichoderma* ha sido ampliamente estudiado y se ha utilizado como agente de control biológico (Howell *et al.*, 2003). *Trichoderma* es un hongo filamentoso de la división *Ascomycetes*, anaerobio facultativo que está presente en todo tipo de suelos agrícolas y ecosistemas, su versatilidad, adaptación y fácil manipulación ha permitido su uso por más de 70 años como antagonista para el control de enfermedades en plantas producidas por hongos patógenos en el mundo. *Trichoderma* es un hongo invasor oportunista, que se caracteriza por su rápido crecimiento, por la capacidad de asimilar una amplia gama de sustratos y por la producción de una variedad de compuestos antimicrobianos (Verma *et al.*, 2007; Vinale *et al.*, 2008). En particular, *T. atroviride* es un hongo saprófito benéfico que coloniza la raíz, promueve el crecimiento vegetal y ayuda a la supervivencia de la planta al proporcionar una

barrera inicial de defensa contra el ataque de patógenos (Hoyos *et al.*, 2009). La protección de *Trichoderma* ha sido reportado para varias plantas de interés agrícola, incluido el maíz, donde además se ha observado que induce las respuestas de defensa en la planta frente al ataque de herbívoros foliares como *S. frugiperda* y participa en la atracción de su enemigo natural *C. sonorensis* (Contreras *et al.*, 2018; Contreras *et al.*, 2009). El éxito de *Trichoderma* como agente de biocontrol es por su alta capacidad reproductiva, habilidad para sobrevivir en ambientes desfavorables, eficiencia de utilizar los nutrientes y capacidad para modificar la rizósfera (Benites y Rincon, 2004). La germinación de los conidios (esporas asexuales) está mediada por el tipo de enlace que presenta la fuente de carbono la cual puede ser un disacárido o un polisacárido, sobre los cuales actuarán enzimas como amilasas, celulasas, peptinasas, quitinasas, α -glucosidasas, endo y exoglucanasas que realizan la hidrólisis de los azúcares para iniciar a la germinación (Cucuk *et al.*, 2008). *Trichoderma* es un hongo que se caracteriza por su rápido crecimiento sobre diversos sustratos, donde dependiendo de diferentes factores se puede ver beneficiada su esporulación (Fig.4). La principal forma para inducir la esporulación del hongo es exponiéndolo a periodos de luz, para generar un estrés e inducir su conidiogénesis (Chávez *et al.*, 2008).

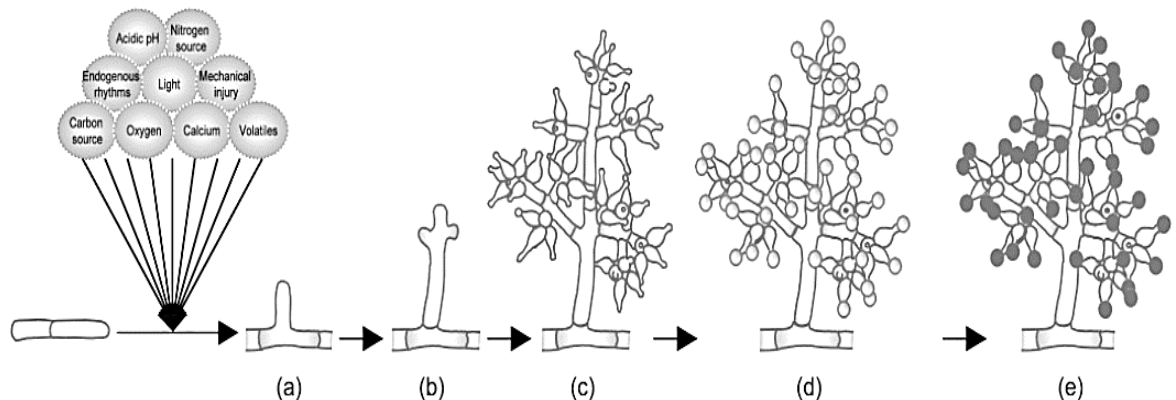


Fig. 4. Conidiogénesis de *Trichoderma* siguiendo la percepción de diferentes estímulos. (a) Aparición de hifas verticales, (b) ramificación de hifas, (c) desarrollo de filidas, (d) aparición de conidios hialinos, (e) maduración de la pigmentación (Steyaert *et al.*, 2010b).

2.7.1 *Trichoderma* como agente de control biológico

Trichoderma tiene una gran capacidad de proliferar en el suelo y como agente de biocontrol actúa por competencia por nutrientes contra microorganismos; y a su vez, su efecto antagónico está relacionado con la antibiosis, micoparasitismo, producción de enzimas, así como cambios en el pH de la rizósfera (Benítez *et al.*, 2004; Contreras *et al.*, 2016).

Competencia por nutrientes. El biocontrol se vuelve más efectivo cuando hay escasez de nutrientes (Tjamos *et al.*, 1992). Por ejemplo, la absorción de hierro es esencial para la viabilidad celular y *Trichoderma* produce sideróforos altamente eficientes que quelan el hierro y detienen el crecimiento de otros fitopatógenos fúngicos (Eisendle M *et al.*, 2004). Además, *Trichoderma* tiene una capacidad superior para movilizar y absorber los nutrientes del suelo en comparación con otros organismos. El uso eficiente de los nutrientes disponibles se basa en la capacidad de *Trichoderma* para generar ATP a partir del metabolismo de diferentes azúcares, como los derivados de los polímeros celulosa, glucano y quitina, entre otros (Chet *et al.*, 1997). Una especie muy estudiada es *T. atroviride* que en un sistema de interacción tripartita modula la exudación radicular de carbohidratos para su crecimiento y además compite por el espacio y nutrientes con *Phytophthora cinnamomi* estimulando el crecimiento de plántulas de jitomate (*Solanum lycopersicum*) (Macías *et al.*, 2018).

Antibiosis. La mayoría de las cepas de *Trichoderma* producen antibióticos o metabolitos tóxicos volátiles y no volátiles que impiden el establecimiento de microorganismos patógenos. Entre estos metabolitos, se ha descrito la producción de ácido harzianico, alameticinas, tricholinas, peptaiboles, 6-pentil- α -pirona, massoilactona, viridina, gliovirina, glisopreninas, ácido heptelídico y otros (Vey *et al.*, 2001).

Micoparasitismo. Este mecanismo se refiere al ataque directo de *Trichoderma* sobre otro hongo y es un proceso muy complejo que involucra eventos secuenciales, que incluyen el reconocimiento, el ataque y la posterior penetración y

muerte del huésped (Carsolio, *et al.*, 1999). *Trichoderma* puede ejercer un biocontrol directo parasitando una variedad de hongos, que después de detectar su presencia, crece hacia ellos. La teledetección se debe en parte a la expresión principalmente de quitinasas, glucanasas y proteasas (Harman *et al.*, 2004). La producción de estas enzimas líticas extracelulares degrada las paredes celulares del hospedante y posibilitan la penetración de las hifas del antagonista. Por los puntos de contacto donde se produce la lisis, aparecen los orificios por donde penetra la hifa del micoparásito. La actividad enzimática en *Trichoderma* ha sido estudiada extensamente, así como las posibles funciones que desenvuelven en el micoparasitismo (Infante, 2009).

2.7.2 *Trichoderma* y su interacción con las plantas

La colonización de las raíces por *Trichoderma* es un proceso natural durante la interacción del hongo con las plantas. Las colonizaciones suelen ser duraderas y robustas sobre los tejidos radiculares, llegando incluso a penetrar la epidermis y la corteza (Valero *et al.*, 2007). Estos hongos crecen intracelularmente en los tejidos externos de la raíz e inducen la acumulación de compuestos fenólicos en el sitio colonizado, esta reacción limita que *Trichoderma* penetre más en el tejido radicular. Esta asociación raíz-hongo, causa importantes cambios en el proteoma y metaboloma de la planta que, dependiendo del tipo de metabolito, afectan la fisiología de la planta, la defensa y las respuestas al estrés (Godes *et al.*, 2007; Valero *et al.*, 2007).

El beneficio de *Trichoderma* hacia las plantas se debe a que actúa por diferentes mecanismos. Uno de ellos involucra la producción de diversas sustancias que impactan de forma positiva en las plantas tal como la auxina ácido indol acético (AIA) y COVs que modulan el crecimiento y desarrollo vegetal o bien activan mecanismos de defensa como ISR (Martínez *et al.*, 2017). Adicionalmente, incrementan la adaptación al estrés abiótico mediante la solubilización de nutrientes y la producción de ácido abscísico (Contreras-Cornejo *et al.*, 2015. Martínez *et al.*, 2017; Medeiros *et al.*, 2017)

Un aspecto importante de la presencia de *Trichoderma* en el suelo es que causa cambios de pH. La acidificación de la rizósfera favorece la solubilización de nutrientes aumentando la capacidad de captación de moléculas importantes para el desarrollo y crecimiento de las plantas, además acondicionan el medio para que diferentes patógenos susceptibles a un ambiente ácido no prosperen (Infante, 2009; Contreras-Cornejo *et al.*, 2016, Pelagio-Flores *et al.*, 2017); e interesantemente, algunas cepas de *T. harzianum* controlan estrictamente el pH externo, asegurando valores óptimos para sus propias enzimas secretadas (McIntyre *et al.*, 2004).

Trichoderma aporta otros beneficios a las plantas a través de la descomposición de materia orgánica, esto permite la liberación de nutrientes en formas inmediatamente disponibles (Howell *et al.*, 2003); y por medio de la actividad solubilizadora de fosfatos (Valero *et al.*, 2007). Además, al colonizar las raíces de las plantas libera factores de crecimiento (auxinas, giberelinas y citoquininas) que estimulan la germinación y el desarrollo de las plantas (Altomare *et al.*, 1999). Particularmente, *T. harzianum* ha sido destacado como promotor del crecimiento vegetal en cultivos de berenjena, frijol, café, tomate, papa y especies forestales, entre otros (Valencia *et al.*, 2007).

El papel de los COVs liberados por *Trichoderma* como responsables de diversos tipos de actividad ha sido tema de estudio en los últimos años. Así, se han identificado alcohol isobutílico, alcohol isopentílico y 3-metilbutanal que se han asociado con la promoción del crecimiento de *Arabidopsis thaliana* (Hung *et al.*, 2013). También se ha detectado la presencia de la lactona 6-pentil-2H-piran-2-ona (6-PP) en *T. atroviride* que modula el mecanismo de señalización de las auxinas (Garnica-Vergara *et al.*, 2016) y esta lactona a su vez, identificada en el perfil de volátiles de *T. viride* presentó actividad nematocida (Yang *et al.*, 2012)

2.8 Impacto de *Trichoderma* en el cultivo del maíz y en la ocurrencia de artrópodos foliares

Akladious y Abbas (2012) investigaron la acción favorable de *T. harzianum* en el crecimiento de la longitud radical, así como aumento en el peso seco total en plantas de *Z. mays*. Además, se ha determinado que *T. harzianum* en *Z. mays* causo un efecto positivo en la germinación con un 92% diferente al 81% en *Z. mays* sin inocular ya que, degradan la capa que recubre el endospermo de la semilla, lo que facilita la emergencia del primordio del tallo y raíz (Kucera *et al.*, 2005, Tavera *et al.*, 2017). *Trichoderma harzianum* aumentan la longitud y el diámetro de las mazorcas y aumento el numero raíces secundarias y desarrollo radical (Castillo *et al.*, 2007, López *et al.*, 2010).

Si bien existen diversos estudios sobre el efecto de *Trichoderma* en el rendimiento del maíz, son pocos los que resaltan el impacto del hongo sobre la ocurrencia de artrópodos foliares. El estudio de las interacciones multitróficas en el medio ambiente es fundamental para comprender los servicios y las colaboraciones del ecosistema (sinergias y antagonismos) entre organismos con potencial aplicación como agentes de biocontrol que podrían interactuar a diferentes niveles tróficos. Como se mencionó anteriormente, las plantas de maíz son atacadas por insectos herbívoros masticadores como el gusano cogollero. Este artrópodo ataca severamente las plantas en diferentes etapas de desarrollo lo que induce importantes pérdidas a nivel agrícola. Para disminuir el ataque de los insectos masticadores en campo se utilizan plaguicidas químicos que en muchos casos son tóxicos para la salud de los agricultores, contaminan los suelos agrícolas, las materias primas y alteran la biota natural de los agroecosistemas, por lo que el uso de agentes de biocontrol es una alternativa sustentable para disminuir el uso indiscriminado de agroquímicos. Así pues, un estudio reciente menciona el efecto de la inoculación en campo de *T. harzianum* en maíz y cómo influye sobre la comunidad de artrópodos asociada al follaje, reduciendo la abundancia de herbívoros (Contreras-Cornejo *et al.*, 2019).

En estudios previos se ha demostrado que la presencia del hongo favorece la emisión de COVs emitidos de manera constitutiva y algunos otros inducidos que permiten la supervivencia de la planta en la naturaleza; tal es el caso de metil salicilato (MeSA), metil jasmonato (MeJA), los volátiles de hoja verde (VHV) y los terpenos de bajo peso molecular como mono- (C10) y sesquiterpenos (C15) (De Moraes *et al.*, 2001; Arimura *et al.*, 2004; Heil, 2014; McCormick *et al.*, 2014). De estos COVs, se conoce que los terpenos están involucrados en la atracción de múltiples parasitoides y depredadores durante el ataque de herbívoros de maíz (Schnee *et al.*, 2006).

Particularmente, se ha demostrado que la especie *T. atroviride* induce mecanismos de resistencia contra el estrés al que es sometido la planta por el ataque de herbívoros foliares como *S. frugiperda* (Contreras *et al.*, 2018a). En este estudio, durante la interacción tripartita *Z. mays*-*T. atroviride*-*S. frugiperda* se incrementó la producción de AJ y al evaluar el porcentaje de larvas alimentándose, número de heridas y área foliar consumida en plantas de maíz sometidas al ataque por *S. frugiperda* se observó que las plantas inoculadas con *T. atroviride* tenían mayor resistencia a la herbivoría y a las características típicas de la herbivoría (Contreras *et al.*, 2018a). Además, se observó que en una interacción multitrófica planta-hongo-insecto, se incrementa la producción de COVs en comparación con una interacción bipartita ya sea hongo- planta o insecto-planta.

En otro estudio, se probó que la 6-PP producida por *T. atroviride* disminuyó el ataque de *S. frugiperda*, pero adicionalmente indujo la atracción de avispas hembra de *C. sonorensis*, uno de los enemigos naturales de este herbívoro. Estos hallazgos proporcionan conocimientos sobre la comunicación química entre hongos e insectos y probablemente la 6-PP representa una molécula de señalización inter-reino ya que se demostró que el parasitismo del herbívoro de maíz *S. frugiperda* por la avispa parasitoide *C. sonorensis* aumentó un 50% después de la inoculación de las raíces de maíz con *T. atroviride* (Contreras *et al.*, 2018b). Con esta información se revela que los agentes de control biológico del género *Trichoderma* son

microorganismos con gran potencial para ser estudiados y aplicados como bioinoculantes en los agroecosistemas (Pineda *et al.*, 2010).

Es interesante el hecho de que existen estudios recientes sobre la relación benéfica de *Trichoderma* con las plantas de maíz incluso durante la herbivoría por artrópodos foliares, sin embargo, es de destacarse que se desconoce si la presencia de un insecto herbívoro en el follaje pudiera impactar de forma negativa en la colonización y el desarrollo reproductivo del hongo.

3. Justificación

El maíz se encuentra expuesto al ataque de diferentes artrópodos herbívoros. La presencia del agente de control biológico *Trichoderma* en la rizósfera del maíz altera la comunidad de artrópodos foliares asociados al cultivo y particularmente, altera el patrón de alimentación del herbívoro *Spodoptera frugiperda*. Sin embargo, se desconoce si el perfil químico de los exudados radiculares de las plantas de maíz varía debido al ataque de artrópodos foliares y el impacto que esto pueda tener sobre el crecimiento de *T. atroviride*. Este conocimiento es relevante, ya que la inoculación de *Trichoderma* es una alternativa sustentable para reemplazar el uso indiscriminado de agroquímicos.

4. Hipótesis

El insecto herbívoro *S. frugiperda* induce cambios en la exudación radicular de compuestos en las plantas de maíz (*Z. mays*) que afectan el crecimiento de *T. atroviride*

5. Objetivo general

Analizar los exudados radiculares que produce la planta de maíz (*Zea mays*) en respuesta al ataque de *Spodoptera frugiperda* y evaluar su efecto sobre el crecimiento de *Trichoderma atroviride*

Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de los exudados radiculares del maíz durante el ataque foliar por *S. frugiperda* sobre el crecimiento de *T. atroviride*
2. Determinar si el reconocimiento de la secreción oral en el sitio de daño influye en la exudación radicular y el crecimiento del hongo
3. Analizar el perfil químico de los exudados radiculares de las plantas de maíz infestadas por el herbívoro

6. Materiales y métodos

6.1 Estrategia general de trabajo

Para determinar el efecto del daño por herbivoría en las plantas de maíz en el desarrollo reproductivo del *T. atroviride*, se siguió la siguiente estrategia experimental. Las plantas de maíz a 15 días de crecimiento se sometieron a los siguientes tratamientos (Fig. 5):

- **C:** control
- **2L:** se colocaron 2 larvas de *S. frugiperda* en estadio L3.
- **4L:** se colocaron 4 larvas de *S. frugiperda* en estadio L3.

- **DM:** daño mecánico en el área foliar con bisturí realizando las heridas similares a las producidas por la herbivoría de *S. frugiperda*.
- **DM + SO:** daño mecánico en el área foliar con bisturí realizando las heridas similares a las producidas por la herbivoría de *S. frugiperda* más 5 µL de secreción oral de larvas de *S. frugiperda* sobre la herida.

Los exudados radiculares de cada tratamiento se recolectaron para realizar bioensayos *in vitro* con *T. atroviride* y determinar su efecto sobre el crecimiento fúngico. Adicionalmente, los exudados se analizaron por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-SM)

Diagrama general de trabajo

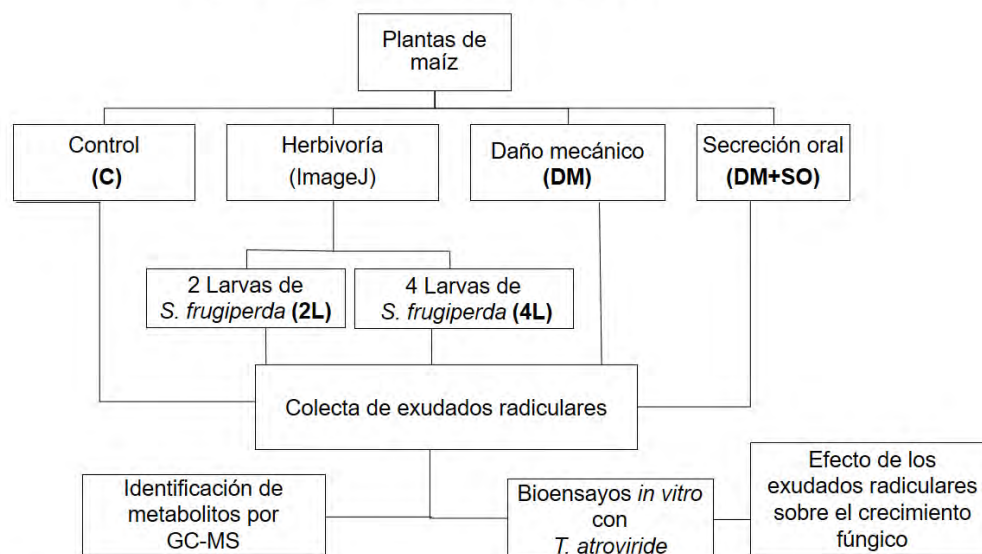


Fig 5. Estrategia general de trabajo

6.2 Material biológico

Este estudio se llevó a cabo en plantas de maíz, variedad chalqueño, donada por el laboratorio de Transducción de Señales de Plantas a cargo del Dr. Homero

Reyes de la Cruz, del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas (IIQB) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

La cepa fúngica fue *T. atroviride* IMI 206040 cuyas esporas se reactivaron y crecieron en agar papa dextrosa (PDA) para su uso posterior.

Las larvas de *S. frugiperda* estadio L3 fueron donadas por el Dr. Alfonso Luna Cruz adscrito al IIQB y su crecimiento fue en ambiente controlado con dieta artificial.

6.3 Métodos

6.3.1 Establecimiento del sistema *in vitro* de *Zea mays*

Las semillas de maíz se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 50 % en agitación constante por 10 min. Posteriormente se enjuagaron tres veces con agua estéril por 3 min y se adicionó etanol al 70% por 10 min; se mantuvo en agitación constante y finalmente se enjuagaron tres veces con agua estéril. Las semillas se colocaron en cajas de Petri con algodón humedecido con agua y en oscuridad por 48 h. Al cabo de este tiempo, se realizó la extracción quirúrgica de ejes embrionarios, que posteriormente fueron desinfectados agregando hipoclorito de sodio al 50 % por 3 min en agitación constante y colocados posteriormente en tubos de vidrio de 20cm x 2.5cm con 10mL de agar MS (Murashige & Skoog) 1.0x. La germinación se llevó a cabo en una cámara de crecimiento en condiciones controladas 16 h de luz, 8 h de oscuridad, humedad relativa de 80%, intensidad luminosa 200 $\mu\text{M}/\text{m}^2\text{-s}$. Las plantas estuvieron en la cámara de crecimiento por un periodo de 15 días (Fig. 6). Posterior a este tiempo, se tomaron con cuidado las plantas de maíz con unas pinzas metálicas estériles para evitar cualquier rompimiento del área foliar o las raíces y se colocaron en tubos de vidrio con 5 mL de agua desionizada estéril para coleccionar los exudados radiculares. Las plantas se mantuvieron por 48 h dentro de la cámara de crecimiento. Este tratamiento fue designado como control (C) (Contreras- Cornejo *et al.*, 2018a).



Figura 6. Fotografía representativa de la planta de *Zea mays* crecida en medio MS 1.0x a los 15 días post germinación.

Adicionalmente, se incluyó un tratamiento designado como daño mecánico (DM), donde plantas de 15 d fueron puestas en los tubos de ensaye con el agua estéril y heridas en el área foliar con un bisturí, realizando un daño similar al producido por la herbivoría de 2L de *S. frugiperda* que corresponde a 5 heridas en diferentes puntos de la hoja de aproximadamente 5 a 4 mm de diámetro. La colecta de exudados se realizó a las 48 h en la cámara de crecimiento.

6.3.2 Sistema de interacción *in vitro* de *Z. mays*-*S. frugiperda*

Plantas de 15 días se retiraron de la cámara de crecimiento y se dispusieron en tubos de ensaye con 5 mL de agua desionizada estéril. Inmediatamente después, se colocaron 2 larvas de *S. frugiperda*. A este tratamiento se le designó 2L. Adicionalmente, se incluyó un tratamiento denominado 4 larvas (4L), donde a plantas de 15 d se colocaron el doble de larvas. Finalmente, en un último tratamiento a plantas de 15 d que fueron colocadas en los tubos con agua sufrieron un daño mecánico con un bisturí y sobre la herida se adicionó 5 μ L de la SO de las larvas de *S. frugiperda*. La SO fue colectada al aplicar presión con pinzas de metal sobre el área abdominal de la larva recolectando la secreción oral expulsada con una micropipeta con capacidad de 10 μ L. Este tratamiento se designó daño mecánico

más secreción oral (DM+SO). La colecta de exudados de todos los tratamientos se realizó a las 48 horas en la cámara de crecimiento (Schmelz *et al.*, 2006).

6.3.3 Determinación del porcentaje de herbivoría

Para determinar el porcentaje de herbivoría en plantas de maíz, las plantas se dejaron en interacción con 2 y 4 L de *S. frugiperda* durante 2 días, posteriormente se cortó el área foliar y se colocó en un fondo negro para ser escaneada; se utilizó el programa imageJ en el que se calculó el área removida por el herbívoro en cm² además, se registró el número de heridas por hoja (Contreras- Cornejo *et al.*, 2018 a, b).

6.3.4 Determinación de pH en los exudados radiculares de maíz

A los exudados radiculares (5 mL) de cada uno de los tratamientos se les agregaron 15 mL del indicador de pH púrpura de bromocresol (SIGMA-ALDRICH ®) cuyo intervalo de transición de pH oscila entre 5.2 y 6.8, virando del color púrpura al amarillo.

A su vez, el pH de las muestras se midió en un potenciómetro HORIBA Scientific ® modelo: F-71G.

6.3.5 Efecto de los exudados radiculares de maíz sobre el crecimiento de *Trichoderma atroviride*

Para evaluar el efecto de los exudados radiculares de los diferentes tratamientos sobre el crecimiento de *T. atroviride*, se preparó medio de cultivo MS 0.2x sin sacarosa enriquecido con 5 mL de exudados radiculares recolectados de cada tratamiento como fuente de carbono, completando la diferencia de volumen con agua destilada (Macías-Rodríguez *et al.*, 2018). Los bioensayos se realizaron en cajas de Petri de 10 cm de diámetro. El medio MS con agar sin adición de exudados fue tomado como control. Las cajas de Petri se inocularon al centro con 10⁶ esporas de *T. atroviride*. A las 24 h, 3 y 5 d de la inoculación se midió el diámetro de la colonia. Adicionalmente, al quinto día de crecimiento del hongo, se agregaron 3 mL

de agua estéril en cada caja para resuspender las esporas. Posteriormente se tomó 1 mL de agua con esporas y se colocaron en un tubo ámbar de 3 mL de capacidad; de ahí se tomaron 1.5 μL de la suspensión de esporas y se colocaron en la cámara de Neubauer colocando en la parte superior un cubreobjetos evitando la aparición de burbujas y con ayuda de un microscopio óptico con el objetivo de 40x se realizó el conteo de esporas de izquierda a derecha y en 5 zonas diferentes como se muestra en la Fig 7.

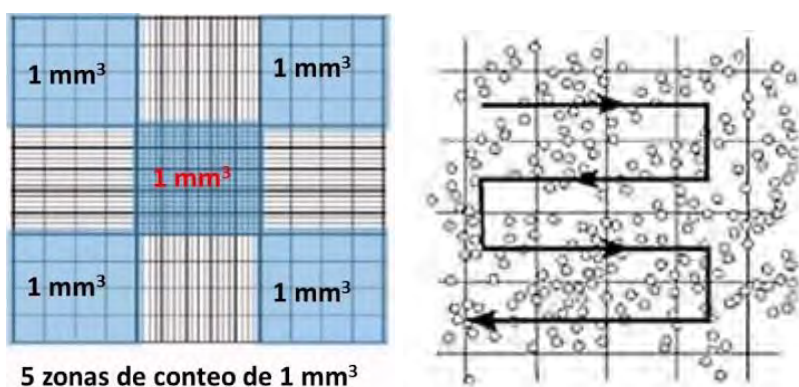


Figura 7. Zonas y dirección de conteo de esporas de *T. atroviride* en cámara de Neubauer.

6.3.6 Procesamiento de las muestras y análisis químico por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-SM)

Del volumen de los exudados radiculares, se tomaron 2.5 mL y se agregaron 2 mL de diclorometano y se sonicó cada muestra por 3 minutos. La fase acuosa se utilizó para el análisis de carbohidratos y la fase orgánica para el análisis de MBOA. Los análisis se realizaron en un cromatógrafo de gases Agilent 6850 Series II acoplado a un detector de masas Agilent model 5973. Los compuestos se identificaron utilizando la base de datos NIST versión 11 y/o por comparación de los

tiempos de retención (Tr) y patrón de masas obtenidos con estándares puros, según el caso.

Carbohidratos. La fase acuosa se concentró con gas nitrógeno y 2 mL de diclorometano en un vial de reacción de 5 mL. Para analizar los carbohidratos por un método cromatográfico, las muestras fueron derivatizadas. A la muestra seca se le agregaron 1.5 mL de cloruro de hidroxilamina disuelta en piridina en proporción de 17.66 mg/mL. De esta manera las muestras se sonicaron por 30 min, para posteriormente calentarse a 85°C por una hora. Después de esperar a que los viales se enfriaran, se agregaron 0.5 mL de piridina y 1 mL de anhídrido acético, y se calentaron nuevamente a 85°C por 20 minutos. La mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente para posteriormente pasarla a tubos de ensaye y diluirla en 1 mL de cloroformo y realizar dos enjuagues con 1 mL de agua desionizada. Finalmente, la fase orgánica se circuló por columnas (15 mL) empacadas con sulfato de sodio anhidro para retirar la humedad y se evaporó con nitrógeno líquido en viales ámbar de 2 mL. Se preparó una mezcla de los estándares L - (+) - arabinosa, myo-inositol, D - (-) - fructosa, sacarosa (SIGMA®), xilosa (DIBICO®) y D-glucosa-monohidrato (MEYER®) a una concentración de 10³ nM, se disolvieron en 5ml de agua estéril, posteriormente se llevó a sequedad con N gaseoso y derivando de la misma forma anteriormente mencionada. El análisis de carbohidratos se llevó a cabo en un CG-SM con las siguientes condiciones: se utilizó una columna HP5-MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm), la temperatura del inyector de 230°C, en modo split con una proporción 1:20, con helio como gas acarreador con un flujo de 1 mL/min, y una temperatura del detector de 300°C; el horno se programó con una temperatura inicial de 150°C por 3 min, seguido de una rampa de 6°C/min, hasta alcanzar los 270°C por 13 min, con una post-corrída a 300°C por 3 min. La adquisición de datos se realizó en modo scan en un rango de masas de 45 a 750 *m/z* (Macías-Rodríguez., *et al.*, 2018). La cuantificación se realizó con un estándar interno de glucosa, sacarosa, fructosa y perseitol por regla proporcional a la intensidad de la señal de los estándares, y las cantidades obtenidas fueron promediadas.

Benzoxazinoide 6-metoxi-benzoxazolin-2-ona (MBOA). La fase orgánica obtenida de la extracción de los exudados se concentró con gas nitrógeno en un vial de reacción de 5 mL. A la muestra seca se le agregaron 2 mL de una solución de cloruro de acetilo (600 mL) en metanol (2 mL) preparado en frío, esta mezcla se realiza lentamente debido a que es una reacción exotérmica. La muestra se sonicó por 30 min y se calentó a 75°C por una hora. La muestra se dejó enfriar a temperatura ambiente y se llevó a sequedad total con gas nitrógeno en un vial ámbar de 2 mL. El estándar MBOA (ALDRICH®), se disolvió 0.0084g en 1 ml de agua destilada, se llevó a sequedad con gas nitrógeno y fue derivado de la misma forma. Para el análisis del MBOA por EM, se diseñó un monitoreo selectivo de iones empleando los valores 150, 165 y 207 *m/z* obtenidos del análisis del estándar (Fig. 8).

Las condiciones de análisis del CG-SM fueron las siguientes: se utilizó una columna HP5-MS, la temperatura del inyector de 180°C, en modo split con una proporción 1:20, con helio como gas acarreador con un flujo de 1 mL/min, y una temperatura del detector de 300°C; el horno se programó con una temperatura inicial de 80°C por 3 minutos, seguido de una rampa de 6°C/min, hasta alcanzar los 230°C por 10 minutos, con una post-corrída a 300°C por 3 minutos. La cuantificación se realizó por regla proporcional a la intensidad de la señal del estándar interno MBOA y las cantidades obtenidas fueron promediadas.

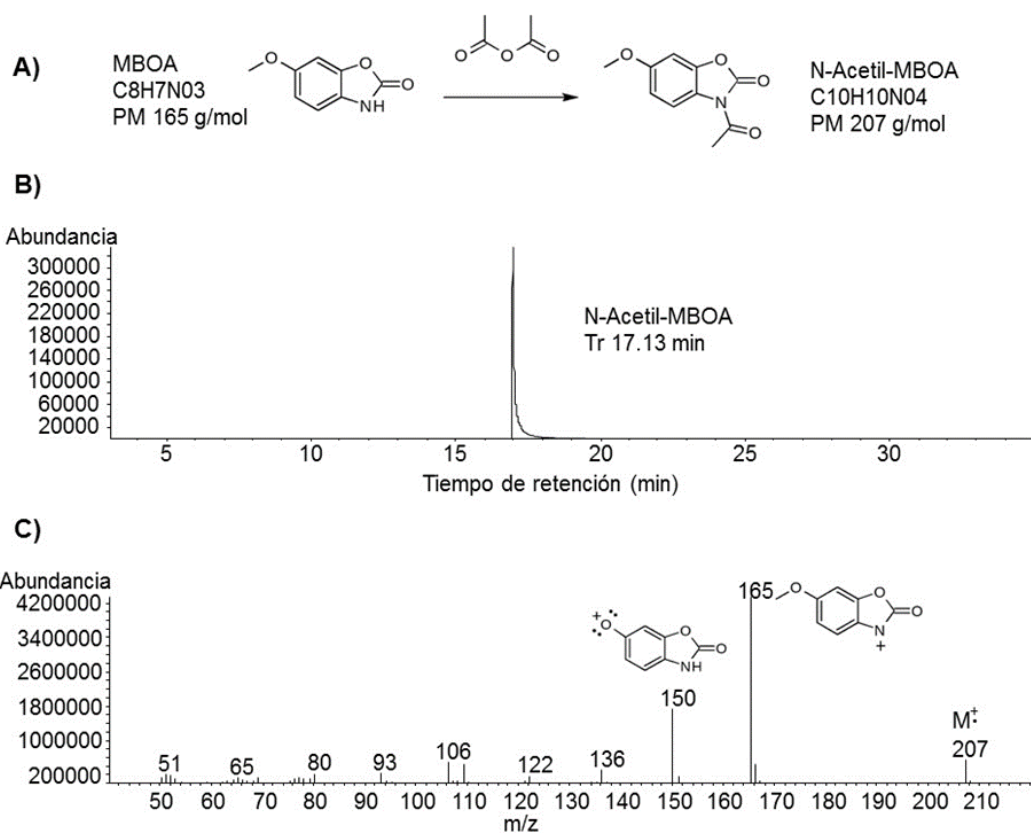


Fig. 8 Análisis del estándar 6-metoxi-benzoxazolin-2-ona (MBOA) por cromatografía de gases y espectrometría de masas (CG-EM). A) Reacción de acetilación del estándar MBOA para facilitar su retención en la columna cromatográfica. B) Cromatograma obtenido del MBOA acetilado donde se indica su retención en la columna cromatográfica de 17.3 min. C) Espectro de masas del MBOA acetilado donde se seleccionaron los iones 150, 165 y 207 m/z para realizar el monitoreo selectivo de iones (SIM) del compuesto en las muestras.

6.3.7 Evaluación del crecimiento colonial y esporulación de *T. atroviride* a diferentes concentraciones de carbohidratos y 6-metoxi-benzoxazolin-2-ona (MBOA)

Para determinar el efecto de los carbohidratos y el MBOA en el crecimiento de *T. atroviride* se realizaron curvas dosis-respuesta en medio MS 0.2x siguiendo la metodología de Macías-Rodríguez *et al.*, (2018). Los tratamientos fueron los siguientes:

a) MS 0.2x sin sacarosa (S-)

b) MS 0.2x sin sacarosa y suplementado con mezclas de los estándares de carbohidratos (glucosa, fructuosa, myo inositol, sacarosa) a una concentración final de 10^2 , 10^3 , 10^4 y 10^5 nM

c) MS 0.2x sin sacarosa y suplementado con MBOA a las concentraciones de 10^2 , 10^3 , 10^4 y 10^5 nM

El diámetro colonial de cada tratamiento se midió a diferentes tiempos: 1, 3 y 5 días, utilizando una regla y reportando el resultado en cm. Al quinto día se realizó la colecta y conteo de esporas de cada uno de los tratamientos.

6.3.8 Análisis estadístico

Los experimentos se analizaron estadísticamente utilizando el programa Statistica 7.0. Según el caso, se corrieron análisis paramétricos de ANOVA de una o dos vías con una prueba post hoc Tukey. Las pruebas estadísticas se utilizaron para establecer las diferencias entre tratamientos en relación con el peso de raíces, peso del área foliar, longitudes de hojas, niveles de carbohidratos y MBOA en el exudado de la raíz, radio o diámetro de la colonia y número de esporas. Se utilizan diferentes letras en las figuras y tablas para indicar medias que varió significativamente ($P < 0.05$).

7. Resultados

7.1 Sistema de interacción *Zea mays*- *Spodoptera frugiperda*

El establecimiento del sistema de interacción en tubos de ensaye entre la planta y el herbívoro fue crucial para el desarrollo del presente trabajo (Fig. 9). De acuerdo con la estrategia experimental, se incluyeron cinco tratamientos: i) el tratamiento control (C) que corresponde a plantas de maíz de 15 d crecidas en medio MS 0.2x, ii) plantas de maíz con daño mecánico (DM) a las cuales se les removió una porción de tejido foliar con un bisturí similar al realizado por 2L del insecto masticador en estado L3, iii) plantas con daño mecánico más secreción oral (DM + SO) que corresponde a plantas con un daño mecánico similar al mencionado anteriormente y además se agregaron 5 μ L de SO sobre la herida causada por el bisturí, y iv) tratamiento de herbivoría con 2L y v) 4L, en ambos casos, las larvas se alimentaron de las plantas por dos días.

De acuerdo con la Fig. 9, las hojas del tratamiento DM + SO presentaron un color amarillento característico de hojas senescentes. Por otro lado, en la fotografía también se observa que el consumo de área foliar en el tratamiento 4L fue superior al de 2L, mientras que en el área radicular no se observó ningún daño aparente, ya que la sobrevivencia de *S. frugiperda* se debe a la ingesta de tejido foliar.

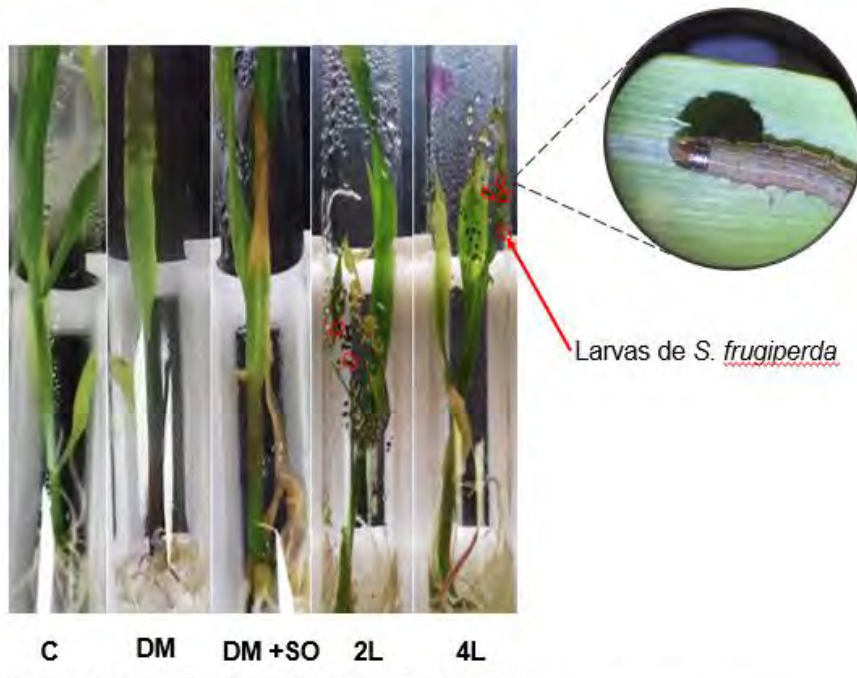


Fig. 9 Sistema de interacción *Zea mays*- *Spodoptera frugiperda*. Tubos representativos de cada uno de los tratamientos. Las abreviaciones indican los siguientes tratamientos, C: control, DM: daño mecánico, DM +SO: daño mecánico más secreción oral, 2L: 2 larvas y 4L: 4 larvas de *S. frugiperda* en el estadio L3. El círculo denota un acercamiento de la fotografía para indicar la presencia de la larva en el follaje.

7.2 Daño ocasionado por *S. frugiperda* en las plantas de *Z. mays*

En el cultivo del maíz, la plaga del gusano cogollero se presenta con frecuencia bajo diferentes intensidades de ataque. El sistema de interacción que se estableció en el laboratorio nos permitió estudiar el efecto de 2 y 4L en el consumo del follaje y en ambos tratamientos hubo diferencias significativas debido al número de individuos de cada tratamiento (Fig. 10). El tratamiento de 4L afectó negativamente la altura y el peso fresco de la planta (Fig. 10 A, B), mientras que en el peso fresco de la raíz no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos ya que esta región de la planta no fue afectada (Fig. 10 C). Por otro lado, los valores obtenidos en las plantas de los tratamientos DM y DM + SO fueron similares al tratamiento control.

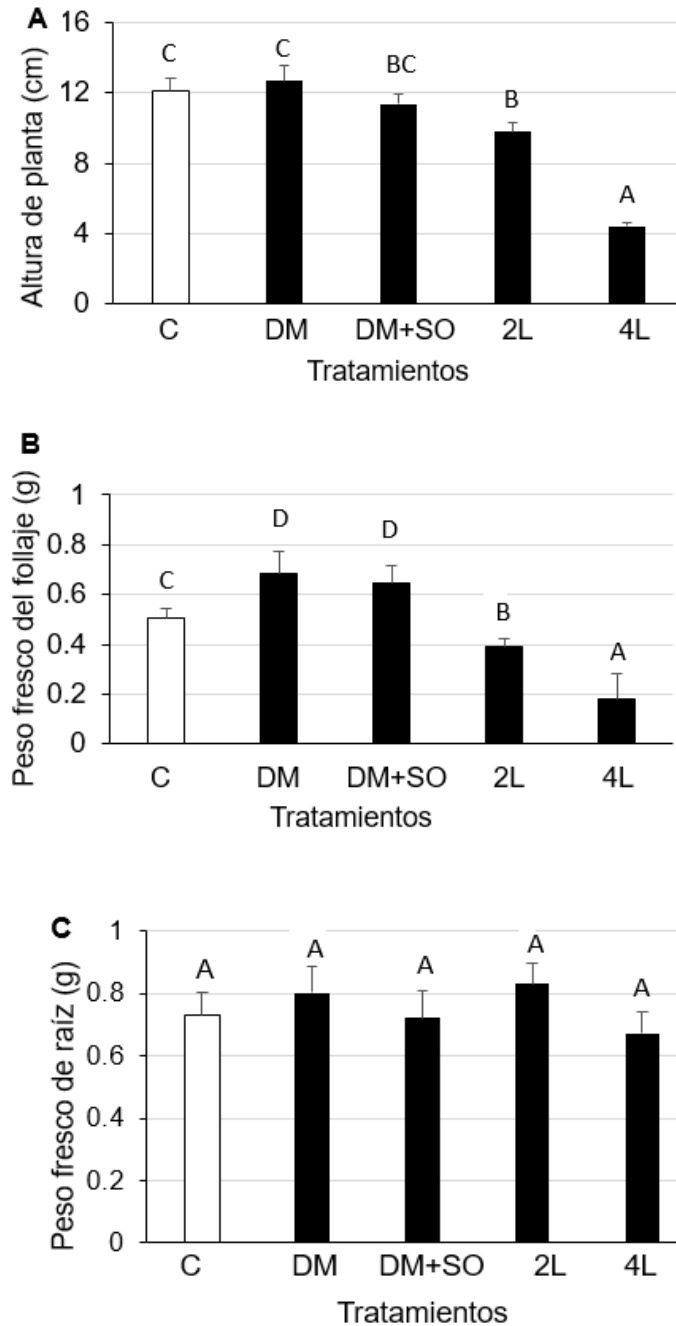


Fig. 10 Efecto del número de individuos de *S. frugiperda* sobre el área fotosintética y la estructura física de las plantas de maíz C: control, DM: daño mecánico, DM+SO: daño mecánico más secreción oral, 2L: dos larvas y 4L: 4 larvas de *S. frugiperda* en estadio L3 A) Altura de planta en los diferentes tratamientos B) Peso fresco del área foliar C) Peso fresco de raíz.-El experimento se realizó tres veces con una $n=5$. Los datos fueron analizados estadísticamente mediante una prueba ANOVA y un poshoc Tukey con un $\alpha \leq 0.05$. Letras diferentes indican medias que son estadísticamente distintas.

En el maíz, las larvas actúan como trozadores cortando las plantas recién germinadas o como cogollero. En la Fig. 11 se observan las perforaciones características en las hojas y un crecimiento anormal de las mismas a causa del herbívoro, las cuales se hicieron más evidente en el tratamiento 4L. En estas condiciones de edad y crecimiento donde las plantas presentan de dos a tres hojas, el número de heridas promedio en el tratamiento 2L fue de 4 heridas, mientras que en 4L se registró un promedio de 7 heridas (Fig. 11 B). Respecto al área foliar consumida (Fig. 12 C), en el tratamiento 2L fue de $\sim 2 \text{ cm}^2$ y con 4L fue de $\sim 5 \text{ cm}^2$. También se determinó el grado de herbivoría en cada tratamiento (Fig. 12 D) y como era de esperarse la herbivoría en 4L fue mayor (37%), respecto de 2L (18%).

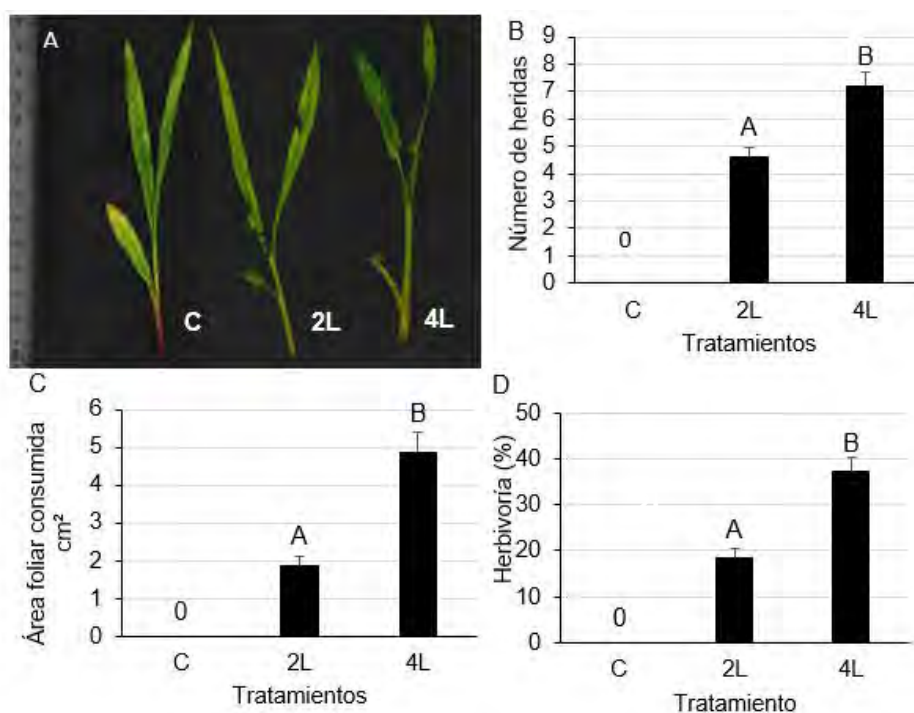


Fig. 11 Parámetros de herbívora foliar en plantas de maíz con 2 (2L) y 4 larvas (4L) de *S. frugiperda* en estadio L3. A) Daño foliar causado al follaje en plantas de maíz por 2L y 4L de *S. frugiperda* en 48 h. B) número de heridas en el área foliar, B) área foliar removida expresada en cm^2 C) porcentaje de herbivoría total. El experimento se realizó tres veces con una $n=4$. Los datos fueron analizados estadísticamente mediante una prueba ANOVA y un poshoc Tukey con un $\alpha \leq 0.05$. Letras diferentes indican medias que son estadísticamente distintas.

7.3 El daño mecánico en el follaje y la herbivoría inducen la acidificación del medio de cultivo

Se ha reportado que las plantas crecidas en estrés por deficiencia de nutrientes o en presencia de fitopatógenos, modifican la composición y cantidad de exudados radiculares, por lo tanto, no se descarta que durante el ataque foliar por *S. frugiperda* se replique esta respuesta. Una forma de determinar si existe algún cambio químico en la exudación radicular de las plantas en respuesta no solo a la presencia del herbívoro, sino a un estrés causado por un daño mecánico en el follaje es mediante el uso de indicadores de acidez o basicidad que mediante un viraje de color es posible visualizar dichos cambios. Por lo tanto, se realizó un experimento en el que se utilizó el indicador de pH púrpura de bromocresol cuyo intervalo de transición de pH oscila entre 5.2 y 6.8, variando de amarillo a púrpura. En la Fig. 12 se muestra como vira el color del indicador a amarillo conforme se incrementa la concentración (10^2 , 10^3 , 10^4 y 10^5 nM) y por tanto la acidez de una mezcla sintética de ácidos orgánicos (ácido succínico, ácido cítrico, ácido málico). Al colocar el indicador de pH en los exudados radiculares de cada uno de los tratamientos se observó que todos ellos presentaron un color amarillo, aunque el amarillo más brillante e intenso se observó en los exudados de los tratamientos 2L y 4L, sugiriendo que la presencia de larvas en el follaje genera un cambio químico (cualitativo y/o cuantitativo) en la exudación.

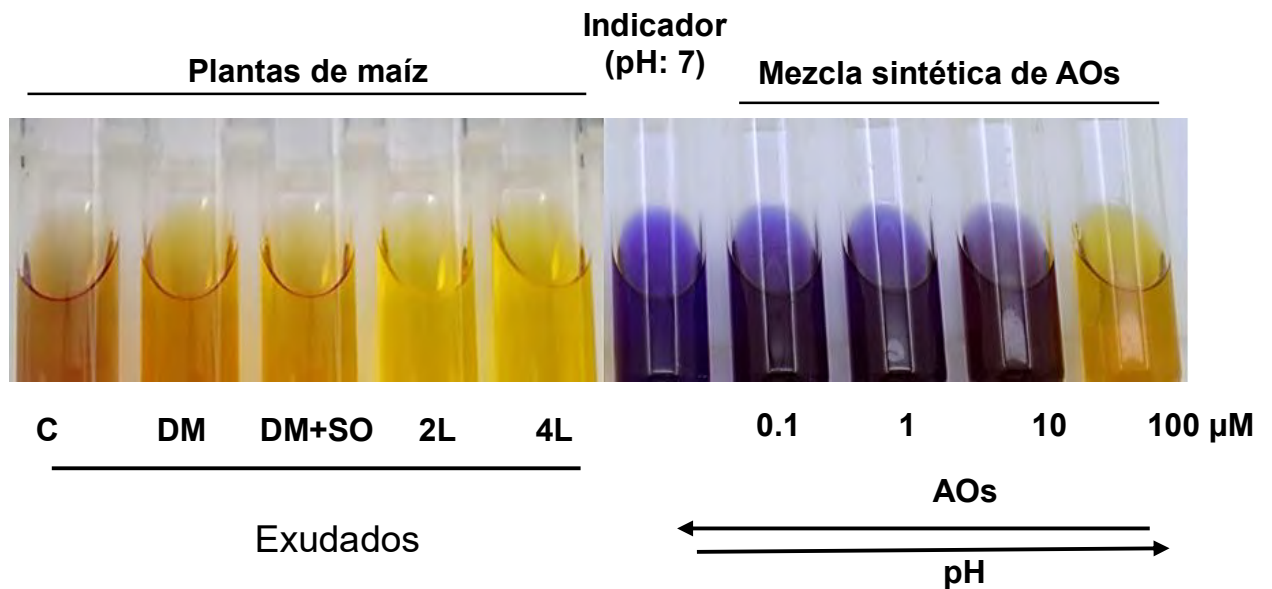


Fig. 12 El ataque de *S. frugiperda* en el follaje favorece la acidificación en los exudados radiculares. Para este ensayo se utilizó el indicador de pH púrpura de bromocresol. Para fines prácticos se utilizó una mezcla sintética de estándares de ácidos orgánicos (AOs) a distintas concentraciones. El color púrpura de la solución refiere un pH cercano a la neutralidad, mientras que el color amarillo es indicativo de acidez. Los tratamientos fueron de plantas C: control, DM: daño mecánico, DM+SO: daño mecánico más secreción oral, 2L: dos larvas y 4L: 4 larvas de *S. frugiperda* en estadio L3. En los tratamientos 2L y 4L se observa un amarillo brillante intenso lo que sugiere acidificación del medio. Este experimento se realizó 3 veces con resultados similares.

Para conocer el pH en los exudados radiculares de cada uno de los tratamientos se utilizó un potenciómetro (Fig. 13). Los exudados que presentaron un menor pH fueron aquellos que se colectaron de los tratamientos 2L y 4L. Es interesante destacar que la aplicación de la SO del herbívoro en una herida induce a una baja en el pH de los exudados, aunque en menor medida que la presencia de las larvas en el follaje. Por su parte el pH de los exudados de las plantas sometidas a un estrés por daño mecánico fue similar al de los exudados de las plantas control.

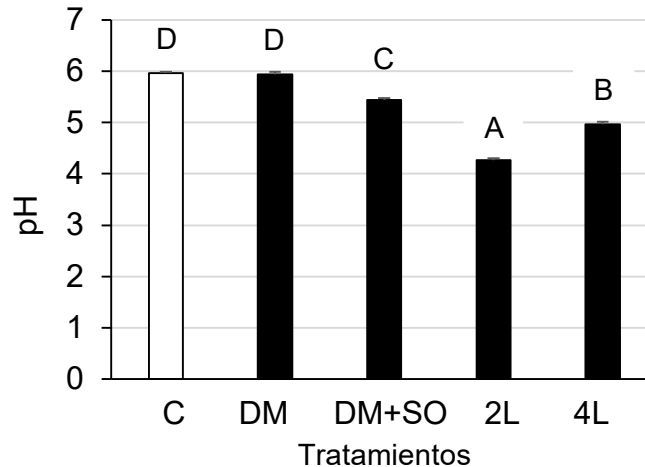


Fig.13 Valores de pH de los exudados radiculares de las plantas de maíz en los diferentes tratamientos C: control, DM: daño mecánico, DM+SO: daño mecánico más secreción oral, 2L: dos larvas y 4L: 4 larvas de *S. frugiperda*. El experimento se realizó tres veces con una n=5. Los datos fueron analizados estadísticamente mediante una prueba ANOVA y un poshoc Tukey con una $\alpha \leq 0.05$. Letras diferentes indican medias que son estadísticamente distintas.

7.4 Los exudados de las plantas expuestas a un daño mecánico en las hojas o al ataque del herbívoro *S. frugiperda* alteran el crecimiento y esporulación de *Trichoderma*

Los experimentos realizados con el indicador de pH, sugieren cambios químicos en la composición de los exudados en respuesta a la SO y a la presencia del herbívoro en la planta, por lo que se decidió estudiar el efecto de estos exudados sobre el crecimiento de *T. atroviride*. Para ello, se utilizó medio de cultivo MS 0.2x con sacarosa (S+) y sin fuente de carbono (sin sacarosa, S-) y medio MS 0.2x sin sacarosa, pero enriquecido con los exudados radiculares obtenidos de las plantas de cada uno de los tratamientos (C, DM, DM + SO, 2L y 4L) (Macías-Rodríguez *et al.*, 2018),

En la Fig. 14, se muestran imágenes representativas del crecimiento del hongo a los 5d. En el medio S+ se observa el crecimiento típico que presenta el hongo en ese medio, el cual se caracteriza por la presencia de un micelio

blanquecino con presencia de pequeñas esporas de color blanco-verduzco con micelio algodonoso. El diámetro de la colonia se midió al 1º, 3º y 5º día de crecimiento y los valores fueron comparados con el resto de los tratamientos (Fig. 15 A). En el medio S- disminuyó el crecimiento del hongo desde el día 1 y también se afectó el número de esporas (Fig. 15 B). Cabe destacar que el conteo de esporas se realizó al quinto día ya que, en ese tiempo, el micelio no ha tocado aún el borde de la caja de Petri.

El diámetro de la colonia y el número de esporas del hongo crecido en el medio enriquecido con los exudados radiculares colectados del tratamiento de las plantas control (C) fue superior al medio S- (Fig. 15), lo que sugiere la existencia de fuente de carbono que permite el crecimiento del hongo; sin embargo, una condición de estrés en el área foliar puede ser “percibida” por el hongo y responder específicamente en función del estímulo. En este estudio los exudados provenientes de los tratamientos DM y DM + SO afectaron el diámetro de la colonia y el número de esporas, mientras tanto los exudados de las plantas con 2L estimularon el crecimiento y desarrollo del hongo puesto que el diámetro y el número de esporas fue similar al obtenido en el medio S+; además en el tratamiento 2L se observándose el color verde oscuro en las esporas de *T. atroviride* que es indicativo de la maduración de las conidias (Fig. 15).

Resultado interesante fue la respuesta del hongo ante los exudados radiculares del tratamiento 4L, presentó un diámetro colonial y número de esporas similar al de los tratamientos S-, DM y DM + SO (Fig. 15 A y B).

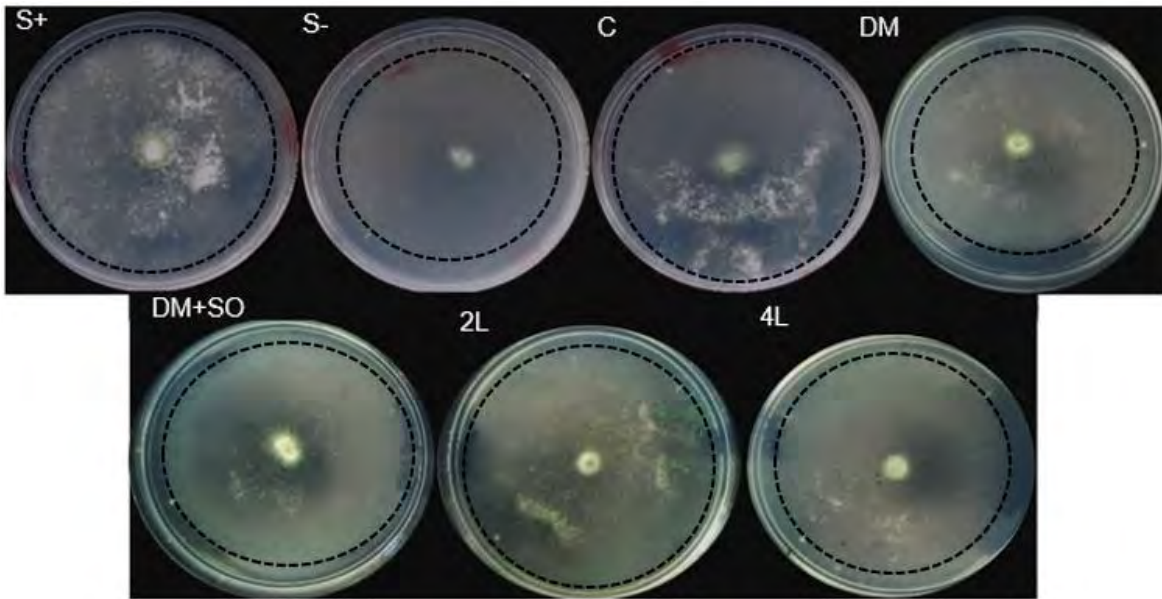


Fig. 14 Crecimiento colonial de *T. atroviride* en medio MS 0.2x en diferentes tratamientos S+: con sacarosa, S-: sin sacarosa, y medio MS 0.2 x sin sacarosa, pero enriquecidos con los exudados de plantas provenientes de los tratamientos C: control, DM: daño mecánico, DM+SO: daño mecánico más secreción oral, 2L: dos larvas y 4L:4 larvas de *S. frugiperda*.

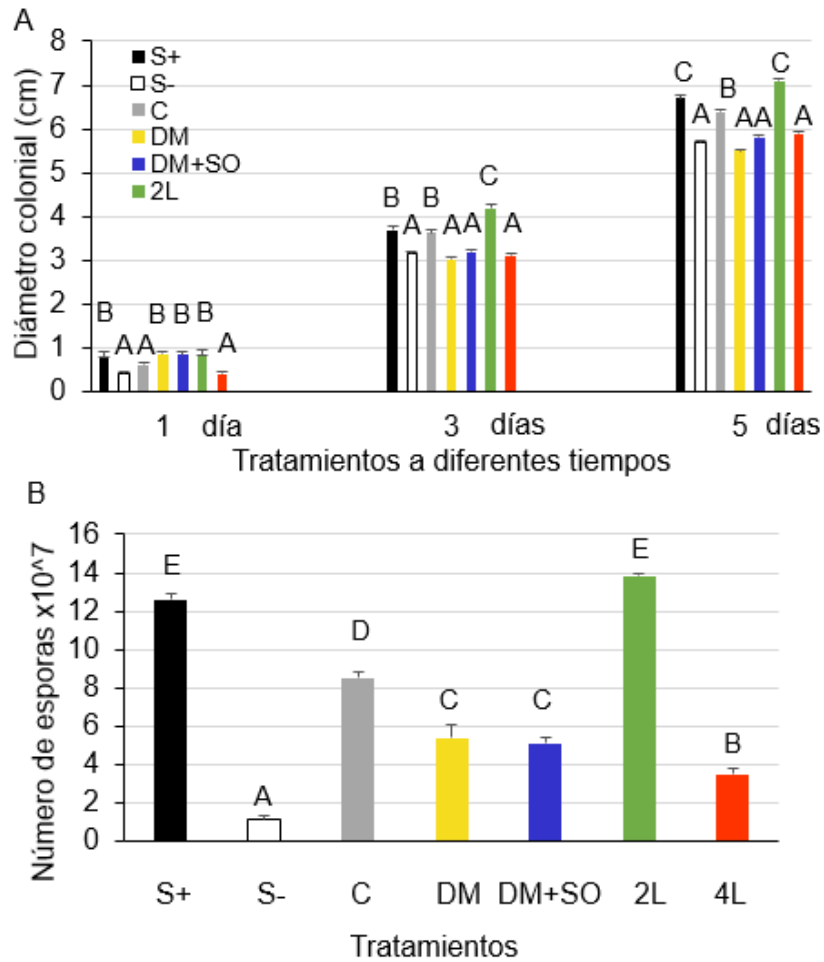


Fig. 15 Efecto de los exudados radiculares de las plantas de maíz sometidas al ataque del herbívoro *S. frugiperda* sobre el crecimiento de *T. atroviride*. Se utilizó medio MS 0.2x con distinta fuente de carbono: S+, MS 0.2x con sacarosa, S-, MS 0.2x sin sacarosa, y el resto de los tratamientos corresponde al medio MS 0.2x suplementado con los exudados radiculares de las plantas control (C), con daño mecánico (DM), secreción oral (DM + SO), 2 (2L) y 4 larvas (4L) de *S. frugiperda* en estadio L3. A) Diámetro colonial a distintos tiempos. B) Número de esporas a los 5d de crecimiento del hongo. El experimento se realizó tres veces con una n=5. Los datos fueron analizados estadísticamente mediante una prueba ANOVA y un poshoc Tukey con un $\alpha \leq 0.05$. Letras diferentes refieren a medias que son estadísticamente distintas.

7.5 La herbivoría foliar causada por *S. frugiperda* afecta la exudación de carbohidratos en plantas de maíz

Los carbohidratos exudados por las raíces de las plantas son una fuente de carbono muy importante para el crecimiento de los microorganismos del suelo.

Particularmente, la glucosa, fructosa y sacarosa favorecen el crecimiento de *Trichoderma* (Macías-Rodríguez *et al.*, 2018). Debido a esto, se decidió determinar si el perfil de carbohidratos se modifica en aquellos exudados radiculares provenientes de plantas sometidas a distintos tipos de estrés en el follaje (C, DM, DM + SO, 2L y 4L); esto considerando además un crecimiento de *Trichoderma* distinto en cada tratamiento. Mediante un análisis por cromatografía de gases y espectrometría de masas, se identificaron en los exudados del maíz de las plantas control (C) a las pentosas ribosa y arabinosa, las hexosas glucosa, fructosa y etil glucopiranosido, los polialcoholes eritrol, myo-inositol y manitol, y al disacárido sacarosa (Fig.16 A).

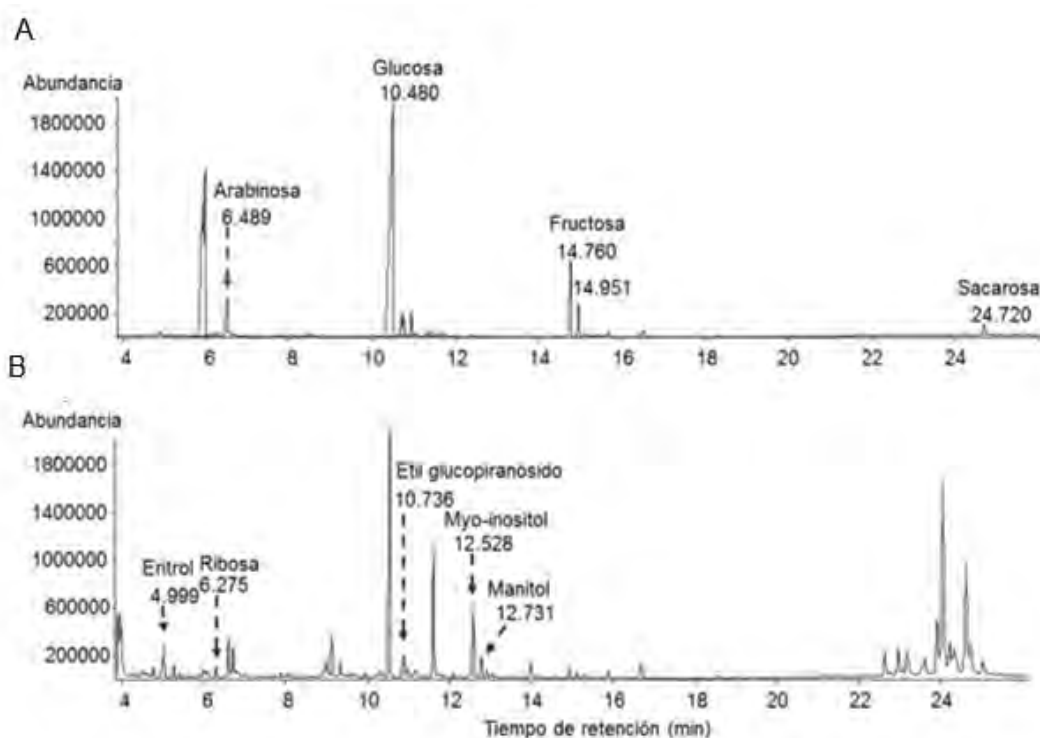


Fig. 16 Perfil cromatográfico de los carbohidratos identificados en los exudados radiculares del maíz. A) Cromatograma obtenido de los exudados del tratamiento de plantas control (C) y B) de los exudados del tratamiento 4L. Los carbohidratos fueron identificados con la base de datos NIST de un espectrómetro de masas y por comparación del tiempo de retención con estándares.

Los resultados de los análisis indicaron la existencia de una diferencia en el contenido de los carbohidratos identificados entre los distintos tratamientos de exudados (Fig. 17 B). Esta diferencia fue más evidente al sumar la concentración de los carbohidratos individuales en cada tratamiento (Fig. 17 A). El DM en las hojas repercutió negativamente en el contenido total de carbohidratos e interesantemente, la presencia de 2L incrementó hasta cuatro veces la exudación de estas moléculas. De manera general, la glucosa, fructosa y sacarosa fueron de los azúcares más abundantes en los perfiles cromatográficos, aunque solo glucosa y fructosa incrementaron significativamente a causa de la presencia de 2L en las hojas (Fig. 17 D y E). Por otra parte, ni el DM, DM + SO, o el incremento en el número de herbívoros en el follaje fue causal de un incremento en la exudación de estos azúcares (Fig. 17).

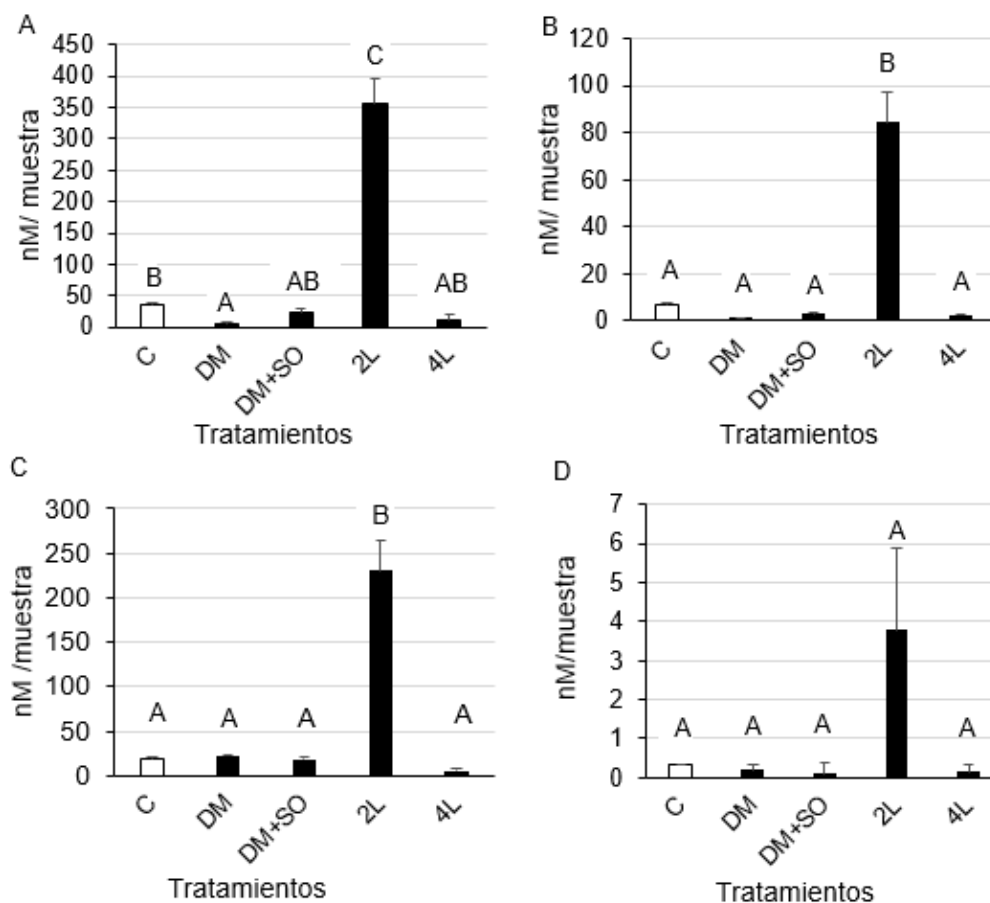


Fig. 17 Contenido de carbohidratos en los exudados radiculares de las plantas de maíz- Las plantas fueron sometidas a los siguientes tratamientos C: control, DM: daño mecánico, DM+SO: daño mecánico más secreción oral, 2L: dos larvas y 4L: 4 larvas de *S. frugiperda* en estadio L3. A) Sumatoria de la concentración de los carbohidratos individuales. B) Contenido de glucosa, C) fructosa y D) sacarosa en los exudados. El experimento se realizó tres veces con una $n=5$. Los datos fueron analizados estadísticamente mediante una prueba ANOVA y un poshoc Tukey con un $\alpha \leq 0.05$. Letras diferentes indican medias que son estadísticamente distintas.

Así mismo, el contenido total de polialcoholes y pentosas se incrementó significativamente hasta dos veces en el tratamiento 2L (Tabla 1); y de los polialcoholes, solo el myo-inositol se exudó más en ese tratamiento. Si bien los tratamientos DM + SO y 4L no mostraron una diferencia significativa en el contenido de polialcoholes y pentosas, se observó una tendencia a una exudación mayor de polialcoholes respecto al tratamiento C y DM.

Tabla 3. Contenido de polialcoholes y pentosas en los exudados radiculares de las plantas de maíz.

Compuesto	Carbohidratos (nM/muestra)				
	C	DM	DM+SO	2L	4L
Polialcoholes					
Eritrol	0.043±0.023	0.142±0.010	0.081±0.022	10.430±0.5	0.501±0.030
Myo-inositol	0.740±0.020 ^A	0.197±0.019 ^A	1.924±0.202 ^{AB}	4.52±0.303 ^B	2.215±0.503 ^{AB}
Manitol	0.021±0.010	0.0905±0.025	0.024±0.012	1.38±0.420	0.140±0.034
Total	0.804 ^A	0.429 ^A	2.029 ^{AB}	16.333 ^B	2.856 ^{AB}
Pentosas					
Ribosa	1.052±0.380	0.002±0.001	0.122±0.023	0.884±0.090	0.192±0.015
Arabinosa	3.790±0.911	0.180±0.021	0.134±0.047	9.013±0.981	0.362±0.152
Total	4.842 ^B	0.182 ^A	0.256 ^{AB}	9.897 ^B	0.554 ^{AB}

Las plantas corresponden a los siguientes tratamientos: control (C), con daño mecánico (DM), secreción oral (DM + SO), 2 (2L) y 4 larvas (4L) de *S. frugiperda* en estadio L3. El experimento se realizó tres veces con una n=5. Los datos fueron analizados estadísticamente mediante una prueba ANOVA y un poshoc Tukey con un $\alpha \leq 0.05$. Letras diferentes refieren a medias que son estadísticamente distintas.

7.6 La concentración de carbohidratos influye en el crecimiento y esporulación de *T. atroviride*

Al observar la modulación existente en la exudación radicular de carbohidratos en las plantas de maíz en respuesta a los diferentes tipos de estrés, se evaluó el crecimiento de *T. atroviride* a distintas concentraciones de azúcares en el medio (Fig. 18). Para ello, se preparó una mezcla sintética con algunos de los

carbohidratos (arabinosa, glucosa, fructuosa, myo inositol, sacarosa) identificados en el tratamiento control (C).

Al día uno no se observó una diferencia significativa en el diámetro colonial en ninguna de las concentraciones de la mezcla de azúcares probadas (10^2 , 10^3 , 10^4 y 10^5 nM). Sin embargo, a partir del tercer día y en las concentraciones de 10^4 y 10^5 nM si se observó una diferencia significativa en el crecimiento con respecto a los medios sin sacarosa (S-), y en las concentraciones de 10^2 y 10^3 nM (Fig. 18 A). En lo que respecta a la esporulación, la respuesta fue dependiente de la cantidad de fuente de carbono en el medio, ya que el número de esporas se incrementó de forma significativa de 7.8×10^6 en la concentración de 10^3 nM hasta 12×10^6 esporas en 10^5 nM (Fig. 18 B), por lo tanto, el crecimiento y esporulación del hongo es muy sensible ante cualquier cambio en la concentración de azúcares.

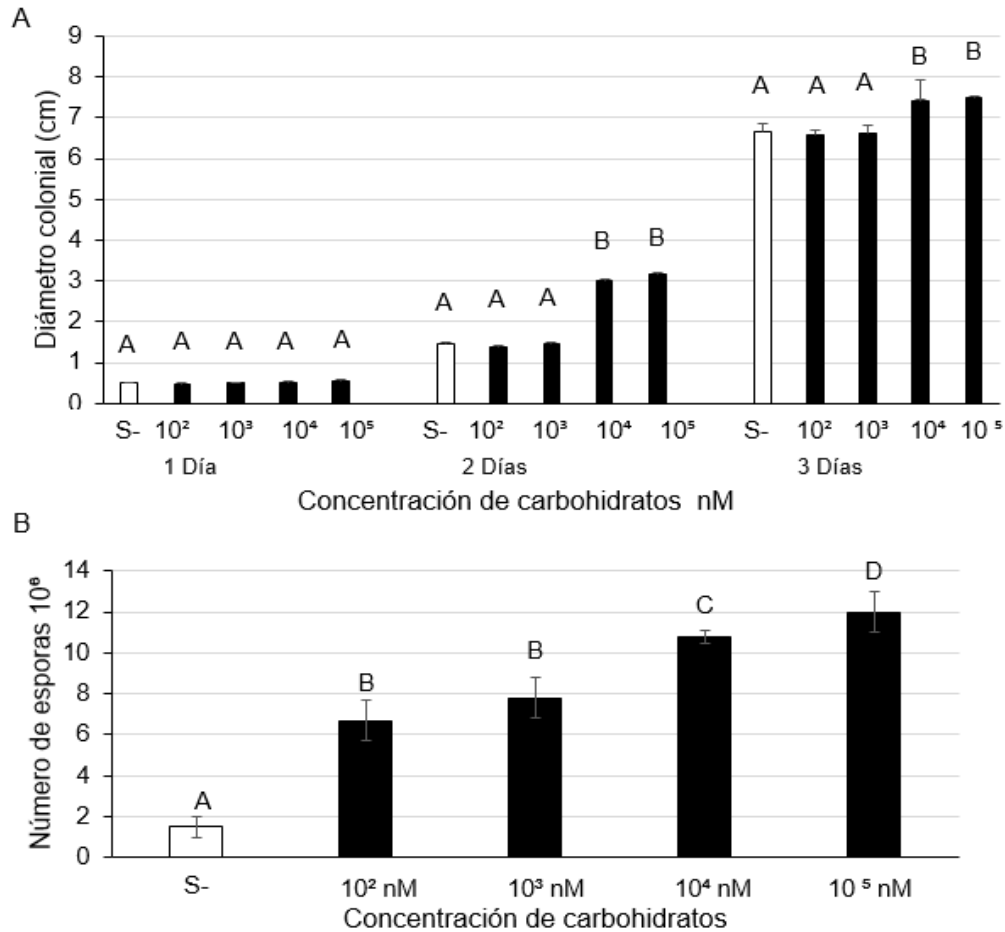


Fig. 18 Efecto dosis-respuesta de la mezcla sintética de carbohidratos (arabinosa, glucosa, fructosa, myo-inositol y sacarosa) sobre A) el crecimiento colonial de *T. atroviride* en el tiempo y B) la esporulación día cinco. El medio utilizado fue MS 0.2x sin sacarosa (S-) y enriquecido con las distintas concentraciones de la mezcla de azúcares. El experimento se realizó tres veces con una $n=5$. Los datos fueron analizados estadísticamente mediante una prueba ANOVA y un poshoc Tukey con un $\alpha \leq 0.05$. Letras diferentes indican medias que son estadísticamente distintas.

7.7 La exudación radicular del benzoxazinoide MBOA en las plantas de maíz se incrementa en respuesta a la secreción oral y a la presencia del herbívoro

Además de carbohidratos, el maíz exuda por las raíces diversos metabolitos implicados en la defensa contra el ataque de artrópodos herbívoros como lo es el MBOA (Hu- Lingfei *et al.*, 2018). Por lo tanto, para este estudio se diseñó una estrategia experimental por CG-EM para el análisis de MBOA en los exudados

radiculares de los distintos tratamientos a los que fueron sometidas las plantas. En las Figs. 19 A, B y C se muestran cromatogramas representativos de los tratamientos C, DM + SO y 4L, respectivamente, en los que se puede observar que la presencia de las larvas en el follaje estimula la exudación radicular del compuesto.

La cantidad de MBOA en los tratamientos C, DM y DM + SO fue similar, aunque se observó una tendencia a incrementarse la exudación del compuesto debido a la presencia de la SO en las heridas generadas en las hojas de forma artificial. Por otro lado, el ataque de 2L promovió la exudación de este metabolito de defensa de forma significativa en una proporción de cuatro veces más que en las plantas control. Aunque no se observó una diferencia significativa entre los tratamientos 2L y 4L, la diferencia en la cantidad de MBOA fue casi del 30%, 4.5 nM y 7.2 nM por muestra, respectivamente (Fig. 20).

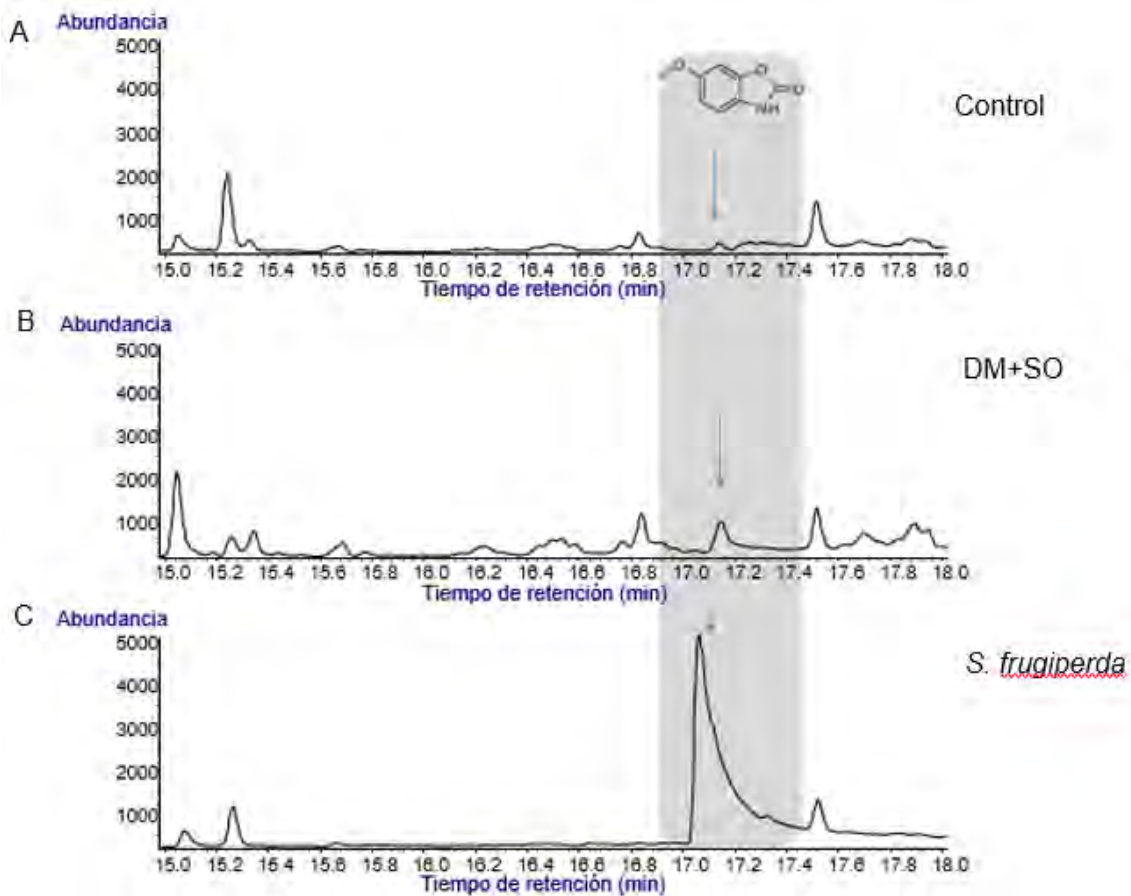


Fig. 19 Identificación benzoxazinoide 6-metoxi-benzoxazolin-2-ona (MBOA) en los exudados radiculares del maíz por cromatografía de gases y espectrometría de masas. Cromatogramas representativos de A) un tratamiento de plantas control, con daño mecánico más secreción oral (DM + SO) y (C) en presencia de 4 larvas (4L). La exudación de MBOA es más evidente en el tratamiento 4L. La identificación del compuesto se realizó por análisis del espectro de masas y comparación con el tiempo de retención del estándar derivado.

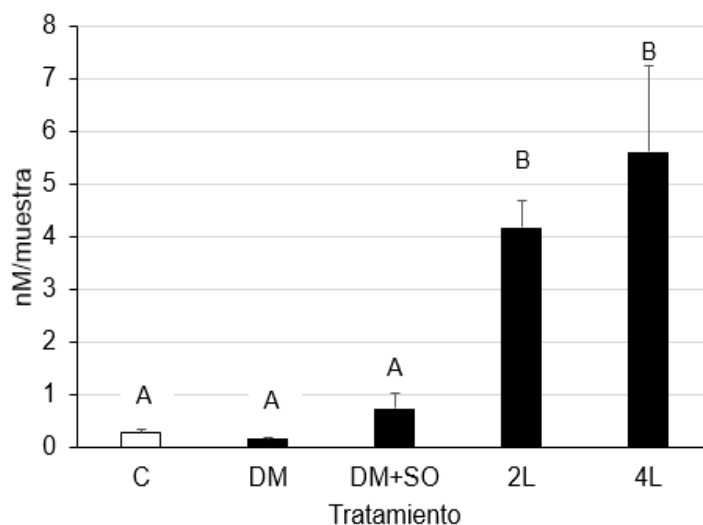


Fig. 20 Concentración de MBOA (nM/ muestra) en los exudados radiculares del tratamiento C (control), DM (daño mecánico), DM+SO (daño mecánico más secreción oral), 2L (2 larvas de *S. frugiperda*) y 4L (cuatro larvas de *S. frugiperda*). El experimento se realizó tres veces con una $n=5$. Los datos fueron analizados estadísticamente mediante una prueba ANOVA y un poshoc Tukey con un $\alpha \leq 0.05$. Letras diferentes indican medias que son estadísticamente distintas.

7.8 El compuesto de defensa MBOA no inhibe el crecimiento de *T. atroviride*

Al detectar un incremento en la concentración del MBOA en la exudación radicular de las plantas de maíz por el ataque del herbívoro, se decidió investigar si este compuesto afectaba el crecimiento de *T. atroviride*. Para lo cual se realizaron curvas dosis-respuesta de MBOA y se evaluó el crecimiento colonial del hongo a 1, 3 y 5 días en un medio MS 0.2x sin sacarosa (S-) suplementado con MBOA a diferentes concentraciones; 10^2 , 10^3 , 10^4 y 10^5 nM. Los resultados obtenidos indicaron que el MBOA no inhibió el crecimiento del hongo (Fig. 21) y esta respuesta fue más evidente con el tiempo, al quinto día, el diámetro de la colonia y el número de esporas fue superior en todas las concentraciones probadas de MBOA en comparación a los valores obtenidos en el medio S- (Fig. 21 A); así, el diámetro de la colonia se incrementó casi en un 40% y el número de esporas fue 16 veces mayor cuando la concentración de MBOA fue de 10^5 nM en comparación a S- (Figs. 21 B).

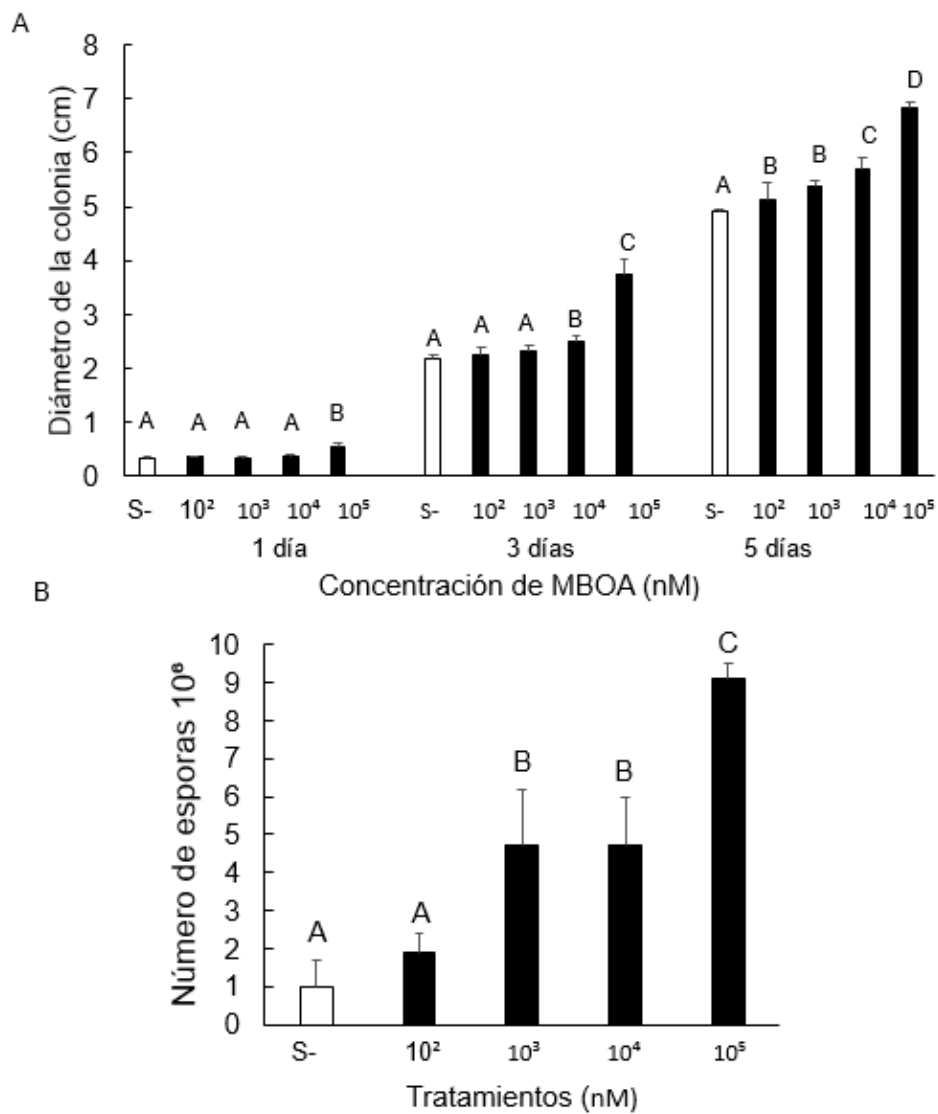


Fig. 21 Efecto dosis-respuesta del MBOA sobre el A) diámetro colonial (cm) de *T. atroviride* y B) la esporulación al 5° día de crecimiento. El medio utilizado fue MS 0.2x sin sacarosa (S-) y enriquecido con las distintas concentraciones de MBOA. El experimento se realizó tres veces con una $n=5$. Los datos fueron analizados estadísticamente mediante una prueba ANOVA y un poshoc Tukey con un $\alpha \leq 0.05$. Letras diferentes indican medias que son estadísticamente distintas.

8. Discusión

El maíz es uno de los cultivos con mayor producción a nivel mundial (FAO, 2017). Las causas que impactan negativamente en la producción del maíz son diversas, tal es el caso de las plagas. En América Central se estiman en 20-40 % las pérdidas en el campo causadas por los insectos al cultivo del maíz (Agroasemex, 2019). Una de estas plagas corresponde *S. frugiperda* (Day *et al.*, 2017). Durante el crecimiento vegetativo del maíz, las larvas se alimentan de las hojas, en los primeros instares larvales suelen tener comportamiento de trozadoras, y cuando pasan a los últimos instares tienen hábito defoliador. (Goergen *et al.*, 2016)

El reconocimiento y el reparo del tejido dañado por el ataque de insectos herbívoros son parte integral para la supervivencia de la planta. Las células dañadas liberan DAMPs (fragmentos de la pared celular, proteínas, péptidos, entre otros) que disparan señales locales dependientes de Ca^{+2} , ROS y fitohormonas que activan la expresión de genes de defensa y el reforzamiento local de la pared celular para sellar la herida y prevenir la evaporización de agua y colonización de patógenos (Bacete *et al.*, 2017; Vega-Muñoz *et al.*, 2020). Dependiendo de la severidad del daño, estas señales de Ca^{+2} y ROS se esparcen por la planta activándose la respuesta sistémica de defensa. De igual forma, la deposición de secreciones glandulares y orales en el sitio de daño son reconocidas por parte de la planta como HAMPs activando la defensa local y sistémica en la planta (Schmelz, 2015).

En el presente trabajo se estudió la interacción *Z. mays* – *S. frugiperda* en un sistema *in vitro* en el que se evaluó el efecto del número de larvas (2 y 4L) sobre la composición química de los exudados radiculares del maíz como parte de la

respuesta sistémica de las plantas al ataque del herbívoro. Los resultados mostraron que dependiendo del tratamiento (2 o 4L), el perfil de compuestos fue distinto, lo que sugiere fuertemente que estas diferencias están directamente relacionadas con la magnitud del daño. La talla de la planta, el número de heridas y área foliar consumida fue superior en el tratamiento de 4L, lo que representó una defoliación del 40% en comparación a la presencia de 2L que fue del 20% (Fig. 22).

Uno de los cambios químicos observados en los exudados radiculares debido al ataque del artrópodo fue la acidificación; este evento se observó gracias a la adición del indicador de acidez púrpura de bromocresol (Zhang *et al.*, 2008). El color amarillo del indicador en ambos tratamientos indicó una disminución en el pH de los exudados radiculares. La acidificación de la rizósfera es un evento ampliamente estudiado cuando las plantas se encuentran en estrés por deficiencia de nutrientes (Römheld y Marschner, 1986 Sterckeman, 2005; Neumann, 2007; Zhiguo *et al.*, 2018). En el maíz, específicamente, se reporta un incremento en la exudación de ácidos orgánicos cuando las plantas son cultivadas con deficiencia de P y Fe (Carvalhais *et al.*, 2011); a su vez, se reporta que en condiciones de estrés por déficit hídrico y durante la toma de nitratos del suelo, la planta acidifica el medio mediante la activación de la H⁺-ATPasa que opera como bomba de protones regulando el pH intra y extracelular, acidificando la pared celular y la turgencia celular (Santi *et al.*, 1995; Fan y Newmann, 2004; Pii *et al.*, 2016).

Si bien existen diversos estudios relacionados con el pH y el estrés abiótico, poco se conoce sobre la acidificación en respuesta a un estímulo de tipo biótico. Recientemente se reportó que plantas de *Arabidopsis thaliana* presentan una

acidificación apoplástica en respuesta al patógeno *Fusarium oxysporum* por una activación de la bomba de protones (Kesten *et al.*, 2021). Sin embargo, no hay un reporte donde se ligue directamente un cambio en el pH en la planta en respuesta al ataque de insectos masticadores. De manera general se menciona sobre el papel de la pared celular en la percepción del estímulo y los mecanismos río abajo que coordinan el crecimiento vegetal para compensar el tejido dañado (Vega-Muñoz *et al.*, 2020). Las paredes celulares de las plantas además de ser una simple barrera de defensa pasiva, son estructuras dinámicas que modifican su composición en respuesta a estímulos diversos (Bacete *et al.*, 2018). La composición química de la pared consiste básicamente de polímeros de carbohidratos (celulosa, hemicelulosa y pectinas) que son susceptibles a diferentes tipos de modificaciones bioquímicas como acetilaciones, esterificaciones y metilaciones; adicionalmente, esta pared se encuentra reforzada por una cara interna que constituye una pared secundaria a base de celulosa, lignina y xilanos o arabinoxilanos (Bacete *et al.*, 2018). Entonces, un pH ácido en la planta puede afectar la estructura molecular y la dinámica de los polisacáridos de la pared y se induce la actividad de la proteína expansina, permitiendo el crecimiento vegetal (Lager *et al.*, 2010; Phyto *et al.*, 2019).

Dado que durante el ataque de insectos herbívoros masticadores se genera un daño en la primer barrera de defensa y a que en este trabajo se observó un cambio en el pH, es factible pensar que los DAMPs y HAMPs activen los mecanismos involucrados con la acidificación que permitirán entre varios procesos, reblandecer la pared celular para favorecer el crecimiento vegetal, restaurar órganos destruidos, activar la protección mecánica (por ejemplo la formación de

tricomas), regenerar nuevos brotes y además asimilar nutrientes del medio que le permitan a la planta producir metabolitos secundarios de defensa para subsistir en un ambiente de estrés.

Las plantas perciben y diferencian entre las señales DAMPs y HAMPs (Schmelz *et al.* 2006; Zebelo *et al.*, 2014; Schmelz, 2015; Chen *et al.*, 2019; Vega-Muñoz *et al.*, 2020), por ello se decidió incluir dos tratamientos más, uno denominado DM, en el cual el tejido foliar fue dañado con un bisturí de forma proporcional a la presencia de 2L, y el otro tratamiento fue DM+SO, en el cual se aplicó SO en el sitio del daño; esto con la finalidad de estudiar si estos tratamientos inducen cambios químicos en el perfil de exudación como parte de la respuesta sistémica (Fig. 22). De acuerdo con los resultados del indicador de acidez y pH, los exudados radiculares obtenidos del tratamiento DM + SO presentaron mayor acidez que los exudados DM y control (C); aunque cabe destacar que este cambio en el pH no fue tan evidente como en los tratamientos donde se encontraban las larvas presentes. Los mecanismos mediante los cuales las plantas diferencian entre heridas mecánicas y heridas del insecto son todavía desconocidos, aunque se evalúa que la cantidad de tejido dañado es un componente clave de la respuesta. Un enfoque novedoso que permite realizar una investigación más específica sobre la respuesta de la planta es el estudio del papel de la SO en la interacción planta-lepidóptero, de ahí la importancia de incluir en el presente estudio el tratamiento DM + SO. En la actualidad se han reportado algunos elicitores en la SO de *Spodoptera spp.* que desencadenan la defensa vegetal como lo son los ácidos grasos conjugados con aminoácidos, tal como la volicitina (*N*-17- hidroxilinoil-L-

glutamina), que fue identificada en la SO de *S. litura* (Yoshinaga *et al.*, 2008) y las inceptinas identificadas en *S. frugiperda*, conocidos como péptidos con uniones disulfuro producidos a través de la digestión de proteínas de la planta en el intestino del insecto (Schmelz *et al.*, 2006). Particularmente, las plantas de maíz sometidas a los tratamientos DM + SO de larvas de *S. frugiperda* y DM + inceptina, reportan un incremento en la producción de AJ, AS y etileno en comparación a las plantas control y plantas con DM (Schmelz *et al.* 2006). Con todo lo descrito anteriormente se sugiere que la interacción de señales DAMPs y HAMPs en el tratamiento DM + SO inducen la acidificación en la planta y la diferencia en el pH con los tratamientos C y DM está directamente relacionada con la magnitud del daño y la presencia de la SO en la herida.

El papel que juegan las raíces de las plantas durante el ataque de insectos herbívoros en el follaje ha sido poco estudiado. Las raíces de las plantas son órganos de almacenamiento dinámico de fuente de carbono, son responsables de la síntesis de metabolitos de defensa y juegan un papel muy activo en la percepción de señales del ambiente, por lo tanto, las raíces forman parte integral de las respuestas de defensa de las plantas y ayudan a la planta a tolerar el estrés por herbivoría foliar o bien por la presencia de fitopatógenos Erb y colaboradores realizaron un estudio específicamente en el maíz, después de una interacción por 18 h con 20 L de *S. littoralis* en estadio L2, la respuesta sistémica de la raíz fue diferente y más pronunciada con respecto al follaje, puesto que la infestación en el follaje resultó en la inducción de 209 y la supresión de 3 transcritos, sin embargo, en la raíz, se indujeron 168 y se reprimieron 201 transcritos, además no se reportó

un traslape en los cambios transcripcionales entre ambos tejidos (Erb *et al.*, 2009). Los autores sugieren que la síntesis de tal variedad de metabolitos de defensa se lleva a cabo en las raíces y luego son transportados a las hojas porque tras el ataque foliar por los artrópodos se destruye gran parte del follaje y de esta manera, el sitio de biosíntesis de estos compuestos permanece protegido debajo del suelo; adicionalmente, mencionan que las raíces tienen acceso al nitrógeno y otros nutrientes del suelo necesarios para la biosíntesis de metabolitos primarios y secundarios.

Un aspecto importante para considerar durante la relación planta – insecto herbívoro es el papel de los carbohidratos durante el periodo de estrés. Los carbohidratos cumplen diversas funciones en las plantas tal como función estructural, de almacenamiento y de señalización. Ante el ataque de un insecto herbívoro, la planta transporta los fotoasimilados hacia la raíz, haciéndolos temporalmente inaccesibles al insecto, una vez transcurrido el ataque, son regresados al follaje para la regeneración del tejido dañado o formación de nuevos brotes, esta distribución de azúcares de la raíz al follaje forma parte de un mecanismo de tolerancia (De Jong y Van Der Meijden, 2000; Erb *et al.*, 2009; Schultz *et al.*, 2013; Mitchell *et al.*, 2016).

Otro cambio químico importante observado en la composición de los exudados radiculares del maíz en respuesta al ataque de *S. frugiperda* estuvo relacionado con el contenido de carbohidratos. Entre los carbohidratos solubles identificados estuvieron pentosas, hexosas, polialcoholes y el disacárido sacarosa. Interesantemente, los resultados mostraron que en el tratamiento 2L con un

incremento considerable en la exudación de carbohidratos en comparación al resto de los tratamientos (C, DM, DM + SO y 4L) (Fig. 22). Los mecanismos que inician y controlan la distribución de fotosintatos en la planta en respuesta a la herbivoría no se han esclarecido por completo. Sin embargo, se reporta que una defoliación parcial conlleva a un incremento en la tasa fotosintética en los tejidos que permanecen intactos, sugiriendo que la fotosíntesis compensatoria es una respuesta fisiológica importante ante la presencia de la plaga (Mitchell *et al.*, 2016). Adicionalmente, en un estudio con plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*), se reporta un incremento en la reserva temporal de azúcares en la raíz y en la actividad de la enzima invertasa ante el ataque de los insectos herbívoros foliares *Trichoplusia ni* y *Manduca sexta* (Kaplan *et al.*, 2008). El incremento en la reserva de carbohidratos en la raíz incrementa a su vez la calidad del tejido y favorecerá a los consumidores que se encuentran ubicados en el área de la rizósfera, tal como los microorganismos benéficos del suelo que proporcionan beneficios a la planta en la resistencia y tolerancia al ataque de insectos herbívoros en el follaje.

El uso de microorganismos benéficos del suelo para el control de plagas ha tomado gran interés en los últimos años (Román *et al.*, 2011; Pangesti *et al.*, 2013; Mitchell *et al.*, 2016; Lombardi *et al.*, 2018). Particularmente, los hongos del género *Trichoderma* inducen resistencia en las plantas de maíz contra *S. frugiperda*; esta protección en la planta está correlacionada con un incremento en la producción de compuestos de defensa como terpenos y AJ. Adicionalmente, ensayos farmacológicos de los compuestos producidos por el hongo, 1-octen-3-ol y 6-PP, reducen el consumo del tejido foliar y alteran los patrones de alimentación de este

insecto herbívoro (Contreras-Cornejo *et al.*, 2018). Otro estudio refiere que la presencia de *Trichoderma* en la rizósfera impacta sobre las comunidades de artrópodos foliares en un campo de maíz; lo que pone de manifiesto como la interacción de dos especies influye sobre otras especies de distinto nivel trófico (Contreras-Cornejo *et al.*, 2021b). Aunque el propósito de un estudio de interacciones multitróficas es comprender cómo se dan estas interacciones interespecíficas en la naturaleza, lo cierto es que aún es necesario continuar con estudios más simples de interacción ya sea entre dos o máximo tres especies, antes de abordar redes complejas de interacciones múltiples.

Los mecanismos de resistencia (síntesis de metabolitos secundarios de defensa y producción de barreras de defensa) y tolerancia (fotosíntesis, crecimiento, retraso en la fenología) que emplea la planta en respuesta al ataque de insectos herbívoros pueden tener un efecto sistémico sobre el rizobioma (Erb *et al.*, 2009; Pangesti *et al.*, 2013; Mitchell *et al.*, 2016). Una de las fuerzas selectivas que afectan la dinámica de la población microbiana en el suelo, lo representan aquellos compuestos químicos excretados por las raíces de las plantas hacia la rizósfera (Pangesti *et al.*, 2013; Steinauer *et al.*, 2016). Con esto, se ha despertado un gran interés en la caracterización funcional de los exudados radiculares y los factores que pueden modificar su riqueza química, tanto su concentración como de las diferentes especies químicas contenidas. Landgraf *et al.* (2012), reportaron que un daño mecánico moderado pero repetido en el follaje en *Medicago truncatula* intensifica la colonización de *Glomus intraradicens* o bien de *Sinorhizobium meliloti*. Por su parte, Lombardi *et al.* (2018), demostraron que las oxilipinas presentes en

los exudados radiculares de plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum*) sometidas a diferentes tipos de estrés (DM, sal, e infección por el fitopatógeno foliar *Botrytis cinerea*) estimulan la quimioatracción y el crecimiento radial de *T. harzianum*.

En el presente trabajo se estudió cómo se afecta el crecimiento de *T. atroviride* en respuesta a los exudados radiculares de las plantas de maíz expuestas al ataque de 2 y 4L de *S. frugiperda* en estadio L3. Para ello, los exudados radiculares se colectaron y adicionaron a un medio de cultivo posteriormente inoculado con esporas del hongo. Los resultados indicaron un crecimiento y esporulación de *T. atroviride* fueron significativamente superiores cuando el medio de cultivo fue enriquecido con los exudados del tratamiento 2L (Fig. 22). Cabe recordar que en este tratamiento hubo una mayor concentración de carbohidratos totales y mayor acidez. Los carbohidratos son una fuente de carbono esencial para el crecimiento de todos los microorganismos. En el caso de *T. atroviride*, Macías-Rodríguez y colaboradores (2018), reportaron que el hongo induce la exudación radicular de carbohidratos en plantas de jitomate, principalmente de sacarosa, lo que favoreció la colonización. Entre los carbohidratos de mayor exudación radicular en el tratamiento 2L fueron glucosa, fructosa, sacarosa y diversos polialcoholes. De acuerdo con un estudio de Oszuts, *et al.* (2020), *Trichoderma* presenta buen crecimiento con pentosas, hexosas o polialcoholes como fuente de carbono; por lo que la cantidad de carbohidratos totales, aunado al pH ácido de los exudados, favorecieron el crecimiento y desarrollo reproductivo del hongo. En este sentido, Pelagio-Flores *et al.* (2017) reportaron que un pH entre 4 y 6 favorece el crecimiento y la colonización de *Trichoderma*.

Por otro lado, los exudados radiculares obtenidos del tratamiento 4L limitaron el crecimiento y la esporulación del hongo; además, la respuesta del hongo fue muy similar al tratamiento del medio de cultivo sin fuente de carbono (S-). La defoliación del 40% del tejido por el ataque de las 4L al parecer afectó severamente la tasa fotosintética, el tejido de conducción y el transporte de los fotosintatos hacia la raíz, lo que a su vez redujo la exudación radicular de carbohidratos; además, el pH del tratamiento 4L fue menos ácido que el de 2L. Este resultado sugiere que un mayor número de individuos en el follaje puede tener una repercusión negativa en la asociación de la planta con los microorganismos benéficos del suelo.

Dado que los exudados radiculares están compuestos por una mezcla de carbohidratos solubles y estos compuestos a su vez son importantes para el crecimiento de *Trichoderma*, se decidió estudiar si distintas concentraciones (10^2 , 10^3 , 10^4 y 10^5 nM) de una mezcla sintética de glucosa, fructosa, myo inositol, arabinosa y sacarosa afectan el crecimiento radial y número de esporas de *T. atroviride*. Lo que se observó fue que *Trichoderma* es sensible a la cantidad de carbono y modula su crecimiento de una forma dosis-dependiente y aún a la concentración más baja de carbohidratos (10^2 nM) no se limita el crecimiento colonial, el cual fue similar al tratamiento sin fuente de carbono (S-), pero si estimuló la esporulación.

Por otro lado, también se estudió el efecto de los exudados radiculares del tratamiento DM + SO sobre el crecimiento radial y el número de esporas del hongo. En este tratamiento el contenido de carbohidratos fue similar a C, pero el pH fue más ácido. Los resultados mostraron que el crecimiento y número de esporas fueron

menores a los obtenidos cuando el hongo se creció en los exudados del tratamiento control (C). Como se mencionó anteriormente, en la SO se encuentran elicitors que desencadenan la defensa en la planta y por consiguiente la aplicación de la SO en la herida probablemente estimuló un cambio no solo en la acidez sino en el tipo de metabolitos secundarios que se exudaron, por lo que no se descarta la presencia de algún compuesto que esté actuando como molécula señal que es percibida por el hongo afectando su crecimiento y desarrollo reproductivo.

Entonces la diferencia en la respuesta del hongo ante los exudados radiculares de los distintos tratamientos puede deberse al pH, al perfil de carbohidratos (tipo y cantidad) y a la presencia de metabolitos secundarios que conjuntamente participan en la modulación del crecimiento y desarrollo reproductivo de hongo. Algunos de esos metabolitos pudieran ser las oxilipinas que ya fueron identificadas en los exudados radiculares de plantas de jitomate infectadas con *B. cinerea* en el follaje y estimularon el crecimiento del hongo de forma dosis dependiente (Lombardi *et al.*, 2018); por lo que resultaría interesante investigar si el ataque de insectos masticadores también induce la exudación de oxilipinas en respuesta al ataque de 2 y 4L de *S. frugiperda*.

Ya que los metabolitos primarios y secundarios que exudan las plantas se consideran un actor importante en el ensamblaje de microbios puesto que son fuente de nutrientes que mantienen la vida microbiana cerca de la planta o bien actúan en procesos dinámicos de selección y supresión (Berendsen, *et al.* 2012), es que se decidió estudiar el efecto de los BX sobre el crecimiento y número de esporas de *Trichoderma*. Los BX son metabolitos secundarios producidos

específicamente en respuesta al ataque de artrópodos herbívoros, y se han identificado en los exudados radiculares del maíz tras el ataque de *S. frugiperda* (Hu-Lingfei *et al.*, 2018). Adicionalmente, estudios previos señalan que los BX participan de la modulación de comunidades microbianas del suelo cuando las plantas se encuentran en estrés por herbivoría foliar (Schütz *et al.*, 2019). Por ejemplo, Neal y Ton (2013) reportaron que el BX 2,4-dihidroxi-7-metoxi-2H-1,4-benzoxazin-3 (4H)-ona (DIMBOA) incrementó la colonización de *Pseudomonas putida* en plantas de maíz.

Los BX son metabolitos heteroaromáticos derivados del triptófano con restos de ácido benzoico y la forma con mayor estabilidad química es el 6-metoxi-benzoxazolin-2-ona (MBOA) (Etzerodt *et al.*, 2006; Frey *et al.*, 2009), por lo que en este trabajo se diseñó una metodología de identificación por EM en los exudados radiculares del maíz. La concentración de MBOA fue superior cuando la planta se encontraba en estrés por la aplicación de la SO y por la presencia de las larvas de *S. frugiperda* (Fig. 22). Una vez corroborada la presencia del BX en los exudados, se realizó una curva dosis-respuesta (10^2 , 10^3 , 10^4 y 10^5 nM) de MBOA para determinar si la presencia de este metabolito limita el crecimiento y el desarrollo reproductivo de *T. atroviride*. En esta investigación ninguna de las concentraciones ensayadas, limitaron el crecimiento y el número de esporas producidas por el hongo. Este resultado muestra que el MBOA no inhibe el crecimiento de *T. atroviride* y sugiere que este compuesto fue procesado por el hongo como fuente de carbono para su crecimiento ya que no se adicionó azúcar al medio de cultivo.

Los mecanismos de emisión y recepción de señales químicas que modulan las interacciones multitróficas son muy complejos. Sin embargo, el conocimiento generado en este estudio sugiere que la relación exitosa que pudiera existir entre una planta y un microorganismos benéfico que le brinde beneficio durante la resistencia y tolerancia al estrés por el ataque de insectos masticadores, dependerá del tipo de estímulo (DM o por la presencia de un insecto herbívoro en el follaje), la severidad del daño, el nivel de infestación, así como de la capacidad del microorganismo para adaptarse a los cambios bioquímicos que sufre la planta, toda vez que el perfil químico en los exudados radiculares son un reflejo del estado nutricional y de defensa que se encuentra la planta durante el estrés.

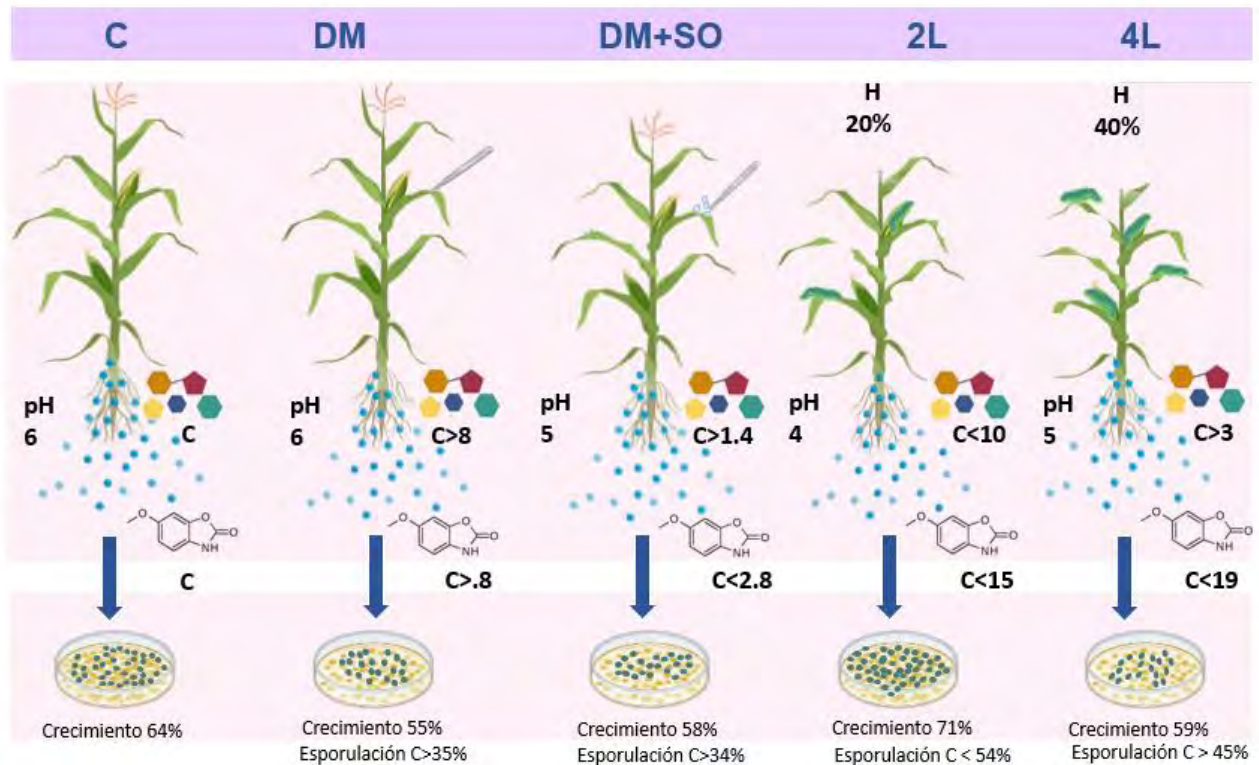


Fig. 22 Efecto del artrópodo herbívoro *S. frugiperda* sobre la exudación radicular de la planta de maíz y el crecimiento y esporulación de *T. atroviride*. El esquema representa como la planta de maíz responde diferente dependiendo del estímulo ya sea mecánico (tratamiento DM) o biológico (tratamientos DM + SO, 2 y 4L) al que se enfrenta. Como parte de la respuesta sistémica de defensa, la planta modifica el pH y el contenido de carbohidratos en los exudados radicales, los cuales a su vez modulan el crecimiento y la esporulación de *T. atroviride*. En particular, en el tratamiento 2L, se observó una mayor acidificación en los exudados radicales y un incremento en la exudación de carbohidratos de 10 veces más que en el control, lo que estimuló en gran medida el crecimiento y la esporulación del hongo. El benzoxasinoide MBOA identificado en los exudados radicales del maíz no afectó el crecimiento ni la esporulación de *T. atroviride*. La letra C refiere al tratamiento control sin daño mecánico y sin la presencia del herbívoro.

9. Conclusión

El perfil químico de exudados radicales en el maíz es dependiente del nivel del daño, la secreción oral y del número de individuos (2L, 4L) de *S. frugiperda*, lo que a su vez generó una respuesta específica en el crecimiento y desarrollo reproductivo de *Trichoderma atroviride*.

10. Referencias

Abrahams P., Bateman M., Beale T., Clotey V., Cock M., Colmenarez A. (2017). Fall Armyworm: Impacts and implications for Africa; Evidence CABI. Oxfordshire. 15: 108-115.

Agroasemex. (2019). Las plagas producen pérdidas de hasta un 40 por ciento en la producción agrícola, revela estudio de la FAO. <https://www.gob.mx/agroasemex/articulos/las-plagas-producen-perdidasdehasta-40-por-ciento-en-la-produccion-agricola-revela-estudio-de-la-fao?idiom=es>

Akladios S., Abbas SM. (2012). Application of *Trichoderma harziunum* T22 as a biofertilizer supporting maize growth. African Journal of Biotechnology. 11: 63- 83.

Altomare C., Norvell T., Björkman., Harman G. (1999). Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai. Applied and Environmental Microbiology 65: 2915-2926.

Aniszewski, T. (2015) Alkaloids: Chemistry, Biology, Ecology, and Applications. Elsevier. 1231: 45-208.

Appel H., Cocroft R. (2014). Las plantas responden a las vibraciones de las hojas causadas por la masticación de insectos herbívoros. Oecologia, 175: 1257-1266.

Aragón, A., López-Olguin, J. (2001). Descripción y control de las plagas del amaranto de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP). Publicación especial. México. 2: 7-8

Arimura G., Ozawa R., Kugimiya S., Takabayashi J., Bohlmann J. (2004 a). Herbivoreinduced defense response in a model legume. Two-spotted spider mites induce emission of (E)- β -ocimene and transcript accumulation of (E)- β -ocimene synthase in *Lotus japonicus*. Plant Physiology. 35: 1970-1983.

Arimura G., Huber D., Bohlmann J. (2004). Forest tent caterpillars (*Malacosoma disstria*) induce local and systemic diurnal emissions of terpenoid volatiles in hybrid poplar (*Populus trichocarpa* × *Deltoides*): cDNA cloning, functional characterization, and patterns of gene expression of (–)-germacrene D synthase, ptdtps1. *The Plant Journal*. 37: 603–616.

Artigas J. (1994). Insectos de interés agrícola, forestal, médico y veterinario (nativos, introducidos y susceptibles de ser introducidos). *Entomología Económica Universidad de Concepción, Concepción*. 2: 166-180.

Avanci N., Luche D., Goldman G., Goldman M. (2010). Jasmonates are phytohormones with multiple functions, including plant defense and reproduction. *Genetics and Molecular Research*. 9: 495- 505.

Avilés González M., Pérez Valdez J., Wong Pérez J. (2016). Principales plagas que atacan al cultivo de maíz. INIFAP. Agro síntesis <https://www.agrosintesis.com/principales-plagas-que-atacan/>

Bacete L, Hamann T. (2020). The Role of Mechanoperception in Plant Cell Wall Integrity Maintenance. *Plants*. 9: 574-598.

Benítez T., Rincon M. (2004). Mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*. 7: 245-260.

Benítez T., Rincón A., Limón M., Codón A. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Microbiological Research*. 7: 249-260.

Benton R., Vannice S., Gomez C., Vosshall L. (2009). Supplemental Experimental Procedures. *Cell*. 136: 149-162

Berendsen L., Corné M., Pieterse P., Bakker A. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*. 18: 478-486,

Bishop P., Makus D. J., Pearce G., Ryan C. (1981). Proteinase inhibitor–inducing factor activity in tomato leaves resides in oligosaccharides enzymically released from cell walls. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 78: 3536–3540.

Blanco-Labra A., Aguirre Mancilla C. (2002). Proteínas Involucradas en los Mecanismos de Defensa de Plantas. *Acta Universitaria*. 12: 3-28

Borrero F., Becher G., Birgersson G., Bengtsson M., Witzgall P., Saveer M. (2015). Flight attraction of *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera, Noctuidae) to cotton headspace and synthetic volatile blends. *Frontiers in Ecology and Evolution*. 3: 56-71

Buenaventura G., Van Doorn A., Baldwin IT. (2011). Estimulantes asociados a herbívoros: señalización y metabolismo de FAC. *Trends Plant Science* 16: 294 – 299

Burdman S., Veder M., German R., Kijel J., Okon Y. (1998). Legume crop yield promotion by inoculation *Azospirillum*. *Agronomie* 32: 550-609.

Camarena G. (2009). Señales en la interacción planta insecto. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. 15: 81-85.

Campbell B., Duffey, S. (1979). Tomatine and parasitic wasps: potential incompatibility of plant antibiosis with biological control. *Science*. 205: 700-709.

Capinera J. (2017). Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Insecta: *Lepidoptera: Noctuidae*). <http://edis.ifas.ufl.edu/in255>

Carsolio C., Benhamou N., Haran S., Cortés C., Gutierrez A., Chet I., Herrera E. (1999). Role of the *Trichoderma harzianum* endochitinase gene, ech42, in mycoparasitism. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 929-935.

Carvalhais C. Dmitri F., Mohammad-Reza H., Rainer B., Nicolaus von W. (2011). Root exudation of sugars, amino acids, and organic acids by maize as affected by

nitrogen, phosphorus, potassium, and iron deficiency. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. 174:11-33.

Castillo Samudio Ricaurte. (2007). Efecto de la aplicación de (*Trichoderma harzianum*) en la producción de maíz dulce (*Zea mays*) variedad Golden Baby. Escuela Agrícola Panamericana ZAMORANO. Tesis de maestría.4-78

Chávez L., Álvarez A., Ramírez R. (2012). Apuntes sobre algunos reguladores del crecimiento vegetal que participan en la respuesta de las plantas frente al estrés abiótico. *Revista de Cultivos Tropicales*. 33: 42-56.

Chávez M.; Montaña J., Martínez M., Mercado M., Rodríguez M., Quevedo B. (2008). Efecto del sustrato y la exposición a la luz en la producción de una cepa de *Trichoderma sp.* *Universitas Scientiarum*. 13: 245- 251.

Chen M., Zhang C., Zhang J., Guoyin K., Bin L., Zhenlin H., Lili J. (2019). The involvement of DAMPs-mediated inflammation in cyclophosphamide-induced liver injury and the protection of liquiritigenin and liquiritin, *European Journal of Pharmacology*. 32: 856-873.

Chet I., Inbar J., Hadar I. (1997) Fungal antagonists and mycoparasites: Environmental and microbial relationships. *Advances in Enzyme Research* 165: 175- 184

Clyne J., Warr G., Carlson R. (2000). Candidate taste receptors in *Drosophila*. *Science*. 287: 1830-1834.

Contreras H., Macías L., Cortés C., López 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: 1579-1592

Contreras H., Macías L., del-Val E., Larsen J. (2016). Ecological functions of *Trichoderma spp.* and their secondary metabolites in the rhizosphere: interactions with plants. *FEMS Microbiology Ecology*. 92: 36-48.

Contreras H., Macías L., Ek del-Vala C., Larsen J. (2018a). The root endophytic fungus *Trichoderma atroviride* induces foliar herbivory resistance in maize plants. *Applied Soil Ecology*. 124: 45-53.

Contreras H., Ek del-Val., Macías L., Alarcón A., González C., Larsen J. (2018b). *Trichoderma atroviride*, a maize root associated fungus, increases the parasitism rate of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* by its natural enemy *Campoletis sonorensis*. *Soil Biology and Biochemistry*. 122: 187- 202.

Contreras H., Macías L., del-Val E., Larsen J. (2017). The root endophytic fungus *Trichoderma atroviride* induces foliar herbivory resistance in maize plants. *Applied Soil Ecology*. 78: 105-122.

Cruz C., González- Amaro R., Burgeff C., Enríquez-García C., Oliveros Galindo O., Acevedo Gasman F. (2020). Maíz Chalqueño. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Cd. de México. México. <https://www.biodiversidad.gob.mx/diversidad/alimentos/maices/razas/grupo>

Cucuk C., Kivanci M. (2008). Effect of carbon source on production of lytic enzymes by *Trichoderma harzianum*. *Journal of Applied Biological Sciences*. 2: 15-26.

Davies, P. J. (2010). Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action. Cornell University. 35: 624- 634.

Day R., Abrahams P., Bateman M., Beale T., Clotey V., Cock M., Early R., Godwin J., Gomez J., Moreno P., Murphy S. (2017). Fall armyworm: impacts and implications for Africa. *Pest Management*. 84: 90-103.

De Coste., Gadkar V., Filion M. (2010). *Verticillium dahliae* altera *Pseudomonas* spp. poblaciones y expresión génica de HCN en la rizosfera de fresa. *Journal of Microbiology*. 56: 906-915.

De Jong T., Van Der Meijden. (2000). On the correlation between allocation to defence and regrowth in plants. *OIKOS*. 23: 114- 133.

Dekker T., Ibba I., Siju P., Stensmyr C., Hansson S. (2006). Olfactory shifts parallel superspecialism for toxic fruit in *Drosophila melanogaster* sibling, *D. sechellia*. *Current Biology*. 16: 101-109.

De Moraes C., Mescher M., Tumlinson J. (2001). Caterpillar-induced nocturnal plant volatiles repel conspecific females. *Nature*. 410: 550- 580.

De Rijke E., Fuera P., Wilfried M., Niessen A., Freek A., Cees G., Udo A., Brinkman T. (2006). Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography*. 1112: 31–63

De Vos M., Van Oosten V., Van Poecke R., Van Pelt J., Pozo M., Mueller M., Buchala A., Metraux J., Van Loon L., Dicke M., Pieterse C., (2005). Signal signature and transcriptome changes of *Arabidopsis* during pathogen and insect attack. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 18: 915-937.

Dicke, Marcel., Vet, Louise. (1999). Plant-carnivore interactions: evolutionary and ecological consequences for plant, herbivore and carnivore. In: *Herbivores: Between Plants and Predators*. The 38th Symposium of the British Ecological Society. 448: 483-520.

Eisendle M., Oberegger H., Buttinger R., Illmer P., Haas H. (2004). Biosynthesis and uptake of siderophores is controlled by the PacC-mediated ambient-pH regulatory system in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell* 3: 533-561.

EMIM (2019). Encuesta Mensual de la Industria Manufacturera (EMIM) - 2007 - 2019. Base En: <https://www.inegi.org.mx/programas/emim/2007/>

Erb M., Lenk C., Degenhardt J., Turlings T. (2009). The underestimated role of roots in defense against leaf attackers. *Trends in plant science*. 14: 653-9.

Estrada L. (1989). El código florentino: su información etnobotánica. *Agrociencia*. 71: 382-399

Etzerodt T., Nielsen S., Mortensen AG., Christophersen C., Fomsgaard I. (2006). Elucidar el patrón de transformación del aleloquímico de cereales 6-metoxi-2-benzoxazolinona (MBOA) y el análogo de trideuteriometoxi [D₃] -MBOA en el suelo. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54: 1075–1085.

Evangelou M., Ebel M., Schaeffer A. (2006). Evaluation of the effect of small organic acids on phytoextraction of Cu and Pb from soil with tobacco *Nicotiana tabacum*. *Chemosphere*. 63: 993-1004.

Fan L., Neumann M. (2004) The Spatially Variable Inhibition by Water Deficit of Maize Root Growth Correlates with Altered Profiles of Proton Flux and Cell Wall pH, *Plant Physiology*. 135: 2291–2300

FAO. (2017). Maíz. En: <http://www.fao.org/3/t0395s/T0395S02.htm>.

Farmer E., Almeras E., Krishnamurthy V. (2003). Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. *Current Opinion in Plant Biology*. 6: 366- 378.

Farmer E., Ryan C. (1990). Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of protease inhibitors in plant leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 87: 7713–7716.

Fravel D. (2005). Commercialization and implementation of biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*. 43: 325- 359.

Frey M., Chomet P., Glawischnig E., Stettner C., Grün S., Winklmeier A. (1997). Analysis of a chemical plant defense mechanism in grasses. *Science*. 277: 680- 696.

Frey M., Schullehner K., Dick R., Fiesselmann A., Gierl A. (2009). Biosíntesis de benzoxazinoides, un modelo para la evolución de vías metabólicas secundarias en plantas. *Fitoquímica*. 70: 1645–1651.

Galarza M. (1996). Aumente su cosecha de maíz en la Sierra Quito, Ecuador., Estación Experimental Santa Catalina. Boletín Divulgativo. 12: 35-48.

García C., Gonzáles M., Cortez E. (2012). Uso de enemigos naturales y biorracionales para el control de plagas de maíz. Ra Ximhai. 8: 57-70.

Garnica A., Barrera S., Muñoz E., Raya J., Méndez A., Macías L., Ruiz L., López J. (2015). The volatile 6-pentyl-2H-pyran-2-one from *Trichoderma atroviride* regulates *Arabidopsis thaliana* root morphogenesis via auxin signaling and ethylene insensitive functioning. The New phytologist. 209: 111-135.

Glazebrook J. (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. Annual Review of Phytopathology. 43: 215- 227.

Goergen G., Kumar P., Sankung S., Togola A., Tamò M. (2016). First report of outbreaks of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera, Noctuidae), a new alien invasive pest in West and Central Africa. PLoS ONE.11: 5-9.

Grabe V., Sachse S. (2017). Fundamental principles of the olfactory code. Biosystems. 164: 10-16

Gudiel L. (1997). Abonos. Mundi Prensa. 93: 185-199

Halitschke R., Schittko U., Pohnert G., Boland W., Baldwin T. (2001). Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. III. Fatty acid–amino acid conjugates in herbivore oral secretions are necessary and sufficient for herbivore–specific plant responses. Plant Physiology. 125: 711–717

Halkier B., Gershenzon J. (2006). Biology and biochemistry of glucosinolates. Annual Review of Plant Biology. 57: 315-333.

Hancock R., Hogenhout S., Foyer C. (2015). Mechanisms of plant-insect interaction. Journal of Experimental Botany. 66: 380- 421.

Harman G., Howell CR., Viterbo A., Chet I., Lorito M. (2004) *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Reviews. 2: 43-56

Harper J., Jones M., Sackvill H. (1991) The evolution of roots and the problems of analysing their behaviour. Plant root growth. An ecological perspective Atkinson, plant root growth. An ecological perspective. Blackwell Scientific Publications Oxford. 3: 13-22.

Hedin P., Davis F., Williams W., Hicks R., Fisher T. (1996). Hemicellulose is an important leaf-feeding resistance factor in corn to the fall armyworm. Journal of Chemical Ecology. 22: 1523- 1655.

Heil M. (2014). Herbivore-induced plant volatiles: targets, perception and unanswered questions. New Phytologist. 204: 288-306.

Hochholdinger F., Feix G. (1998). Early post-embryonic root formation is affected in the maize mutant *lrt1*. Plant Journal. 16: 220-255.

Hoffland E., Findenegg G., Nelemans J. (1989). Solubilization of rock phosphate by rape. Plant Soil. 113: 123-161.

Howell C. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. Plant Disease 87: 4–10.

Howell R. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. Plant Disease. 87: 22-34.

Howe G. (2004). Jasmonates as Signals in the Wound Response. Journal of Plant Growth Regulation. 23: 223-237

Howell C., Puckhaber L. (2005). A study of the characteristics of “P” and “Q” strains of *Trichoderma virens* to account for differences in biological control efficacy against cotton seedling diseases. *Biology Control*. 33: 210- 217.

Howell C. (2006). Understanding the mechanisms employed by *Trichoderma virens* to effect biological control of cotton diseases. *Phytopath*. 96: 263-178.

Hoyos C., Orduz S., Bisset J. (2009). Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. *Biology Control*. 51: 387-409.

Hu L., Cam R., Cadot S., Zhang X., Ye M., Li B., Manzo D., Chervet N., Steinger T., van der Heijden M., Schlaeppi K., Erb M. (2018). Root exudate metabolites drive plant-soil feedbacks on growth and defense by shaping the rhizosphere microbiota. *Nature Communications*. 9: 2738-2756.

Huerta. (2020) El lenguaje de las plantas. Gaceta UNAM. <https://www.gaceta.unam.mx/el-lenguaje-de-las-plantas/>

Hung R., Lee S., Bennett J. (2013). *Arabidopsis thaliana* as model system for testing the effect of *Trichoderma* volatile organic compounds. *Fungal Ecology*. 6: 4-19.

Hunter M. (2003). Effects of plant quality on the population ecology of parasitoids. *Agriculture and Forest Entomology*. 5: 4-8.

Ibarra A. (2011). Caracterización de ácidos orgánicos de bajo peso molecular presentes en exudados radiculares de *Zea mays*: aplicaciones para la remediación de suelos contaminados por metales pesados. *Revista de divulgación científica y tecnología de la Universidad Nacional de Nuevo León*. 58: 77-108.

Infante D., Martínez B., González N., Reyes Y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal*. 4: 24-35.

INTAGRI. (2013) Ciclo biológico de *Spodoptera frugiperda*. INTAGRI. 20:13-33

Jetiyanon K., Kloepper J. (2002). Mixtures of plant growth- promoting rhizobacteria for induction of systemic resistance against multiple plant diseases. *Biology control*. 24: 202-241.

Jordan M., Casaretto J. (2006). Hormonas y reguladores del crecimiento: etileno, ácido abscísico, brasinoesteroides, poliaminas, ácido salicílico y ácido jasmónico. *Fisiología Vegetal*. Ediciones Universidad de la Serena, 12: 5-16.

Juszczuk I., Wiktorowska A., Malusa E., Rychter A. (2004). Changes in the concentration of phenolic compounds and exudation induced by phosphate deficiency in bean plants. *Plant Soil*. 267: 33-41.

Kaplan I., Halitschke R., Kessler A., Rehill B., Sardanelli S., Denno R. (2008). Physiological integration of roots and shoots in plant defense strategies links above- and belowground herbivory. *Ecology letters*.5: 448-463

Kesten C., Gámez-Arjona F., Menna A., Scholl S., Dora S., Huerta A., Huang H., Tintor N., Kinoshita T., Rep M., Krebs M., Schumacher K., Sánchez-Rodríguez C. (2019). Pathogen-induced pH changes regulate the growth-defense balance in plants. *The EMBO Journal*. 16: 24-38.

Kucera B., Cohn MA., Leubner-Metzger G. (2005). Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Science Research*. 15: 281-307.

Lager I., Andréasson O., Dunbar T., Andreasson E., Escobar M., Rasmusson A. (2010). Changes in external pH rapidly alter plant gene expression and modulate auxin and elicitor responses. *Plant Cell Environ*. 33: 1513-28.

Lampkin, Nicolas. (1998). *Agricultura Ecológica*. Mundi Prensa. 3: 12-24

Landero E., Sanchez S. (1997). Algunos Enemigos naturales de plagas de maíz y crucíferas en Saltillo, México. *Memorias XX Congreso, Sociedad Mexicana de Control Biológico Universidad de Guadalajara*. 3: 155-157.

Landgraf R., Schaarschmidt S., Hause B. (2012). Repeated leaf wounding alters the colonization of *Medicago truncatula* roots by beneficial and pathogenic microorganisms. *Plant Cell Environment*. 35: 1344-57.

Leal W. (2013). Odorant reception in insects roles of receptors, binding proteins, and degrading enzymes. *Annual Review of Entomology*. 58: 373-391

Leandro L., Guzmán T., Ferguson L., Fernandez G., Jouws F. (2007). Population dynamics of *Trichoderma* in fumigated and compostamended soil and on strawberry roots. *Applied Soil Ecology*. 35: 222-237.

Lezaun J. (2014). Oruga militar o Gusano cogollero un problema para los cultivos de maíz y sorgo. *CropLife*. <https://www.croplifela.org/es/plagas/listado-de-plagas/gusano-cogollero>

Loaiza J. (2007). Volatile compounds from plants. Origin, emission, effects, analysis and agro applications *Revista Fitotecnia Mexicana*. 30: 315-327.

Lombardi N, Vitale S., Turrà D., Reverberi M., Fanelli C., Vinale F., Marra R., Ruocco M., Pascale A., d'Errico G., Woo S., Lorito M. (2018). Root Exudates of Stressed Plants Stimulate and Attract *Trichoderma* Soil Fungi. *Molecular Plant Microbe Interactions*. 4: 17-31

López Y., Pineda J., Hernández A., Ulacio D. (2010) Efecto diferencial de seis aislamientos de *Trichoderma* sobre la severidad de *Rhizoctonia solani*, desarrollo radical y crecimiento de plantas de maíz. *Bioagro*. 22: 111-133.

Macías L., Contreras H., Adame S. Larsen J. (2020) The interactions of *Trichoderma* at multiple trophic levels: inter-kingdom communication. *Microbiological Research*. 240: 15-36.

Macías L., Guzmán A., García P., Contreras H. (2018). *Trichoderma atroviride* promotes tomato development and alters the root exudation of carbohydrates, which stimulates fungal growth and the biocontrol of the phytopathogen *Phytophthora*

cinnamomi in a tripartite interaction system. FEMS Microbiology Ecology. 94: 137-155.

Marschner P., Rengel Z. (2007). Nutrient Cycling in Terrestrial Ecosystems. Soil Biology. 11: 112-136

Martinez A., Fernandez I., Lok G., Pozo M., Pieterse C., Van Wees S., (2017). Shifting from priming of salicylic acid- to jasmonic acid-regulated defences by *Trichoderma* protects tomato against the root knot nematode *Meloidogyne incognita*. New Phytology. 213: 1363-1377.

Martínez E., Barrios G., Rovesti L., Santos R. (2006). Manejo Integrado de Plagas. Manual Práctico. Centro Nacional de Sanidad Vegetal Cuba.12: 103-122.

McCormick A., Irmisch S., Reinecke A., Boeckler G.A., Veit D., Reichelt M., Hasson B., Gershenzon J., Köllner T., Unsicker S. (2014). Herbivore-induced volatile emission in black poplar: regulation and role in attracting herbivore enemies. Plant, Cell and Environment. 37: 1911-1923.

McIntyre M., Nielsen J., Arnau J., Van der Brink H., Hansen K., Madrid S. (2004.) Proceedings of the 7th European Conference on Fungal Genetics. Copenhagen Denmark.18: 22-34.

Medeiros H., Araujo V., Freitas L., Castillo P., Rubio M., Hermosa R., Monte E., (2017). Tomato progeny inherit resistance to the nematode *Meloidogyne javanica* linked to plant growth induced by the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride*. Nature.7: 40-216.

Mitchell C., Brennan M., Graham J., Karley A. (2016). J.Plant Defense against Herbivorous Pests: Exploiting Resistance and Tolerance Traits for Sustainable Crop Protection. Frontiers in Plant Science. 7: 1132-1145

Morant A., Jorgensen K., Jorgensen C., Paquette S., Sánchez-Pérez R., Moller B. (2008). β -Glucosidases as detonators of plant chemical defense. Phytochemistry. 69: 1803-1813.

Murúa G., Defagó V., Virla E. (2003). Evaluación de cuatro dietas artificiales para la cría de *Spodoptera frugiperda* (Lep.: *Noctuidae*) destinada a mantener poblaciones experimentales de himenópteros parasitoides. Boletín de Sanidad Vegetal Plagas. 29: 43- 51.

Murúa M., Virla E. (2004 a). Population parameters of *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lep.: *Noctuidae*) fed on corn and two predominant grasses in Tucumán (Argentina). Acta Zoológica Mexicana nueva serie. 210: 65-92.

Murúa M., VIRLA E. (2004b). Presencia invernal de *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lep.: *Noctuidae*) en el área maicera de la Provincia de Tucumán, Argentina. Revista Facultad Nacional Agronomía. 105: 33- 46.

Murúa G., Molina J., Coviella C. (2006). Population dynamics of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (*Lepidoptera: Noctuidae*) and its parasitoids in Northwestern Argentina. Florida Entomologist. 89: 175-182.

Neal A., Ton J. (2013). El cebado de defensa sistémico por *Pseudomonas putida* KT2440 en el maíz depende de la exudación de benzoxazinoides de las raíces. Plant Signal and Behavior. 8: 22-46

Neumann G. (2007). Root exudates and nutrient cycling. Soil biology. Nutrient cycling in terrestrial ecosystem. 7: 123-157

Niemeyer H. (2009). Hydroxamic acids derived from 2-hydroxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one: Key defense chemicals of cereals. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 57: 1680- 1696.

O'donnell, P., Calvert C., Atzorn R., Wasternack C., Leyser H., Bowles D. (1996). Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. Science 274: 1914–1917.

Ongley E. (1997). Lucha contra la contaminación agrícola de los recursos hídricos. FAO. 20: 95-116.

Ortiz F. (2010). Diccionario de especialidades agroquímicas. Thomson PLM del Ecuador S.A. Quito, Ecuador. 4: 292-310.

Oszust K., Cybulska, J., Frac, M. (2020). How Do Trichoderma Genus Fungi Win a Nutritional Competition Battle against Soft Fruit Pathogens? A Report on Niche Overlap Nutritional Potentiates. International Journal of Molecular Sciences. 21: 4235-4264

Pangesti N., Pineda A., Pieterse C., Dicke M., Van Loon J. (2013). Two-way plant mediated interactions between root-associated microbes and insects: from ecology to mechanisms. Frontiers in Plant Science. 4: 414-435

Pearce G., Strydom D., Johnson S., Ryan C. (1991a) Polypeptide from Tomato Leaves Induces Wound-Inducible Proteinase Inhibitor proteins. Science. 253: 895-897.

Pelagio R., Reynoso S., Garnica A. López J. (2017) La acidificación inducida por *Trichoderma* es un desencadenante temprano de cambios en el crecimiento de la raíz de *Arabidopsis* y determina la fitestimulación fúngica. Plant Science. 8: 800-822

Peña C., Sánchez J., Mertens R., Willmitzer L. (1989). Abscisic acid is involved in the wound-induced expression of the proteinase inhibitor II gene in potato and tomato. Proceedings of the National Academy of Sciences. 86: 9851-9855.

Phyo P., Gu Y., Hong M. (2019). Impact of acidic pH on plant cell wall polysaccharide structure and dynamics: insights into the mechanism of acid growth in plants from solid-state NMR. Cellulose 26: 291-304

Pieterse C., Dicke M. (2007). Plant interactions with microbes and insects: from molecular mechanisms to ecology. Trends in Plant Science. 12: 558- 569.

Pieterse C., Van Der D., Zamioudis C., Leon A., Van Wees S. (2012) Hormonal modulation of plant immunity. Annual Review of Cell and Developmental Biology. 28: 469-489.

Pii Y., Alessandrini M., Dall'Osto L., Guardini K., Prinsi B., Espen L., Zamboni A., Varanini Z. (2016). Time-Resolved Investigation of Molecular Components Involved in the Induction of NO₃⁻ High Affinity Transport System in Maize Roots. *Frontiers in Plant Science*. 7: 1657-1682

Pineda A., Zheng S., Van Loon J., Pieterse C., Dicke M. (2010). Helping plants to deal with insects: the role of beneficial soil-borne microbes. *Trends in Plant Science*. 15: 480- 514.

Pozo M., Van Loon L., Pieterse C. (2005) Jasmonates - Signals in plant-microbe interactions. *Journal of Plant Growth Regulation*. 23: 212- 222.

Prikryl L., Vancura V. (1980). Wheat root exudation as dependent on growth, concentration gradient of exudates and the presence of bacteria. *Plant Soil*. 57: 45- 69.

Ravensberg W. (2015). Crop protection in 2030: Towards a natural, efficient, safe and sustainable approach. In *Proceedings of the IBMA International Symposium*, Swansea University, Swansea, Wales. 7: 3-9.

Robert C., Veyrat N., Glauser G., Marti G., Doyen N., Villard M., Gaillard T., Köllner D. Giron., M Body. (2012). Un herbívoro de raíces especializado explota metabolitos defensivos para localizar tejidos nutritivos. *Ecology Letters* 15: 55–64.

Roman M., Fernandez R., Wyatt T., Sahrawy M., Heil M. Pozo M. (2011). Elicitation of foliar resistance mechanisms transiently impairs root association with arbuscular mycorrhizal fungi. *Journal of Ecology*. 99: 36-45

Römheld V., Marschner H. (1986). Evidence for a specific uptake system for iron phytosiderophores in roots of grasses. *Plant Physiol*. 80: 175–180.

Santana P., Jr, Kumar L., Da Silva S., Pereira L., Picanço, M. (2019). Assessing the impact of climate change on the worldwide distribution of *Dalbulus maidis*. *Pest management science*. 75: 2706–2715

Santi S., Locci G., Pinton R. Cesco S. Varanini Z. (1996). Plasma membrane H⁺-ATPase in maize roots induced for NO₃- Uptake. *Plant physiology*. 109: 1277-1283.

Schnee C., Köllner G., Held M., Turlings C., Gershenzon J., Degenhardt J. (2006). The products of a single maize sesquiterpene synthase form a volatile defense signal that attracts natural enemies of maize herbivores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103: 1129–1134.

Schuster A., Schmoll M. (2010). *Biology and biotechnology of Trichoderma*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 87: 760-787.

Schultz C., Appel H., Ferrieri A., Arnold T. (2013). Flexible resource allocation during plant defense responses. *Frontiers Plant Science*. 4: 324-346

Schmelz E., Carroll M., Leclere S., Phipps S., Meredith J. (2006). Fragments of ATP synthase mediate plant perception of insect attack. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103: 8894–8899.

Schmelz E. (2015). Impacts of Insect Oral Secretions on Defoliation-Induced Plant Defense. *Current Opinion in Insect Science*. 304: 1016-1044

Schoonhoven L., Van Loon J., Dicke P. (2005). *Insect-Plant Biology*. Oxford University Press. 38: 33-46

Shelton A., Turner D., Giga P., Wilkinson E., Zitzanza D., Utete T. (1995) *Diamondback Moth*. *Zimbabwe Horticultural Crops Pest Management*. New York State Agricultural Experiment Station. 2: 13-22.

Shrader J., Bohlmann J. (2015). *Biotechnology of Isoprenoids*. Springer: Switzerland. 12: 450- 470.

Singh V., Van Oos T., Jordan D., Messina C., Cooper M., Hammer G. (2010). Morphological and architectural development of root systems in sorghum and maize. *Plant Soil*. 2: 256- 299.

Somerrs E., Vanderleyden J., Srisnivasan M. (2004). Rhizosphere bacterial signallin a love parade beneath our feet. *Critical Reviews in Microbiology*. 30: 128-205.

Steenland K., Wesseling C., Román N., Quirós I., Juncos J. (2013). Occupational pesticide exposure and screening tests for neurodegenerative disease among an elderly population in Costa Rica. *Environmental Research*. 120: 96–101.

Steinauer K., Chatzinotas A., Eisenhauer N. (2016). Root exudate cocktails: the link between plant diversity and soil microorganisms. *Ecology and Evolution*. 13: 24:44

Sterckeman T., Duquene L., Jérôme P., Morel J. (2005). Quantifying the effect of rhizosphere process on the availability of soil cadmium and zinc. *Plant and Soil*. 276: 332-345.

Steyaert M., Weld J., Loguercio L., Stewart A. (2010a). Rhythmic conidiation in the blue-light fungus *Trichoderma pleuroticola*. *Fungal Biology*. 114: 219–223.

Steyaert M., Weld J., Stewart A. (2010b). Ambient pHintrinsically influences *Trichoderma* conidiation and colony morphology. *Fungal Biology*. 114: 198–208

Tavera-Zavala D., Hernández-Escareño J., Ulibarri G., Sánchez-Yáñez J M. (2017). Inoculation of *Trichoderma harzianum* on *Zea mays* its effect on the addition of nitrogen fertilizer at 50%. *Journal of the Selva Andina Research Society*.22: 1342-1465.

Ting L., Kun M., Hong-Li M., Yang L., Ling L., Yang H. (2014). Jasmonic acid enhancement of anthocyanin accumulation is dependent on phytochrome A signaling pathway under far-red light in *Arabidopsis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1: 65-83.

Tjamos C., Papavizas G., Cook R. (1992) Biological control of plant diseases. Progress and challenges for the future. Plenum Press. Greece. 34: 78-88.

Torregrosa F. (1997). Esquema de mejoramiento de maíz en la Sierra Ecuatoriana. Quito, Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias de Ecuador. 8: 5-12

Uren N. (2000). Types, amounts, and possible functions of compounds release into the rhizosphere by soil-grown plant. The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil interface. Dekker, New York. 19: 19-40.

Valencia H., Sánchez J., Vera N., Valero M. (2007). Microorganismos solubilizadores de fosfatos y bacterias fijadoras de nitrógeno en páramos y región cálida tropical. Potencial biotecnológico de microorganismos en ecosistemas naturales y agroecosistemas. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. 20: 117-122.

Valero N. (2007). Determinación del valor fertilizante de microorganismos solubilizadores de fosfato en cultivos de arroz. Trabajo de grado, Universidad Nacional de Colombia. 28: 12-65

Van Den B., Messenger R., Gutiérrez A. (1982). An Introduction to Biological Control. Plenum Press. 12: 234-247.

Vega-Muñoz I., Duran-Flores D., Fernández-Fernández Á., Heyman J., Ritter A., Stael S. (2020) Breaking Bad News: Dynamic Molecular Mechanisms of Wound Response in Plants. *Frontiers in Plant Science*. 11: 1959-1987

Verma M., Brar S., Tyagi R., Surampalli R., Valéro J. (2007). Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: *Panoply* of biological control. *Biochemical Engineering Journal*. 37: 54-77.

Vey A., Hoagland R., Butt T. (2001) Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. *Fungi as biocontrol agents*. CAB International. 15: 306- 334.

Vinale F., Sivasithamparam K., Ghisalberti E., Marra R., Barbetti M., LI H., Woo S., Lorito M. (2008). A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 72: 70- 80.

Vivanco J., Cosio E., Loyola V., Flores H. (2005). Mecanismos químicos de defensa en las plantas. *Investigación y Ciencia*. 4: 2-75.

Vosshall L., Amrein H., Morozov P., Rzhetsky A., Axel R. (1999) Spatial map of olfactory receptor expression in the *Drosophila antenna*. *Cell*. 96: 725–736

Walling L. (2000) The myriad plant responses to herbivores. *Journal of Plant Growth Regulation*. 19: 202-216.

Wang J. (2017). La bacteria *Helicoverpa zea* asociada al intestino induce indirectamente las defensas en el tomate al desencadenar un elicitor (es) salival. *New Phytologist*. 214: 1294 -1306

Wasternack C. (2006). Oxylipins: Biosynthesis, Signal Traduction and Action. *Plant Hormone Signaling*. Oxford: Blackwell. 67: 185-222

Waterman J., Cazzonelli C., Hartley S., Johnson S. (2019). Simulated herbivory: the key to untangling plant defense responses. *Trends in Ecology and Evolution*. 34: 447–458

Willink E., Osoreo W., Costilla M. (1993). Daños, pérdidas y niveles de daño económico por *Spodoptera frugiperda* (*Lepidoptera: Noctuidae*) en maíz. *Revista Industrial y Agrícola de Tucumán*. 70: 49-52.

Wittenmayer L., Merbach W. (2005). Plant responses to drought and phosphorus deficiency: contribution of phytohormones in root-related processes. *Journal Plant Nutrition Soil Science*. 168: 513- 531.

Yang Z., Yu Z., Lei L., Xia Z., Shao L., Zhnag K., Li G. (2012). Nematicidal effect of volatiles produced by *Trichoderma sp.* *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 15: 634- 650.

Yoshinaga N., Aboshi T., Abe H., Nishida R., Alborn H. T., Tumlinson J. H., Mori N. (2008). Active role of fatty acid amino acid conjugates in nitrogen metabolism in

Spodoptera litura larvae. Proceedings of the National Academy of Sciences, 105: 18058-18063.

Zabala Jorge. (2010). Respuestas inmunológicas de las plantas frente al ataque de insectos. Ciencia hoy. 20: 109- 117.

Zavala J., Patankar A., Gase K., Hui D., Baldwin I. (2004). Manipulation of endogenous trypsin proteinase inhibitor production in *Nicotiana attenuata* demonstrates their function as anti-herbivore defenses. Plant Physiology. 134: 1165-1181.

Zebelo S., Piorkowski J., Disi J. (2014). Secretions from the ventral eversible gland of *Spodoptera exigua* caterpillars activate defense-related genes and induce emission of volatile organic compounds in tomato, *Solanum lycopersicum*. BMC Plant Biology. 14: 140-155

Zhang H., Xie X., Kim S., Kornyejev A., Holaday S., Paré P. (2008b). Soil bacteria augment *Arabidopsis* photosynthesis by decreasing glucose sensing and abscisic acid levels in planta. The Plant Journal. 56: 264-273.

Zhang Y., Du B., Jin Z., Li ZH., Song H., Ding Y. (2011). Análisis de comunidades bacterianas en suelo rizosférico de algodón sano y enfermo (*Gossypium* sp) En diferentes etapas de crecimiento vegetal. Plant and Soil 339: 447-45

Zhiguo E., Tingting Li, Chen Chen, Wang Lei. (2018). Genome-Wide Survey and Expression Analysis of P1B-ATPases in Rice, Maize and Sorghum. Rice Science. 25: 208-217

11. Adenda

11.1 Macías-Rodríguez L., Contreras-Cornejo H., Adame-Garnica S. G., del Val E., Larsen J. (2020). The interactions of *Trichoderma* at multiple trophic levels: inter-kingdom communication. Microbiological Research. 240: 126552. DOI: 10.1016/j.micres.2020.126552. ISSN: 0944-5013.



The interactions of *Trichoderma* at multiple trophic levels: inter-kingdom communication



Lourdes Macías-Rodríguez^{1,2*}, Hexon Angel Contreras-Correa^{1,2,3,4,5,6},
Sandra Goretti Adame-Garnica², Ek del-Val¹, John Larsen¹

¹ Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Ciro, Francisco J. Muñoz S/N, Ciudad Universitaria, C.P. 58000, Morelia, Michoacán, México

² Instituto de Investigaciones en Economía y Sustentabilidad, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Ingeniería Química y Biotecnología, ECTI, Ex-Hacienda De San José De La Huera, C.P. 48700, Morelia, Michoacán, México

ARTICLE INFO

Keywords:
Microbiota
Herbivores
Plant defense
Phytohormones
Secondary metabolites

ABSTRACT

Trichoderma spp. are natural saprotrophic (fungal) microorganism, and as entomophagous organisms, they mediate interactions with other soil microorganisms, plants, and arthropods at multiple trophic levels. In the rhizosphere, *Trichoderma* can reduce the abundance of phytopathogenic microorganisms, which involves the action of potent inhibitory molecules, such as gliotoxin and siderophores, whereas mutualistic associations between *Trichoderma* and the seeds and roots of host plants can result in enhanced plant growth and crop productivity, as well as the alteration of abiotic stress. Such beneficial effects are mediated via the activation of analogous mechanisms controlled by phytohormones such as auxins and abscisic acid, as well as by alterations to host plant metabolism. During other host colonization or in the absence of physical contact, *Trichoderma* can trigger early defense responses mediated by Ca^{2+} and reactive oxygen species, and consequently stimulate plant immunity by enhancing resistance mechanisms regulated by the phytohormones salicylic acid, jasmonic acid, and ethylene. In addition, *Trichoderma* release volatile organic compounds and nitrogen or oxygen heterocyclic compounds that serve as signaling molecules, which have effects on plant growth, phytopathogen levels, herbivorous insects, and at the third trophic level, play roles in attracting the natural enemies (predators and parasitoids) of herbivores. In this paper, we review some of the most recent advances in our understanding of the environmental influences of *Trichoderma* spp., with particular emphasis on their multiple interactions at different trophic levels.

1. Introduction

Terrrestrial ecosystems comprise microorganisms, plants, and animals, which engage in multiple interactions, both beneficial and detrimental, at multiple trophic levels (Hector et al., 2010; de Longh et al., 2010; Bradford et al., 2016). Plants, for example, have to contend with numerous aggressors, notably herbivorous arthropods and phytopathogenic microorganisms (Garnica and Torres, 2012; Torres et al., 2017), and the effects of both above- and belowground antagonists on plant performance in natural and agricultural systems are well documented. Depending on the mode of plant attack deployed, aggressors such as pathogenic microorganisms (biotroph vs. necrotroph) and herbivorous arthropods (planting/making vs. chewing), plants will

activate the corresponding signaling defense mechanisms, in which the phytohormones ethylene (ET), jasmonic acid (JA), and salicylic acid (SA) function as key regulators (Garnica and Torres, 2012; Torres et al., 2017). However, under circumstances in which plants are the target of multiple aggressors, the preferential activation of one pathway in the response of another can have profound effects on plant defense and resistance to attack (Dreyer et al., 2017).

Numerous studies have described the contribution of rhizospheric microorganisms to counteracting plant invaders or enabling plants cope with environmental stress (Wells et al., 2002; de la Haza et al., 2014; Delgado-García-Moreno et al., 2017), and in this review, we consider information that has accumulated from *in vitro* studies and investigations conducted under greenhouse and field conditions, in which

* Corresponding author at: Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Ciro, Francisco J. Muñoz S/N, Ciudad Universitaria, C.P. 58000, Morelia, Michoacán, México

✉ Corresponding author.

E-mail addresses: macias@umich.mx (L. Macías-Rodríguez), hcontreras@umich.mx (H.A. Contreras-Correa).

Pre-proof 1-10 | <https://doi.org/10.24015/2388-5822>

Received 08 February 2020; Received in revised form 29 May 2020; Accepted 3 June 2020

Available online 07 July 2020

ISSN 2388-5822 / © 2020 Elsevier GmbH. All rights reserved.

11.2 Contreras-Cornejo H., Macías-Rodríguez L., López-Carmona D., Real-Santillán R., García-Gómez G., Galicia-Gallardo A., Alfaro-Cuevas R., Gonzalez-Esquivel C., Najera-Rincón M., Adame-Garnica S., Rebollar-Alviter A., Larsen J. (2021). In a belowground multitrophic interaction, *Trichoderma harzianum* induces maize root herbivore tolerance against *Phytophaga vetula*. Pest Management Science. DOI: 10.1002/ps.6415

doi:10.5539/journal.v11n11.2021p.2445

In a belowground multitrophic interaction, *Trichoderma harzianum* induces maize root herbivore tolerance against *Phyllophaga vetula*

Hexon Angel Contreras-Cornejo,^{a,*} Lourdes Macías-Rodríguez,^b Raúl Omar Real-Santillán,^c Dante López-Carmona,^d Griselda García-Gómez,^e Ana Paola Galicia-Gallardo,^a Ruth Alfaro-Cuevas,^d Carlos E. González-Esquivel,^a Miguel Bernardo Najera-Rincón,^d Sandra Goretti Adame-Garnica,^b Angel Rebollar-Alviter,^f Mariana Álvarez-Navarrete^g and John Larsen^{a, h}

Abstract

BACKGROUND: *Trichoderma* spp. are soil fungi that interact with plant roots and associated biota such as other microorganisms and soil fauna. However, information about their interactions with root-feeding insects is limited. Here, interactions between *Trichoderma harzianum* and the root-feeding insect *Phyllophaga vetula*, a common insect pest in maize agroecosystems, were examined.

RESULTS: Applications of *T. harzianum* and *P. vetula* to the root system increased and decreased maize growth, respectively. Induced tolerance against herbivore attack was provided by *T. harzianum* maintaining a robust and functional root system as evidenced by the increased uptake of Ca, Cu, Mg, Na and K. Herbivore tolerance also coincided with changes in the emission of root volatiles known to induce indirect defense responses and attract natural enemies of the herbivore. More importantly, *T. harzianum* induced de novo emission of several sesquiterpenes such as β -caryophyllene and α -cadinene. In addition, single and combined applications of *T. harzianum* and *P. vetula* altered the sucrose content of the roots. Finally, *T. harzianum* produced (E)-pentyl 2-hydroxy-3-oxo (E-PP) a volatile compound that may act as an antifeedant signaling compound mitigating root herbivory by *P. vetula*.

CONCLUSIONS: Our results provide novel information about belowground multitrophic plant-microbe-arthropod interactions between *T. harzianum* and *P. vetula* in the maize rhizosphere resulting in alterations in maize phenotypic plant responses, including root herbivore tolerance.

© 2021 Society of Chemical Industry.

Supporting information can be found in the online version of this article.

*Correspondence to: Hexon Angel Contreras-Cornejo, hcontreras@ciqa.izami.unam.mx (Hexon Angel Contreras-Cornejo), hcontreras@ciqa.izami.unam.mx (Hexon Angel Contreras-Cornejo), hcontreras@ciqa.izami.unam.mx (Hexon Angel Contreras-Cornejo), hcontreras@ciqa.izami.unam.mx (Hexon Angel Contreras-Cornejo)

Keywords

Maize, *Trichoderma harzianum*, *Phyllophaga vetula*, root-feeding insect, root herbivory, root system

Trichoderma harzianum is a filamentous fungus that is widely used in agriculture as a biocontrol agent against plant pathogens.

Phyllophaga vetula is a root-feeding insect that causes damage to maize roots and is a major pest of maize in Mexico.

Root-feeding insects cause damage to plant roots and reduce plant growth and yield.

Trichoderma harzianum is a filamentous fungus that is widely used in agriculture as a biocontrol agent against plant pathogens.

Phyllophaga vetula is a root-feeding insect that causes damage to maize roots and is a major pest of maize in Mexico.

Root-feeding insects cause damage to plant roots and reduce plant growth and yield.

Trichoderma harzianum is a filamentous fungus that is widely used in agriculture as a biocontrol agent against plant pathogens.

