



UNIVERSIDAD DE CORDOBA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y de Montes

Departamento de Ciencias y Recursos Agrícolas y Forestales

TESIS DOCTORAL

Los hongos entomopatógenos endófitos mejoran la nutrición férrica y el crecimiento vegetal

Doctoranda: **D^a Silvia Raya Díaz**

Directores:

Prof. Dr. D. Enrique Quesada Moraga

Dr. D. Antonio Rafael Sánchez Rodríguez

Córdoba, 2017

TITULO: *Los hongos entomopatógenos endófitos mejoran la nutrición férrica y el crecimiento vegetal*

AUTOR: *Silvia Raya Díaz*

© Edita: UCOPress. 2018
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es



UNIVERSIDAD DE CORDOBA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y de Montes
Departamento de Ciencias y Recursos Agrícolas y Forestales

Los hongos entomopatógenos endófitos mejoran la nutrición férrica y el crecimiento vegetal

Tesis Presentada por **D^a Silvia Raya Díaz** para optar al grado de
Doctora por la Universidad de Córdoba

Córdoba, noviembre 2017

Fdo.: **Silvia Raya Díaz**

VºBº del Director

Fdo.:

Prof. Dr. D. Enrique Quesada Moraga
Catedrático de Universidad
E.T.S.I.A.M. D.p.t.o. C.R.A.F.
Universidad de Córdoba

VºBº del Codirector

Fdo.:

Dr. D. Antonio R. Sánchez Rodríguez
PhD Research Officer
School of Environment, Natural
Resources and Geography,
Environment Centre Wales
Bangor University



UNIVERSIDAD DE CORDOBA

D. Enrique Quesada Moraga, Doctor Ingeniero Agrónomo, Profesor Catedrático de Producción Vegetal de la Universidad de Córdoba en el Departamento de Ciencias y Recursos Agrícolas y Forestales de la E.T.S.I.A.M, y Responsable del Grupo PAIDI AGR 163 “Entomología Agrícola” y el Doctor Ingeniero Agrónomo Antonio Rafael Sánchez Rodríguez, PhD Research Officer in the School of Environmental, Natural Resources and Geography, Environment Centre Wales, Bangor University

INFORMAN: que el trabajo “Los hongos entomopatógenos endófitos mejoran la nutrición férrica y el crecimiento vegetal” realizado bajo nuestra dirección por la licenciada en Ciencias Ambientales D^a Silvia Raya Díaz, lo consideramos ya finalizado y puede ser presentado para su exposición y defensa como Tesis Doctoral en el Departamento de Ciencias y Recursos Agrícolas y Forestales de la Universidad de Córdoba.

Córdoba, noviembre de 2017

Doctoranda: **D^a. Silvia Raya Díaz**

Fdo.:

V^oB^o del Director

Fdo.:

Prof. Dr. D. Enrique Quesada Moraga
Catedrático de Universidad
E.T.S.I.A.M. D.p.t.o. C.R.A.F.
Universidad de Córdoba

V^oB^o del Codirector

Fdo.:

Dr. D. Antonio R. Sánchez Rodríguez
PhD Research Officer
School of Environment, Natural
Resources and Geography,
Environment Centre Wales
Bangor University



TÍTULO DE LA TESIS:

Los hongos entomopatógenos endófitos mejoran la nutrición férrica y el crecimiento vegetal.

DOCTORANDO/A:

Silvia Raya Díaz

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

La Doctoranda, D^a. Silvia Raya Díaz, se incorporó al Grupo de Investigación AGR 163-Entomología Agrícola contratada con fecha 1 de junio de 2014 dentro del Proyecto de Excelencia de la Junta de Andalucía P11-AGR-7681 titulado “Estrategias sostenibles de control de plagas basadas en el establecimiento endofítico y en la rizosfera de Hongos Entomopatógenos” con fecha de finalización 30 de marzo de 2018. Esta Tesis Doctoral ha sido presentada dentro del plazo de 3 años de duración del presente Proyecto. Esta Tesis Doctoral cumple el requisito establecido por la Universidad de Córdoba para su presentación como compendio de artículos.

Los distintos objetivos planteados en esta Tesis Doctoral se abordan en capítulos como trabajos independientes con formato artículo, ya que todos ellos han sido publicados como “full length papers”, como se indica a continuación:

Sánchez-Rodríguez AR, Raya-Díaz S, Zamarreño AM, García-Mina JM, del Campillo MC, Quesada-Moraga E. 2017. An endophytic *Beauveria bassiana* strain increases spike production in bread and durum wheat plants and

effectively controls cotton leafworm (*Spodoptera littoralis*) larvae. *Biological Control*, pp: 1049-9644. doi:10.1016/j.biocontrol.2017.01.012

Raya-Díaz S, Quesada-Moraga E, Barrón V, del Campillo MC, Sánchez-Rodríguez AR. 2017. Redefining the dose of the entomopathogenic fungus *Metarhizium brunneum* (Ascomycota: Hypocreales) to increase Fe bioavailability and promote plant growth in calcareous and sandy soils. *Plant and Soil*. 418: 387-404, doi:10.1007/s11104-017-3303-0.

Raya-Díaz S, Sánchez-Rodríguez AR, Segura-Fernández JM, del Campillo MC, Quesada-Moraga E. 2017. Entomopathogenic fungi-based mechanisms for improved Fe nutrition in sorghum plants grown on calcareous substrates. *PLoS ONE* 12:(e0185903), doi: 10.1371/journal.pone.0185903

Por tanto, se han publicado tres trabajos en revistas de mayor impacto Q1 del Journal of Citation Reports (JCR). El primer artículo en la revista *Biological Control* Factor de Impacto JCR: 2.3, Q1 (11/93), se trata de una de las revistas de mayor índice de impacto donde se puede publicar un trabajo de control de plagas en el área de Entomología, pues las que la preceden se refieren a aspectos de investigación básica en fisiología de insectos. Además, se ha publicado un segundo trabajo en la revista *Plant and Soil*, situada en Q1 en el área de Agronomía Factor de Impacto JCR: 3.1, Q1 (11/83). Finalmente se ha publicado un trabajo en la revista *PLoS ONE* del primer cuartil Q1 con Factor de Impacto JCR: 2.8, Q1 (15/64) en ciencias multidisciplinares.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 20 de Noviembre de 2017

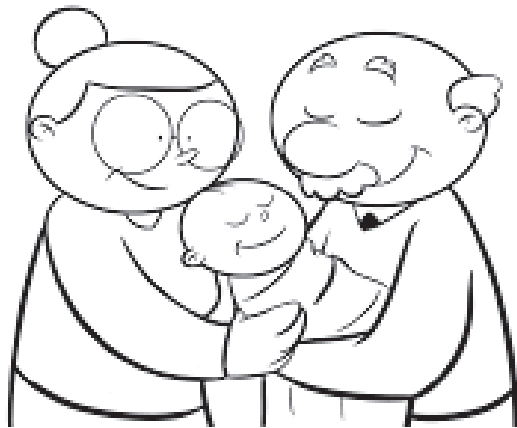
Firma del/de los director/es



Fdo.: Enrique Quesada Moraga Fdo.: Antonio R. Sánchez Rodríguez

Los trabajos incluidos en esta Tesis Doctoral han sido financiados por el Proyecto de Investigación de Excelencia de la Consejería de Economía, Innovación, Ciencia y Empleo de la Junta de Andalucía convocatoria 2011, con referencia AGR-P11-7681, titulado “Estrategias sostenibles de control de plagas basadas en el establecimiento endofítico y en la rizosfera de Hongos Entomopatógenos”. La doctoranda ha contado con la ayuda de una beca de Personal Investigador en Formación (PIF) de la Consejería de Economía, Innovación, Ciencia y Empleo de la Junta de Andalucía para la realización de la presente Tesis Doctoral.

A Pepe y a mis padres
por cuidar de él,



Agradecimientos

Así como no existen personas pequeñas ni vidas sin importancia, tampoco existe trabajo insignificante. Educar a una persona no es hacerle aprender algo que no sabía sino hacer de él alguien que no existía, por esto, quiero agradecer a mi director Prof. Dr. D. Enrique Quesada Moraga su esfuerzo por enseñarme el apasionante mundo de la entomología, espero con más alegrías que tristezas.

Las grandes obras no son llevadas a cabo por la fuerza sino por la perseverancia, es por esto que no puedo dejar de agradecer al Dr. D. Antonio R. Sánchez Rodríguez su ayuda incondicional y su paciencia que sin duda producían un efecto mágico ante el cual las dificultades y los obstáculos desaparecían.

Hay personas que brillan con luz propia y hacen más bello el camino estando a su lado. Para alcanzar la meta no he viajado sola sino que me han acompañado mis amigos y compañeros (Adri, Álex, Carmen, Dani, Gloria, José Manuel, María, Meelad, Natalia, Pedro, Sandra y M^aVictoria). Hoy estoy aquí para celebrar mi éxito, que no hubiese sido posible sin vuestra ayuda.

Un líder es alguien que conoce el camino, anda el camino y muestra el camino. Gracias Inma y gracias Campi por guiarme en este recorrido.

La amistad, si se alimenta solo de gratitud, equivale a una fotografía que con el tiempo se borra. José María y M^a Ángeles vosotros siempre tendréis un lugar en mi corazón.

Muchas gracias a todos y todas.

Resumen

Los ascomicetos mitospóricos entomopatógenos (AME) son un componente importante de la microbiota de los ecosistemas naturales, agrícolas y forestales, donde regulan las poblaciones de insectos y ácaros fitófagos, pero además, pueden ser utilizados de forma deliberada para el control de plagas de acuerdo con distintas estrategias, incluso de forma inundativa, como micoinsecticidas. Más allá, trabajos llevados a cabo principalmente en la última década resaltan que la función ecológica de los AME sobrepasa su condición de entomopatógenos, pues sus sorprendentes relaciones con las plantas, como endófitos, en el filoplano o en la rizosfera, abren nuevos horizontes en la protección y producción vegetal. Los resultados de esta tesis doctoral ponen de manifiesto los beneficios asociados al carácter endófito y competente en la rizosfera de cepas de AME, principalmente de los géneros *Beauveria* y *Metarhizium*, sobre distintas plantas cultivadas, no sólo por su impacto en el control de plagas, sino también sobre su crecimiento y nutrición férrica en suelos calcáreos.

En el capítulo II se ha evaluado el efecto de la colonización endofítica de plantas de trigo blando y trigo duro por la cepa EABb 04/01-Tip de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Ascomycota; Hypocreales) mediante distintas estrategia de aplicación, tratamiento de semilla (SE), aplicación al suelo (SU), o pulverización foliar (PU), sobre el crecimiento, rendimiento, niveles de fitohormonas y absorción de nutrientes, y en paralelo, el efecto de este comportamiento endofítico sobre la mortalidad de larvas de *Spodoptera littoralis* Boisduval (Lepidoptera; Noctuidae) que consumen tejido foliar colonizado. La cepa EABb 04/01-Tip colonizó con

éxito las plantas de trigo blando y duro, e incluso el hongo fue re-aislado del grano de las plantas inoculadas en los tratamientos SE y SU. El tratamiento SE incrementó un 40% el rendimiento del grano y la longitud de la raíz en trigo blando en comparación con las plantas control. La mortalidad de larvas del noctuido alimentadas con hojas de las plantas inoculadas varió desde el 30% al 57%, en los tratamientos SE y PU respectivamente.

En el capítulo III se determinó la dosis mínima de la cepa EAMa 01/58-Su de *Metarhizium brunneum* Petch. (Ascomycota; Hypocreales) que aplicada al suelo, produce efectos sobre el crecimiento vegetal y la biodisponibilidad de Fe en plantas que crecen sobre suelos calcáreos y no calcáreos, con el objetivo de optimizar su utilización. Para ello se diseñó un ensayo *in vitro* con el objetivo de evaluar la capacidad de las cepas EABb 04/01-Tip, EAMa 01/58-Su y EAlf 10/04-Msp de *Isaria farinosa* (Holmsk.) Fr. para movilizar Fe a partir de nueve óxidos de Fe incluyendo ferrihidrita, hematites, goethita y magnetita, que difieren en composición, tamaño de partícula y cristalinidad. Además, se realizó un ensayo en maceta, para explorar la capacidad de los hongos de mejorar la nutrición de Fe y promover el crecimiento de plantas de sorgo y girasol, en el que se aplicaron al suelo cinco dosis fúngicas (0 , 5×10^2 , 5×10^4 , 5×10^6 y 5×10^8 conidios ml^{-1}) de una suspensión de conidios de la cepa EAMa 01/58-Su. El suelo calcáreo, debido a su baja disponibilidad de Fe, indujo clorosis en las plantas de sorgo, a diferencia del suelo no calcáreo utilizado como control. Los resultados del ensayo *in vitro* mostraron que las tres especies fúngicas aumentaron la disponibilidad de Fe de forma diferente en función del tamaño de partícula y cristalinidad de las fuente de Fe utilizadas. Las cepas EABb 04/01-Tip y EAlf 10/04-Msp aumentaron el pH del medio de cultivo,

mientras que la cepa EAMa 01/58-Su no produjo efecto. Los resultados del cultivo en maceta mostraron que las dosis más altas (5×10^6 y 5×10^8 conidios ml^{-1}) de la cepa EAMa 01/58-Su aliviaron los síntomas de clorosis Fe de las plantas de sorgo crecido en el suelo calcáreo, y aumentaron la altura de la planta y la producción de inflorescencias de girasol cultivado en ambos suelos.

En el capítulo IV se determinó *in vitro* la capacidad de las cepas EAMa 01/58-Su, EABb 04/01-Tip y EAIf 10/01-Msp para aumentar la biodisponibilidad de Fe en medios calcáreos o no calcáreos que contienen diversas fuentes de Fe (ferrihidrita, hematites y goethita), y se evaluó en maceta la influencia del método de inoculación SE, SU y PU con las cepas EAMa 01/58-Su y EABb 04/01-Tip, sobre la extensión de la colonización endofítica y la mejora en la nutrición de Fe en plantas de sorgo cultivadas en un sustrato calcáreo. Los resultados mostraron que las tres cepas aumentaron la disponibilidad de Fe en el ensayo *in vitro*. La cepa más eficiente fue EAMa 01/58-Su, que disminuyó el pH del medio calcáreo, lo que sugiere que utilizó una estrategia diferente (probablemente, mayor producción de ácidos orgánicos), que los otros dos hongos, que elevaron el pH del medio no calcáreo. Los resultados del ensayo en maceta mostraron que los tres métodos de inoculación utilizados, condujeron a diferencias en el aislamiento de los tejidos vegetales, incrementaron la altura, el contenido de clorofila foliar, el Fe de la biomasa aérea, la longitud total de la raíz y la densidad de raíces finas. Sin embargo, el tratamiento SU fue el más eficaz, por su mayor efecto y persistencia sobre el contenido de clorofila foliar cuando los síntomas de clorosis férrica eran más evidentes en las plantas control, y tuvo un mayor efecto sobre la longitud total de la raíz y densidad de las raíces finas.

Los resultados de esta tesis doctoral nos revelan importantes beneficios asociados al empleo de AME en el control biológico. Más allá del control de plagas, hemos informado de la mejora del crecimiento de varias especies mono y dicotiledóneas, así como de la nutrición férrica en suelos calcáreos. Si bien el método de aplicación tuvo una influencia en estos efectos, los tres métodos utilizados, SE, SU y PU, podrían ser utilizados en función del tipo de cultivo, tipo de fitófago, y condicionantes económicos. Esta tesis abre nuevos horizontes científicos y de aplicación práctica, pues es necesario profundizar en las bases fisiológicas y moleculares de la relación endófito-planta, e incluso endófito-planta-fitófago, para potenciar los efectos de mejora de la nutrición y crecimiento del cultivo, sin olvidar el impacto de la estrategia sobre otros estreses abióticos.

Palabras clave: Endófito, rizosfera, clorosis férrica, método de inoculación, longitud raíz, *Metarhizium brunneum*, *Beauveria bassiana*, *Isaria farinosa*, *Spodoptera littoralis*, Sorgo, Girasol, Trigo.

Abstract

The entomopathogenic mitosporic ascomycetes (EMA) are an important component of the microbiota of natural, agricultural and forest ecosystems, where they regulate insect populations and phytophagous mites, but can also be used deliberately for the control of pests in accordance with different strategies, including inundative release as mycoinsecticides. Furthermore, works carried out mainly in the last decade highlight that the ecological role of EMAs exceeds their status as entomopathogens, because of their surprising associations with plants, as endophytes, in the phylloplane or in the rhizosphere, open new horizons in Plant protection and Production. The results of this Doctoral Thesis show the benefits associated with the endophytic and rhizosphere competent behavior of strains of EMA, mainly of the genera *Beauveria* and *Metarhizium*, on different cultivated plants, not only for their impact on the control of pests, but also about its growth and ferric nutrition in calcareous soils.

In chapter II, the effect of the endophytic colonization of bread wheat and durum wheat plants by the strain EABb 04/01-Tip of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Ascomycota; Hypocreales) has been evaluated through different application strategies, seed dressing (SD), soil application (SA), or leaf spraying (LS), on growth, yield, phytohormone levels and nutrient uptake, and in parallel, the effect of this endophytic behavior on mortality of larvae of *Spodoptera littoralis* Boisduval (Lepidoptera; Noctuidae) that consumed colonized leaf tissue. The EABb 04/01-Tip strain successfully colonized bread and durum wheat plants, and even the fungus was re-isolated from the grain of inoculated plants in the SD and SA

treatments. The SD treatment increased grain yield up to a 40% and root length in bread wheat in comparison to control plants. The mortality of larvae of the noctuid fed with leaves of the inoculated plants varied from 30% to 57%, for SD and LS, respectively.

In chapter III, it was investigated the minimum dose of EAMa 01/58-Su *Metarhizium brunneum* Petch (Ascomycota; Hypocreales) that applied to soil produces a positive effect on plant growth and Fe nutrition in plants grown on calcareous and non-calcareous soils, with the aim of optimizing their use. To this end, a preliminary *in vitro* assay was designed to evaluate the capacity of several EMA strains (EABb 04/01-Tip, EAMa 01/58-Su and EAIf 10/04-Msp of *Isaria farinosa* (Holmsk.) Fr.) to mobilize Fe from nine Fe sources (Fe oxides including ferrihydrite, hematite, goethite and magnetite), which differ in composition, particle size and crystallinity. In addition, a pot trial was conducted to explore the ability of the *M. brunneum* EAMa 01/58-Su strain to improve Fe nutrition and promote the growth of sorghum and sunflower plants. In this experiment, five fungal doses (0 , 5×10^2 , 5×10^4 , 5×10^6 y 5×10^8 conidia ml⁻¹) of a suspension of conidia were applied to the surface of soil. The calcareous soil, due to its low availability of Fe, induced Fe chlorosis in sorghum plants, unlike the non-calcareous soil used as a control. The results of the *in vitro* test showed that the three fungal species increased Fe availability differently depending on the particle size and crystallinity of the Fe sources. The strains EABb 04/01-Tip and EAIf 10/04-Msp increased the pH of the culture medium, while the strain EAMa 01/58-Su produced no effect. The results of the pot culture showed that the highest doses (5×10^6 and 5×10^8 conidia ml⁻¹) of the strain EAMa 01/58-Su alleviated the Fe chlorosis symptoms in sorghum plants grown in the calcareous soil, and

increased the plant height of and the production of inflorescences of sunflower grown in both soils.

In chapter IV, the potential of strains EAMa 01/58-Su, EABb 04/01-Tip and EAlf 10/01-Msp to increase the bioavailability of Fe in calcareous or non-calcareous media containing several sources of Fe (ferrihydrite, hematite and goethite) was determined *in vitro*. In a second experiment, the influence of the inoculation methods SD, SA and LS was assessed using the strains EAMa 01/58-Su and EABb 04/01-Tip, on the extent of endophytic colonization and the improvement in Fe nutrition in sorghum plants grown on a calcareous substrate. The results showed that all the three strains increased Fe availability. The most efficient strain was EAMa 01/58-Su, which decreased the pH of the calcareous medium, suggesting that it used a different strategy (probably, greater production of organic acids), than the other two fungi, which raised the pH of the medium not calcareous. The results of the pot trial showed that the three inoculation methods led to differences in the isolation of plant tissues, increased plant height, leaf chlorophyll content, Fe of aboveground biomass, total length of root and the density of fine roots. However, the SA treatment was the most effective, due to its greater effect and persistence on the foliar chlorophyll content (SPAD values) when the symptoms of Fe chlorosis were more evident in the control plants, and had a greater effect on the total length of the root and density of fine roots.

The results of this Doctoral Thesis reveal important benefits associated with the use of EMA in biological control. Beyond the control of pests, we have reported the improvement of the growth of several mono and dicotyledonous species, as well as ferric nutrition in calcareous soils. Although the method of application had an influence on these effects, the

three methods used, SD, SA and LS, could be used depending on the type of crop, type of phytophagous, and economic conditions. This thesis opens new scientific horizons and of practical application, since it is necessary to deepen in the physiological and molecular bases of the relation endophyte-plant, and even endophyte-plant-phytophagous, to enhance the effects of improvement of nutrition and crop growth, and even the impact of the strategy on other abiotic stresses.

Keywords: Endophyte, rhizosphere, iron chlorosis, inoculation method, root length, *Metarhizium brunneum*, *Beauveria bassiana*, *Isaria farinosa*, *Spodoptera littoralis*, Sorghum, Sunflower, Wheat.

Índice general

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	1
I. El Control Biológico, piedra angular del Control Integrado de Plagas ...	3
II. Los hongos entomopatógenos: más allá del control de plagas	7
II.1. Clasificación y diversidad	7
II.2. Modo de acción de los ascomicetos mitospóricos Entomopatógenos	8
II.3. Estrategias de uso de los ascomicetos mitospóricos entomopatógenos	11
II.4. Presencia natural de ascomicetos mitospóricos Entomopatógenos	13
II.4.1. En los artrópodos	13
II.4.2. En el suelo	15
II.4.3. Asociaciones con las plantas: como endófitos y en el filoplano	18
III. Nuevas funciones ecológicas de los ascomicetos mitospóricos entomopatógenos y sus aplicaciones	23
III.1. Protección de la planta frente a factores bióticos	25
III.1.1. Plagas de insectos	25
III.1.2. Enfermedades de las plantas	26
III.1.2.1. Supresión directa de patógenos de plantas	26
III.2. Protección de la planta frente a factores abióticos	30

III.3. Microorganismos que mejoran la nutrición y crecimiento de las plantas	31
III.3.1. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal	32
III.3.1.1. Bacterias intracelulares	32
III.3.1.2. Bacterias extracelulares	34
III.3.2. Hongos	35
III.3.2.1. Hongos asociados a las raíces	35
III.3.2.2. Hongos formadores de micorrizas	37
III.3.3. Los hongos entomopatógenos en la nutrición y crecimiento de las plantas	39
IV. Objetivos de la presente Tesis Doctoral	41
V. Referencias	43
CAPÍTULO II. An endophytic <i>Beauveria bassiana</i> strain increases spike production in bread and durum wheat plants and effectively controls cotton leafworm (<i>Spodoptera littoralis</i>) larvae	61
1. Introduction	65
2. Material and methods	68
2.1. Experimental design	68
2.2. Plant material, soil properties and cropping	71
2.3. Fungus cultures and inoculation methods	72
2.4. Soil and plant assessments	74
2.5. <i>Spodoptera littoralis</i> (Boisduval) (Lepidoptera; Noctuidae) Culturing and feeding on inoculated plant leaves. Larval mortality	76

2.6. Statistical analysis	77
3. Results	78
3.1. Experiment 1: effect of <i>B. bassiana</i> on bread wheat growth	78
3.2. Experiment 2: effect of <i>B. bassiana</i> on bread and durum wheat yield	83
3.3. Experiment 3: effect of <i>B. bassiana</i> on bread wheat yield and root length	94
3.4. Experiment 4: survival of <i>S. littoralis</i> larvae fed with endophytically colonized bread wheat	98
4. Discussion	99
5. Conclusions	105
6. Acknowledgments	106
7. Supplementary data	106
8. References	107
CAPÍTULO III. Redefining the dose of the entomopathogenic fungus <i>Metarhizium brunneum</i> (Ascomycota; Hypocreales) to increase Fe bioavailability and promote plant growth in calcareous and sandy soils	115
1. Introduction	117
2. Materials and methods	119
2.1 <i>In vitro</i> assay	119
2.1.1. Synthetic iron oxides	119

2.1.2. Fungal strains, experimental design and analysis	120
2.2. <i>In vivo</i> assay	124
2.2.1. Soil properties	124
2.2.2. Plant material, fungal treatment and experimental design	124
2.2.3. Soil and plant analyses	127
2.3. Statistical analyses	128
3. Results	129
3.1. <i>In vitro</i> assay	129
3.2. <i>In vivo</i> assay	136
3.2.1. Colony Forming Units (CFU)	136
3.2.2. SPAD chlorophyll measurements	137
3.2.3. Plant growth	138
3.2.4. Total mineral nutrient contents in above-ground plant biomass	141
3.2.5. Total mineral nutrient content in rizhospheric soil	145
4. Discussion	145
5. Conclusions	151
6. Acknowledgements	151
7. Supplementary data	152
8. References	154

CAPÍTULO IV. Entomopathogenic fungi based mechanisms for improved Fe nutrition in sorghum plants grown on calcareous substrates	161
1. Introduction	163
2. Materials and methods	167
2.1. <i>In vitro</i> assay	167
2.1.1. Synthetic iron oxides	167
2.1.2. Fungal strains, experimental design, FeDTPA and pH analyses ..	169
2.2. Pot experiment	171
2.2.1. Artificial substrate	171
2.2.2. Plants and culture	172
2.2.3. Inoculation methods (treatments) and experimental design ...	173
2.2.4. Substrate analyses: Colony-forming units (CFU) and FeDTPA ...	174
2.2.5. Fungal re-isolation from plant tissues	176
2.2.6. Plant and root parameters	177
2.2.7. Statistical analysis	179
3. Results.....	180
3.1. <i>In vitro</i> experiment	180
3.2. Pot experiment	183
3.2.1. Colony-Forming Units (CFU)	183
3.2.2. Fungal re-isolation	184

3.2.3. Plant growth and LCC	188
3.2.4. Root parameters	191
3.2.5. Nutrient contents of above-ground biomass	193
4. Discussion	195
4.1. <i>In vitro</i> experiment	195
4.2. Pot experiment	197
5. Conclusions	204
6. Acknowledgments	205
7. Supplementary data	206
8. References	210
CAPITULO V. DISCUSIÓN GENERAL.....	219
Referencias	232
CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES	235
CAPÍTULO VII. ANEXOS	240
1. Producción científica derivada de la Tesis Doctoral	241
1.1. Contribución a revistas internacionales de carácter científico (SCI).....	241
1.2. Aportaciones científicas en congresos	242

Índice de Tablas

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

Tabla 1. Comparación de los aspectos relacionados con el desarrollo y aplicación del control químico y el biológico	3
Tabla 2. Especies de plantas colonizadas de manera natural y artificial por hongos entomopatógenos endófitos	19
Tabla 3. Funciones más importantes de las micorrizas arbusculares en los sistemas agrarios	38

CAPÍTULO II. An endophytic *Beauveria bassiana* strain increases spike production in bread and durum wheat plants and effectively controls cotton leafworm (*Spodoptera littoralis*) larvae

Table 1. Description of the experiments	69
Table 2. Mean \pm standard error of total plant dry weight (aerial biomass) and nutrient concentration in aerial biomass of bread wheat as affected by <i>B. bassiana</i> inoculation method 31 days after sowing (DAS) in Experiment 1	82
Table 3. Mean \pm standard error for dry weight of leaf + stem, spike, total plant (leaf + stem + spike), total weight of grains, number of grains per plant and individual weight per grain (upper part), and mineral nutrient concentration in grain of bread wheat and durum wheat (bottom part) as affected by the <i>B. bassiana</i> inoculation method at the termination of Experiment 2 (120 days after sowing (DAS) for bread wheat, and 100 DAS for durum wheat)	91

Table 4. Mean \pm standard error for concentration of phytohormones over time in the aerial biomass of bread wheat and durum wheat as affected by *B. bassiana* inoculation method in Experiment 2. Three replicates per treatment and sampling occasion. Values followed by the same letter are not significantly different using Bonferroni's multiple comparison test, $P < 0.05$ 93

Table 5. Mean \pm standard error for dry weight of leaf + stem, spike, total plant (leaf + stem + spike), total weight of grains, number of grains per plant, and individual weight per grain (upper part), and mineral nutrient concentration in grain (lower part) of bread wheat as affected by *B. bassiana* inoculation method at the termination of Experiment 3 (140 days after sowing)..... 97

Table 6. Mean \pm standard error of mortality (%) and average survival time (AST) of second instar *S. littoralis* larvae after 5 days of feeding with leaf discs from inoculated plants (three inoculation methods used) and uninoculated ('control') bread wheat plants. Thirty larvae (replicates) were used per treatment and 'control' 99

CAPÍTULO III. Redefining the dose of the entomopathogenic fungus *Metarhizium brunneum* (Ascomycota, Hypocreales) to increase Fe bioavailability and promote plant growth in calcareous and sandy soils

Table 1 *In vivo* assay. Selected properties of the soils 126

Table 2 *In vitro* assay. Factorial ANOVA of the slope of the growth (mm day^{-1}) for each fungus as a function of the Fe oxide and Fe dose (mean \pm standard error, $n = 4$ Petri dishes per combination of fungal strain, Fe oxide and Fe dose) 130

Table 3 *In vitro* assay. Factorial ANOVA of Fe_{DTPA} and pH (mean \pm standard error, $n = 4$ Petri dishes per combination of fungal strain, Fe oxide and Fe dose) in the medium after culturing the three different strains for 11 (*M. brunneum*), 15 (*B. bassiana*) and 42 (*I. farinosa*) days (when each fungal strain fully covered the surface of the Petri dishes) at 25 °C, as a function of the Fe oxide and Fe dose 134

Table 4 <i>In vivo</i> assay. Factorial ANOVA for SPAD at the beginning and at the end of the experiment (mean ± standard error; calcareous soil: $n = 5$, non-calcareous soil: $n = 6$)	137
Table 5 <i>In vivo</i> assay. Factorial ANOVA for plant height (at the beginning and at the end of the experiment) and above-ground plant dry weight (without inflorescence for sunflower; mean ± standard error; calcareous soil: $n = 5$, non-calcareous soil: $n = 6$)	140
Table 6 <i>In vivo</i> assay. Factorial ANOVA for total nutrient content in the above-ground plant biomass of sorghum and sunflower plants, and in sunflower's inflorescence, grown on the two different soils (mean ± standard error with $n = 5$ for the calcareous soil and $n = 6$ for the non-calcareous soil).....	143
Table S1 <i>In vivo</i> assay. Factorial ANOVA for diameter and dry weight of sunflower inflorescence (mean ± standard error; calcareous soil: $n = 5$, non-calcareous soil: $n = 6$)	152
Table S2 <i>In vivo</i> assay. Factorial ANOVA for nutrient concentrations in rhizospheric soil at the end of the experiment (mean ± standard error with $n = 5$ for the calcareous soil and $n = 6$ for the non-calcareous soil)	153
 CAPÍTULO IV. Entomopathogenic fungi based mechanisms for improved Fe nutrition in sorghum plants grown on calcareous substrates	
Table 1. Factorial ANOVA for the Fe_{DTPA} and pH (mean and standard error, $n = 4$) of the Czapek-Dox medium after culturing the three strains at 25 °C for 35 days with each combination of fungus, Fe oxide (0 or 250 mg L ⁻¹) and the presence or absence of CaCO ₃	181
Table 2. Analysis of variance for above-ground plant dry weights and micronutrient contents in the biomass of the sorghum plants (mean ± standard error, $n = 4$) at the end of the experiment (93 DAS) with each fungus and inoculation method	194

S1 Table. Fe_{DTPA} and pH (mean \pm standard error, $n = 4$) Of the culture medium after 35 days of fungal growth in the presence of different sources of Fe (0 or 250 mg L^{-1}) and the presence or absence of CaCO_3 (0 or 300 mg L^{-1})206

S2 Table. Chlorophyll total concentration (CTC). Chlorophyll total concentration (CTC) extracted from the two youngest leaves of each plant (mean \pm standard error, $n = 4$) according to the combination of fungus and inoculation method at the end of the experiment (93 DAS)207

S3 Table. Total macronutrient contents of plant biomass and root parameters. Analysis of variance of macronutrient contents in the above-ground biomass, root dry weight and root length of sorghum (mean \pm standard error, $n = 4$) as a function of the fungus and inoculation method at the end of the experiment (93 DAS)207

CAPITULO V. DISCUSIÓN GENERAL

Tabla 1. Resumen de los resultados obtenidos228

Índice de figuras

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

Fig. 1. Los bioinsecticidas: más allá del control de plagas.....	5
Fig. 2. Funciones ecológicas inusuales de los hongos entomopatógenos.....	6
Fig. 3. Clasificación sistemática de los hongos entomopatógenos	9
Fig. 4. Modo de acción general de un ascomiceto mitospórico entomopatógeno	10

CAPÍTULO II. An endophytic *Beauveria bassiana* strain increases spike production in bread and durum wheat plants and effectively controls cotton leafworm (*Spodoptera littoralis*) larvae

Fig. 1. Experiment 1: Mean \pm standard error of <i>B. bassiana</i> re-isolation (%) rates from bread wheat leaves and roots as influenced by inoculation method at different times after sowing (DAS)	79
Fig. 2. Experiment 1: Mean \pm standard error of plant height (mean value \pm standard) for bread wheat as influenced by inoculation method at different times after sowing (DAS)	81
Fig. 3. Experiment 2: The number of Colony Forming Units (CFU, mean \pm standard error) over time in soil treated with <i>B. bassiana</i> and used to grow bread wheat and durum wheat	83
Fig. 4. Experiment 2: Mean \pm standard error of <i>B. bassiana</i> re-isolation (%) from bread wheat and durum wheat leaves, roots, stems and grains at different phenological stages as influenced by inoculation method	86

Fig. 5. Experiment 2: Plant height (mean value \pm standard) of bread wheat and durum wheat at different times (DAS) as influenced by inoculation method 88

Fig. 6. Experiment 3: Plant height (mean value \pm standard) of bread wheat at different phenological stages as influenced by inoculation method 95

S1 Fig. Experiment 3: Mean \pm standard error of *B. bassiana* re-isolation (%) from bread wheat leaves, roots, stems and grains at different phenological stages following inoculation with *B. bassiana* using the 'seed dressing' method 106

CAPÍTULO III. Redefining the dose of the entomopathogenic fungus *Metarhizium brunneum* (Ascomycota, Hypocreales) to increase Fe bioavailability and promote plant growth in calcareous and sandy soils

Fig. 1. *In vitro* assay. Electron micrographs showing the average particle size, the X-ray diffraction patterns and the characteristic peaks for each Fe oxide. Fh= Ferrihydrite, Hm= Hematite, Mag= Magnetite, Gt= Goethite. The number in each Fe oxide means the specific surface area ($m^2 g^{-1}$) 122

Fig. 2. *In vitro* assay. Diameter growth (slope in $mm day^{-1}$) as a function of the Fe source (A), Fe dose (B) for each fungal strain and Fe source \times Fe dose (C) for the three fungal strains 131

Fig. 3. *In vitro* assay. Fe_{DTPA} and pH for each fungal strain as a function of the Fe source and Fe dose. Fh= Ferrihydrite, Hm= Hematite, Mag= Magnetite, Gt= Goethite. The number in each Fe oxide means the specific surface area ($m^2 g^{-1}$) 135

Fig. 4. *In vivo* assay. Colony Forming Units (CFU) of *M. brunneum* in the soil as a function of the plant species (sorghum and sunflower), kind of soil (calcareous soil and non-calcareous soil), days after sowing (DAS) and fungal dose applied to the surface of each pot at the beginning of the experiment 136

Fig. 5. *In vivo* assay. SPAD chlorophyll measurements (SPAD value) in sorghum and sunflower plants as a function of the kind of soil (calcareous soil and non-calcareous soil), days after sowing (DAS) and fungal dose applied to the surface of each pot at the beginning of the experiment138

Fig. 6. *In vivo* assay. Flower diameter and dry weight in sunflower as a function of the kind of soil (calcareous soil and non-calcareous soil), days after sowing (DAS) and fungal dose applied to the surface of each pot at the beginning of the experiment. Mean \pm standard error for $n = 5$ (calcareous soil) and $n = 6$ (non-calcareous soil)141

CAPÍTULO IV. Entomopathogenic fungi based mechanisms for improved Fe nutrition in sorghum plants grown on calcareous substrates

Fig. 1. Electron micrographs. Micrographs and characteristic XRD peaks for the Fe oxides168

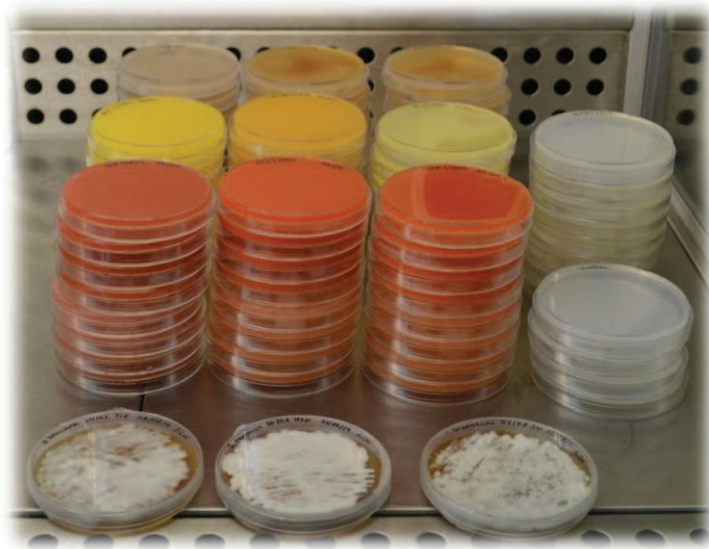
Fig. 2. Mean Fe_{DTPA} and pH. The Fe_{DTPA} (A) and pH (B) in the Czapek-Dox medium (mean \pm standard error, $n = 4$) at the end of the *in vitro* assay182

Fig. 3. Colony-forming units (CFU). The number of conidia g^{-1} in the calcareous substrate (mean \pm standard error, $n = 4$) for each fungal strain as a function of the inoculation method (seed dressing, soil treatment and leaf spraying) at 7, 30, 68 and 93 days after sowing (DAS).....185

Fig. 4. Re-isolation. The time course for the colonization (mean \pm standard error, $n = 4$) of the leaves, stems and roots by *B. bassiana* (A, C, E) and *M. brunneum* (B, D, F) as a function of the inoculation method186

Fig. 5. Plant height, LCC and LCC × Plant height in sorghum. A time course of the sorghum plant height, LCC (leaf chlorophyll concentration) and LCC × plant height (mean ± standard error, $n = 4$) for <i>B. bassiana</i> (A, C, E) and <i>M. brunneum</i> (B, D, F) as a function of the inoculation method	190
Fig. 6. Root parameters. Specific root length (SRL), specific root area (SRA) and root length according to the root diameter (mean ± standard error, $n = 4$) for sorghum plants inoculated with <i>B. bassiana</i> (A, C, E) or <i>M. brunneum</i> (B, D, F) by using different inoculation methods	193
S1Fig. Number of leaves. Number of plant leaves for each treatment (mean ± standard error, $n = 4$) applied to <i>B. bassiana</i> (A) and <i>M. brunneum</i> (B)	208
S2 Fig. Images of the roots of plants that were inoculated with the fungi by using different inoculation methods	209

CAPÍTULO I: Introducción



CAPÍTULO I

I. El Control Biológico, piedra angular del Control Integrado de Plagas

El concepto de Manejo Integrado o Control Integrado de Plagas (Smith, 1978), surgió en los años cincuenta (Barlett, 1956; Stern et al., 1959) y se consolidó a finales de los setenta (Zalom y Fry, 1992), en respuesta a los problemas causados por el uso comercial de insecticidas químicos en los sistemas agrícolas que caracterizaron a la denominada “revolución verde”, con énfasis en el impacto sobre la salud humana y el medio ambiente. Al principio, este enfoque promulgaba principios ecológicos en la utilización de métodos biológicos y químicos de control contra plagas de insectos (Smith y Reynolds, 1966) pero posteriormente, se amplió para incluir todos los métodos de control (Smith et al., 1976).

Aún así, el control biológico, o estudio y empleo de entomófagos (depredadores y parasitoides) y entomopatógenos (virus, bacterias, protozoos, nematodos y hongos) para la regulación de las poblaciones de insectos fitófagos (DeBach, 1964), constituye la piedra angular del Control Integrado de Plagas. Más allá, en la actualidad el biocontrol es fomentado por varios factores, donde destacan la prohibición de materias activas químicas (p.ej. revisión en la UE previa al Reglamento (CE) nº 1107/2009 de comercialización de productos fitosanitarios), la importancia creciente del fenómeno de la resistencia de insectos a insecticidas, la concienciación cada vez mayor de los consumidores por productos sanos, libres de residuos y obtenidos mediante técnicas de cultivo sostenibles, así como a la importancia clave de la seguridad alimentaria (Hampton, 2014). Estos aspectos han presidido las políticas agrícolas en el siglo XXI (p.ej. Directiva

CAPÍTULO I

128/2009/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 21 de octubre de 2009, por el que se establece un marco de actuación comunitaria para conseguir un uso sostenible de los plaguicidas).

Se ha discutido mucho sobre el potencial del control biológico como alternativa a los insecticidas químicos de síntesis, pero los principales obstáculos para la implantación de un bioinsecticida en el mercado son la necesidad de una formación más especializada para su aplicación efectiva, su mayor coste, así como el requisito de tiempos más largos para suprimir la población del fitófago (Ehlers, 2011). Sin embargo, existen importantes ventajas de los productos biológicos respecto a los químicos, tanto en su desarrollo y rentabilidad, como en sus menores efectos secundarios, a lo que se debe añadir un menor riesgo de aparición de resistencia (Tabla 1).

Tabla 1. Comparación de los aspectos relacionados con el desarrollo y aplicación del control químico y el biológico (Actualizado a 2004; adaptado de (van Lenteren, 1997a; van Lenteren, 1997b; Lacey et al., 2001).

	Control químico	Control biológico
Número de productos evaluados	>3.5 millones	3000
Ratio de éxito	1 : 200 000	1 : 20
Coste de desarrollo	180 millones US\$	2 millones US\$
Tiempo de desarrollo	10 años	10 años
Beneficio por unidad monetaria invertida	2.5–5	30
Riesgo de resistencia	Alto	Pequeño o nulo
Especificidad	Baja	Alta
Efectos secundarios negativos	Muchos	Pocos o ningunos

Además, existe una diferencia entre ambos grupos que adquiere gran relevancia en la actualidad, mientras que los insecticidas químicos son diseñados exclusivamente para el control de plagas, el desarrollo de un insecticida biológico, que también persigue el control directo del fitófago, puede llevar asociados otros efectos positivos para la planta, mejorando su respuesta frente a otros estreses de tipo biótico, como enfermedades, e incluso, abiótico, p.ej. hídricos, térmicos o nutricionales (Fig. 1) (Olson, 2015).

CAPÍTULO I

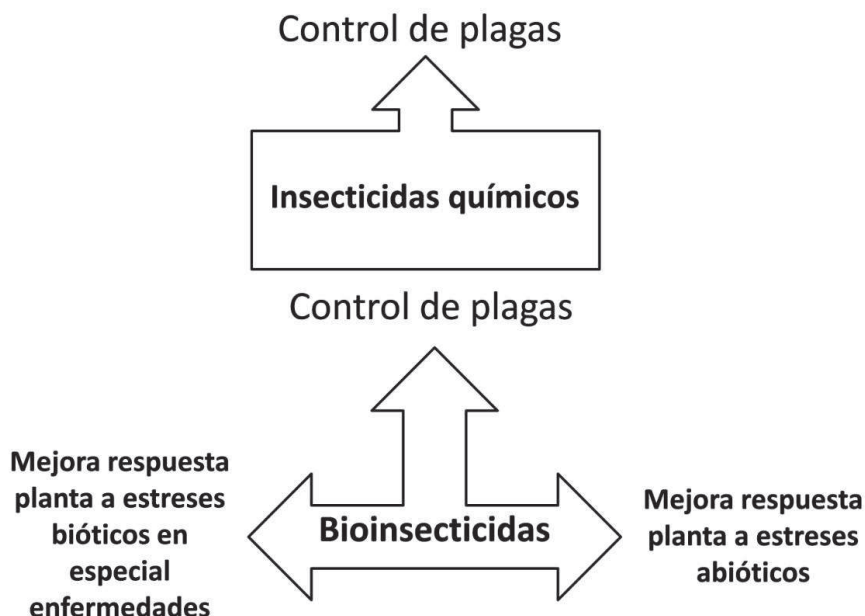


Fig. 1. Los bioinsecticidas: más allá del control de plagas. Aunque tradicionalmente el control biológico se centraba en la protección de cultivos frente a plagas y enfermedades de insectos, se están observando nuevos roles relacionados con la mejora de la respuesta de las plantas frente a estreses de tipo abiótico.

Este es el caso de los hongos entomopatógenos (HE), agentes microbianos de control biológico, un conjunto diverso de especies con diferencias en sus requisitos nutricionales, modo de acción, persistencia y dispersión, pero que comparten su capacidad de infectar a los artrópodos por vía tegumentaria y causarles la muerte (Goettel et al., 2005; Lacey, 2017), cuyo empleo para el control de plagas se considera hoy día un método eficaz y respetuoso con el medioambiente. **Pero además, en los últimos años se han descrito nuevas funciones de los HE en la naturaleza más allá de la regulación de poblaciones de artrópodos, en particular las relacionadas con sus sorprendentes asociaciones con las plantas, de las que emanan nuevas estrategias no sólo para la protección de cultivos,**

CAPÍTULO I

sino incluso para la producción vegetal (Fig. 2), a las que se dirigen los objetivos de esta tesis.

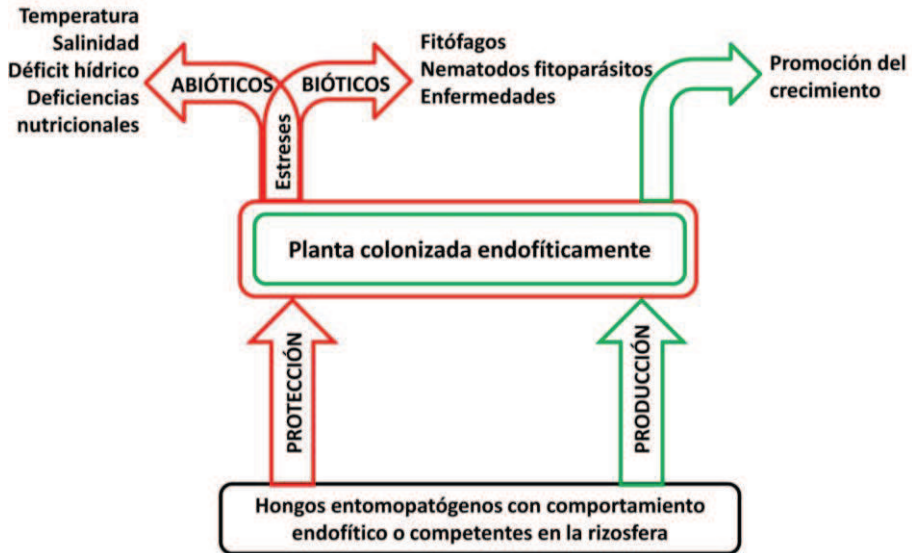


Fig. 2. Descripción general de las funciones ecológicas inusuales de los hongos endófitos entomopatógenos. La protección directa frente a plagas y enfermedades se representa en rojo, mientras que las actividades de promoción del crecimiento y su efecto indirecto sobre la producción del cultivo se representa en verde. Fuente: modificado de Quesada–Moraga (2013).

II. Los hongos entomopatógenos: más allá del control de plagas

Para profundizar en las nuevas funciones ecológicas de los HE y de las sorprendentes aplicaciones en protección de cultivos, pero más importante, en producción vegetal, es necesaria una aproximación a este fascinante grupo, a su diversidad, ecología, modo de acción y propiedades.

II.1. Clasificación y diversidad

Dentro del reino Mycota, se estima que existen alrededor de 700–750 especies de patógenos de artrópodos. La mayoría pertenecen a dos divisiones, Entomophthoromycota y Ascomycota, y en menor número a las divisiones Blastocladiomycota y Basidiomycota. Dentro de las divisiones Entomophthoromycota y Ascomycota se sitúan respectivamente los órdenes con más representantes, Entomophthorales e Hypocreales (Hibbett et al., 2007; Gryganskyi et al., 2013; Humber, 2012) (Fig. 3). Los **Entomophthorales** se caracterizan por ser biotrofos obligados, pues dependen de los insectos a los que parasitan para completar su ciclo de vida, lo que les hace difíciles de multiplicar en medio artificial y limita su desarrollo comercial (Keller, 2007; Pell et al., 2010). Por el contrario, los **ascomicetos mitospóricos entomopatógenos**, con más de 600 especies que infectan insectos y ácaros, poseen ciclos de vida más complejos que incluyen etapas fuera del insecto hospedante que les permiten persistir durante prolongados periodos de tiempo en el suelo o asociados con las plantas a la espera de infectar al insecto (Sung et al., 2008; Chandler, 2017). Estas especies fúngicas son de fácil manejo, lo que facilita su

CAPÍTULO I

producción en masa, y su aplicación comercial como micoinsecticidas, en especial las familias Clavicipitaceae, Cordycipitaceae y Ophiocordycipitaceae, del orden Hypocreales, y Trichocomaceae, del orden Eurotiales (Lacey et al., 2015; Lacey, 2017).

II.2. Modo de acción de los ascomicetos mitospóricos entomopatógenos

Las especies de HE más distribuidas y de mayor relevancia pertenecen a los ascomicetos mitospóricos entomopatógenos (AME) clasificados en el orden Hypocreales del Filo Ascomycota. La mayoría de los AME tienen ciclos vitales que sincronizan con los de sus hospedantes, así como con las condiciones ambientales del entorno (Quesada–Moraga y Santiago–Álvarez, 2008). Su modo de acción, por contacto por vía tegumentaria, los hace singulares dentro de los agentes de control microbiano de plagas (Quesada–Moraga y Santiago–Álvarez, 2008; Jaronski, 2010; Quesada–Moraga et al., 2014b).

El ciclo de vida de los AME comprende dos fases, una patógena y la otra saprofitica (Fig. 4). La **fase patogénica** involucra cuatro pasos principales: adhesión, germinación, diferenciación y penetración. La colonización se inicia con la adhesión de los conidios del hongo a la cutícula del insecto hospedante, donde se adhieren fuertemente debido a mecanismos mediados por fuerzas hidrofóbicas de su pared celular (Ortiz–Urquiza y Keyhani, 2013), a lo que sigue la formación de un tubo germinativo y en ocasiones de estructuras de anclaje tipo apresorio, a lo que sigue la penetración de la cutícula gracias a una combinación de acciones mecánicas y bioquímicas que facilitan la invasión del hemocele

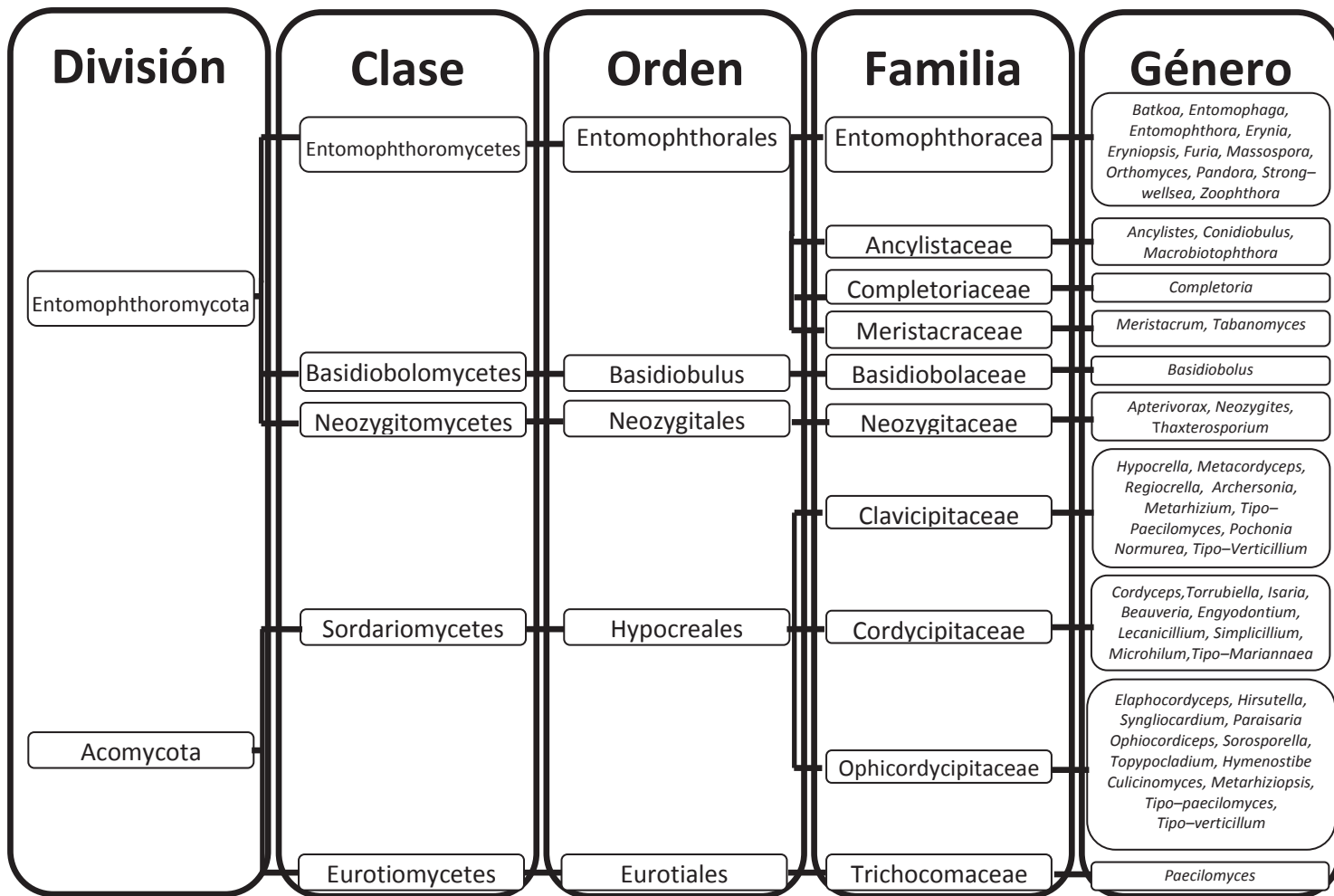


Fig. 3. Clasificación sistemática de los hongos entomopatógenos. Adaptada de (Hibbett et al., 2007; Humber, 2012; Gryganskyi et al., 2013).

CAPÍTULO I

donde el hongo crece en forma de cuerpos hifales, una vez que vence la respuesta defensiva del hospedante, tanto celular (fagocitosis y encapsulación) (Han et al., 2013; Tseng et al., 2014), como humoral (producción de fenoloxidasas, lectinas u otras proteínas y péptidos defensivos) (Vey et al., 2001; Volkoff et al., 2003).

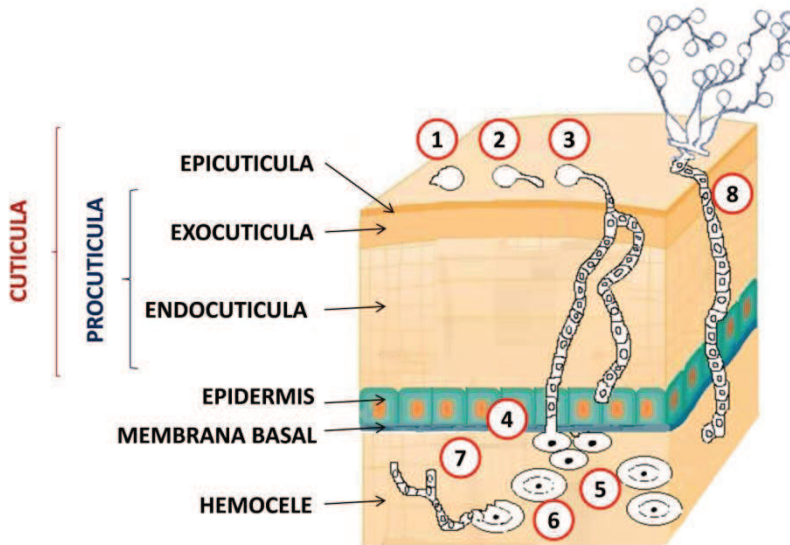


Fig. 4. Modo de acción general de un ascomiceto mitospórico entomopatógeno. 1) Adhesión: contacto entre el conidio y la cutícula del insecto; 2) Germinación y formación del apresorio; 3) Penetración de la cutícula hasta alcanzar el hemocele; 4) Reacción defensiva celular (hemocitos del insecto en el lugar de penetración fúngica); 5) Fagocitosis de cuerpos hifales por hemocitos del insecto; 6) Evasión del sistema inmune; 7) Cuerpos hifales propagándose en el hemocele; 8) Esporulación tras atravesar la cutícula del insecto.

La muerte del hospedante ocurre por la invasión de tejidos y órganos, por la utilización de parte de sus nutrientes, y/o por el efecto de los metabolitos tóxicos producidos por el mismo (Ríos–Moreno et al., 2016). La muerte del insecto marca el fin de la fase patogénica, y da lugar a

CAPÍTULO I

la **saprofítica**, pues en condiciones favorables, las hifas emergen del cadáver, donde producen conidióforos y conidios, que se dispersarán a través del viento, la lluvia o los propios insectos, y se iniciará un nuevo ciclo de infección (Goettel et al., 2005; Charnley y Collins, 2007; Ortiz–Urquiza y Keyhani, 2016).

II.3. Estrategias de uso de los ascomicetos mitospóricos entomopatógenos

Las estrategias para el empleo de AME en el control de insectos son cuatro: (1) conservación, (2) control biológico clásico, (3) inoculación e (4) inundación (Eilenberg, 2002). La **estrategia de conservación** implica la modificación de algunas prácticas agronómicas que propicien las condiciones necesarias para aumentar su actividad epizootica sobre la población del insecto que se quiere controlar (Quesada–Moraga y Santiago–Álvarez, 2008), tales como la reducción del uso de fitosanitarios, la provisión de lugares de hibernación para hospedantes alternativos, o proporcionar una humedad por irrigación apropiada, entre otras. El **control biológico clásico** promulga la introducción deliberada del HE en un hábitat nuevo para el control de una especie invasiva. La eficacia de la estrategia se favorece en hábitats con un cierto grado de permanencia, como por ejemplo praderas, bosques y cultivos leñosos. Además, esta estrategia requiere un alto nivel de especificidad por parte del enemigo natural y, que su respuesta a la población del hospedante se acomode al modelo de densidad dependiente. La **estrategia de inoculación** mediante la aplicación puntual de cantidades bajas o medias de inóculo para iniciar ciclos de enfermedad, establecer el hongo en la población del insecto y mantener el control a largo plazo. Finalmente, la **de inundación** con la aplicación del

CAPÍTULO I

insecticida microbiano generalmente en grandes cantidades, para iniciar una epizootia conducente al declive de la población en un tiempo relativamente corto. En este caso el hongo se usa de manera similar a los insecticidas químicos y se emplea el término **micoinsecticida**. Existen numerosos ejemplos de AME utilizados por inundación para el control de plagas, tanto en ambientes epigeos, como en hipogeos, mediante la **pulverización** de micoinsecticidas a los **árboles y partes aéreas de plantas**, o mediante la estrategia de **atracción e infección**, que se fundamenta en la aplicación utilizando trampas atrayentes impregnadas con el hongo, que permiten la autodiseminación del inóculo por el propio insecto (Ekesi et al., 2007, Quesada–Moraga y Santiago–Álvarez, 2008). En los **ambientes hipogeos** también se han obtenido buenos resultados, no en vano, el suelo es el hábitat natural de los AME, donde se encuentran protegidos de cualquier factor adverso, y es donde ejercen su máximo potencial de biocontrol, por lo que constituyen la mejor alternativa, junto con los nematodos entomopatógenos, para el control microbiano de plagas de insectos del suelo (St. Leger, 2008; Scheepmaker y Butt, 2010).

Los AME también pueden ser aplicados mediante los **tratamientos de semilla**, técnica que se ha utilizado tradicionalmente para proteger de plagas y enfermedades de suelo a semillas y plántulas en desarrollo, mediante el recubrimiento de éstas con fungicidas e insecticidas de amplio espectro, facilitado por la aparición de nuevos biopolímeros en la industria de la formulación de insecticidas.

En la actualidad, en el mercado mundial hay disponibles más de 30 formulados comerciales de AME que están basadas en un número restringido de especies pertenecientes a los géneros *Beauveria*, *Metarhizium*, *Isaria* y *Lecanicillium*, para el control de insectos picadores–

CAPÍTULO I

chupadores, insectos de suelo, lepidópteros y coleópteros, así como langostas y saltamontes y varios grupos de fitófagos para los que no se conocen enfermedades de naturaleza vírica o bacteriana, sin olvidar los insectos sinantrópicos (Lacey et al., 2015; Lacey, 2017).

II.4. Presencia natural de ascomicetos mitospóricos entomopatógenos

Los AME se encuentran de forma natural en el suelo y en los insectos cuyas poblaciones regulan (Goettel et al., 2005; Quesada–Moraga et al., 2007; Quesada–Moraga y Santiago–Álvarez, 2008). En la última década, varias investigaciones han puesto de manifiesto la existencia de sorprendentes asociaciones de los AME con las plantas, tanto en el filoplano (Meyling y Eilenberg, 2006, 2007; Keyser et al., 2015), como endófitos (Vega et al., 2009, 2012; Ownley et al., 2010; Quesada–Moraga et al., 2014b), o incluso como microorganismos competentes en la rizosfera (Hu y St. Leger, 2002).

II.4.1. En los artrópodos

Los AME están adaptados a vivir a expensas de sus hospedantes ya que han coevolucionado de manera intrínseca con los insectos a los que parasitan, de los que obtienen la energía necesaria para su desarrollo (Roy et al., 2006). En función de la asociación trófica de los HE con sus hospedantes, se pueden distinguir tres grupos: (1) hongos biotrofos que se alimentan únicamente de células vivas, proceso que cesa con la muerte de las mismas, (2) necrotrofos que matan al hospedante y después crecen a expensas de los tejidos muertos, y (3) hemibiotrofos que son inicialmente biotrofos y una vez que el hospedante muere se vuelven necrotrofos (Quesada–Moraga y Santiago–Álvarez, 2008; Vega et al., 2009).

CAPÍTULO I

Fruto de esta coevolución, diversos análisis filogenéticos muestran que muchas especies de AME tienen características similares a un ancestro común (Freckleton, 2000), como es el caso de los géneros monofiléticos *Beauveria* o *Metarhizium* (Sung et al., 2007) de amplia distribución geográfica que infectan a más de 700 especies de hospedantes (Rehner et al., 2006; Meyling y Eilenberg, 2007; Meyling et al., 2009). Análisis moleculares han diferenciado doce especies para *Beauveria* (*B. amorpha*, *B. bassiana*, *B. brongniartii*, *B. caledonica*, *B. malawiensis*, *B. vermicornia*, *B. asiatica*, *B. australis*, *B. kipukae*, *B. pseudobassiana*, *B. sungii* y *B. varroae* (Rehner et al., 2011), y nueve especies diferentes para *Metarhizium* (*M. majus*, *M. guizhouense*, *M. brunneum*, *M. pingshaense*, *M. robertsii*, *M. anisopliae*, *M. lepidiotae*, *M. acridum* y *M. globosum*) (Bischoff et al., 2009; Schneider et al., 2011). Conocer el origen y diversidad de los AME resulta primordial para entender el comportamiento e interacción con el hábitat y el ecosistema (Beebee y Rowe, 2008), siendo clave para promover el desarrollo de epizootias como consecuencia de su acción sobre los insectos, para lo que también es importante la adquisición de un profundo conocimiento de su ambiente, distribución y abundancia en el medio (Fisher et al., 2011).

Algunas especies del orden Entomophthorales originan llamativas y espectaculares epizootias. Infectan preferentemente estados inmaduros de insectos (ninfas, larvas, pupas), aunque en ocasiones es el adulto el estado más comúnmente infectado, como en los dípteros (Eilenberg, 2002). En general, las especies de HE presentan patogeneicidad para una especie o grupo de especies relacionadas filogenéticamente aunque algunas, muy pocas, tienen un amplio rango de hospedantes. El desarrollo natural de la enfermedad e incluso su posible dispersión espacial y

CAPÍTULO I

temporal están sujetas a características de las poblaciones del insecto hospedante (p.ej. susceptibilidad, densidad, movimiento y distribución espacial) y del HE (p.ej. virulencia, poder de dispersión, densidad de inóculo y distribución espacial), así como a factores ambientales (p.ej. temperatura, humedad y radiación UV) y al impacto de la actividad del hombre en los ecosistemas naturales y agroforestales (Quesada–Moraga et al., 2007). Cuando existe escasez de insectos hospedantes, o las condiciones ambientales no son favorables, la mayoría de especies de Entomophthorales producen esporas de reposo, clamidosporas, zigosporas o azigosporas para persistir en el suelo durante largos períodos de tiempo, mientras que a tal efecto, los AME pueden formar otras estructuras como esclerocios, clamidosporas, etc. (Quesada–Moraga et al., 2007).

II.4.2. En el suelo

La presencia, diversidad y dinámica poblacional de los AME en el suelo está estrechamente relacionada con el grado de manejo de los ecosistemas (Keller et al., 2003; Meyling y Eilenberg, 2006; Quesada–Moraga et al., 2007). La mayoría de los AME se encuentran en los primeros 10 cm del suelo, y su número disminuye a medida que aumenta la profundidad (Jaronski, 2007). Mediante el análisis con marcadores moleculares se puede constatar la presencia a lo largo del tiempo del aislado con el que se ha realizado un tratamiento (Enkerli et al., 2002), que puede variar entre pocas semanas e incluso años (Kabaluk et al., 2007).

En el hábitat epigeo es donde habitualmente ocurren las epizootias ya que la infección se dispersa rápidamente a través de los conidios de la superficie del sustrato vegetal, del viento, o a través de la transmisión horizontal con insectos enfermos (Goettel et al., 2005). La superficie del

CAPÍTULO I

suelo se considera un entorno favorable para los AME ya que proporciona refugio a los propágulos fúngicos contra las condiciones ambientales (Jaronski, 2007). No obstante, el suelo es un medio extremadamente complejo, y un gran número de factores del mismo (textura, pH, materia orgánica, capacidad de intercambio catiónico, etc.) (Jaronski, 2010), así como ambientales (temperatura, humedad), y relacionados con el comportamiento de los insectos (microflora) que habitan en el suelo, hacen que la distribución y persistencia de conidios a lo largo del perfil del suelo sea extremadamente heterogénea (Jaronski, 2010). La interacción con otros microorganismos del suelo puede afectar a la viabilidad y persistencia de los HE por fungistasis (Grodén y Lockwood, 1991; Jaronski, 2010). Algunos invertebrados geobiontes o geófilos, en especial colémbolos, ácaros o lombrices, desempeñan un papel importante en la dispersión en el suelo de los conidios tras ser ingeridos por ellos. Además, la prevalencia de los HE en el suelo está estrechamente relacionada con la presencia de insectos susceptibles a la infección (Meyling y Eilenberg, 2007; Lacey et al., 2015).

En las zonas cercanas a la rizosfera se desarrollan complejas interacciones hongo– fitófago– planta. Así, se ha demostrado que *M. anisopliae* expresa genes diferentes cuando crece en los exudados de las raíces de plantas que cuando lo hace sobre la cutícula o hemolinfa de un insecto, lo que revela el desarrollo por parte de los AME de diferentes mecanismos de adaptación para su supervivencia en el medio ambiente, ya sea como patógenos de artrópodos, como endófitos o incluso por su competencia en la rizosfera (Hu y St. Leger, 2002; Wang et al., 2005; Bais et al., 2006). También se conoce que *M. anisopliae* produce las proteínas MAD1 y MAD2 que se combinan de manera diferente según la adhesión

CAPÍTULO I

del conidio se produzca en la cutícula del insecto o en la superficie de la planta (Wang y St Leger, 2007). Esto ha llevado a algunos autores a proponer que muchos de estos hongos nunca han abandonado su papel como simbioses vegetales y plantean la hipótesis de que la patogeneidad del insecto es una adaptación que permite a ciertas especies de hongos endófitos acceder a una fuente especializada de nitrógeno y otros nutrientes derivados de los insectos, y que son capaces de intercambiar efectivamente estos nutrientes derivados de insectos por el acceso a los carbohidratos vegetales (Elliot et al., 2000; Behie et al., 2017).

La humedad y textura del suelo son dos factores que se encuentran muy relacionados e influyen directamente en la viabilidad y la actividad de los propágulos fúngicos, mientras que la lluvia juega un papel muy importante en el movimiento vertical de los HE, ya que la humedad favorece la viabilidad (Keller, 1989), pero también la excesiva precipitación puede afectar a la eficacia del patógeno, debido al lavado de los propágulos cuando no se da una buena adhesión del conidio a la cutícula del insecto (Inglis et al., 2000). Algunos estudios han revelado que el movimiento de los conidios de algunos hongos, entre ellos *B. bassiana* y *M. brunneum*, difiere y depende del tipo de suelo (Garrido–Jurado et al., 2011).

Además, estudios recientes para evaluar la disponibilidad y el movimiento de conidios de *B. bassiana* y *M. brunneum* en función de las propiedades físico–químicas del suelo, ponen de manifiesto diferencias claras entre los dos hongos en su interacción con el mismo. La adsorción y arrastre de conidios en experimentos de columnas empaquetadas con diferentes suelos indica que los conidios de *B. bassiana* son retenidos en la

CAPÍTULO I

capa superficial por las partículas de arcilla, mientras que la retención es menor en suelos arenosos con macroporos más grandes que los primeros (Salazar et al., 2007; Garrido–Jurado et al., 2011). Por el contrario, la retención de *M. brunneum* fue mayor en arena, como consecuencia del mayor tamaño y la naturaleza hidrófoba de sus conidios (Jeffs et al., 1999).

Los experimentos de adsorción y de arrastre revelan la existencia de una interacción entre los conidios de *B. bassiana* y los minerales de la arcilla del suelo (Garrido–Jurado et al., 2011). La pared celular exterior de los conidios de *B. bassiana* se compone de una gran diversidad de hidratos de carbono que contribuyen a la formación de enlaces de hidrógeno entre los conidios y las superficies hidrófobas e hidrófilas (Holder y Keyhani, 2005; Wanchoo et al., 2009), que pueden estar implicados en la interacción de conidios con las superficies de arcilla para el intercambio de iones (Lavie y Stotzky, 1986). Además, se ha demostrado que el hierro (Fe) extraíble con ditionito (Fe_D), que es una medida de los óxidos de Fe asociados con las arcillas de silicato del suelo, está relacionado con la retención de conidios de *B. bassiana* en el suelo (Garrido–Jurado et al., 2011).

II.4.3. Asociaciones con las plantas: como endófitos y en el filoplano

A pesar de que el término 'endófito' se emplee para todos los organismos que habitan las plantas, los micólogos han llegado a utilizar el término '**endófito fúngico**' para los hongos que colonizan las plantas sin causar síntomas de enfermedad visibles (Schulz y Boyle, 2005; Hyde y Soyong, 2008; Quesada–Moraga et al., 2014a). Aunque el suelo se considera el reservorio natural de los AME, también han sido aislados en hábitats muy diversos como el filoplano. Se han citado una gran variedad de plantas,

CAPÍTULO I

incluidas especies herbáceas, arbustivas y leñosas, colonizadas de forma natural por AME endófitos (Vega et al., 2008; Roy et al., 2010; Meyling et al., 2011; Sasan y Bidochka, 2012; Garrido–Jurado et al., 2015; Jaber y Enkerli, 2017), así como producto de la introducción artificial como endófitos en una gran variedad de cultivos (Gurulingappa et al., 2010; Quesada–Moraga et al., 2014a) (Tabla 2).

Tabla 2. Especies de plantas colonizadas de manera natural y artificial por hongos entomopatógenos endófitos. Modificada de Resquín–Romero (2016b) y actualizada. Continúa 1/3

Especie fúngica	Inoculación	Plantas hospedantes	Referencias (*)
<i>Metarhizium brunneum</i>	Natural	<i>Schizachne purpurascens</i>	
	Artificial	<i>Helianthus annuus</i> , <i>Sorghum bicolor</i> , <i>Zea mays</i> , <i>Cucumis melo</i> , <i>Vicia faba</i>	Jaber y Enkerli, 2016, Garrido–Jurado et al., 2017; Ramanujam, et al., 2017, Raya–Díaz, et al., 2017
<i>Metarhizium guizhouense</i>	Natural	<i>Solidago altissima</i>	
<i>Nematoctonus robustus</i>	Artificial	<i>Hordeum vulgare</i>	
<i>Paecilomyces</i> sp.	Natural	<i>Carpinus caroliniana</i> , <i>Dactylis glomerata</i> , <i>Holcus lanatus</i> , <i>Musa acuminata</i> , <i>Oryza sativa</i>	
<i>Plectosphaerella cucumerina</i>	Natural	<i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Cynodon dactylon</i> , <i>Ammophila arenaria</i> , <i>Elymus farctus</i>	
<i>Pleurotus djamor</i>	Artificial	<i>Hordeum vulgare</i>	
<i>Pochonia chlamydosporia</i>	Artificial	<i>Hordeum vulgare</i> , <i>Solanum lycopersicum</i> , <i>Schizachne purpurascens</i>	
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	Artificial	<i>Gossypium hirsutum</i>	
<i>Tolypocladium cylindrosporum</i>	Natural	<i>Festuca rubra</i> , <i>Holcus lanatus</i>	
<i>Arthrobotrys oligospora</i>	Artificial	<i>Hordeum vulgare</i> , <i>Solanum lycopersicum</i>	
<i>Arthrobotrys dactyloides</i>	Artificial	<i>Hordeum vulgare</i>	

CAPÍTULO I

Tabla 2. Especies de plantas colonizadas de manera natural y artificial por hongos entomopatógenos endófitos. Modificada de Resquín–Romero (2016b) y actualizada. Continuación 2/3

Especie fúngica	Inoculación	Plantas hospedantes	Referencias (*)
<i>Beauveria bassiana</i>	Natural	<i>Abies beshanzuensis</i> , <i>Ammophila arenaria</i> , <i>Carpinus carolinana</i> , <i>Coffea arabica</i> , <i>Dactylis glomerata</i> , <i>Datura stramonium</i> , <i>Elymus farctus</i> , <i>Espeletia</i> spp., <i>Eucalyptus globulus</i> , <i>Gossypium hirsutum</i> , <i>Papaver somniferum</i> , <i>Pinus monticola</i> , <i>Pinus radiata</i> , <i>Pinus sylvestris</i> , <i>Quercus ilex</i> , <i>Theobroma gileri</i> , <i>Zea mays</i> , <i>Schizachne purpurascens</i> .	
	Artificial	<i>Coffea arabica</i> , <i>Corchorus olitorius</i> , <i>Musa</i> sp., <i>Papaver somniferum</i> , <i>Phoenix dactylifera</i> , <i>Pinus radiata</i> , <i>Sorghum bicolor</i> , <i>Theobroma cacao</i> , <i>Zea mays</i> , <i>Lycopersicon esculentum</i> , <i>Triticum aestivum</i> , <i>Gossypium hirsutum</i> , <i>Cynara scolymus</i> , <i>Vitis vinifera</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Nicotiana tabacum</i> , <i>Triticum sativus</i> , <i>Glycine max</i> , <i>Brassica napus</i> , <i>Oryza sativa</i> , <i>Solanum lycopersicum</i> , <i>Brassica oleracea</i> , <i>Festuca arundinacea</i> , <i>Cucumis melo</i> , <i>Manihot esculenta</i> , <i>Vitis vinifera</i> , <i>Vicia faba</i>	Greenfield et al., 2016; Jaber y Enkerli, 2016; Culebro–Ricaldi, et al., 2017; Gan et al., 2017; Garrido–Jurado et al., 2017; Herbst, et al., 2017; Raya–Díaz, et al., 2017; Rondot y Reineke, 2017
<i>Bionectria ochroleuca</i>	Artificial	<i>Cynara scolymus</i>	
<i>Cladosporium velox</i>	Natural	<i>Tinospora cordifolia</i>	Singh et al., 2016
<i>Clonostachys rosea</i>	Natural	<i>Coffea arabica</i> , <i>Quercus myrsinifolia</i>	

CAPÍTULO I

Tabla 2. Especies de plantas colonizadas de manera natural y artificial por hongos entomopatógenos endófitos. Modificada de Resquín–Romero et al., 2016b y actualizada. Continuación 3/3

Espece fúngica	Inoculación	Plantas hospedantes	Referencias
<i>Cordyceps sinensis</i>	Natural	<i>Holcus lanatus</i> , <i>Theobroma giler</i>	
<i>Cordyceps memorabilis</i>	Natural	<i>Eucaliptus globulus</i>	
<i>Lecanicillium dimorphum</i> , <i>Lecanicillium psalliotae</i>	cf.	<i>Phoenix dactylifera</i>	
<i>Lecanicillium lecanii</i>	Natural	<i>Ammophila arenaria</i> , <i>Carpinus caroliniana</i> , <i>Dactylis glomerata</i> , <i>Elymus farctus</i> , <i>Gossypium hirsutum</i>	
<i>Hirsutella aphidis</i>	Natural	<i>Lolium perenne</i>	
<i>Hypocrea lixii</i>	Artificial	<i>Allium cepa</i>	
<i>Isaria farinosa</i>	Natural	<i>Pinus sylvestris</i>	
<i>Isaria fumosorosea</i>	Artificial	<i>Sorghum bicolor</i> , <i>Festuca arundinacea</i>	Gan et al., 2017
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Natural	<i>Cynodon dactylon</i>	
	Artificial	<i>Solanum lycopersicum</i> , <i>Manihot esculenta</i>	Greenfield et al., 2016
<i>Metarhizium robertsii</i>	Natural	<i>Aster vimineus</i> , <i>Hieracium pratense</i> , <i>Solidago altissima</i>	
	Artificial	<i>Panicum virgatum</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Sorghum bicolor</i>	

(*) Se indican solo referencias recientes, posteriores a Resquín–Romero et al., 2016b

Para realizar la inoculación artificial de plantas con AME endófitos pueden utilizarse diversas técnicas como son la pulverización foliar, inyecciones al tronco, inoculación al suelo o tratamiento de semillas, con resultados variables que pueden determinar el éxito y extensión de la colonización sistémica del tratamiento fúngico (Tefera y Vidal, 2009). La colonización puede ser intercelular o intracelular, localizada o sistémica (Stone et al., 2000; Arnold y Lutzoni, 2007) y pueden colonizar cualquier tejido de la planta, pudiendo dar lugar a la transmisión vertical a través de

CAPÍTULO I

las semillas (Bacon y White, 2000; Quesada–Moraga et al., 2014b). La penetración de los AME en los tejidos de las plantas se realiza a través de los estomas o por medio de la penetración directa mediante la actuación de la enzima MAD2 que permite la adhesión a la planta (Wang y St Leger, 2007). Posteriormente, el movimiento se produce en los espacios intercelulares siguiendo la vía del apoplasto (Landa et al., 2013).

El uso de los AME como endófitos tiene la ventaja de que son necesarias menores cantidades de inóculo que con los insecticidas convencionales, debido a que el inóculo fúngico queda confinado en el interior de la planta. La planta proporciona protección al inóculo frente a factores abióticos y bióticos que limitarían su uso en condiciones de campo (Akello et al., 2008; Backman y Sikora, 2008). Las interacciones de los AME endofíticos con las plantas a las que colonizan son heterogéneas, con requerimientos ecológicos y adaptaciones distintas entre los diferentes grupos de endófitos. Muchos intentos para establecer asociaciones endofíticas entre cepas de AME y varias especies vegetales han fracasado (Akutse et al., 2013; Vidal y Jaber, 2015; Mutune et al., 2016). Esto podría deberse a las características innatas del aislamiento fúngico (Posada et al., 2007) o a la genética de la planta hospedante (Arnold y Lewis, 2005), lo que indica una elevada diversidad en la especificidad de la misma, que va desde muy estrecha para los entomopatógenos obligados, hasta muy amplia para los entomopatógenos facultativos (Wraight et al., 2007). Dado que la colonización endofítica es principalmente intercelular, los endófitos dependen de los nutrientes del apoplasto para el crecimiento. Sólo unos pocos estudios tratan sobre la translocación y la fisiología específica, sobre el intercambio de nutrientes o la acumulación *in vivo* (Pan y Clay, 2004). Sin embargo, puede haber una reacción inducida de defensa de la planta.

CAPÍTULO I

Algunas plantas pueden producir algunos exudados que inhiben el crecimiento de algunos hongos, como se ha observado en *Quercus ilex* (L.) (Magnoliophyta; Fagaceae), que produce fenoles que pueden inhibir el crecimiento de los hongos nematófagos y entomopatógenos: *Verticillium suchlaporium* (Ascomycota: Glomerellales), *B. bassiana* (Ascomycota: Hypocreales), *Isaria farinosa* (Holmsk.) (Ascomycota; Hypocreales), *Hirsutella rhossiliensis* Minter y BL Brady (Ascomycota: Hypocreales) (López–Lorca y Olivares–Bernabéu, 1997).

Por otra parte, en el suelo son los exudados de las raíces los que pueden favorecer la presencia y competencia del hongo en la rizosfera, en especial para el género *Metarhizium*; cuando los AME se encuentran en el **filoplano**, pueden verse afectados por la química de la superficie de las plantas y la emisión de compuestos volátiles (Cory y Ericsson, 2010). La gran exposición de esta zona a las condiciones ambientales, en especial la radiación solar, podría limitar la posible presencia epífita de AME (Meyling y Eilenberg, 2006). De hecho, algunos autores como Jaronski (2010) han observado que el envés de las hojas, con menor exposición a la radiación solar y el lavado de lluvia, parece ser más rico en AME.

III. Nuevas funciones ecológicas de los ascomicetos mitospóricos entomopatógenos y sus aplicaciones

Hasta finales del siglo XX los retos científicos en el estudio de los AME se dirigían principalmente a su presencia natural, ecología, modo de acción y

CAPÍTULO I

empleo práctico para el control de insectos y ácaros, pero en el siglo XXI se han descrito nuevas funciones ecológicas de los AME relacionadas con su carácter endófito y su competencia en la rizosfera, de enorme significación para la protección de cultivos y la producción vegetal (Quesada–Moraga et al., 2014a). Cada día son más numerosos los estudios que demuestran que los AME no son únicamente eficaces contra plagas de insectos, sino que también mejoran la respuesta de la planta a otros estreses bióticos. Así, se ha demostrado que los AME pueden inducir resistencia sistémica contra patógenos de plantas gracias a su capacidad para secretar compuestos con múltiples actividades biocidas como insecticidas, antifúngicos, herbicidas y antivirales (Goettel et al., 2008; Ownley et al., 2008; 2010; Sasan y Bidochka, 2013; Quesada–Moraga et al., 2014a). También se ha demostrado que aportan beneficios como colonizadores de la rizosfera (Hu y St. Leger, 2002; St. Leger, 2008; Pava–Ripoll et al., 2011), promueven el crecimiento vegetal (Kabaluk y Ericsson, 2007; García et al., 2011; Lopez y Sword, 2015; Jaber y Enkerli, 2016; 2017; Sánchez–Rodríguez et al., 2015), mejoran la nutrición de las plantas (Behie et al., 2012; Behie y Bidochka, 2014), incrementan el desarrollo de las raíces (Wyrebek et al., 2011; Sasan y Bidochka, 2012; Liao et al., 2014), y alivian estreses abióticos, como salinidad (Waller et al., 2005) o deficiencia de Fe (Sánchez–Rodríguez et al., 2015; 2016).

Estos beneficios adicionales sugieren que los HE tienen un gran potencial para ser desarrollados con múltiples propósitos en estrategias de Producción Integrada de Cultivos (Goettel et al., 2008; Vega et al., 2009; Ownley et al., 2010), más respetuosas con el medio ambiente, incluso podrían ayudar a reducir la necesidad de fertilizantes convencionales bajo determinadas condiciones (Sánchez–Rodríguez et al., 2016).

CAPÍTULO I

III.1. Protección de la planta frente a factores bióticos

III.1.1. Plagas de insectos

Las propiedades tan sobresalientes que presentan los AME para el control de plagas de insectos han permitido que sean desarrollados como bioinsecticidas y que hayan sido incorporados al Registro de Productos Fitosanitarios. Las primeras aplicaciones de AME endófitos en control de plagas se produjeron con la llegada del siglo XXI, en su mayor parte con insectos barrenadores, con énfasis en maíz, adormidera, platanera y café (Quesada–Moraga et al., 2014a), donde los insectos que colonizan los tejidos de la planta de forma endofítica, entran en contacto con el inóculo fúngico dentro de la planta, con inicio de ciclos de infección como los ya descritos. Sin embargo, estudios recientes ponen de manifiesto que la colonización endofítica transitoria del tejido vegetal por AME puede originar también mortalidad en insectos masticadores y chupadores que se alimentan de la planta de forma ectófito (Resquín–Romero et al., 2016). Aunque aún se desconocen con precisión los mecanismos implicados en este efecto, la presencia de compuestos insecticidas dentro de la planta aparece como uno de los principales (Schulz et al., 2002; Sree y Padmaja, 2008; Rohlf y Churchill, 2011; Ríos–Moreno et al., 2016). Este origen viene apoyado por la ausencia de esporulación fúngica (micosis) en insectos que han muerto al alimentarse en plantas endofíticamente colonizadas por AME. A pesar de ello, sólo algunos estudios han identificado los metabolitos secundarios de hongos producidos en tejidos vegetales colonizados por AME. Es el caso de la destruxina A implicada en la patogénesis de insectos, en fragmentos de hojas, tallo, tubérculo y raíz de

CAPÍTULO I

plantas de patata (Ríos–Moreno et al., 2016) y en hojas de melón colonizadas con *M. brunneum* (Garrido–Jurado et al., 2017). Sin embargo la cantidad de destruxina A producida por *M. brunneum* detectada dentro de los tejidos vegetales fue muy pequeña comparada con el grado de colonización de la planta por el hongo, lo que indica que la persistencia de destruxina A es efímera, haciéndola inocua para otros grupos de animales como los parasitoides (Ríos–Moreno et al., 2017).

III.1.2. Enfermedades de las plantas

Resulta crucial, como se ha indicado en la sección I, la aparición de otras ventajas adicionales para la planta asociadas a su colonización endofítica por parte de AME, tales como la inducción de resistencia, mediante la activación de las defensas de la planta que reducen o alivian la enfermedad, así como una extensión de la hipótesis defensiva del mutualismo (Bultman y Murphy, 2000; Ownley et al., 2010). En muchos casos, los mecanismos de control biológico no son mutuamente excluyentes, sino que una combinación de múltiples mecanismos puede estar operando contra un patógeno vegetal, por ejemplo, la competencia, la antibiosis, el micoparasitismo, la resistencia sistémica de las plantas y producción de metabolitos secundarios vegetales (Vega et al., 2009).

III.1.2.1. Supresión directa de patógenos de plantas

Los AME endófitos pueden suprimir directamente a los patógenos vegetales a través de competencia por nichos ecológicos y nutrición, por producción de metabolitos secundarios y micoparasitismo. Los hongos endófitos compiten activamente contra los patógenos de plantas por el nicho o sitio de infección, carbono (C), nitrógeno (N) y diversos microelementos que les son necesarios para su nutrición. El sitio de

CAPÍTULO I

competición es a menudo la rizosfera, el filoplano o el apoplasto. La **competencia** exitosa suele ser una cuestión de oportunidad, ya que es probable que los recursos lleguen al colonizador inicial, que ocupa en primer lugar su espacio y depende de los nutrientes proporcionados por la planta hospedante, que de esta forma no están a disposición de un posible patógeno que aborde la infección en segunda instancia. El cambio en el orden de la colonización de las plantas, por ejemplo cuando el patógeno coloniza la planta antes que el endófito, puede desplazar la interacción endófito–patógeno de la supresión de la enfermedad a la promoción de la misma (Adame–Álvarez et al., 2014). En la literatura existen numerosos ejemplos de competencia como es el caso de la resistencia que ofrecen diversos aislados de *B. bassiana* aplicado a las semillas de plantas de tomate (Ownley et al., 2004; Clark et al., 2006) y algodón (Griffin, 2007; Ownley et al., 2008) contra *Rhizoctonia solani* Kühn (Basidiomycota; Cantharellales) y *Pythium myriotylum* Drechsler (Oomycota; Pythiales).

La **antibiosis** por la producción de metabolitos secundarios es otro de los mecanismos de resistencia contra patógenos de plantas (Ownley et al., 2010). Los AME son una rica fuente de metabolitos secundarios con actividades antimicrobianas, insecticidas y citotóxicas (Gibson et al., 2014). Por ejemplo, *B. bassiana* produce numerosos metabolitos secundarios incluyendo beauvericina, bassianina, beauverolidas, bassianolidas, oosporeina, y bassianolona, entre otros (Ownley et al., 2010). De estos compuestos, la beauvericina, secretada por los géneros *Beauveria* e *Isaria*, es particularmente interesante por su propiedades antimicrobianas (Wang y Xu, 2012).

El **micoparasitismo** es el parasitismo de un hongo por otro (Barnett, 1963; Jeffries, 1995). Existen varios grados de especificidad pues

CAPÍTULO I

dentro de una especie fúngica, algunos aislados pueden infectar a un gran número de hongos taxonómicamente diversos, mientras que otros demuestran un alto nivel de especificidad (Askary et al., 1998). Un ejemplo es *Phialemonium inflatum* (Burnside) (Ascomycota: Sordariales) aplicado a la semilla de algodón contra *Meloidogyne incognita* Kofoid y White (Tylenchida; Heteroderidae) (Zhou et al., 2016). También ha sido descrito el micoparasitismo *in vitro* de *Metarhizium* y *Beauveria*, como es el caso de *M. brunneum* y *B. bassiana* contra *Verticillium dahliae* Kleb. (Ascomycota: Glomerellales) y *Phytophthora megasperma* Drechler (Oomycota; Peronosporales) hongos patógenos que afectan gravemente al olivar (Lozano–Tovar et al., 2013, Lozano–Tovar et al., 2017).

La **inducción de la resistencia sistémica de las plantas** es un mecanismo importante por el cual la planta presenta una mejor respuesta defensiva frente a posibles patógenos (Pieterse et al., 2014). La colonización de plantas por hongos endófitos puede estimular a la planta a producir **metabolitos secundarios** bioactivos (Hartley et al., 2015), entre los que se encuentran las fitoalexinas con propiedades antifúngicas, antibacterianas y antivirales, que ayudan a proteger las plantas contra patógenos. La cantidad de fitoalexinas isoflavonoides aumentó significativamente en las plantas de soja inoculadas con *M. anisopliae* en comparación con las plantas testigo (Khan et al., 2012). La colonización endofítica también induce a las plantas a producir lignina y otros depósitos de la pared celular como una respuesta de defensa mecánica, lo que puede prevenir o limitar la infección por patógenos de plantas que causan enfermedades (Schulz y Boyle, 2005). La resistencia ofrecida incluye la reducción de los síntomas de la enfermedad en partes de plantas distantes del sitio donde el agente inductor está activo. Esto se ha demostrado con

CAPÍTULO I

B. bassiana aplicado a la raíz de plántulas de algodón contra bacterias como *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (Smith)(Bacteria; Xanthomonadaceae) 13 días después de la infección (Griffin et al., 2006; Ownley et al., 2008), lo que produjo una reducción significativa de la gravedad de la enfermedad en comparación con las plantas control no tratadas. Ya existen en el mercado productos como Naturalis®, formulado con una cepa de *B. bassiana*, que reducen significativamente la incidencia y la gravedad de los síntomas de enfermedad causados por el virus del mosaico amarillo Zucchini (ZYMV, género *Potyvirus*, familia Potyviridae) en calabaza (Jaber y Salem, 2014). Además, también se ha demostrado que la aplicación foliar de *B. bassiana* proporciona resistencia sistémica a plantas contra otros hongos como *Plasmopara viticola* (Berk. y MA Curtis) Berl. y De Toni (Oomycota; Peronosporales) que atacan a la vid (Jaber, 2015). Otros hongos como *Lecanicillium spp.* producen resistencia contra *Pythium ultimum* Trow (Oomycota; Pythiales) (Benhamou y Brodeur, 2001) y el oídio *Sphaerotheca fuliginea* (Schlecht.: Fr.) Pollacci (Leotiomycetes; Erysiphales) (Hirano et al., 2008), y *M. robertsii*, que confieren protección contra la pudrición de la raíz del frijol causada por *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. F. sp. *Phaseoli* (Burkholder) W.C. Snyder y N.H. Hans (Ascomycota; Hypocreales) (Sasan y Bidochka, 2013). Asimismo, se ha observado la protección frente a *Fusarium spp* de distintas plantas cultivadas con sus raíces colonizadas por *Acremonium* Link (Ascomycota; Hypocreales) (Raps y Vidal, 1996; 1998; Dugassa et al., 1998; Kuldau, 2000), así como el incremento de la tasa de supervivencia de plantas de tabaco al *damping-off* tras la colonización por inoculaciones con *Piriformospora indica* Sav. Verma, Aj. Varma, Rexer, G. Kost y P. Franken (Basidiomycota; Sebaciales) (Sahay y Varma, 1999)

CAPÍTULO I

Finalmente se ha estudiado el empleo conjunto de microorganismos endofíticos para el manejo simultáneo de plagas y enfermedades. Así, el uso de una cepa de *B. bassiana* y otra de *Pseudomona fluorescens* Migula (Bacteria; Pseudomonadaceae) redujo significativamente el daño causado por la minadora de hojas *Aproaerema modicella* Deventer (Lepidóptera; Gelechiidae) y la pudrición del tizón del sur *Athelia rolfsii* (Curzi) CC Tu y Kimbr. (Basidiomycota; Atheliales) en cacahuete (*Arachis hypogaea* L.) (Fabales; Fabaceae) (Senthilraja et al., 2010). Una combinación similar fue el uso de *B. bassiana* y un hongo micorrízico arbuscular, *Rhizophagus intraradices* NC Schenck y GS Sm. (Mucoromycota; Glomerales), que permitió mejorar la respuesta defensiva de la planta de tomate contra *Spodoptera exigua* Hilbner (Lepidoptera; Noctuidae) (Shrivastava et al., 2015) con expresión en la producción de terpenoides beneficiosos para la planta.

III.2. Protección de la planta frente a factores abióticos

Además de proteger a las plantas frente a estreses bióticos (plagas y enfermedades), algunas especies de hongos endófitos pueden mejorar su adaptabilidad ecológica con mejora de la tolerancia a estreses ambientales (Schulz et al., 1999; Tan y Zou, 2001), tales como **sequía** (Bacon y Hill, 1996), **salinidad** (Waller et al., 2005), **temperatura** (Redman et al., 2002), **radiación ultravioleta** (Inglis et al., 1997), y estrés nutricional (Sánchez-Rodríguez et al., 2015; 2016). La mejora del crecimiento depende de la especie vegetal y de su estado metabólico (Schulz et al., 2002). Así, los AME *B. bassiana*, *I. fumosorosea* Wize. Bull y *M. brunneum* promueven el crecimiento, mejorando la salud y vigor de plantas de col bajo estrés

CAPÍTULO I

hídrico (Dara, 2016), mientras que *B. bassiana* también promueve el crecimiento de plantas de fresa (Dara, 2013), *M. anisopliae* reduce el estrés salino en soja (Khan et al., 2012), y *M. robertsii* mejora el crecimiento de raíces y la absorción de nutrientes en pastizales y habichuelas (Sasan y Bidochka, 2012). Las plantas cuyas raíces están colonizadas por endófitos a menudo crecen más rápido que las no colonizadas, lo que se asocia a la síntesis de fitohormonas y otras sustancias promotoras del crecimiento por los hongos (Petrini, 1991; Tudzynski y Sharon, 2002). **El posible impacto de la colonización endofítica por AME o la presencia de los mismos en la rizosfera sobre la respuesta de la planta a estrés nutricional es el principal objetivo de la presente tesis doctoral. Pero antes, conviene profundizar en el conocimiento actual de microorganismos que mejoran la nutrición y crecimiento de plantas.**

III.3. Microorganismos que mejoran la nutrición y crecimiento de las plantas

Los microorganismos, con su participación en innumerables reacciones metabólicas, son componente clave del ciclo de los nutrientes, base de toda productividad, lo que confiere un papel fundamental en la fertilidad de los suelos (Johansson et al., 2004). Más allá, se han desarrollado estrategias para incrementar la microbiota del suelo y acelerar todos los procesos microbianos, como la utilización de *bio-inoculantes*, que consisten en cepas individuales o conjunto de microorganismos que añadidos directamente al suelo, o como un recubrimiento de semillas, aportan beneficios para el crecimiento de las plantas (Roesti et al., 2006; Ahmad et al., 2013; Owen et al., 2014). Estos productos pueden estimular

CAPÍTULO I

el crecimiento vegetal a través de mecanismos tales como control de fitopatógenos en la rizósfera, producción de hormonas vegetales, liberación de nutrientes del suelo o de la materia orgánica, y mejora en la absorción y translocación de nutrientes (Aguado–Santacruz, 2012). Los bioinoculantes pueden clasificarse en dos grupos principales: (1) bacterias promotoras del crecimiento vegetal, inter y extracelulares (Gray y Smith, 2005), (2) hongos asociados a la raíz y hongos formadores de micorrizas (Gray y Smith, 2005).

III.3.1. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal

Estas bacterias intervienen en el ciclo de algunos elementos minerales como P, N, C, Fe, etc., favoreciendo la nutrición de las plantas. A cambio utilizan los exudados de las raíces en forma de ácidos orgánicos, aminoácidos o azúcares. Las bacterias se pueden dividir en dos grupos con respecto al mecanismo de asociación de la planta: bacterias **intracelulares** que son las que residen dentro de las células vegetales, produciendo nódulos localizados dentro de estructuras especializadas (principalmente rizobios que fijan N); y las bacterias **extracelulares**, que son aquellas que residen fuera de la célula vegetal y no producen nódulos, pero pueden residir en los espacios apoplásticos como endófitos, en el rizoplaneo (Compant et al., 2010), o incluso en la filosfera (Compant et al., 2008).

III.3.1.1. Bacterias intracelulares

Las bacterias intracelulares intervienen en la fijación del N en plantas vasculares a través de los nódulos como las bacterias del género *Rhizobium* (Bacteria; Rhizobiales) que están asociadas simbióticamente en plantas de leguminosas. También las cianobacterias que colonizan la superficie de las raíces de una gran diversidad de plantas, son capaces de fijar N sin formar

CAPÍTULO I

nódulos destacando principalmente los géneros *Nostoc* (Bacteria; Nostocales) y *Anabaena* (Bacteria; Nostocales) (Frenche et al., 2009). Un ejemplo es *Azospirillum* (Bacteria; Rhodospirillales) que es capaz de realizar la fijación biológica del N, es decir, transforman el N molecular del suelo o la atmósfera, en nitrato o amonio. Esta bacteria también solubiliza el P del suelo haciéndolo más fácilmente asimilable por la planta (Okon y Labandera–Gonzalez, 1994; Dobbelaere et al., 1999).

Las bacterias fijadoras de N se encuentran en el suelo bajo dos formas, estado libre o en simbiosis. En general, la importancia agrícola de las bacterias fijadoras libres es relativa ya que las cantidades de N fijadas, del orden de 10 a 20 kg N ha⁻¹ año⁻¹, son insuficientes para permitir el desarrollo de la agricultura, mientras que la fijación simbiótica es mucho más eficaz (p.ej. con judías: 80 kg N ha⁻¹ año⁻¹; con alfalfa: 400 kg N ha⁻¹ año⁻¹)(Herridge y Bergensen, 1988; Lampkin, 1998). La más común es la simbiosis con plantas leguminosas, esta fijación se hace mediante bacterias del género *Rhizobium* que viven en los nódulos radiculares de las leguminosas. La asociación *Rhizobium* – leguminosa suele ser bastante específica, de manera que cada especie bacteriana se asocia con una sola especie de leguminosa (p.ej. *Bradyrhizobium japonicum* Kichner– Soja, *Rhizobium phaseoli* Dangeard– Judías, *Rhizobium leguminosarum* Frank– guisantes, lentejas y habas). La nodulación se ve drásticamente reducida cuando el suelo contiene N soluble, por lo que el abonado de síntesis impide la simbiosis entre la bacteria y la leguminosa (Johansson et al., 2004).

CAPÍTULO I

III.3.1.2. Bacterias extracelulares

Las bacterias extracelulares promueven el crecimiento de las plantas por mecanismos tales como síntesis de fitohormonas (fundamentalmente el ácido indolacético) y enzimas (Gray y Smith, 2005), promoción del crecimiento de la raíz y la proliferación de los pelos radiculares, producción de vitaminas, síntesis de compuestos químicos inhibitorios como antibióticos que inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos (Gamalero y Glick, 2011; Owen et al., 2014) y enzimas líticas detoxificadoras que inducen resistencia en la planta, producción de sustancias quelantes de Fe (sideróforos) que facilitan su absorción por parte de las plantas (Franco–Correa et al., 2010), mejora de la solubilización de P (Frossard et al., 2000; Khan et al., 2007; Tao et al., 2008), y aumento de la porosidad y capacidad de retención de agua y nutrientes del suelo.

Uno de los principales mecanismos utilizados por las bacterias para solubilizar nutrientes y hacerlos más disponibles para las plantas es a través de la síntesis de ácidos orgánicos como el oxálico, cítrico, butírico, malónico, láctico, succínico, málico, glucónico, acético, glicónico, fumárico, adípico, indolacético y 2–cetoglucónico, los cuales acidifican la rizosfera (Rodríguez y Fraga, 1999; Paredes–Mendoza y Espinosa–Victoria, 2010). Algunos de los géneros bacterianos más conocidos que producen ácidos orgánicos son *Pseudomonas* (Bacteria; Pseudomonadales), *Bacillus* (Bacteria; Bacillales), *Enterobacter* (Bacteria; Enterobacteriales), *Streptomyces* (Bacteria; Actinomycetales), *Burkholderia* (Bacteria; Burkholderiales), *Achromobacter* (Bacteria; Burkholderiales), *Agrobacterium* (Bacteria; Rhizobiales), *Aereobacter* (Bacteria; Enterobacteriales), *Flavobacterium* (Bacteria; Flavobacteriaceae),

CAPÍTULO I

Streptosporangium (Bacteria; Actinomycetales) y *Erwinia* (Bacteria; Enterobacteriales) (Rodríguez et al., 2004; Tao et al., 2008; Gamalero y Glick, 2011; Hungria et al., 2016).

III.3.2. Hongos

Las raíces de los vegetales, que pueden llegar a suponer un total de 5 a 6 Tm por hectárea en un campo cultivado, producen exudados radiculares que contienen, según las especies vegetales, entre el 10 y el 50 % de la energía fijada por la fotosíntesis. Los exudados radiculares son ricos en compuestos carbonatados que sirven de alimento a los microorganismos de la rizosfera, entre ellos los hongos, que a cambio, proporcionan los minerales que necesita la planta. Las raíces están colonizadas por un gran número de especies de hongos, tanto en superficie como en su interior. Hay más de 6.000 hongos diferentes que pueden establecer distintas relaciones con las raíces de las plantas (Owen et al., 2014).

III.3.2.1. Hongos asociados a las raíces

Al igual que las bacterias, los hongos asociados a las raíces pueden residir dentro de la rizosfera, en el rizoplano, y en muchos casos, colonizan la corteza de la raíz, donde se desarrolla un micelio externo que ayuda a la planta a adquirir nutrientes minerales y agua, a modo de sistema radicular complementario (Bowen y Rovira, 1991). Los hongos asociados a las raíces confieren efectos beneficiosos a las plantas a través de varios mecanismos, por ejemplo, mediante la inducción de resistencia a las enfermedades y la tolerancia a los estreses abióticos (Waller et al., 2005; Rawat y Tewari, 2011), como por ejemplo, *Trichoderma spp.* (Ascomycota; Hypocreales), que sintetiza auxinas que estimulan el desarrollo lateral de las raíces de las plantas (Benitez et al., 2004) o modifican la síntesis del óxido nítrico de la

CAPÍTULO I

planta hospedante en condiciones de ataque del patógeno (Gupta et al., 2000). Otras funciones han sido categorizadas como de biocontrol y bioremediación (Rodríguez et al., 2009).

Los hongos asociados a las raíces también son capaces tanto de solubilizar P inorgánico como de mineralizar P orgánico, por ejemplo los ascomicetos *Aspergillus* y *Penicillium spp.*, que habitan la rizosfera y pueden secretar ácidos orgánicos que movilizan P inorgánico a partir de fosfato de roca, así como enzimas fosfatasa, permitiendo la hidrólisis del P orgánico (Bolan, 1991), (Barrow y Osuna, 2002). *Piriformospora indica* Sav.Verma, Aj.Varma, Rexer, G.Kost y P.Franken (Basidiomycota; Sebaciales), *Cryptosporiopsis sp.* Gené y Guarro (Ascomycota; Helotiales) (Varma, et al., 2000), *Fusarium spp.* Link ex Grey (Ascomycota; Hypocreales) y *Cladorrhinum foecundissimum* Sacc. y Marchal (Ascomycota; Sordariales) (Gasoni y Stegman De Gurfinkel, 1997; Kuldau, 2000; Sieber, 2002) son colonizadores de raíz no micorrízicos que han demostrado mejorar el crecimiento de sus plantas hospedantes. En particular, *C. foecundissimum* puede incrementar la absorción de P, así como la de otros nutrientes como el Fe y N (O'Brien, 2008; de Santiago et al., 2009; Behie et al., 2012).

Existen varias investigaciones que apuntan a que los efectos de promoción del crecimiento asociados a varios hongos endófitos pueden estar asociados a la síntesis de hormonas de crecimiento de las plantas por éstos o a la puesta a disposición de la planta de nutrientes. Así, la colonización endofítica de las raíces de cebada *Hordeum vulgare L.* (Magnoliophyta; Poaceae) por *Chaetomium spp.* Kunze (Ascomycota; Sordariales) causó un aumento del peso fresco de la raíz (Vilich et al., 1998), la de *Vulpia ciliata* subsp. *ambigua* Dumort (Le Gall) Stacey Auquier

CAPÍTULO I

(Poaceae) por *Phoma fimeti* Brunaud (Ascomycota; Pleosporales) mejoró la biomasa de sus raíces y los brotes, la longitud de la raíz y el número de tallos (Newsham, 1994), y un sordariomiceto endófito no identificado de *Mentha piperita* L. (Magnoliophyta; Lamiaceae) promovió la expansión del sistema radicular de la planta y aumentó tanto la biomasa como la altura (Mucciarelli et al., 2002; 2003).

La colonización de las raíces vegetales por los endofitos puede tener otras ventajas para ambos organismos, los segundos mejoran sus fuentes nutritivas, los primeros no sólo su crecimiento, sino su respuesta a estreses bióticos y abióticos (Schoenbeck y Dehne, 1979; Bargmann y Schoenbeck, 1992; Hallmann y Sikora, 1994; Redman et al., 2001; Sieber, 2002). Así, se ha observado mejora de la nutrición férrica en plantas de trigo (*Triticum aestivum* L) (Magnoliophyta; Poaceae) cultivadas en medio calcáreo, tras su inoculación con *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckf. Nirenberg (Ascomycota; Hypocreales) (de Santiago et al., 2009; 2011), y el incremento de la tolerancia de *Dichanthelium lanuginosum* (Ell.) Gould (Poaceae) a temperaturas de hasta 65°C gracias al endófito *Curvularia* sp. Boedjin (Ascomycota; Pleosporales) (Redman et al., 2002).

III.3.2.2. Hongos formadores de micorrizas

Las micorrizas son asociaciones de un hongo con la raíz de una planta que resultan en una extensa red de hifas que actúan como una extensión de sus raíces (Malloch et al., 1980). La asociación simbiótica se establece entre las raíces de plantas y las hifas de los filos Glomeromycota, Basidiomycota y Ascomycota. Al inicio de la colonización el hongo forma un manto constituido por hifas que rodean el ápice de la raíz, posteriormente otras hifas penetran el espacio intercelular entre las células radiculares,

CAPÍTULO I

formando lo que se conoce como la red de Harting (Malloch et al., 1980), dónde se producirá el intercambio de nutrientes (sacarosa al hongo y N/P, minerales y agua a la planta). Las raíces sólo pueden formar micorrizas a partir del momento en que el vegetal es capaz de realizar la fotosíntesis, después del desarrollo y apertura de las primeras hojas.

Las micorrizas se clasifican en siete grupos principales según las hifas de los hongos permanezcan en el exterior de la raíz (ectomicorrizas) o penetren en el interior (endomicorrizas) (Smith y Read, 2008; Martínez y Pugnaire, 2009), pero los tipos más extendidos comercialmente y ecológicamente más importantes son los formadores de micorrizas arbusculares y las ectomicorrizas (Tabla 3).

Tabla 3. Funciones más importantes de las micorrizas arbusculares en los sistemas agrarios. Fuente: Gianinazzi et al., (2010).

Función de las micorrizas arbusculares	Servicio ecosistémico que realizan
Modificación de la morfología de las raíces y creación de una red de micelio en el suelo.	Aumenta la adherencia planta/suelo y la estabilidad del suelo (mejora de la estructura del suelo).
Aumento del agua y los minerales disponibles para la planta.	Incremento de la absorción de P que favorece el crecimiento de las plantas. Disminución del uso de fertilizantes.
Amortiguación del efecto del estrés abiótico.	Aumenta la resistencia de las plantas a la sequía, salinidad, contaminación por metales pesados y niveles bajos de nutrientes minerales.
Secreción de glomalina en el suelo.	Aumento de la estabilidad del suelo y la retención de agua.
Protección de las plantas contra patógenos de las raíces y a enfermedades producidas por hongos y microorganismos del suelo. Control de malas hierbas.	Aumenta la resistencia de las plantas al estrés biótico y reduce el uso de insecticidas.
Modificación del metabolismo y fisiología de las plantas.	Bioregulación del desarrollo de la planta. Aumento del contenido nutricional de las plantas y de la calidad de la planta para la salud humana.

CAPÍTULO I

El interés natural y económico de las micorrizas es enorme, algunas especies de plantas no pueden germinar o emitir nuevos brotes en ausencia de su hongo simbionte, el crecimiento está claramente estimulado y presentan mayor resistencia al parasitismo. El caso más remarcable es el de las orquídeas con tubérculos (*Orchis*, *Ophrys*), que son totalmente dependientes de la formación de la endomicorriza con el hongo *Rhizoctonia* para poder germinar (Ordoñez et al., 2016). En las comunidades vegetales naturales es común que los hongos conecten a nivel de sus raíces diferentes vegetales, de la misma o distinta especie, creando un puente para la transferencia de sustancias nutritivas de una planta a otra. Las micorrizas arbusculares tienen un papel clave en los sistemas agrarios garantizando la productividad y la calidad, así como una producción más sostenible. En el mercado es fácil encontrar biofertilizantes que aporten micorrizas al suelo, o semillas micorrizadas, por ejemplo hongos arbusculares pertenecientes al filo Glomeromycota, especialmente *Rhizophagus intraradices* (NC Schenck y GS Sm.) C. Walker y A. Schüßler (anteriormente *Glomus intraradices*) (Mucoromycota; Glomerales) y *Funneliformis mosseae* (TH Nicolson y Gerd.) C. Walker y A. Schüßler (Mucoromycota; Glomerales) (anteriormente *Glomus mosseae*) (Krüger et al., 2012), para los que se ha demostrado que aumentan la captación de P en diversas plantas de cultivo (Barea et al., 1983; Douds et al., 2007; Antunes et al., 2009; Cozzolino et al., 2013).

III.3.3. Los hongos entomopatógenos en la nutrición y crecimiento de las plantas

Al igual que las micorrizas, algunos AME endófitos establecen interacciones mutualistas que no sólo son beneficiosas para la planta, sino que

CAPÍTULO I

proporcionan suficientes nutrientes para que los endófitos colonicen extensamente las raíces y favorezcan su crecimiento en la rizosfera (Sieber, 2002; Schulz et al., 2002). La mejora del crecimiento de las plantas puede deberse a una mejor absorción de P, o en un sistema cerrado, a la mayor disponibilidad de carbohidratos y/o CO₂, ambos resultantes del metabolismo fúngico (Jumpponen, 1999).

En este sentido, los primeros trabajos realizados a este respecto indican que *B. bassiana* y *Metarhizium spp.* son capaces de transferir directamente a la planta el N obtenido de un insecto hospedante infectado, a cambio de este nitrógeno derivado del insecto, la planta proporcionaba carbono derivado de la fotosíntesis al hongo (Behie et al., 2012). Estos hallazgos evidencian una interacción tripartita y simbiótica entre el insecto–hongo–planta (Behie et al., 2017). **Más allá, trabajos pioneros realizados en el seno del Grupo de Investigación PAIDI AGR 163 “Entomología Agrícola” de la Universidad de Córdoba en colaboración con el Grupo AGR 165 “Unidad de Edafología” de la misma universidad, han aportado luz sobre el efecto de los hongos entomopatógenos endófitos sobre el crecimiento de la planta y sobre su nutrición férrica, lo que se ha demostrado en plantas de tomate y de trigo cuya semilla fue inoculada con *B. bassiana* antes de su cultivo en sustrato calcáreo deficitario en Fe, bajo ciertas circunstancias (Sánchez–Rodríguez et al., 2015), o en plantas de sorgo, trigo y girasol en suelos calcáreos inoculados con *M. brunneum* (Sánchez–Rodríguez et al., 2016). Esta mejora puede explicarse por la capacidad de los HE de producir sideróforos (transportadores de Fe) para acumular y transportar el Fe del medio ambiente a las células (Lavie y Stotzky, 1986), también pueden promover fenómenos de adsorción de hidróxidos de Fe (Cornejo et al., 2004), y**

CAPÍTULO I

producir ácidos orgánicos que incrementan la solubilidad de Fe (Joseph et al. 2012). Es importante destacar que la capacidad de varias especies de hongos entomopatógenos para promover el crecimiento de las plantas después de su colonización endofítica, con énfasis en *B. bassiana*, *B. brongniartii* y *M. brunneum*, depende del método usado para la inoculación de las plantas, de la dosis y del tiempo de duración de la inoculación (Jaber y Enkerli, 2016; 2017), ya que determinan el tipo de establecimiento de los mismos como endófitos.

Sin embargo, aún son numerosas las incógnitas sobre esta sorprendente nueva función de los hongos entomopatógenos en la promoción de la nutrición vegetal, más allá del control de plagas, y en la presente tesis doctoral se ha pretendido dar luz sobre algunas de ellas, con especial atención a la mejora de la nutrición férrica en suelos calcáreos.

IV. Objetivos de la presente Tesis Doctoral

Los objetivos de la presente Tesis Doctoral, que se enumeran a continuación, se dirigen a investigar el comportamiento endofítico de cepas de AME sobre distintas plantas cultivadas, su implicación en el control de plagas, y la posible existencia paralela de efectos sobre su crecimiento y nutrición férrica:

1. Evaluar el efecto de la colonización endofítica de plantas de trigo blando y trigo duro por la cepa EABb 04/01–Tip de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Ascomycota; Hypocreales) sobre el crecimiento, rendimiento, niveles de fitohormonas y absorción de nutrientes, así como paralelamente, su efecto sobre la mortalidad de larvas de *Spodoptera littoralis* Boisduval

CAPÍTULO I

(Lepidoptera; Noctuidae) alimentadas con hojas de trigo colonizadas endofíticamente.

2. Evaluar *in vitro* la capacidad de las cepas EABb 04/01–Tip de *B. bassiana*, EAMa 01/58–Su de *Metarhizium brunneum* Petch, y EAIf 10/01–Msp de *Isaria farinosa* (Holmsk.) Fr. (Ascomycota, Hypocreales), para incrementar la disponibilidad de Fe de distintos óxidos de Fe con diferentes propiedades (cristalinidad, superficie específica y tamaño de partícula), en condiciones ácidas, neutras y calcáreas.

3. Determinar la dosis mínima a la que la cepa EAMa 01/58–Su aplicada al suelo produce efectos sobre el crecimiento vegetal y la biodisponibilidad de Fe en plantas monocotiledóneas como el sorgo y dicotiledóneas como el girasol que crecen sobre suelos calcáreos y no calcáreos con el objetivo de optimizar la dosis.

4. Evaluar el efecto de diferentes métodos de inoculación (tratamiento de semilla (SE), aplicación al suelo (SU) y pulverización foliar (PU)) con las cepas EABb 04/01–Tip y EAMa 01/58–Su, seleccionadas por su potencial de crecimiento endofítico y su competencia en la rizosfera, sobre el crecimiento, nutrición y producción de plantas de sorgo cultivadas en sustrato calcáreo.

El capítulo II recoge los resultados relativos al primer objetivo, incluidos en el manuscrito “An endophytic *Beauveria bassiana* strain increases spike production in bread and durum wheat plants and effectively controls cotton leafworm (*Spodoptera littoralis*) larvae”, publicado en la revista Biological Control. (2017) pp: 1049–9644 doi:

CAPÍTULO I

10.1016/j.biocontrol.2017.01.012. [Factor de Impacto JCR: 2.3, Q1 (11/93) en “Entomology”].

El capítulo III recoge los resultados relativos a los objetivos segundo y tercero, que comprende el manuscrito “Redefining the dose of the entomopathogenic fungus *Metarhizium brunneum* (Ascomycota, Hypocreales) to increase Fe bioavailability and promote plant growth in calcareous and sandy soils”, publicado en la revista Plant and Soil. (2017) 418: 387–404. doi: 10.1007/s11104–017–3303–0. [Factor de Impacto JCR: 3.1, Q1 (11/83) en “Agronomy”].

El capítulo IV recoge los resultados relativos a los objetivos tercero y cuarto, incluidos en el manuscrito “Entomopathogenic fungi–based mechanisms to improve Fe nutrition of sorghum plants grown in calcareous substrates” publicado en la revista PLoS ONE. (2017) 12: (e0185903). doi: 10.1371/journal.pone.0185903. [Factor de Impacto JCR: 2.8, Q1 (15/64) en “Multidisciplinary sciences”].

V. Referencias

Adame–Álvarez R, Mendiola–Soto J, Heil M. 2014. Order of arrival shifts endophyte–pathogen interactions in bean from resistance induction to disease facilitation. FEMS Microbiology Letters 355: 100–107.

Aguado–Santacruz GA, 2012. Uso de microorganismos como biofertilizantes. En: Aguado–Santacruz GA (Eds.) Introducción al Uso y Manejo de los Biofertilizantes en la Agricultura. México: INIFAP/SAGARPA, pp: 35–78.

Ahmad F, Uddin S, Ahmad N, Islam, R. 2013. Phosphorus–microbes interaction on growth, yield and phosphorus–use efficiency of irrigated cotton. Archives of Agronomy and Soil Science 59: 341–351.

CAPÍTULO I

Akello J, Dubois T, Coyne D, Kyamanywa S. 2008. Effect of endophytic *Beauveria bassiana* on populations of the banana weevil, *Cosmopolites sordidus*, and their damage in tissue-cultured banana plants. *Entomologia experimentalis et applicata* 129: 157–165.

Akutse KS, Maniania NK, Fiaboe KKM, Van den Berg J, Ekesi S. 2013. Endophytic colonization of *Vicia faba* and *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae) by fungal pathogens and their effects on the life–history parameters of *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae). *Fungal Ecology* 6: 293–301.

Antunes P, Koch A, Dunfield K, Hart M, Downing A, Rillig M, Klironomos J. 2009. Influence of commercial inoculation with *Glomus intraradices* on the structure and functioning of an AM fungal community from an agricultural site. *Plant and Soil* 317: 257–266.

Arnold A, Lewis L. 2005. Ecology and evolution of fungal endophytes and their roles against insects. En: Vega F, Blackwell M (Eds.) *Insect–Fungal Associations: Ecology and Evolution*. New York: Oxford University Press, pp: 74–96.

Arnold A, Lutzoni F. 2007. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? *Ecology* 88: 541–549.

Askary H, Carrière Y, Bélanger RR, Brodeur, J. 1998. Pathogenicity of the fungus *Verticillium lecanii* to aphids and powdery mildew. *Biocontrol Science and Technology* 8: 23–32.

Backman P, Sikora R. 2008. Endophytes: An emerging tool for biological control. *Biological Control* 46: 1–3.

Bacon C, Hill N. 1996. Symptomless grass endophytes: products of coevolutionary symbioses and their role in the ecological adaptations of infected grasses. En: Redlin S, Carris L (Eds.) *Endophytic Fungi in Grasses and Woody Plants*. St Paul, MN: American Phytopathological Society Press, pp: 155–178.

Bacon C, White J. 2000. Physiological adaptations in the evolution of endophytism in the Clavicipitaceae. En: Bacon C, White (Eds.) *Microbial Endophytes*. New York: Marcel Dekker, pp: 237–261.

Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology* 57: 233–266.

Barea JM, Bonis AF, Olivares J. 1983. Interactions between *Azospirillum* and mycorrhiza and their effects on growth and nutrition of maize and ryegrass. *Soil Biology and Biochemistry* 15: 705–709.

Bargmann C, Schoenbeck F. 1992. *Acremonium kiliense* as inducer of resistance to wilt disease on tomatoes. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 99: 266–272. ISSN 0340–8159

Barlett BR. 1956. Natural predators. Can selective insecticides help to preserve biotic control?. *Agricultural Chemistry* 11: 42–44.

CAPÍTULO I

Barnett H. 1963. Nature of mycoparasitism by fungi. *Annual Review of Microbiology* 17: 1–44.

Barrow J, Osuna P. 2002. Phosphorus solubilization and uptake by dark septate fungi in fourwing saltbush, *Atriplex canescens* (Pursh) Nutt. *Journal of Arid Environments* 51: 449–459.

Beebee T, Rowe G. 2004. *An introduction to molecular ecology*. Oxford University Press, New York. ISBN: 0–19–924857–5

Behie S, Bidochka M. 2014. Ubiquity of insect–derived nitrogen transfer to plants by endophytic insect–pathogenic fungi: an additional branch of the soil nitrogen cycle. *Applied and Environmental Microbiology* 80: 1553–1560.

Behie SW, Moreira CC, Sementchoukova I, Barelli L, Zelisko PM, Bidochka MJ. 2017. Carbon translocation from a plant to an insect–pathogenic endophytic fungus. *Nature Communications* 8: 14245.

Behie S, Zelisko P, Bidochka M. 2012. Endophytic insect–parasitic fungi translocate nitrogen directly from insects to plants. *Science* 336: 1576–1577.

Benhamou N, Brodeur J. 2001. Pre–inoculation of Ri T–DNA transformed cucumber roots with the mycoparasite, *Verticillium lecanii*, induces host defense reactions against *Pythium ultimum* infection. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 58: 133–146.

Benitez T, Rincon A, Limon M, Codon A. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology* 7: 249–260.

Bischoff J, Rehner S, Humber R. 2009. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia* 101: 512–530.

Bolan N. 1991. A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. *Plant and Soil* 134: 189–207.

Bowen GD, Rovira AD. 1991. The Rhizosphere: The hidden half of the hidden half. En: Waesel Y, Eshal E and Kafkafi U (Eds.) *Plant Roots: The hidden half*. New York: Marcel Dekker, pp: 641–699.

Bultman T, Murphy J. 2000. Do fungal endophytes mediate wound–induced resistance? En: Bacon C, White J (Eds.) *Microbial Endophytes*. New York: Marcel Dekker, pp: 421–455.

Chandler D. 2017. Basic and applied research on entomopathogenic fungi. En: Lacey, L (Eds.), *Microbial control of insect and mite pests*. Yakima, WA, USA: Academic Press., pp: 69–89

Charnley AK, Collins SA. 2007. Entomopathogenic fungi and their role in pest control. En: Kubicek CP and Druzhinina IS (Eds.) *Environmental and microbial relationships*. Springer Berlin, pp: 159–187.

CAPÍTULO I

Clark MM, Gwinn KD, Ownley BH. 2006. Biological control of *Pythium myriotylum*. *Phytopathology* 96: S25.

Compant S, Clément C, Sessitsch A. 2010. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry* 42: 669–678.

Compant S, Clément C, Sessitsch A. 2008. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L: by *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN: from the rhizosphere to inflorescence tissues. *FEMS Microbiology Ecology* 63: 84–93.

Cornejo J, Celis R, Cox L, Hermosín M. 2004. Pesticide-clay interactions and formulations. En: Wypych F, Satyanarayana K (Eds.) *Clay Surfaces: Fundamentals and Applications*. Academic Press., pp: 247–266.

Cory, J, Ericsson, J. 2010. Fungal entomopathogens in a tritrophic context. *Biocontrol* 55: 75–88.

Cozzolino V, Di Meo V, Piccolo A. 2013. Impact of arbuscular mycorrhizal fungi applications on maize production and soil phosphorus availability. *Journal of Geochemical Exploration* 129: 40–44.

Culebro-Ricaldi JM, Ruiz-Valdiviezo VM, Rodríguez-Mendiola MA, Avila-Miranda ME, Gutierrez-Miceli FA, Cruz-Rodríguez RI, Dendooven L, Montes-Molina JA. 2017. Antifungal properties of *Beauveria bassiana* strains against *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* race 3 in tomato crop. *Journal of Environmental Biology* 38: 821–827.

Dara S. 2013. Entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* promotes strawberry plant growth and health. *UCCE eNewsletter Strawberries and Vegetables*.

Dara S. 2016. First report of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea*, and *Metarhizium brunneum* promoting the growth and health cabbage plants growing under water stress. *UCCE eNewsletter Strawberries and Vegetables*, pp: 1–5.

de Santiago A, Quintero J, Aviles M, Delgado A. 2009. Effect of *Trichoderma asperellum* strain T34 on iron nutrition in white lupin. *Soil Biology Biochemistry* 41:2453–2459.

de Santiago A, Quintero J, Avilés M, Delgado A. 2011. Effect of *Trichoderma asperellum* strain T34 on iron, copper, manganese, and zinc uptake by wheat grown on a calcareous medium. *Plant and Soil* 342: 97–104.

DeBach P. 1964. Biological control of insect pests and weeds. DeBach P (Eds.) Published by Chapman and Hall Ltd., London, pp: 844

Dobbelaere S, Croonenborghs A, Thys A, Broek AV, Vanderleyden J. 1999. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant and Soil* 212: 153–162.

CAPÍTULO I

Douds D, Nagahashi G, Reider C, Hepperly P. 2007. Inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi increases the yield of potatoes in a high P soil. *Biological Agriculture and Horticulture* 25: 67–78.

Dugassa G, Raps A, Vidal S. 1998. Influence of fungal endophytes on allelochemicals of their host plants and the behaviour of insects. *Mededelingen Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen Universiteit Gent* 63: 333–337.

Ehlers R. 2011. *Regulation of Biological Control Agents*. Ralf-Udo Ehlers (Eds.) Springer, Germany. ISBN 978–90–481–3663–6.

Eilenberg J. 2002. *Biology of fungi from the order Entomophthorales with emphasis on the genera Entomophthora, Strongwellsea and Eryniopsis: a contribution to insect pathology and biological control*. The Royal Veterinary and Agricultural University.

Ekesi S, Dimbi S, Maniania N. 2007. The role of entomopathogenic fungi in the integrated management of fruit flies (Diptera: Tephritidae) with emphasis on species occurring in Africa. En: Maniana K, Ekesi S (Eds.) *Use of entomopathogenic fungi in biological pest management*. India: Research SignPosts, Trivandrum, pp: 239–274.

Elliot SL, Sabelis MW, Janssen A, van der Geest LPS, Beerling EAM, Fransen J. 2000. Can plants use entomopathogens as bodyguards?. *Ecology Letter* 3: 228–235.

Enkerli J, Widmer F, Keller S. 2002. Microsatellite markers in *Beauveria brongniartii*: a sensitive and efficient method for strain characterisation and identification. *IOBC wprs Bulletin* 25:91–96.

Fisher J, Rehner S, Bruck D. 2011. Diversity of rhizosphere associated entomopathogenic fungi of perennial herbs, shrubs and coniferous trees. *Journal of Invertebrate Pathology* 106: 89–295.

Franco-Correa, M, Quintana A, Duque C, Suarez C, Rodríguez MX, Barea J. 2010. Evaluation of actinomycete strains for key traits related with plant growth promotion and mycorrhiza helping activities. *Applied Soil Ecology* 45: 209–217.

Freckleton R. 2000. Phylogenetic tests of ecological and evolutionary hypotheses: checking for phylogenetic independence. *Functional Ecology* 14: 129–134.

Frenche C, Lindström K, Elmerich C. 2009. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant and Soil* 321: 35–59.

Frossard E, Condon LM, Oberson A, Sinaj S, Fardeau JC. 2000. Processes governing phosphorus availability in temperate soils. *Journal Environmental Quality* 29: 15–23.

Gamalero E, Glick B. 2011. Mechanism used by plant growth-promoting bacteria. En: Maheshwari D (Eds.) *Bacteria in agrobiolgy: plant nutrient management*. Germany: Springer, pp: 17–46.

CAPÍTULO I

Gan HJ, Churchill ACL, Wickings K. 2017. Invisible but consequential: root endophytic fungi have variable effects on belowground plant–insect interactions. *Ecosphere* 8:(e01710).

García JE, Posadas JB, Perticari, A, Lecuona, RE. 2011. *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin promotes growth and has endophytic activity in tomato plants. *Advances in Biological Research* 5: 22–27.

Garrido–Jurado I, Fernandez–Bravo M, Campos, C, Quesada–Moraga E. 2015. Diversity of entomopathogenic Hypocreales in soil and phylloplanes of five Mediterranean cropping systems. *Journal of Invertebrate Pathology* 130: 97–106.

Garrido–Jurado I, Resquín–Romero G, Amarilla SP, Ríos–Moreno A, Carrasco L, Quesada–Moraga E. 2017. Transient endophytic colonization of melon plants by entomopathogenic fungi after foliar application for the control of *Bemisia tabaci* Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae). *Journal of Pest Science* 90: 319–330.

Garrido–Jurado I, Torrent J, Barron V, Corpas A, Quesada–Moraga E. 2011. Soil properties affect the availability, movement, and virulence of entomopathogenic fungi conidia against puparia of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Biological Control* 58: 277–285.

Gasoni L, Stegman De Gurfinkel B. 1997. The endophyte *Cladorrhinum foecundissimum* in cotton roots: phosphorus uptake and host growth. *Mycological Research* 101: 867–870.

Gianinazzi S, Gollotte A, Binet M, van Tuinen D, Redecker D, Wipf D. 2010. Agroecology: the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. *Mycorrhiza* 20: 519–530.

Gibson D, Donzelli B, Krasnoff S, Keyhani N. 2014. Discovering the secondary metabolite potential encoded within entomopathogenic fungi. *Natural Product Reports* 31: 1287–1305.

Goettel M, Eilenberg J, Glare T. 2005. Entomopathogenic fungi and their role in regulation of insect populations. En: Gilbert L, Latrou K (Eds.) *Comprehensive molecular insect science*. Pergamon, Oxford, UK: Elsevier Pergamon, pp: 361–406.

Goettel MS, Koike M, Kim JJ, Aiuchi D, Shinya R, Brodeur J. 2008. Potential of *Lecanicillium spp.* for management of insects, nematodes and plant diseases. *Journal of Invertebrate Pathology* 98: 256–261.

Gray E, Smith D. 2005. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. *Soil Biology Biochemistry* 37: 395–412.

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

Griffin MR. 2007. *Beauveria bassiana*, a Cotton Endophyte with Biocontrol Activity Against Seedling Disease. PhD Dissertation. University of Tennessee.

Griffin MR, Ownley BH, Klingeman WE, Pereira RM. 2006. Evidence of induced systemic resistance with *Beauveria bassiana* against *Xanthomonas* in cotton. *Phytopathology* 96: S42.

CAPÍTULO I

Groden E, Lockwood J. 1991. Effects of soil fungistasis on *Beauveria bassiana* and its relationship to disease incidence in the colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata*, in Michigan and Rhode–Island soils. *Journal of Invertebrate Pathology* 57: 7–16.

Gryganskyi AP, Humber RA, Smith ME, Hodge K, Huang B, Voigt K, Vilgalys R. 2013. Phylogenetic lineages in Entomophthoromycota. *Persoonia* 30: 94–105.

Gupta V, Satyanarayana T, Garg S. 2000. General aspects of mycorrhiza. En: Mukerji K, Singh, J y Chamola, B (Eds.) *Mycorrhizal Biology*. New York: KluwerAcademic/Plenum, pp: 27–44.

Gurulingappa P, Sword G, Murdoch G, Mcgee P. 2010. Colonization of crop plants by fungal entomopathogens and their effects on two insect pests when in planta. *Biological Control* 55: 34–41.

Hallmann J, Sikora R. 1994. Influence of *Fusarium oxysporum*, a mutualistic fungal endophyte on *Meloidogyne incognita* infection of tomato. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 101: 475–481.

Hampton T. 2014. Tweaking Proposed Food Safety Rules. *Jama–Journal of the American Medical Association* 312: 1625.

Han PF, Jin FL, Dong XL, Fan JQ, Qiu BL, Ren SX. 2013. Transcript and protein profiling analysis of the destruxin A–induced response in larvae of *Plutella xylostella*. *PlosOne* 8:(e60771).

Hartley SE, Eschen R, Horwood JM, Gange AC, Hill EM. 2015. Infection by a foliar endophyte elicits novel arabidopside–based plant defence reactions in its host, *Cirsium arvense*. *New Phytologist* 205: 816–827.

Herbst M, Razinger J, Ugrinovic K, Skof M, Schroers HJ, Hommes M, Poehling HM. 2017. Evaluation of low risk methods for managing *Delia radicum*, cabbage root fly, in broccoli production. *Crop Protection* 96: 273–280.

Herridge D, Bergersen F. 1988. Symbiotic nitrogen fixation. En: Wilson J (Eds.) *Advances in nitrogen cycling in agricultural systems* pp: 45–65.

Hibbett DS, Binder M, Bishoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, Huhndorf S, James T, Kirk PM, Lucking R, Lumbsch HT, Lutzoni F, Matheny, PB, McLaughlin, DJ, Powell, MJ, Redhead, S, Schoch CL, Spatafora JW, Stalpers JA, Vilgalys R, Aime MC, Aptroot A, Bauer R, Begerow D, Benny GL, Castlebury LA, Crous PW, Dai YC, Gams W, Geiser DM, Griffith GW, Gueidan C, Hawksworth DL, Hestmark G, Hosaka K, Humber RA, Hyde KD, Ironside JE, Koljalg U, Kurtzman CP, Larsson KH, Lichtwardt R, Longcore J, Miadlikowska J, Miller A, Moncalvo JM, Mozley–Standridge S, Oberwinkler F, Parmasto E, Reeb V, Rogers JD, Roux C, Ryvardeen L, Sampaio JP, Schussler A, Sugiyama J, Thorn RG, Tibell L, Untereiner WA, Walker C, Wang Z, Weir A, Weiss M White MM, Winka K, Yao YJ, Zhang N. 2007. Higher–level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research* 111: 509–547.

CAPÍTULO I

Hirano E, Koike M, Aiuchi D, Tani M. 2008. Pre-inoculation of cucumber roots with *Verticillium lecanii* (*Lecanicillium muscarium*) induces resistance to powdery mildew. Research Bulletin of Obihiro University 29: 82–94.

Holder D, Keyhani N. 2005. Adhesion of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Cordyceps) to substrate. Applied and Environmental Microbiology. Applied and Environmental Microbiology 71: 5260–5266.

Hu G, St. Leger R. 2002. Field studies using a recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. Applied and Environmental Microbiology 68: 6383–6387.

Humber R. 2012. Entomophthoromycota: a new phylum and reclassification for entomophthoroid fungi. Mycotaxon 120: 477–492.

Hungria M, Nogueira M, Araujo R. 2016. Inoculation of *Brachiaria spp.* with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*: An environment-friendly component in the reclamation of degraded pastures in the tropics. Agriculture, Ecosystems and Environment 221: 125–131.

Hyde K, Soyong K. 2008. The fungal endophyte dilemma. Fungal Divers 33: 163–173.

Inglis D, Ivie T, Duke G, Goettel M. 2000. Influence of rain and conidial formulation on persistence of *Beauveria bassiana* on potato leaves and Colorado potato beetle larvae. Biological Control 18: 55–64.

Inglis D, Johnson D, Goettel M. 1997. Effects of temperature and sunlight on mycosis (*Beauveria bassiana*) Hyphomycetes: Sympudolospora of grasshopper under field conditions. Environmental Entomology 26: 400–409.

Jaber L. 2015. Grapevine leaf tissue colonization by the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* and its effect against downy mildew. Biocontrol 60: 103–112.

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

Jaber L, Enkerli J. 2017. Fungal entomopathogens as endophytes: can they promote plant growth?. Biocontrol Science and Technology 27: 28–41.

Jaber L, Salem N. 2014. Endophytic colonisation of squash by the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) for managing Zucchini yellow mosaic virus in cucurbits. Biocontrol Science and Technology 24: 1096–1109.

Jaronski S. 2007. Soil ecology of the entomopathogenic ascomycetes: a critical examination of what we (think) we know. En: Maniana KES (Eds) Use of Entomopathogenic Fungi in Biological Pest Management. Trivandrum, India: Research SignPosts, pp: 91–144.

Jaronski S. 2010. Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens. Biocontrol 55: 159–185.

CAPÍTULO I

Jeffries P. 1995. Biology and ecology of mycoparasitism. *Canadian Journal of Botany* 73: 1284–1290.

Jefferies L, Xavier I, Matai R, Khachatourians G. 1999. Relationships between fungal spore morphologies and surface properties for entomopathogenic members of the genera *Beauveria*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Tolypocladium*, and *Verticillium*. *Canadian Journal of Microbiology* 45: 936–948.

Johansson J, Paul L, Finlay R. 2004. Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. *FEMS Microbiology Ecology* 48: 1–13.

Joseph E, Cario S, Simon A, Wörle M, Mazzeo R, Junier P, Job D. 2012. Protection of metal artifacts with the formation of metal–oxalates complexes by *Beauveria bassiana*. *Frontiers in Microbiology* 2: 270. doi: 10.3389/fmicb.2011.00270

Jumpponen A. 1999. Spatial distribution of discrete RAPD phenotypes of a root endophytic fungus, *Phialocephala fortinii*, at a primary successional site on a glacier forefront. *New Phytologist* 141: 333–344.

Kabaluk J, Ericsson J. 2007. *Metarhizium anisopliae* seed treatment increases yield of field corn when applied for wireworm control. *Agronomy Journal*. 99: 1377–1381.

Kabaluk J, Vernon R, Goettel M. 2007. Mortality and infection of wireworm, *Agriotes obscurus* Coleoptera: Elateridae, with inundative field applications of *Metarhizium anisopliae*. *Phytoprotection* 88: 51–56.

Keller S. 2007. Arthropod–pathogenic Entomophthorales from Switzerland. III. First additions. *Sydowia* 59: 75–113.

Keller S, Kessler P, Schweizer C. 2003. Distribution of insect pathogenic soil fungi in Switzerland with special reference to *Beauveria brongniartii* and *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol* 48: 307–319.

Keller SZG. 1989. Mycopathogens of soil insects. San Diego, Academic Press., pp: 240–265.

Keyser C, De Fine Licht H, Steinwender B, Meyling N. 2015. Diversity within the entomopathogenic fungal species *Metarhizium flavoviride* associated with agricultural crops in Denmark. *BMC Microbiology* 30: 15–249.

Khan AL, Hamayun M, Khan SA, Kang S, Shinwari ZK, Kamran M, Rehman S. 2012. Pure culture of *Metarhizium anisopliae* LHL07 reprograms soybean to higher growth and mitigates salt stress. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28: 1483–1494.

Khan M, Zaidi A, Wani P. 2007. Role of phosphate–solubilizing microorganisms in sustainable agriculture. *Agronomy Sustainable Development* 27: 29–43.

Krüger M, Krüger C, Walker C, Stockinger H, Schüßler A. 2012. Phylogenetic reference data for systematics and phylotaxonomy of arbuscular mycorrhizal fungi from phylum to species level. *New Phytologist* 193: 970–984.

CAPÍTULO I

Kuldau GYI. 2000. Evidence for *Fusarium* endophytes in cultivated and wild plants. En: Bacon C, White J (Eds.) *Microbial Endophytes*. New York and Basel: Marcel Dekker, pp: 85–120.

Lacey L. 2017. Entomopathogens used as microbial control agents. En: Lacey L (Eds.) *Microbial control of insect and mite pests*. Yakima, WA, USA: Academic Press., pp: 3–12.

Lacey L, Frutos R, Kaya H, Vail P. 2001. Insect pathogens as biological control agents: Do they have a future? *Biological Control* 21: 230–248.

Lacey LA, Grzywacz D, Shapiro–Ilan DI, Frutos R, Brownbridge M, Goettel MS. 2015. Insect pathogens as biological control agents: back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology* 132: 1–41.

Lampkin N. 1998. La nutrición de los cultivos. En: *Agricultura ecológica*. Mundi–Prensa, España, pp: 51–83.

Landa BB, López–Díaz C, Jiménez–Fernández D, Montes–Borrego M, Muñoz–Ledesma FJ, Ortiz–Urquiza A, Quesada–Moraga E. 2013. In–planta detection and monitorization of endophytic colonization by a *Beauveria bassiana* strain using a new–developed nested and quantitative PCR–based assay and confocal laser scanning microscopy. *Journal of Invertebrate Pathology* 114: 128–138.

Lavie S, Stotzky G. 1986. Interactions between clay–minerals and siderophores affect the respiration of *Histoplasma capsulatum*. *Applied and Environmental Microbiology* 51: 74–79.

Liao X, O'Brien T, Fang W, St Leger R. 2014. The plant beneficial effects of *Metarhizium* species correlate with their association with roots. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98: 7089–7096.

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

López–Lorca L, Olivares–Bernaéu C. 1997. Growth inhibition of nematophagous and entomopathogenic fungi by leaf litter and soil containing phenols. *Mycological Research* 106: 691–697.

Lozano–Tovar MD, Ortiz–Urquiza A, Garrido–Jurado I, Trapero–Casas A, Quesada–Moraga E. 2013. Assessment of entomopathogenic fungi and their extracts against a soil–dwelling pest and soil–borne pathogens of olive. *Biological Control* 67: 409–420.

Lozano–Tovar MD, Garrido–Jurado I, Quesada–Moraga E, Raya–Ortega MC, Trapero–Casas A. 2017. *Metarhizium brunneum* and *Beauveria bassiana* release secondary metabolites with antagonistic activity against *Verticillium dahliae* and *Phytophthora megasperma* olive pathogens. *Crop Protection* 100: 186–195.

CAPÍTULO I

Malloch D, Pirozynski, K, Haven P. 1980. Ecological and evolutionary significance of micorrhizal symbiosis in vascular plants (A review). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 77: 2113–2118.

Martínez L, Pugnaire F. 2009. Interacciones entre las comunidades de hongos formadores de micorrizas arbusculares y de plantas. Algunos ejemplos en los ecosistemas semiáridos. *Asociación Española de Ecología Terrestre* 18: 44–54.

Meyling N, Eilenberg J. 2006. Occurrence and distribution of soil borne entomopathogenic fungi within a single organic agroecosystem. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 113: 336–341.

Meyling N, Eilenberg J. 2007. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. *Biological Control* 43: 145–155.

Meyling NV, Lubeck M, Buckley EP, Eilenberg J, Rehner SA. 2009. Community composition, host range and genetic structure of the fungal entomo–pathogen *Beauveria* in adjoining agricultural and seminatural habitats. *Molecular Ecology* 18: 1282–1293.

Meyling N, Thorup–Kristensen K, Eilenberg J. 2011. Below– and aboveground abundance and distribution of fungal entomopathogens in experimental conventional and organic cropping. *Biological Control* 59: 180–186.

Mucciarelli M, Scannerini S, Berteà C, Maffei M. 2002. An ascomycetous endophyte isolated from *Mentha piperita* L.: biological features and molecular studies. *Mycologia* 94: 28–39.

Mucciarelli M, Scannerini S, Berteà C, Maffei M. 2003. *In vitro* and *in vivo* peppermint (*Mentha piperita*) growth promotion by nonmycorrhizal fungal colonization. *New Phytologist* 158: 579–591.

Mutune B, Ekesi S, Niassy S, Matiru V, Bii C, Maniania NK. 2016. Fungal endophytes as promising tools for the management of bean stem maggot *Ophiomyia phaseoli* on beans *Phaseolus vulgaris*. *Journal of Pest Science* 89: 993–1001.

Newsham K. 1994. First record of intracellular sporulation by a coelomycete fungus. *Mycological Research* 98: 1390–1392.

O'Brien T. 2008. *Metarhizium anisopliae*'s persistence as a saprophyte, genetic basis of adaptation and role as a plant symbiont. PhD thesis, University of Maryland.

Okon Y, Labandera–Gonzalez C. 1994. Agronomic applications of azospirillum: An evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biology and Biochemistry* 26: 1591–1601.

Olson S. 2015. The biopesticide market. An analysis of the biopesticide market now and where it is going. *Outlooks on Pest Management*, pp. 203–206.

CAPÍTULO I

Ordoñez S, Pillacela D, Salazar J, Peña D. 2016. Especificidad del hongo micorrizico (*Rhizoctonia sp.*) en *Phalaenopsis sp.*, *Cymbidium sp.*, *Trichoceros antenifer*, *Oncidium excavatum*, y *Cyrtochilum sp.* MASKANA 7: 83–87.

Ortiz–Urquiza A, Keyhani N. 2013. Action on the surface: entomopathogenic fungi versus the insect cuticle. *Insects* 4: 357–374.

Ortiz–Urquiza A, Keyhani NO. 2016. Molecular Genetics of *Beauveria bassiana* Infection of Insects. En: Lovett B, St. Leger R (Eds.) Genetics and molecular biology of entomopathogenic fungi. San Diego, USA: Academic Press., pp: 165–249.

Owen D, Williams A, Griffith G, Withers P. 2014. Use of commercial bio–inoculants to increase agricultural production through improved phosphorous acquisition. *Applied Soil Ecology* 86: 41–54.

Ownley BH, Griffin MR, Klingeman WE, Gwinn KD, Moulton JK, Pereira RM. 2008. *Beauveria bassiana*: endophytic colonization and plant disease control. *Journal of Invertebrate Pathology* 98: 267–270.

Ownley BH, Gwinn KD, Vega FE. 2010. Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. *Biocontrol* 55: 113–128.

Ownley BH, Pereira RM, Klingeman WE, Quigley NB, Leckie BM. 2004. *Beauveria bassiana*, a dual purpose biocontrol organism, with activity against insect pests and plant pathogens. En: Lartey R, Caesar A (Eds.) Emerging Concepts in Plant Health Management. Kerala: Research Signpost, pp: 256–269.

Pan J, Clay K. 2004. *Epichloë glyceriae* infection affects carbon translocation in the clonal grass *Glyceria striata*. *New Phytologist* 164: 467–475.

Paredes–Mendoza M, Espinosa–Victoria D. 2010. Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato: una revisión crítica. *Terra Latinoamericana* 28: 61–70.

Pava–Ripoll M, Angelini C, Fang W, Wang S, Posada FJ, St Leger R. 2011. The rhizosphere–competent entomopathogen *Metarhizium anisopliae* expresses a specific subset of genes in plant root exudate. *Microbiology* 157: 47–55.

Pell J, Hannam J, Steinkraus D. 2010. Conservation biological control using fungal entomopathogens. *Biocontrol* 55: 187–198.

Petrini O. 1991. Fungal endophytes of tree leaves. En: Andrews J, Hirano S (Eds) *Microbial Ecology of Leaves*. New York: Springer Verlag, pp: 179–197.

Pieterse CM, Zamioudis C, Berendsen RL, Weller DM, Van Wees SC, Bakker PA. 2014. Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology* 52: 347–375.

Posada F, Aime MC, Peterson SW, Rehner SA, Vega FE. 2007. Inoculation of coffee plants with the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota:Hypocreales). *Mycological Research* 111: 748–757.

CAPÍTULO I

Quesada–Moraga E. 2013. Tendencias en sanidad vegetal. Nuevas y sorprendentes aplicaciones de los hongos entomopatógenos en sanidad vegetal. *Phytoma*, España 250: 72–73.

Quesada–Moraga E, Herrero–Asensio N, Zabalgogea I. 2014a. Entomopathogenic and nematophagous fungal endophytes. En: Verma V, Gange A (Eds.). *Advances in Endophytic Research*. India: Springer, pp: 85–99.

Quesada–Moraga E, López–Díaz C, Landa B. 2014b. The Hidden Habit of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana*: First Demonstration of Vertical Plant Transmission. *PLoS One* 9:(e89278).

Quesada–Moraga E, Navas–Cortés JA, Maranhao EAA, Ortiz–Urquiza A, Santiago–Álvarez C. 2007. Factors affecting the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in natural and cultivated soils. *Mycological Research* 111: 947–966.

Quesada–Moraga E, Santiago–Álvarez C. 2008. Hongos Entomopatógenos. En: Urbaneja A, Jacas (Eds.) *Control biológico de plagas*. Navarra: Phytoma y Publicaciones de la Universidad Pública de Navarra, pp: 98–120.

Ramanujam B, Japur K, Poornesha B, Shylesha AN, Rangeshwaran R. 2017. Field evaluation of endophytic entomopathogenic fungus against maize stem borer (*Chilo partellus*) (Crambidae: Lepidoptera). *Indian Journal of Agricultural Sciences* 87:1099–1103.

Raps A, Vidal S. 1996. The influence of a root–colonizing endophyte on the development of root–knot nematodes on tomato. *Mitteilung der Biologischen Bundesanstalt für Land– und Forstwirtschaft* 321: 453.

Raps A, Vidal S. 1998. Indirect effects of an unspecialized endophytic fungus on specialized plant–herbivorous insect interactions. *Oecologia* 114: 541–547.

Rawat R, Tewari L. 2011. Effect of abiotic stress on phosphate solubilization by biocontrol fungus *Trichoderma spp.* *Current Microbiology* 62: 1521–1526.

Redman R, Dunigan D, Rodríguez R. 2001. Fungal symbiosis from mutualism to parasitism: who controls the outcome, host or invader?. *New Phytologist* 151: 705–716.

Redman RS, Sheehan KB, Stout RG, Rodríguez RJ, Henson JM. 2002. Thermotolerance Generated by Plant/Fungal Symbiosis. *Science* 298: 1581.

Registro de Productos Fitosanitarios. Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. <http://www.mapama.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/productos-fitosanitarios/registro/menu.asp>

Rehner SA, Minnis AM, Sung GH, Luangsa–ard JJ, Devotto L, Humber RA. 2011. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycologia* 103: 1055–1073.

CAPÍTULO I

- Rehner SA, Posada F, Buckley EP, Infante F, Castillo A, Vega FE. 2006. Phylogenetic origins of African and Neotropical *Beauveria bassiana* s.l. pathogens of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*. *Journal of Invertebrate Pathology* 93: 11–21.
- Resquín–Romero G, Garrido–Jurado I, Delso C, Ríos–Moreno A, Quesada–Moraga E. 2016. Transient endophytic colonizations of plants improve the outcome of foliar applications of mycoinsecticides against chewing insects. *Journal of Invertebrate Pathology* 136: 23–31.
- Resquín–Romero G. 2016. Combinación de diferentes estrategias de aplicación de hongos entomopatógenos para el control de *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) y *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). Tesis doctoral. Departamento de Ciencias y Recursos Agrícolas y Forestales. Universidad de Córdoba.
- Ríos–Moreno A, Garrido–Jurado I, Quesada–Moraga E. 2017. Treatments with *Metarhizium brunneum* BIPESCO5 and EAMa 01/58–Su strains (Ascomycota: Hypocreales) are low risk for the generalist predator *Chrysoperla carnea*. *Journal of Pest Science*.
- Ríos–Moreno A, Garrido–Jurado I, Resquín–Romero G, Arroyo–Manzanares, Arce L, Quesada–Moraga, E. 2016. Destruxin A production by *Metarhizium brunneum* strains during transient endophytic colonisation of *Solanum tuberosum*. *Biocontrol Science and Technology* 26: 1574–1585.
- Rodríguez H, Fraga R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances* 17: 319–339.
- Rodríguez H, González T, Goire I, Bashan Y. 2004. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth–promoting bacterium *Azospirillum* spp. *Naturwissenschaften* 91: 522–555.
- Rodríguez RJ, Jr White JF, Arnold AE, Redman RS. 2009. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist* 182: 314–330.
- Roesti D, Gaur R, Johri BN, Imfeld G, Sharma S, Kawaljeet K, Aragno M. 2006. Plant growth stage: fertiliser management and bio–inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth promoting rhizobacteria affect the rhizobacterial community structure in rain–fed wheat fields. *Soil Biology Biochemistry* 38: 1111–1120.
- Rohlf M, Churchill, ACL. 2011. Fungal secondary metabolites as modulators of interactions with insects. *Fungal Genetics and Biology* 48: 23–34.
- Rondot Y y Reineke A. 2017. Association of *Beauveria bassiana* with grapevine plants deters adult black vine weevils, *Otiorynchus sulcatus*. *Biocontrol Science and Technology* 27: 7.
- Roy H, Brodie E, Chandler D. 2010. Deep space and hidden depths: understanding the evolution and ecology of fungal entomopathogens. *BioControl* 55: 1–6.
- Roy HE, Steinkraus DC, Eilenberg J, Hajek AE, Pell JK. 2006. Bizarre interactions and endgames: Entomopathogenic fungi and their arthropod hosts. *Annual Review of Entomology* 51: 331–357.

CAPÍTULO I

Sahay N, Varma A. 1999. Piriformospora indica: a new biological hardening tool for micropropagated plants. FEMS Microbiology Letters 181: 297–302.

Salazar A, Gerding M, France A, Sandoval M. 2007. Displacement of conidia of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* in columns of three soil series. Agricultura Técnica 67: 236–243.

Sánchez-Rodríguez AR, Barrón V, del Campillo MC, Quesada-Moraga E. 2016. The entomopathogenic fungus *Metarhizium brunneum*: a tool for alleviating Fe chlorosis. Plant and Soil 406: 1–17.

Sánchez-Rodríguez AR, del Campillo, MC, Quesada-Moraga E. 2015. *Beauveria bassiana*: An entomopathogenic fungus alleviates Fe chlorosis symptoms in plants grown on calcareous substrates. Scientia Horticulturae 197: 193–202. doi: 10.1016/j.scienta.2015.09.029

Sasan R, Bidochka M. 2012. The insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* (Clavicipitaceae) is also an endophyte that stimulates plant root development. American Journal of Botany 99: 101–107.

Sasan R, Bidochka M. 2013. Antagonism of the endophytic insect pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* against the bean plant pathogen *Fusarium solani* F. sp. *phaseoli*. Canadian Journal of Plant Pathology 35: 288–293.

Scheepmaker J, Butt T. 2010. Natural and released inoculum levels of entomopathogenic fungal biocontrol agents in soil in relation to risk assessment and in accordance with EU regulations. Biocontrol Science and Technology 20: 503–552.

Schneider S, Rehner S, Widmer F, Enkerli J. 2011. PCR-based tool for cultivation-independent detection and quantification of *Metarhizium* clade 1. Journal of Invertebrate Pathology 108: 106–114.

Schoenbeck F, Dehne H. 1979. Untersuchungen zum Einfluß der endotrophen Mykorrhiza auf Pflanzenkrankheiten. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz 86: 103–112.

Schulz B, Boyle C. 2005. The endophytic continuum. Mycological Research 109: 661–686.

Schulz B, Boyle C, Draeger S, Römmert AK, Krohn K. 2002. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. Mycological Research 106: 996–1004.

Schulz B, Römmert AK, Dammann U, Peters S, Guske S, Strack D, Boyle C. 1999. Endophyte-host symbioses. Bielefelder Ökologischer Beiträge 14: 307–312.

Senthilraja G, Anand T, Durairaj C, Kennedy JS, Suresh S, Raguchander T, Samiyappan R. 2010. A new microbial consortia containing entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* and plant growth promoting rhizobacteria, *Pseudomonas fluorescens* for simultaneous management of leafminers and collar rot disease in groundnut. Biocontrol Science and Technology 20: 449–464.

CAPÍTULO I

- Shrivastava G, Ownley BH, Augé RM, Toler H, Dee M, Vu A, Köllner TG, Chen F. 2015. Colonization by arbuscular mycorrhizal and endophytic fungi enhanced terpene production in tomato plants and their defense against a herbivorous insect. *Symbiosis* 65: 65–74.
- Sieber T. 2002. Fungal root endophytes. En: Waisel Y, Eshel A, Kafkafi U (Eds.) *The Hidden Half*. New York: Marcel Dekker, pp. 887–917.
- Singh B, Kaur T, Kaur S, Manhas RK, Kaur A. 2016. Insecticidal potential of an endophytic *Cladosporium velox* against *Spodoptera litura* mediated through inhibition of alpha glycosidases. *Pesticide Biochemistry and physiology* 131:46–52.
- Smith R. 1978. History and complexity of integrated pest management. En: Smith E, Pimentel D (Eds.) *Pest control strategies*. New York: Academic Press, pp: 41–53.
- Smith R, Apple J, Bottrell D. 1976. The origins of integrated pest management concepts for agricultural crops. En: Apple J, Smith R (Eds.) *Integrated pest management*. New York: Plenum Press, pp: 1–17.
- Smith R, Reynolds, H. 1966. Principles, definitions and scope of integrated pest control. *Proc. FAO Symposium on Integrated Pest Control* 1:11–17.
- Smith S, Read, D. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*. Third Edition, London: Academic Press.
- Sree KS, Padmaja V. 2008. Destruxin from *Metarhizium anisopliae* induces oxidative stress effecting larval mortality of the polyphagous pest *Spodoptera litura*. *Journal of Applied Entomology* 132: 68–78.
- St. Leger R. 2008. Studies on adaptations of *Metarhizium anisopliae* to life in the soil. *Journal of Invertebrate Pathology* 98: 271–276.
- Stern V, Smith R, van den Bosch R, Hagen K. 1959. The integrated control concept. *Hilgardia* 29: 81–101.
- Stone J, Bacon C, White J. 2000. An overview of endophytic microbes: endophytism defined. En: Bacon C, White J (Eds.) *Microbial Endophytes*. New York: Marcel Dekker, pp:3–30.
- Sung GH, Hywel-Jones NL, Sung JM, Luangsa-Ard JJ, Shrestha B, Spatafora JW. 2007. Phylogenetic classification of Cordyceps and the clavicipitaceous fungi. *Studies in Mycology*, pp: 5–59.
- Sung G, Poinar G, Spatafora J. 2008. The oldest fossil evidence of animal parasitism by fungi supports a Cretaceous diversification of fungal–arthropod symbioses. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49: 495–502.
- Tan R, Zou W. 2001. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Product Reports* 18: 448–459.

CAPÍTULO I

Tao G, Tian S, Cay M, Xie G. 2008. Phosphate-solubilizing and mineralizing abilities of bacteria isolated from soils. *Pedosphere* 18: 515–523.

Tefera T, Vidal S. 2009. Effect of inoculation method and plant growth medium on endophytic colonization of sorghum by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *BioControl* 54: 663–669.

Tseng M, Chung C, Tzean S. 2014. Mechanisms relevant to the enhanced virulence of a dihydroxynaphthalene-melanin metabolically engineered entomopathogen. *PlosOne* 9: (e90473).

Tudzynski B, Sharon A. 2002. Biosynthesis, biological role and application of fungal phytohormones. En: Osie H (Eds.) *The Mycota. Industrial Applications*. Berlin: Springer Verlag 10: 183–212.

van Lenteren J. 1997a. From Homo economicus to Homo ecologicus: towards environmentally safe pest control. En: Rosen D, Tel-Or E, Hadar Y, Chen Y(Eds.) *Modern agriculture and the environment. Developments in Plant and Soil Sciences*, Springer, Dordrecht Vol. 71.

van Lenteren J. 1997b. Benefits and risk of introducing exotic macro-biological control agents into Europe. *EPPO Bulletin* 27: 15–27.

Varma A, Singh A, Sahay NS, Sharma J, Roy A, Kumari M, Raha D, Thakran S, Deha D, Bharti K, Hurek T, Bleichert O, Rexer KH, Kost G, Hahn A, Maier W, Walter M, Strack D, Kranner I. 2000. *Piriformospora indica*: an axenically culturable mycorrhiza-like endosymbiotic fungus. En: H. (Eds.) *The Mycota. Fungal Associations*. Berlin: Springer-Verlag 9: 125–150.

Vega FE, Posada F, Catherine A, Pava-Ripoll M, Infante F, Rehner SA. 2008. Entomopathogenic fungal endophytes. *Biological Control* 46: 72–82.

Vega, FE, Goettel MS, Blackwell M, Chandler D, Jackson MA, Keller S, Koike M. 2009. Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. *Fungal Ecology* 2: 149–159.

Vega FE, Meyling N, Luangsa-ard J, Blackwell M. 2012. Fungal entomopathogens. In: Vega FE y Kaya HE (Eds.) *Insect Pathology. Second Edition* ed. San Diego: Academic Press, pp: 171–220.

Vey A, Hoagland R, Butt T. 2001. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. En: Butt T, Jackson C, Magan N (Eds.) *Fungi as Biocontrol Agents Progress: Problems and Potential*. Wallingford, UK: CABI Publishing, pp: 311–346.

Vidal S, Jaber L. 2015. Entomopathogenic fungi as endophytes: plant-endophyte-herbivore interactions and prospects for use in biological control. *Current Science* 109: 46–54.

Vilich V, Dolfen M, Sikora R. 1998. *Chaetomium spp.* colonization of barley following seed treatment and its effect on plant growth and *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* disease severity. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 105: 130–139.

CAPÍTULO I

Volkoff AN, Rocher J, d'Alencon E, Bouton M, Landais I, Quesada–Moraga E, Vey A, Fournier P, Mita K, Devauchelle G. 2003. Characterization and transcriptional profiles of three *Spodoptera frugiperda* genes encoding cysteine–rich peptides. A new class of defensin–like genes from lepidopteran insects *Gene* 319: 43–53.

Waller F, Achatz B, Baltruschat H, Fodor J, Becker K, Fischer M, Heier T, Hückelhoven R, Neumann C, von Wettstein D, Franken P, Kogel KH. 2005. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt–stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 102: 13386–13391.

Wanchoo A, Lewis M, Keyhani N. 2009. Lectin mapping reveals stage– specific display of surface carbohydrates in *in vitro* and haemolymph–derived cells of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Microbiology–Sgm* 155: 3121–3133.

Wang C, Hu G, St. Leger R. 2005. Differential gene expression by *Metarhizium anisopliae* growing in root exudate and host (*Manduca sexta*) cuticle or hemolymph reveals mechanisms of physiological adaptation. *Fungal Genetics and Biology* 42: 704–718.

Wang C, St Leger R. 2007. The MAD1 adhesin of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enables attachment to plants. *Eukaryotic Cell* 6: 808–816.

Wang Q, Xu L. 2012. Beauvericin, a bioactive compound produced by fungi: a short review. *Molecules* 17: 2367–2377.

Wraight S, Inglis G, Goettel M. 2007. Fungi. En: Lacey L, Kaya H (Eds.) *Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*. Second ed. The Netherlands, Dordrecht: s.n., pp: 223–248.

Wyrebek M, Huber C, Sasan R, Bidochka, M. 2011. Three sympatrically occurring species of *Metarhizium* show plant rhizosphere specificity. *Mycrobiology Society* 157: 2904–2911.

Zalom FG, Fry WE. 1992. Biologically intensive IPM for vegetable crops. En: Zalom F, Fry W (Eds.), *Food, Crop Pests and the Environment; the need and potential for biologically intensive integrated oest management*. The American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota, pp: 107–165.

Zhou W, Wheeler TA, Starr JL, Valencia CU, Sword GA. 2016. A fungal endophyte defensive symbiosis affects plant–nematode interactions in cotton. *Plant and Soil* pp: 1–16.

CAPÍTULO II

Este capítulo es una versión adaptada del artículo:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.01.012>

ARTICLE IN PRESS

Biological Control xxx (2017) xxx–xxx

Contents lists available at ScienceDirect

 Biological Control 

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybcon

An endophytic *Beauveria bassiana* strain increases spike production in bread and durum wheat plants and effectively controls cotton leafworm (*Spodoptera littoralis*) larvae

Antonio R. Sánchez-Rodríguez^{a,*}, Silvia Raya-Díaz^a, Ángel María Zamarreño^b, José María García-Mina^b, María Carmen del Campillo^c, Enrique Quesada-Moraga^d

^a Departamento de Ciencias y Recursos Agrícolas y Forestales, Universidad de Córdoba, Edificio C4, Campus de Rabanales, 14071 Córdoba, Spain

^b CIPAV TimaAGRO International-Roullier Group, Polígono Arzuri-Orkoien, s/C no. 32, 31160 Orkoien, Navarra, Spain

^c Departamento de Agronomía, Universidad de Córdoba, Edificio C4, Campus de Rabanales, 14071 Córdoba, Spain

CAPÍTULO II

An endophytic *Beauveria bassiana* strain increases spike production in bread and durum wheat plants and effectively controls cotton leafworm (*Spodoptera littoralis*) larvae

Authors: Antonio R Sánchez–Rodríguez^{1,*}, Silvia Raya–Díaz¹, Ángel María Zamarreño², José María García–Mina², María Carmen del Campillo³, Enrique Quesada–Moraga¹

Address:

¹Departamento de Ciencias y Recursos Agrícolas y Forestales, Universidad de Córdoba, Edificio C4, Campus de Rabanales, 14071 Córdoba, Spain

²CIPAV TimacAGRO International–Roullier Group, Polígono Arazuri–Orkoien, c/C no. 32, 31160 Orkoien, Navarra, Spain

³Departamento de Agronomía, Universidad de Córdoba, Edificio C4, Campus de Rabanales, 14071 Córdoba, Spain

***Corresponding author E–mail address:** I02saroa@uco.es (Antonio R Sánchez–Rodríguez).

CAPÍTULO III

Este capítulo es una versión adaptada del artículo:


<https://doi.org/10.1007/s11104-017-3303-0>

Plant Soil
DOI 10.1007/s11104-017-3303-0



REGULAR ARTICLE

Redefining the dose of the entomopathogenic fungus *Metarhizium brunneum* (Ascomycota, Hypocreales) to increase Fe bioavailability and promote plant growth in calcareous and sandy soils

Silvia Raya-Díaz · Enrique Quesada-Moraga ·
Vidal Barrón · María Carmen del Campillo ·
Antonio Rafael Sánchez-Rodríguez 

Received: 8 December 2016 / Accepted: 26 May 2017
© Springer International Publishing Switzerland 2017

Redefining the dose of the entomopathogenic fungus *Metarhizium brunneum* (Ascomycota; Hypocreales) to increase Fe bioavailability and promote plant growth in calcareous and sandy soils

Authors: Silvia Raya–Díaz¹, Enrique Quesada–Moraga¹, Vidal Barrón², María Carmen del Campillo², Antonio R. Sánchez–Rodríguez^{3,*}

Address:

¹Departamento de Ciencias y Recursos Agrícolas y Forestales, Universidad de Córdoba, Edificio C4, Campus de Rabanales, Córdoba, España

²Departamento de Agronomía, Universidad de Córdoba, Edificio C4, Campus de Rabanales, Córdoba, España

³School of Environment, Natural Resources and Geography, Environment Centre Wales, Bangor, United Kingdom

***Corresponding author E-mail address:** l02saroa@uco.es (Antonio R Sánchez–Rodríguez).

CAPÍTULO IV

Este capítulo es una versión adaptada del artículo:

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185903>



RESEARCH ARTICLE

Entomopathogenic fungi-based mechanisms for improved Fe nutrition in sorghum plants grown on calcareous substrates

Silvia Raya-Díaz¹, Antonio Rafael Sánchez-Rodríguez^{2*}, José Manuel Segura-Fernández¹, María del Carmen del Campillo³, Enrique Quesada-Moraga¹

1 Departamento de Ciencias y Recursos Agrícolas y Forestales, Universidad de Córdoba, ETSIAM, Córdoba, Spain, 2 School of Environment, Natural Resources and Geography, Environment Centre Wales, Bangor, United Kingdom, 3 Departamento de Agronomía, Universidad de Córdoba, ETSIAM, Córdoba, Spain

* i02saroa@uco.es



Entomopathogenic fungi based mechanisms for improved Fe nutrition in sorghum plants grown on calcareous substrates

Authors: Silvia Raya–Díaz¹, Antonio R. Sánchez–Rodríguez^{2,*}, José Manuel Segura–Fernández¹, María Carmen del Campillo³, Enrique Quesada–Moraga¹

Address:

¹Departamento de Ciencias y Recursos Agrícolas y Forestales, Universidad de Córdoba, Edificio C4, Campus de Rabanales, Córdoba, España

²School of Environment, Natural Resources and Geography, Environment Centre Wales, Bangor, United Kingdom

³Departamento de Agronomía, Universidad de Córdoba, Edificio C4, Campus de Rabanales, Córdoba, España

***Corresponding author E-mail address:** I02saroa@uco.es (Antonio R Sánchez–Rodríguez).

Abstract

Although entomopathogenic fungi (EPF) are best known for their ability to protect crops against insect pests, they may have other beneficial effects on their host plants. These effects, which include promoting plant growth

CAPÍTULO IV

and conferring resistance against abiotic stresses, have been examined in recent years to acquire a better understanding of them. The primary purposes of the present study were (i) to ascertain *in vitro* whether three different strains of EPF (viz., *Metarhizium*, *Beauveria* and *Isaria*) would increase the Fe bioavailability in calcareous or non-calcareous media containing various Fe sources (ferrihydrite, hematite and goethite) and (ii) to assess the influence of the EPF inoculation method (seed dressing, soil treatment or leaf spraying) on the extent of the endophytic colonization of sorghum and the improvement in the Fe nutrition of pot-grown sorghum plants on an artificial calcareous substrate. All the EPFs studied were found to increase the Fe availability during the *in vitro* assay. The most efficient EPF was *M. brunneum* EAMa 01/58-Su, which lowered the pH of the calcareous medium, suggesting that it used a different strategy (organic acid release) than the other two fungi that raised the pH of the non-calcareous medium. The three methods used to inoculate sorghum plants with *B. bassiana* and *M. brunneum* in the pot experiment led to differences in re-isolation from plant tissues and in the plant height. These three inoculation methods increased the leaf chlorophyll content of young leaves when the Fe deficiency symptoms were most apparent in the control plants (without fungal inoculation) as well as the Fe content of the above-ground biomass in the plants at the end of the experiment. The total root lengths and fine roots were also increased in response to fungal applications with the three inoculation methods. However, the soil treatment was the most efficient method; thus, its effect on the leaf chlorophyll content was the most persistent, and the effects on the total root length and fine roots were the most apparent. In conclusion, EPF

CAPÍTULO IV

improved the Fe nutrition of the sorghum plants, but their effects depended on the inoculation method.

1. Introduction

Entomopathogenic fungi (EPF) such as *Beauveria*, *Metarhizium* and *Isaria* (Ascomycota; Hypocreales) are commonly found in both agricultural and non-agricultural soils (Quesada–Moraga et al., 2007). These fungi are an essential element of most agroecosystems because of their usefulness for agricultural production and pest control in temperate regions (Vega et al., 2012). Using EPF for pest control minimizes environmental damage and complies with the stringent laws enacted in recent years (e.g., Regulation (EU) 1107/2009) concerning the placement of plant protection products on the market, in addition, it provides a natural, efficient pest management strategy that is consistent with the concept of sustainable agriculture and the principles of the European Union’s Common Agricultural Policy (CAP).

Entomopathogenic fungi are best known for their microbial control potential; however, they have recently been assigned new roles, especially in relation to their ability to establish themselves as endophytes in the different parts of plants, and to compete with the rest of the rhizosphere microorganisms for root exudates as well as for physical locations near the radicular system (Vega et al., 2009; Sasan and Bidochka, 2012; Quesada–Moraga et al., 2014). In addition, EPFs induce systemic resistance in plants against other biotic stresses such as pathogens and phytoparasitic nematodes (Bayat et al., 2009), promote plant growth (Kabaluk and Ericsson, 2007), increase yields (Sánchez–Rodríguez et al., 2017), improve

CAPÍTULO IV

plant nutrition (Behie et al., 2012; Behie and Bidochka, 2014), boost root development (Sasan and Bidochka, 2012; Wyrebek et al., 2011; Liao et al., 2014) and alleviate abiotic stresses such as salinity (Waller et al., 2005) or iron (Fe) chlorosis (Sánchez-Rodríguez et al., 2015, 2016). These new ecological functions provide potential additional benefits to plant health while reducing the need for conventional fertilizers, uncovering new horizons (Sánchez-Rodríguez et al., 2016).

One of these abiotic stresses is Fe chlorosis or Fe deficiency, a nutritional disorder that affects sensitive plants (fruit trees, olive trees, citrus, cereals and berries) grown in calcareous soils (del Campillo y Torrent, 1992). Iron is an essential microelement for plants; thus, it is a component of many enzymatic systems and participates in major processes such as photosynthesis (by catalyzing chlorophyll synthesis) and respiration. The primary symptom of Fe chlorosis is the interveinal yellowing of young leaves due to the inhibition of chlorophyll synthesis and the limited ability by the plants to redistribute Fe in their phloem (Korkak, 1987), which may ultimately reduce plant growth and yield (Gruber and Kosegarten, 2002; Rombolà and Tagliavini, 2006). Iron is poorly soluble at neutral and alkaline pH values, and it is present as crystalline and amorphous oxides in soil (Chen and Barak, 1982). Crystalline Fe oxides such as goethite and hematite, which prevail in calcareous soils, are less soluble than the more amorphous Fe oxides such as ferrihydrite (Torrent and Barrón, 2003). As a result, Fe availability in calcareous soils, the pH of which typically ranges from 7.5 to 8.5, is rather low and causes Fe chlorosis in especially sensitive plants (del Campillo and Torrent, 1992). This is a widespread nutritional disorder because calcareous soils account for

CAPÍTULO IV

almost 30% of the world's arable land area (Marschner, 1995; Imsande, 1998).

In response to low Fe availability, most fungi develop specific mechanisms to obtain Fe for their own survival (Behie and Bidochka, 2014). In addition, fungi possess highly efficient Fe acquisition systems such as siderophores. Siderophores are biomolecules with low molecular weights (0.5 to 1.5 kDa) with a high affinity for the Fe^{3+} ion (Lesuisse et al., 2001; Stenico et al., 2005; Philpott and Protchenko, 2008; Kaplan and Kaplan, 2009; Sanvisens and Puig, 2011) that mediates Fe uptake; additionally, they possess Fe reduction mechanisms (ferroxidation and permeation) for the extracellular reduction, and hence the solubilization, of inorganic Fe^{3+} to Fe^{2+} by cell surface metalloreductases (Sanvisens and Puig, 2011; Georgatsou and Alexandraki, 1994; Grusak et al., 1999; Felice et al., 2005). Some fungal siderophores act as virulence factors and provide resistance to oxidative stress, thereby facilitating sexual or asexual development, Fe storage and protection from Fe-induced toxicity (Sanvisens and Puig, 2011).

Previous studies have revealed that EPF increases the bioavailability of certain nutrients such as Cd, Cu, Pb and Zn (Maniania et al., 2003; Fomina et al., 2005; Behl et al., 2007). Thus, applying *Beauveria bassiana* strain EA04/01–Tip to tomato seeds and wheat grown on artificial calcareous substrates was found to improve Fe nutrition under certain conditions (Sánchez–Rodríguez et al., 2015), and applying *Metarhizium brunneum* strain EAMa 01/58–Su to the calcareous soils used to pot-grow sorghum, wheat and sunflower improved the Fe bioavailability and/or plant growth (Sánchez–Rodríguez et al., 2016). In addition, the inoculation

CAPÍTULO IV

method was found to influence plant growth decisively in bread and durum wheats that were inoculated with *B. bassiana* EABb 04/01–Tip when they were grown on a sandy soil (Sánchez–Rodríguez et al., 2017). The degree of endophytic establishment and the rhizosphere competence of the EPF have been shown to depend on the particular inoculation method in use (e.g., leaf spraying, seed dressing, and soil treatment) (Liao et al., 2014; Bing and Lewis, 1991; Wraight et al., 2001; Posada and Vega, 2005; Tefera and Vidal, 2009; Akutse et al., 2013; Parsa et al., 2013); however, there is still a question as to which is the best plant inoculation method for exploiting EPF's potential to increase the Fe bioavailability. The primary purposes of this study were: (1) to ascertain whether applying endophytic strains of *Metarhizium*, *Beauveria* and *Isaria* would modify Fe bioavailability in calcareous and non–calcareous media in an *in vitro* assay with three Fe oxides that differed in their composition, particle size and crystallinity (viz., ferrihydrite, hematite and goethite) and (2) to assess persistence and endophytic colonization by *B. bassiana* and *M. brunneum*, as previously examined in the *in vitro* assay, and their effects on the growth and Fe nutrition in a sensitive plant such as sorghum grown on an artificial calcareous substrate (a sand mixture) after inoculation with three different methods (seed dressing, soil treatment or leaf spraying).

2. Materials and methods

2.1. *In vitro* assay

2.1.1. Synthetic iron oxides

Ferrihydrite, hematite and goethite were prepared according to Schwertmann and Cornell, (2000), Colombo et al. (1994) and Torrent et al. (1990), respectively, and purified by vigorous stirring, then centrifuged, washed with de-ionized water and dialyzed to a conductivity below $10 \mu\text{S cm}^{-1}$ to remove the salts. Their specific surface area was determined by using the BET method (Brunauer et al., 1938), which is based on N_2 adsorption measurements and found to be $350 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ for ferrihydrite, $119 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ for hematite and $115 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ for goethite.

A sample of each Fe oxide was lyophilized and ground in a mortar for analysis on a Siemens D5000 X-ray diffractometer using $\text{Co K}\alpha$ radiation and a JEOL JEM 2010 transmission electron microscope. Fig. 1 shows selected electron micrographs of the oxides including their average particle size as well as the characteristic peaks for each oxide in the XRD patterns. The particle size of the oxides was inversely related to their surface area ($< 4 \text{ nm}$ for ferrihydrite, $100\text{--}400 \text{ nm}$ for hematite and $100\text{--}500 \text{ nm}$ for goethite).

CAPÍTULO IV

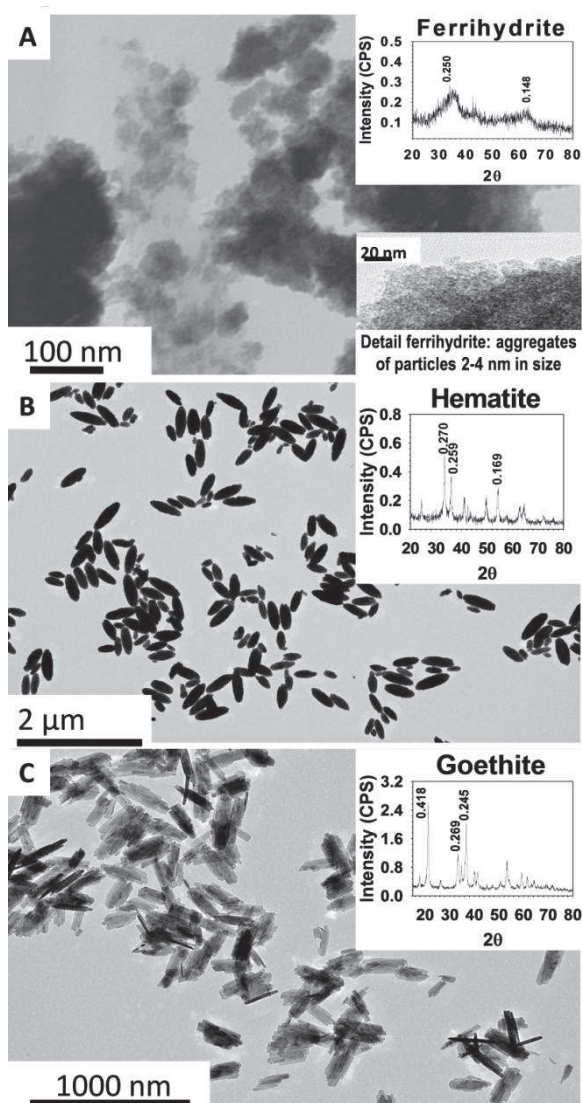


Fig. 1. Electron micrographs. Micrographs and characteristic XRD peaks for the Fe oxides. The average particle size of each oxide is shown.

CAPÍTULO IV

2.1.2. Fungal strains, experimental design, FeDTPA and pH analyses

Three different EPF strains that were deposited in the Entomopathogenic Fungi Collection (CRAF) at the University of Córdoba, Spain were used as follows:

- (1) *Beauveria bassiana* EABb 04/01–Tip isolated from an *Iraella luteipes* larva collected from a field in the town of Carmona (Sevilla, Spain). This strain had previously been found to exhibit endophytic behavior on opium–inoculated plants (Quesada–Moraga, et al., 2006) and it is deposited with accession No. CECT 20744 in the Spanish Collection of Culture Types (CECT) at the University of Valencia (Spain).
- (2) *Metarhizium brunneum* EAMa 01/58–Su isolated from soil from the town of Hinojosa del Duque (Córdoba, Spain). The specimens were deposited under accession No. CECT 20764 in the Spanish Collection of Culture Types (CECT) at the University of Valencia (Spain).
- (3) *Isaria farinosa* EAIf 10/01–Msp was isolated from a *Monochamus* (Coleoptera: Cerambycidae) specimen of an unknown species.

The three strains were grown in Petri dishes containing Sabouraud Dextrose Agar (SDA; Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) at 25 °C in the dark for 15 days, which facilitated optimal growth for fungal sporulation. The mycelia were then carefully removed by scraping the surface of the dishes and placed in sterile beakers containing 50 ml of sterile de–ionized water with

CAPÍTULO IV

Tween 80 (0.1% v/v). The three suspensions (one per fungal strain) were stirred, sonicated for 2 min, filtered to remove the mycelia and adjusted to a concentration of 5×10^8 conidia ml^{-1} by using a hemocytometer (a Malassez chamber). The conidial viability was checked before preparing the suspensions, using germination tests in liquid Czapek–Dox broth containing 1% (w/v) yeast extract. The germination rates exceeded 90% in all the tests.

Then, 0.1 ml aliquots of each fungal suspension were homogeneously distributed over the surface of Petri dishes containing 20 ml of Czapek–Dox solid medium (3 g NaNO_3 , 1 g KH_2PO_4 , 0.5 g KCl, 0.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 30 g glucose and 15 g of agar per liter) supplemented with three different Fe oxides (250 mg Fe L^{-1} plus a control containing 0 mg Fe L^{-1}) and calcium carbonate (0 or 300 mg $\text{CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$). The control medium was prepared similarly, using 0.1 ml of a fungus-free solution of Tween 80 (0.1% v/v) per Petri dish. A 20 ml volume of Czapek–Dox medium ensured optimal fungal growth and nutrient use during the cultivation period.

After 35 days of cultivation, the fungal mycelium was carefully removed by surface scraping, and fungus-free medium was cut into small pieces (1–2 mm) with sterilized scissors. The pH was measured in a 1 M KCl solution (1:2.5 w/v) and the Fe content was determined on an AAnalyst 200 atomic absorption spectrophotometer from Perkin Elmer (Perkin Elmer AAS) after extraction with 0.005 M diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA, 1:2 w/v), with stirring at 120 rpm for 2 h and centrifugation at 4053 g. The Fe_{DTPA} was used as a measure of the labile Fe (Lindsay and Norvell, 1978).

CAPÍTULO IV

In summary, four fungal treatments (with *M. brunneum*, *B. bassiana*, *I. farinosa* and a control without fungus), three different Fe oxides (250 mg of Fe L⁻¹ ferrihydrite, hematite, or goethite, and 0 mg of Fe L⁻¹ as a control), and the presence or absence of CaCO₃ (0 or 300 mg CaCO₃ L⁻¹) were used to develop a completely randomized design with four replicates per combination of the three factors (i.e., 32 treatment combinations, with one Petri dish as the experimental unit and 128 Petri dishes in total).

2.2. Pot experiment

2.2.1. Artificial substrate

A mixture containing 71% silica sand as inert medium, 4% silica sand coated with ferrihydrite (Fe oxide-coated sand, FOCS) and 25% calcareous sand to mimic calcareous conditions was used as the substrate. The silica sand was sieved (0.2–0.5 mm), washed several times with Na₂CO₃-enriched water (pH 9.5) to disperse clay and impurities, repeatedly washed with de-ionized water and finally dried in an oven with forced aeration at 40 °C. The specific surface area of the sand as measured by N₂ adsorption (BET method) was 0.14 m² g⁻¹; its content of citrate/bicarbonate/dithionite-extractable Fe (Fe_d), which is a measure of total Fe oxides (Mehra and Jackson, 1958), was 40 mg kg⁻¹; and its content of available phosphorus as determined by Olsen method (Olsen et al., 1954) was 0.3 mg kg⁻¹. Part of the silica sand was coated with ferrihydrite according to Rahmatullah and Torrent (Rahmatullah and Torrent, 2000). For the FOCS, the Fe_d was 380 mg kg⁻¹, citrate/ascorbate-extractable Fe (Fe_{ca}) (Reyes and Torrent, 1996) at 250 mg kg⁻¹ and oxalate-extractable Fe (Fe_{ox}) (Schwertmann, 1964) at 210 mg kg⁻¹. The Fe_{ca} and Fe_{ox} are acceptably

CAPÍTULO IV

accurate proxies for poorly crystalline Fe oxides, which act as sources of readily available Fe for plants.

The calcareous sand was sieved (0.2–0.5 mm), washed six times with water and once with de-ionized water to remove impurities, and dried at 40 °C. It had a surface area of $0.27 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, $\text{Fe}_d = 120 \text{ mg kg}^{-1}$, $\text{Fe}_{ca} = 105 \text{ mg kg}^{-1}$ and Olsen P = 1.0 mg kg^{-1} .

2.2.2. Plants and culture

Cylindrical PVC pots that were 12 cm high and 5 cm in diameter were covered with aluminum foil, and the drainage holes at the bottom were filled with 250 g of the above-described mixture of sands after autoclaving them at 121 °C for 20 min twice. Seeds of uniform size from *Sorghum bicolor* L. cv 03CS780/779 were disinfected with 5% sodium hypochlorite for 2 min and then washed several times with sterile de-ionized water. After that, 10 seeds were placed on Petri dishes containing Malt Agar from Biolife Italiana (Milan, Italy) to check the efficacy of the disinfection method. As expected, no fungi or bacteria were re-isolated from the disinfected seeds. Four seeds per pot were then sown before (leaf spraying) or after the fungal applications (seed dressing and soil treatment). All the plants except one in each pot were harvested and removed 20 days after sowing (DAS).

The sorghum crop was held in a growth chamber under photosynthetically active radiation at $350 \mu\text{mol m}^2 \text{ s}^{-1}$, with a photoperiod of 16 h day/8 h night, a day/night temperature of 24/20 °C and a relative humidity of 75% for 93 days. The plants were irrigated with 10 ml of modified Hoagland solution per pot on a weekly basis. The solution contained 5 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1 mM KH_2PO_4 , 5 mM KNO_3 , 2 mM MgSO_4 ,

CAPÍTULO IV

0.05 μM KCl, 25 μM H_3BO_3 , 2 μM $\text{MnSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$, 2 μM $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 μM $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ and 3 μM $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$. The KH_2PO_4 concentration was increased to 10 mM after 2 weeks because some plants exhibited signs of P deficiency, with purple spots on some leaves. The plants were weighed and irrigated to 85% field capacity with de-ionized water on a daily basis, and with nutrient solution once a week.

2.2.3. Inoculation methods (treatments) and experimental design

Suspensions containing 5×10^8 conidia ml^{-1} of either *B. bassiana* or *M. brunneum* were prepared by following the above-described procedure, and they were used separately with the different inoculation methods. These fungal strains were selected in response to the results of the initial assay. The treatments involved applying the fungal solutions in three different ways, and a control treatment without fungus was also used, as follows:

- (1) *Seed dressing.* This method was used before the seeds were transferred to the pots. A total of 40 seeds were immersed in an aseptic vessel containing 40 ml of fungal suspension, stirred at 120 rpm for 4 h and dried for less than 15 min in a flow chamber before sowing. The seeds used in the other treatments were stirred for 4 h in aseptic vessels containing 40 ml of sterile de-ionized water with Tween 80 (0.1% v/v, no fungus).
- (2) *Soil treatment.* A 5 ml volume of fungal solution was applied to the top of the artificial substrate in each pot after sowing. All the other pots were supplied with 5 ml of de-ionized water containing Tween 80 (0.1% v/v, no fungus).

CAPÍTULO IV

- (3) *Leaf spraying*. This treatment involved spraying 1 ml of fungal suspension onto the first two leaves by using a manual hand sprayer A model 27085 piston compressor from Artesania Latina, (Cantabria, Spain) (23 L min^{-1} , 103–345 kPa, 0.3 mm nozzle diameter) was used 26 days after sowing (DAS) and prior to spraying, and the surface of the pots was covered with aluminum foil to prevent the conidia from reaching the substrate. Immediately after the application, the plants were covered with a transparent plastic bag for 24 h to facilitate moisture retention and leaf penetration by the desired fungi. All the other plants were sprayed with 1 ml of de-ionized water containing Tween 80 (0.1% v/v, no fungus) and covered individually with plastic bags for 24 h.
- (4) *Control method*. In this method, the seeds, substrate and first two leaves were handled similarly to the previous one except that they received a fungus-free solution (Tween 80, 0.1% v/v).

A total of 70 pots were used [(10 pots per combination of inoculation method (soil treatment, seed dressing or leaf spraying) \times 2 fungi (*B. bassiana* or *M. brunneum*), and 10 pots for the control treatment without fungus]. A completely randomized design with four factors (three inoculation methods and a control method) and 10 replicates (pots) per factor was developed for each fungus. The experimental unit was a pot bearing a plant.

2.2.4. Substrate analyses: Colony-forming units (CFU) and FeDTPA

A 1 g quantity of substrate was collected from the top 0–2 cm of soil from three randomly selected pots per sampling and inoculation method at 7,

CAPÍTULO IV

30, 68 and 93 DAS, and also from the control pots. Then, 10 ml of sterile de-ionized water was added to the soil samples and the mixtures were shaken on a Model 3000445 Orbit rotator stirrer from J.P. Selecta (Barcelona, Spain) at 12 rpm for 90 min. Aliquots (0.1 ml) of four different dilutions (1:10, 1:100, 1:1000 and 1:10000) were placed on four Petri dishes containing SDAC (Biolife, Italy). The plates were placed in a culture oven at 25 °C for 3–4 days and their numbers of colony-forming units (CFU) were determined by counting.

The fungal growth was visually identified; *B. bassiana* colonies exhibited dense white mycelia, whereas *M. brunneum* colonies exhibited circular growth, were largely white and contained varying shades of green in the central mycelia (Humber, 1997). In the event of contamination or potential confusion with other fungal taxa, the mycelia and conidia were removed with a sterile needle and mounted in a drop of fuchsin on a microscope slide. The mounted slide was examined under a Motic BA400 light microscope for typical features of *B. bassiana* (viz., globose conidia and zig-zag-shaped conidiophores) and *M. brunneum* (conidiophores heavily branched in a candelabrum-like manner but very densely intertwined and forming nearly wax-like fertile areas; short, blocky conidiogenous cells lacking apical necks; and long conidial chains usually laterally adherent in prismatic columns or continuous plates) (Humber, 1997).

Finally, substrate from four pots per inoculation method and fungus was used to determine the Fe_{DTPA} at the end of the experiment. For this purpose, 10 g of soil per pot was shaken with 20 ml of 0.005 M diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA, 1:2 w/v) at 120 rpm for 2 h

CAPÍTULO IV

before centrifugation at 4053 g. The Fe_{DTPA} was determined on the Perkin Elmer AAS as described in the *in vitro* assay section.

2.2.5. Fungal re-isolation from plant tissues

The endophytic colonization by *B. bassiana* and *M. brunneum* was assessed in four determinations at 20, 28, 70, and 93 DAS. Three plants per inoculation method (plus one from the control method) and sampling time were randomly selected and harvested. During the first sampling (20 DAS), the plants were randomly selected from those that were sown at the beginning of the experiment and harvested to leave a single plant per pot (experimental unit). For the second and third samplings (at 28 and 70 DAS, respectively), the total number of pots per treatment and fungal strain was reduced to 7 and 4, respectively. In the last sampling (93 DAS), three of the last four plants per treatment and fungal strain were used to re-isolate the endophytes and all four were used for additional analyses (see next section).

For each sampling, the plants were harvested, and their leaves, stems and roots were separated. A sample of the different plant parts was disinfected in 2% NaClO (5% for roots) for 2 min before washing with sterile de-ionized water twice for 2 min. The effectiveness of the surface sterilization method was tested by plating 100 μL aliquots of 10^{-1} to 10^{-3} dilutions from the water used to wash the plant material in Malt Agar from Biolife Italiana (Milan, Italy) and incubated at 25 °C for 2 weeks to determine the CFU. As expected, no fungi or bacteria were re-isolated from the water that was used to wash the plant material. The surface of the plant material was properly sterilized since no fungi or bacteria were re-isolated from the water that was used to wash the plant material.

CAPÍTULO IV

The two youngest leaves in each sampling were split into 6 fragments of 1 cm² each, and the stems and roots were split into 6 fragments that were 0.5 cm long. The resulting fragments were separately placed on Petri dishes (one dish per plant for leaves, another for stems and a third for roots) containing selective medium for *B. bassiana* and *M. brunneum*. The *B. bassiana* selective medium consisted of 500 ml of de-ionized water containing 10 g of oatmeal infusion, 10 g of agar, 225 mg of dodine (*N*-dodecylguanidine monoacetate), 2.5 mg of chlortetracycline as an antibacterial and 5 ml of a 10 mg L⁻¹ solution of Crystal Violet. The *M. brunneum* selective medium contained the following components, which were suspended in 500 ml of de-ionized water: 5 g of glucose, 5 g of bacteriological peptone, 7.5 g of ox gall, 17.5 g of agar, 5 mg of dodine (*N*-dodecylguanidine monoacetate), 125 mg of cycloheximide and 250 mg of chloramphenicol as an antibacterial. The Petri dishes containing the different plant tissues were placed in a culture oven at 25 °C for approximately 15–20 days, during which the proportion of fragments exhibiting fungal outgrowth was recorded.

2.2.6. Plant and root parameters

The plant height, number of leaves and leaf chlorophyll concentration (LCC) in the two youngest leaves from each pot were determined at 20, 29, 34, 42, 49, 56, 72, 79, 87 and 93 DAS. These variables were measured in 10 plants at the beginning of the experiment, but the number was reduced to 4 when they had to be harvested to assess the endophytic colonization in the different samplings (destructive samplings). The LCC was determined with an SPAD 502 portable chlorophyll meter from Minolta Camera Co. (Osaka, Japan). The measurements were validated at the end of the experiment against the chlorophyll total concentration (CTC) extracted

CAPÍTULO IV

from the two youngest leaves with a 99.5 wt% solution of methanol ($r = 0.75$, $p < 0.001$) according to (Wintermans and de Mots, 1965). The SPAD proved a reliable proxy for estimating the CTC in the pot experiment.

The last four sorghum plants for each inoculation method, control method included, and the fungal strain remaining at the end of the experiment (93 DAS) were harvested and split according to the plant tissue (roots, stems and leaves). A portion of each type of tissue was used to assess the fungal re-isolation as described in the previous section. The remaining roots were washed with de-ionized water for scanning on an Epson Perfection V700 scanner, and the captured images were analyzed with WinRhizo[®] software (Régent Instrument, Inc., Québec, Canada, regent.qc.ca). As recommended by (Bouma et al., 2000), we used the automatic thresholding in the imaging software to optimize the threshold that divided the gray levels into two distinct groups (roots and background) and to determine the root length, specific root length (SRL, equation 1) (Klepper, 1991; Fitter, 2002), specific root area (SRA, equation 2) (Cornelissen et al., 2003; Jiménez and Arias, 2004) and root length as a function of the root diameter ($L \leq 0.2$, $0.2 < L \leq 1.0$, $L > 1.0$ mm).

$$SRL (m/g) = \frac{\text{Root length}}{\text{Dry weight}} \quad (1)$$

$$SRA (m^2/kg) = \frac{\text{Root area}}{\text{Dry weight}} \quad (2)$$

The leaves and stems (in combination) and roots (after scanning) were dried in an oven at 70 °C for at least 73 h to determine the dry weight per plant. The dried leaves were ground and digested with a mixture of nitric and perchloric acids (Zasoski and Burau, 1977). The Ca, Mg, Fe, Mn, Zn and Cu were determined on the Perkin Elmer AAS, K on a Jenway PFP7

CAPÍTULO IV

flame emission spectrometer and P by Molybdenum Blue method (Murphy et al., 1962) on a Perkin Elmer Lambda 35 UV/VIS spectrophotometer. The C and N were quantified by direct combustion on an EA3000 Analyzer from Eurovector SpA (Milan, Italy).

2.2.7. Statistical analysis

Statistical analyses were performed with STATISTIX 10 software from Analytical Software (Tallahassee, FL, USA). Previously, the data were checked for normal distribution and homoscedasticity by using the Kolmogorov–Smirnov test and Levene’s test, respectively. An analysis of variance (ANOVA) was performed to identify the effects of the studied factors (fungal strain, Fe oxide and CaCO₃) on the pH and Fe_{DTPA} in the *in vitro* assay and on the dry weight of the above-ground biomass and roots; nutrient contents of above-ground biomass; CTC; root length; SRL, SRA and root length as a function of root diameter in the sorghum plants; CFU in soil and re-isolation of each fungal strain from plant tissues in the pot experiment. An additional factorial ANOVA for the Fe_{DTPA} and pH was performed for each combination of fungal strain, Fe oxide and the absence or presence of CaCO₃ in the *in vitro* assay. Logarithmic transformations were applied whenever the requirements for parametric analyses were not met. Additional correlation analyses between the pH and Fe_{DTPA} at the end of the experiment (35 days) were performed. In addition, a split-plot ANOVA was performed on each fungal strain with a provision for the factor time and the interaction time × inoculation method for the plant height, number of leaves, LCC and LCC × plant height for each fungal strain. When the differences were significant ($p < 0.05$), a *post hoc* LSD test was used to separate the means. The control group was excluded from the statistical

CAPÍTULO IV

analyses for CFU in soil and the colonization of plant tissues in the pot experiment because it almost invariably had zero values.

3. Results

3.1. *In vitro* experiment

Table 1 shows the results of the factorial analysis for the Fe_{DTPA} and pH in the Czapek–Dox medium at the end of the *in vitro* assay (after 35 days). Regarding Table 1, *M. brunneum* could be said to produce the highest Fe_{DTPA} concentrations (in mg Fe L^{-1}), at 27.2 ± 5.6 and was followed in this respect by *I. farinosa* (12.3 ± 1.8), *B. bassiana* (9.7 ± 1.9) and the control without fungus (1.2 ± 0.3). Table 1 indicates that ferrihydrite was the individual Fe oxide leading to the highest Fe_{DTPA} contents in the medium at 30.1 ± 5.2 , followed by hematite (10.8 ± 1.9) and goethite (9.2 ± 1.9). However, the addition of CaCO_3 decreased the Fe_{DTPA} . *Beauveria bassiana* and *I. farinosa* raised the pH of the medium (to 8.1 ± 0.1 and 8.2 ± 0.1 , respectively); by contrast, *M. brunneum* did not alter the pH relative to the control without fungus (6.5 ± 0.1 vs 6.7 ± 0.3). Finally, all three Fe oxides increased the pH in relation to the control without Fe ($7.4\text{--}7.5$ vs 7.0 ± 0.3), and so did the presence of CaCO_3 ($7.9 \pm 0.1\text{--}6.8 \pm 0.2$).

In any case, there were multiple interactions between the different factors for the Fe_{DTPA} and pH except for Fe oxide \times CaCO_3 in Fe_{DTPA} ($p = 0.096$) and Fungus \times Fe oxide \times CaCO_3 and pH ($p = 0.449$) (see Table 1). These interactions are illustrated in Fig. 2 and the S1 Table. The S1 Table indicates that the presence of CaCO_3 decreased the Fe_{DTPA} and increased the pH in most determinations. In all the factor combinations, the EPF

CAPÍTULO IV

activity led to increased Fe_{DTPA} values in relation to the control without fungus. Although *M. brunneum* invariably produced the highest Fe_{DTPA} concentrations, the differences from the other two fungi with goethite as the Fe source in the presence of $CaCO_3$ were not significant, nor were those between *M. brunneum* and *I. farinosa* with the same Fe source in the absence of $CaCO_3$ (Fig. 2A).

Table 1. Factorial ANOVA for the Fe_{DTPA} and pH (mean and standard error, $n = 4$) of the Czapek–Dox medium after culturing the three strains at 25 °C for 35 days with each combination of fungus, Fe oxide (0 or 250 mg L⁻¹) and the presence or absence of $CaCO_3$

	Fe_{DTPA} (mg L ⁻¹)	pH _{KCl}
Fungus		
No fungus	1.2 ± 0.3	6.7 ± 0.3
<i>B. bassiana</i>	9.7 ± 1.9	8.1 ± 0.1
<i>I. farinosa</i>	12.3 ± 1.8	8.2 ± 0.1
<i>M. brunneum</i>	27.2 ± 5.6	6.5 ± 0.1
<i>p value</i>	< 0.001	< 0.001
Fe oxide		
Control ^(a)	0.0 ± 0.0	7.0 ± 0.3
Ferrihydrite	30.1 ± 5.2	7.5 ± 0.2
Hematite	10.8 ± 1.9	7.5 ± 0.2
Goethite	9.2 ± 1.9	7.4 ± 0.2
<i>p value</i>	< 0.001	< 0.001
CaCO₃		
0 mg L ⁻¹	17.0 ± 3.1	6.8 ± 0.2
300 mg L ⁻¹	8.1 ± 1.3	7.9 ± 0.1
<i>p value</i>	< 0.001	< 0.001
Interactions		
Fungus × Fe oxide	<0.001	<0.001
Fungus × CaCO ₃	0.045	<0.001
Fe oxide × CaCO ₃	0.096	<0.001
Fungus × Fe oxide × CaCO ₃	<0.001	0.449

^(a) Control (0 mg Fe L⁻¹)

CAPÍTULO IV

In addition, *I. farinosa* significantly increased the Fe_{DTPA} in relation to *B. bassiana* with hematite as the Fe source, whether or not $CaCO_3$ was present, and with goethite in the absence of $CaCO_3$. However, this trend was not found with the other combinations of factors (Fig. 2A).

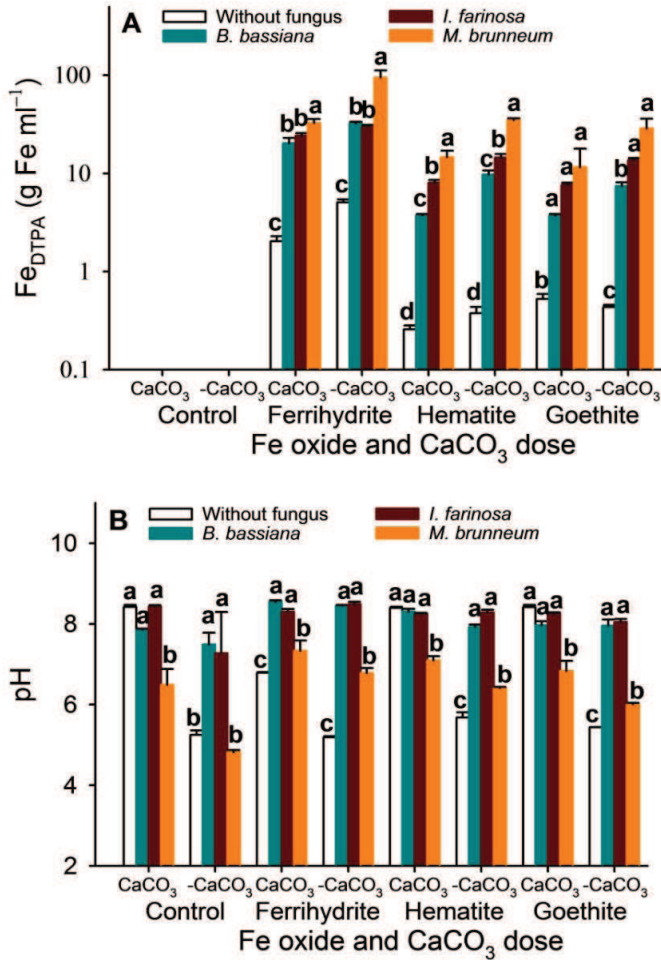


Fig. 2. Mean Fe_{DTPA} and pH. The Fe_{DTPA} (A) and pH (B) in the Czapek–Dox medium (mean \pm standard error, $n = 4$) at the end of the *in vitro* assay. Different letters indicate significant differences between the different levels of each factor according to an LSD *post hoc* test at $p < 0.05$.

CAPÍTULO IV

The fungus-free treatment led to the lowest pH values in the absence of CaCO₃ except when no Fe source was used; however, it exhibited the opposite trend with ferrihydrite as the Fe source in the presence of CaCO₃ (Fig. 2B). Overall, *I. farinosa* and *B. bassiana* increased the pH compared to *M. brunneum* in all the combinations of factors. In addition, *M. brunneum* resulted in the lowest pH in the presence of CaCO₃, except with ferrihydrite, as shown in S1 Table and Fig. 2B.

The Fe_{DTPA} and pH were negatively correlated in the control without Fe in the absence of CaCO₃ ($r = -0.47$, $p < 0.001$). Conversely, these two variables were positively correlated for *B. bassiana*, *I. farinosa* and *M. brunneum* ($r = 0.72$, $r = 0.36$, and $r = 0.80$, respectively; $p < 0.001$). In the presence of CaCO₃, the pH and Fe_{DTPA} were negatively correlated in the dishes without fungus ($r = -0.94$, $p < 0.001$), but positively correlated in those containing *B. bassiana*, *I. farinosa* or *M. brunneum* ($r = 0.74$, $r = 0.35$, $r = 0.63$, respectively; $p < 0.001$).

3.2. Pot experiment

3.2.1. Colony-Forming Units (CFU)

Fig. 3 shows the time course of CFU in the substrate. As expected, no *B. bassiana* or *M. brunneum* CFU were detected in the substrate samples from the control pots. The highest CFU concentrations in the first sampling (7 DAS) were those in the substrates from the soil treatment ($4.3 \times 10^6 \pm 3.3 \times 10^4$ conidia g⁻¹ for *B. bassiana* and $1.6 \times 10^7 \pm 3.4 \times 10^5$ conidia g⁻¹ for *M. brunneum*), followed by seed dressing ($9.7 \times 10^4 \pm 3.3 \times 10^3$ conidia g⁻¹ for *B. bassiana* and $8.3 \times 10^5 \pm 8.8 \times 10^4$ conidia g⁻¹ for *M. brunneum*) and leaf spraying (no CFU detected, $p < 0.001$). In the second sampling, which

CAPÍTULO IV

was performed four days after leaf spraying (i.e., 30 DAS), the soil treatment led to significantly ($p < 0.001$) higher CFU concentrations ($9.3 \times 10^5 \pm 6.7 \times 10^4$ conidia g^{-1} for *B. bassiana* and $1.3 \times 10^7 \pm 1.1 \times 10^6$ conidia g^{-1} for *M. brunneum*) than the seed dressing and leaf spraying (ca. 2×10^4 conidia g^{-1} for both treatments and fungi). A decrease in the CFU was observed with both fungi that was especially sharp with seed dressing and leaf spraying in *B. bassiana* (Fig. 3A), and with leaf spraying in *M. brunneum* (Fig. 3B), during the third sampling (68 DAS). Note that seed dressing resulted in a constant CFU concentration with *M. brunneum* throughout the experiment and that leaf spraying only resulted in CFU production at 30 DAS with both fungal strains.

3.2.2. Fungal re-isolation

Neither *B. bassiana* nor *M. brunneum* were detected in any plant tissue from the control plants. In addition, neither fungus was re-isolated from the leaves, stems or roots of the leaf-sprayed plants in the first sampling (20 DAS) because this treatment was applied 6 days after sampling (26 DAS). The fungal re-isolation from the different plant tissues progressively decreased after the second sampling until the end of the culture (93 DAS), independent of the inoculation method (Fig. 4).

CAPÍTULO IV

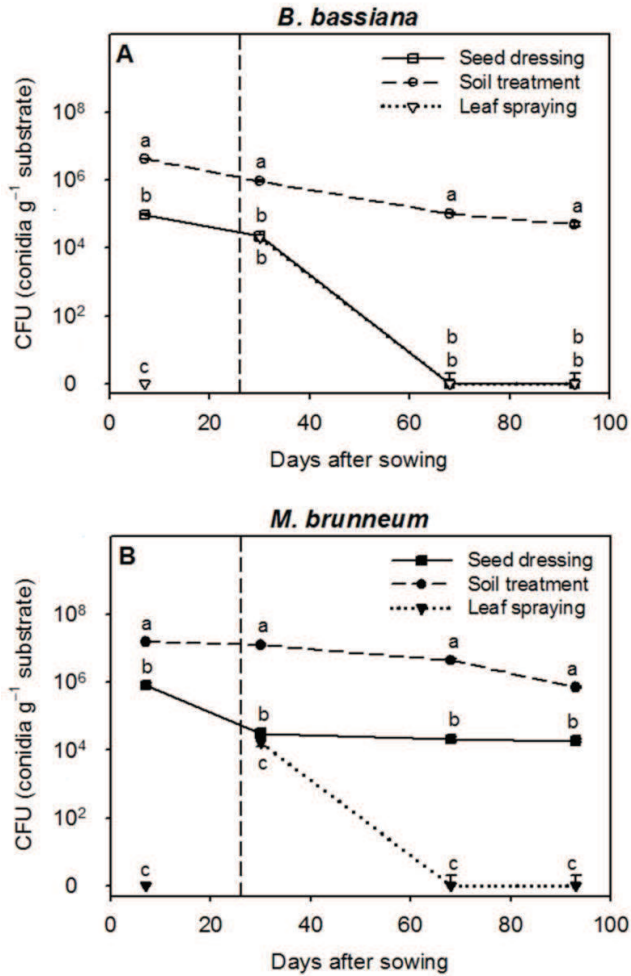


Fig. 3. Colony-forming units (CFU). The number of conidia g^{-1} in the calcareous substrate (mean \pm standard error, $n = 4$) for each fungal strain as a function of the inoculation method (seed dressing, soil treatment and leaf spraying) at 7, 30, 68 and 93 days after sowing (DAS). The dashed line indicates the time of application of the leaf treatment. No *B. bassiana* or *M. brunneum* CFUs were detected in the substrate samples from the control pots. Different letters indicate significant differences between inoculation methods in each sampling according to the LSD *post hoc* test at $p < 0.05$

CAPÍTULO IV

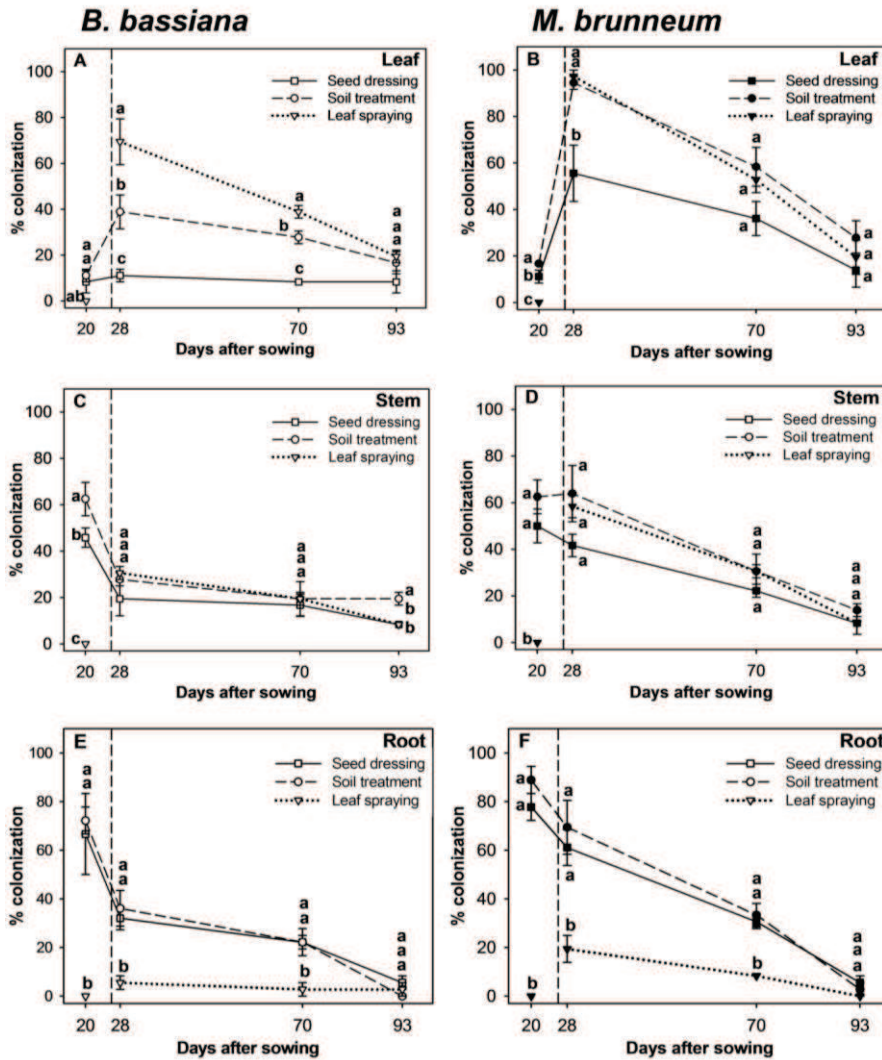


Fig. 4. Re-isolation. The time course for the colonization (mean \pm standard error, $n = 4$) of the leaves, stems and roots by *B. bassiana* (A, C, E) and *M. brunneum* (B, D, F) as a function of the inoculation method. The dashed line indicates the time of the leaf spraying (26 DAS) application. Different letters indicate significant differences between inoculation methods according to the LSD *post hoc* test at $p < 0.05$.

The re-isolation of both fungi from leaves peaked in the second sampling (28 DAS) and amounted to $69 \pm 10\%$ with leaf spraying, $39 \pm 7\%$ with soil treatment and $11 \pm 3\%$ with seed dressing in *B. bassiana* (Fig. 4A), 90% with leaf spraying and soil treatment with no difference between the

CAPÍTULO IV

two and $56 \pm 12\%$ with seed dressing in *M. brunneum* (Fig. 4B). A decrease in re-isolation was observed in the third and fourth samplings (70 and 93 DAS, respectively) with leaf spraying ($39 \pm 3\%$ and $19 \pm 3\%$) and soil treatment ($28 \pm 3\%$ and $17 \pm 5\%$). However, the re-isolation of *B. bassiana* as applied by seed dressing remained constant at $8 \pm 5\%$ (Fig. 4A). A decrease in the *M. brunneum* re-isolation was also observed in the third and fourth samplings with the leaf spraying ($53 \pm 6\%$ and $19 \pm 7\%$), soil treatment ($58 \pm 8\%$ and $28 \pm 7\%$) and seed dressing ($36 \pm 7\%$ and $14 \pm 7\%$) (Fig. 4B). However, the differences among treatments at the end of the experiment were not significant (Fig. 4A and 4B).

During the first sampling (20 DAS), soil treatment resulted in the highest re-isolation ($63 \pm 7\%$), followed by seed dressing ($46 \pm 4\%$) in *B. bassiana* (Fig. 4C). During the second and third samplings (28 and 70 DAS, respectively), a decrease in re-isolation was observed with leaf spraying ($31 \pm 3\%$ and $19 \pm 7\%$) and soil treatment ($28 \pm 3\%$ and $19 \pm 3\%$); this was not the case with seed dressing ($19 \pm 7\%$ and $17 \pm 5\%$), which resulted in insubstantial differences among the treatments (Fig. 4C). The previous values are lower than those obtained with seed dressing and soil treatment in the first sampling. After the fourth sampling (93 DAS), the soil treatment resulted in greater re-isolation ($19 \pm 3\%$) than leaf spraying and seed dressing (*ca.* 8 with both) (Fig. 4C). The re-isolation of *M. brunneum* at 20 DAS (Fig. 4D) exhibited $63 \pm 7\%$ with soil treatment and $50 \pm 7\%$ with seed dressing, with no significant differences between the two. In the second and subsequent samplings, the differences among treatments were not significant. The re-isolation decreased in the following sequence from 28 to 93 DAS: soil treatment ($64 \pm 12\%$ to $14 \pm 3\%$) > leaf spraying ($58 \pm 5\%$ to $8 \pm 5\%$) > seed dressing ($42 \pm 5\%$ to $8 \pm 0\%$) (see Fig. 4D).

CAPÍTULO IV

Significant differences in root colonization among treatments were observed in the first, second and third samplings (Fig. 4E and 4F). The seed dressing and soil treatment showed no significant differences between the two and resulted in the greater re-isolation of both fungi from 20 to 70 DAS than did leaf spraying. The re-isolation declined gradually in the following sequence with *B. bassiana*: soil treatment ($72 \pm 6\%$ to $22 \pm 6\%$) > seed dressing ($67 \pm 17\%$ to $22 \pm 3\%$), with no significant differences between the two (Fig. 4E). The situation was similar for *M. brunneum*, with no significant differences between the soil treatment (a decrease from $89 \pm 6\%$ to $33 \pm 5\%$) and seed dressing ($78 \pm 6\%$ to $31 \pm 3\%$) (Fig. 4F). The re-isolation with leaf spraying never exceeded $6 \pm 3\%$ for *B. bassiana* or $19 \pm 6\%$ for *M. brunneum* in any sampling.

3.2.3. Plant growth and LCC

As observed in Fig. 5A and 5B, the fungal inoculation method used here influenced the sorghum plant height. Thus, from 72 DAS to 93 DAS, the *B. bassiana* plants inoculated by seed dressing were significantly taller than the ones that were inoculated by leaf spraying (Fig. 5A). The seed-dressed plants were also significantly higher than those in the soil treatment and control groups at 79 DAS, and higher than the control plants at 93 DAS. In most cases, the leaf-sprayed plants were the shortest, but the differences from the control plants were never significant. The tallest *M. brunneum* plants from 72 DAS to the end of the experiment were in the soil treatment and seed dressing groups ($p < 0.001$ for each determination; Fig. 5B). Leaf spraying produced the shortest plants in relation to the other treatments (control plants included). Although a similar effect was observed at 56 DAS, no significant differences in this respect were found between the seed dressing and control plants (Fig. 5B).

CAPÍTULO IV

Fig. 5C and 5D show the time course of the LCC. As observed, there were three distinct stages. The LCC peaked in the first stage (20 to 34 DAS), at 33.6 ± 0.6 in the control plants, 33.1 ± 0.9 in *B. bassiana*-inoculated plants and 31.5 ± 0.8 in *M. brunneum*-inoculated plants, with no significant differences between the inoculation methods and the control treatment in either fungus. During the second stage (42 to 79 DAS), the LCC dropped and the Fe chlorosis symptoms (viz., interveinal yellowing) became apparent. There were significant differences among the treatments in inoculated plants at the end of this stage. Thus, the inoculated *B. bassiana* plants exhibited significantly higher LCC values than their control counterparts at 72 DAS ($p = 0.021$ for the three inoculation methods) and 79 DAS ($p = 0.048$, but they were significant only in the soil treatment group) (Fig. 5C). Inoculated *M. brunneum* plants also differed significantly from the control plants at 72 DAS ($p < 0.001$ for the three inoculation methods) and 79 DAS ($p = 0.013$, but significant only with leaf spraying and soil treatment) (Fig. 5D). In the last two measurements, the LCC increased slightly and became more similar among treatments, with no significant differences through the end of the experiment (third stage, 87 to 93 DAS).

Fig. 5E and 5F show the LCC \times Plant height interaction as a measure of the overall plant status regarding Fe chlorosis, interveinal yellowing and growth. All the fungal treatments led to higher values in *B. bassiana* than did the control treatment at 72 DAS ($p = 0.007$) and 79 DAS ($p = 0.013$); however, on the latter date, the differences from the control group were only significant with soil treatment and leaf spraying (Fig. 5E).

CAPÍTULO IV

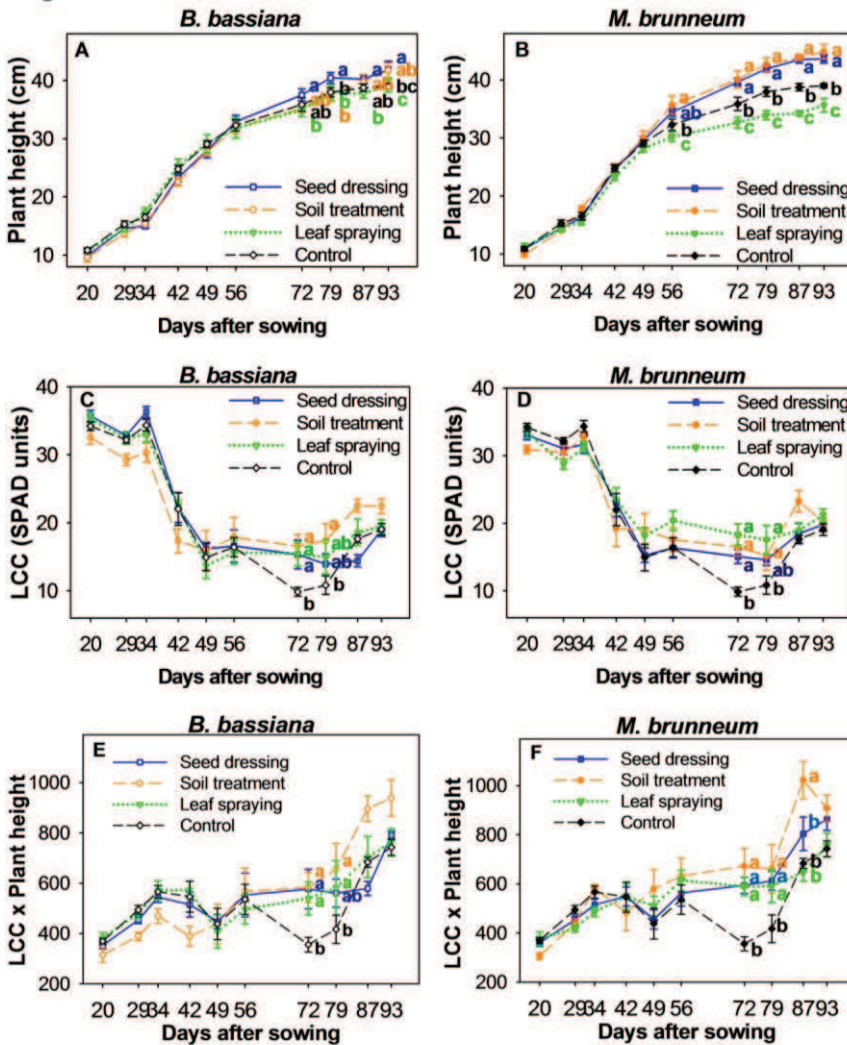


Fig. 5. Plant height, LCC and LCC × Plant height in sorghum. A time course of the sorghum plant height, LCC (leaf chlorophyll concentration) and LCC × plant height (mean ± standard error, $n = 4$) for *B. bassiana* (A, C, E) and *M. brunneum* (B, D, F) as a function of the inoculation method. Different letters indicate significant differences between inoculation methods according to the LSD *post hoc* test at $p < 0.05$.

In *M. brunneum* (Fig. 5F), the three fungal treatments led to significantly higher LCC × Plant height values than the control treatment at 72 DAS ($p < 0.001$) and 79 DAS ($p = 0.005$). Subsequently, the only significant differences were those resulting from soil treatment, which led

CAPÍTULO IV

to the highest values, at 87 DAS ($p = 0.055$ for *B. bassiana* and $p < 0.001$ for *M. brunneum*).

There were no significant differences in the number of leaves between the plants inoculated with *B. bassiana* and those in the control group (Fig. S1A). By contrast, the plants inoculated with *M. brunneum* (Fig. S1B) differed significantly among the groups ($p < 0.001$) in all the samplings except at 49 DAS). The smallest numbers of leaves were those in the soil treatment plants at 20, 29, 34, 42 and 72 DAS and those in the plants of the soil treatment, seed dressing and control groups at 56, 79, 87 and 93 DAS. By contrast, leaf spraying produced the largest number of leaves at the end of the cropping period (56 to 93 DAS, Fig. S1B).

The CTC values (in $\mu\text{g cm}^{-2}$) of plants inoculated with *B. bassiana* at the end of the experiment (93 DAS) decreased in the following sequence (S2 Table: soil treatment > seed dressing > control treatment > leaf spraying ($p = 0.029$). The sequence for plants inoculated with *M. brunneum* was as follows: leaf spraying > soil treatment > seed dressing > control treatment ($p = 0.011$).

3.2.4. Root parameters

The root dry weights (S3 Table) were unaffected by the fungal strain and inoculation method. However, the total root length (m) for both fungal strains was significantly influenced by the inoculation method. Thus, the total root length in the plants inoculated with *B. bassiana* was 21.2 ± 2.4 with seed dressing, 21.6 ± 1.4 with soil treatment and 22.5 ± 2.8 with leaf spraying, with all three values being significantly greater ($p = 0.031$) than that for the control plants (12.2 ± 1.3) but not significantly different from one another. With *M. brunneum* ($p < 0.004$), the total root length was

CAPÍTULO IV

greatest with soil treatment (26.5 ± 0.8), followed by leaf spraying (21.3 ± 2.3), seed dressing (18.2 ± 2.7) and the control treatment (12.2 ± 1.3) (Fig. S2).

The specific root length (SRL) in the plants inoculated with *B. bassiana* (Fig. 6A) was greater with seed dressing and soil treatment than with the control treatment ($p = 0.024$); however, there were no significant differences with leaf spraying. A similar trend was observed with *M. brunneum* (Fig. 6B), but the differences were only significant with the soil treatment ($p = 0.008$). The specific root area (SRA) in the plants inoculated with *B. bassiana* exceeded that in the control plants; the differences were significant for all treatments except leaf spraying ($p = 0.014$, Fig. 6C). The plants inoculated with *M. brunneum* behaved similarly with regards to the SRA, with the differences being significant for all treatments except seed dressing ($p = 0.005$, Fig. 6D).

The fine roots (less than 0.2 mm in diameter) were less abundant in the control plants than in those inoculated with *B. bassiana* ($p = 0.039$, Fig. 6E) or *M. brunneum* ($p = 0.001$, Fig. 6F, seed-dressing plants excepted). The results for roots 0.2–1.0 mm in diameter were similar ($p = 0.029$ with *B. bassiana* and $p = 0.006$ with *M. brunneum*). No differences between inoculation methods and the control treatment were found in roots thicker than 1.0 mm ($p = 0.154$ with *B. bassiana* and $p = 0.091$ with *M. brunneum*; Fig. 6E and 6F).

CAPÍTULO IV

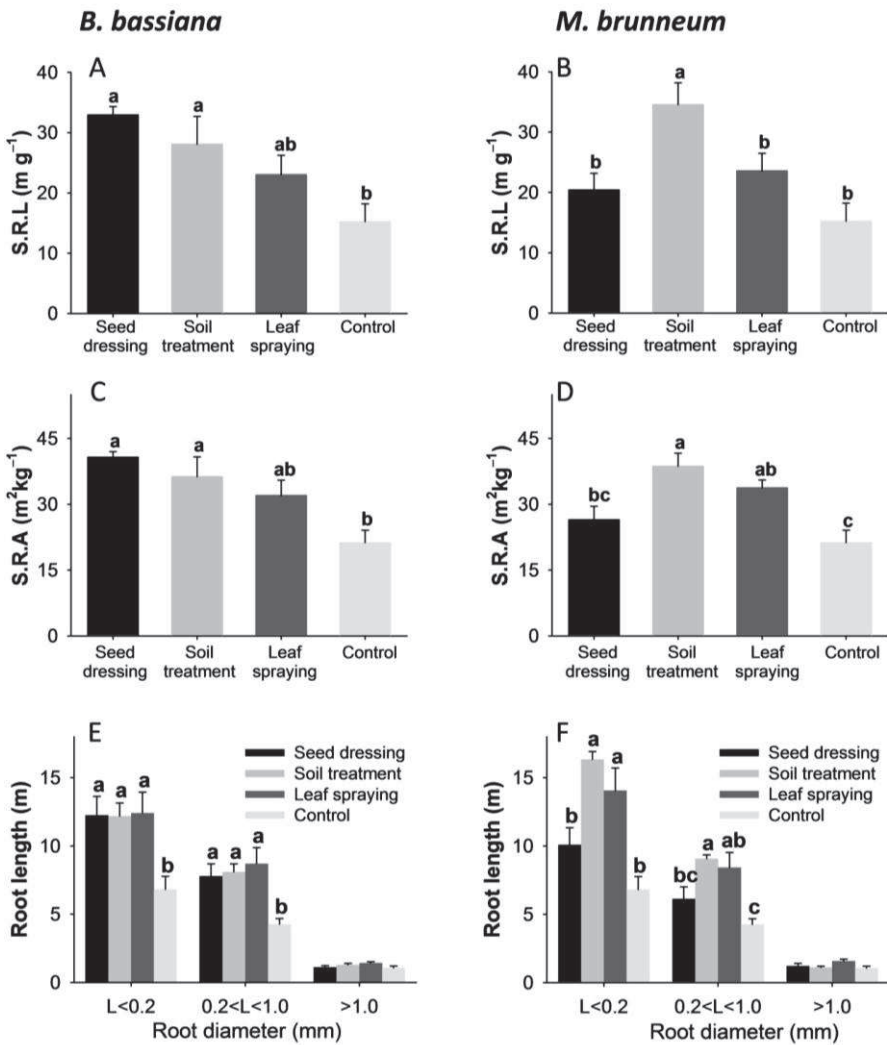


Fig. 6. Root parameters. Specific root length (SRL), specific root area (SRA) and root length according to the root diameter (mean \pm standard error, $n = 4$) for sorghum plants inoculated with *B. bassiana* (A, C, E) or *M. brunneum* (B, D, F) by using different inoculation methods. Different letters indicate significant differences between inoculation methods according to an LSD *post hoc* test at $p < 0.05$.

3.2.5. Nutrient contents of above-ground biomass

Table 2 and S3 Table show the dry weight and nutrient contents of the above-ground biomass from the sorghum plants at the end of the cropping

CAPÍTULO IV

period (93 DAS). Although the sorghum plants exhibited Fe deficiency symptoms (internerval yellowing throughout the trial) and purple leaf coloration due to P deficiency (in this case, only during the first two weeks), all the plants exhibited vigorous growth.

Table 2. Analysis of variance for above-ground plant dry weights and micronutrient contents in the biomass of the sorghum plants (mean \pm standard error, $n = 4$) at the end of the experiment (93 DAS) with each fungus and inoculation method.

	Dry weight (g)	Fe (mg kg ⁻¹)	Mn (mg kg ⁻¹)	Zn (mg kg ⁻¹)	Cu (mg kg ⁻¹)
<i>B. bassiana</i>					
Seed dressing	1.59 \pm 0.12	31.3 \pm 2.5ab	10.2 \pm 0.2a	7.4 \pm 0.5	6.0 \pm 0.3a
Soil treatment	1.63 \pm 0.03	33.2 \pm 1.5a	9.3 \pm 0.6ab	8.4 \pm 0.3	6.2 \pm 0.1a
Leaf spraying	1.82 \pm 0.09	25.6 \pm 1.4b	8.2 \pm 0.3bc	8.7 \pm 1.2	5.4 \pm 0.1b
Control	1.62 \pm 0.19	18.2 \pm 1.9c	7.8 \pm 0.2c	9.7 \pm 0.5	4.9 \pm 0.2b
<i>p</i> value	0.531	<0.001	0.002	0.206	0.002
<i>M. brunneum</i>					
Seed dressing	1.60 \pm 0.12	29.8 \pm 1.3a	13.2 \pm 1.3a	8.4 \pm 0.4b	6.4 \pm 0.1a
Soil treatment	1.79 \pm 0.11	27.7 \pm 2.0a	12.2 \pm 0.7a	7.9 \pm 0.2b	5.6 \pm 0.1b
Leaf spraying	1.52 \pm 0.05	27.4 \pm 1.6a	11.0 \pm 0.7a	7.9 \pm 0.4b	5.4 \pm 0.5b
Control	1.62 \pm 0.19	18.2 \pm 1.9b	7.8 \pm 0.2b	9.7 \pm 0.5a	4.9 \pm 0.2b
<i>p</i> value	0.491	0.002	0.004	0.023	0.010

Different letters indicate significant differences between the levels of each factor according to the LSD *post hoc* test at $p < 0.05$

There were no significant differences in dry weight, or in the K, P, Ca or Mg contents, of the above-ground plant biomass between the inoculation methods and the control treatment with either fungal strain (S3 Table). Overall, the nutrient contents fell within their normal ranges (Benton et al., 1991). Inoculation with *B. bassiana* significantly altered the Fe, Mn and Cu contents ($p < 0.001$, $p = 0.002$ and $p = 0.002$, respectively) in relation to the control plants (Table 2). The mean Fe, Mn and Cu contents with soil treatment and seed dressing were higher than those for the leaf spraying and control groups. Inoculation with *M. brunneum* also altered the Fe, Mn, Cu and Zn contents to a significant extent ($p = 0.002$, $p = 0.004$,

CAPÍTULO IV

$p = 0.023$ and $p = 0.010$, respectively) (Table 2). Thus, the Fe and Mn contents of the inoculated plants were significantly higher than the contents of the control plants. However, the differences in Cu contents were only significant with seed dressing, which led to the highest levels relative to the control treatment. By contrast, the Zn content was slightly lower in all the inoculated plants than in the control plants.

Finally, the Fe_{DTPA} at the end of crop, which is a measure of Fe bioavailability, was not significantly affected by inoculation with either fungus. The mean Fe_{DTPA} contents (mg Fe kg^{-1}) with *B. bassiana* ($p = 0.056$) were 1.16 ± 0.03 with soil treatment, 1.29 ± 0.03 with seed dressing and 1.28 ± 0.03 with leaf spraying, whereas those obtained with *M. brunneum* ($p = 0.208$) were 1.16 ± 0.02 with soil treatment, 1.20 ± 0.05 with seed dressing and 1.24 ± 0.03 with leaf spraying. The Fe_{DTPA} for the control group was 1.28 ± 0.04 .

4. Discussion

4.1. *In vitro* experiment

The soil pH is one of the primary factors influencing the EPF growth and persistence in the soil (Quesada–Moraga et al., 2007). The optimum pH for fungal growth is 5–10 for *B. bassiana* (Padmavathi et al., 2003; Otgonjargal et al., 2015), approximately 7 for some *Metarhizium* species (Issaly et al., 2005; Soundarapandian and Chandra, 2007), and approximately 5.8 for some *Isaria* species (Hussein et al., 2014). These differences in pH values may explain why the three EPF strains performed differently depending on the particular combination of Fe sources and on the presence or absence

CAPÍTULO IV

of CaCO_3 . In fact, the pH of the culture medium ranged from 5.6 without CaCO_3 to 8.4 with CaCO_3 when using hematite or goethite as the Fe sources, and from 5.2 without CaCO_3 to 6.8 with CaCO_3 when ferrihydrite was the Fe source. In the last case, the amorphous nature of ferrihydrite caused it to release protons continuously while crystallizing (Schwertmann and Cornell, 2000). This release might be the reason why ferrihydrite led to a pH of 6.8 and the other Fe sources led to a pH of 8 in the presence of CaCO_3 .

Fungi (EPF included) are known to alter their environment by releasing organic acids (Liaud, et al., 2014), and the concentrations of nutrients such as Fe, Cu, and Ag (Joseph et al., 2012), Zn (Sazanova et al., 2015) or P (Li et al., 2016) increase as a result. The released organic acids lower the pH of the medium and increase the solubility of Fe oxides. In our experiment, *B. bassiana* and *I. farinosa* basically raised the pH of the medium (Table 1) in relation to the control treatment without fungus in the absence of CaCO_3 . This increase in pH can be ascribed to the presence of $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ and NaNO_3 in the Czapek–Dox culture medium, providing NO_3^- anions as a source of N and forcing the fungi to release OH^- ions, which had to be absorbed to ensure homeostatic regulation, thereby alkalizing the medium (Villegas et al., 1996).

Metarhizium brunneum reduced the pH of the medium under calcareous conditions (i.e., in the presence of CaCO_3). However, it is clear (Fig. 2B) that this reduction did not occur in the absence of CaCO_3 , probably because the solubility of Fe was not reduced by the low prevailing pH, or with ferrihydrite as an Fe source in the presence of CaCO_3 , conditions under which Fe was more readily available, more reactive and soluble, because of the higher surface area of ferrihydrite (Chen and Barak,

CAPÍTULO IV

1982; Vempati and Loeppert, 1986). In this situation, the fungi were required to produce smaller amounts of organic acids than under calcareous conditions or when the Fe source was a crystalline Fe oxide, and iron was thus less readily available.

In addition, fungi produce and release substances with low molecular weights called siderophores. These substances have a high affinity for Fe, and also for other nutrients such as Mn, Zn and Cu, which facilitates its chelation and makes it more readily available (Kaplan and Kaplan, 2009, Sanvisen and Puig, 2011; Hider and Kong, 2010; Krasnoff et al., 2014; Jirakkakul et al., 2015). This Fe acquisition mechanism, which requires no direct alteration of the pH, may have compounded with the release of organic acids to increase the Fe availability in the culture medium.

As expected, the presence of CaCO₃ reduced the Fe availability and raised the pH (Tagliviani and Rombolà, 2001). The three EPF strains increased the Fe availability in a different way; thus, *M. brunneum* probably released organic acids in more under calcareous conditions, and probably all three fungi produced siderophores. Based on the results for the three EPF strains and the wider pH range for the optimal growth of *B. bassiana*, we chose to use this species together with *M. brunneum* in the pot experiment under calcareous conditions.

4.2. Pot experiment

Our calcareous artificial substrate mimicked the conditions of low Fe availability in calcareous soils and was useful for reducing the number of variables, potentially modulating the effect of EPF on the plant growth and Fe nutrition in these soils. Although the number of fungal propagules (CFU)

CAPÍTULO IV

of *B. bassiana* and *M. brunneum* decreased gradually throughout the pot experiment, it remained above the natural background level for the substrates in which the fungi were applied to soil at $\leq 10^4$ conidia g^{-1} (Scheepmaker and Butt, 2010). The CFU in the substrate with soil treatment was higher for *M. brunneum* than it was for *B. bassiana*. This result is consistent with those of previous experiments (Salazar et al., 2007; Garrido–Jurado et al., 2011) in which the increased size of the *M. brunneum* conidia resulted in easier retention in sandy substrates, whereas the smaller size of the *B. bassiana* conidia facilitated their vertical dragging by water through macropores in sand particles. Both *M. brunneum* and *B. bassiana* are rhizosphere–competent fungi (St. Leger et al., 2008) and can persist in the soil for a long time (Bidochka et al., 2001). The CFU in the substrate with seed dressing may have resulted from fungal growth from the surface and inside of seeds and plants having been more marked with *M. brunneum* (CFU $> 10^4$ conidia g^{-1} in the four samplings). Although the substrates were covered with aluminum foil to prevent contamination, leaf spraying led to CFU being detected in the substrate during the sampling following the application of the fungi. Nevertheless, the sterilization of the substrate implies that the microbial diversity in our sterile artificial substrate was not the same as it was in non–sterile substrates or under natural conditions, and this environment should have facilitated the growth of the EPF (Katznelson, 1940; Warcup, 1950; Trevors, 1996; Bennet et al., 2003). Consequently, the results obtained using a sterile substrate might not be comparable to those using the same substrate when it is non–sterile. The primary reason is the antagonistic effect of soil sterilization on substrate microbial diversity, which minimizes biological competence for EPF. However, similar trends in CFU in soil have been found in experiments that were developed by our research group using

CAPÍTULO IV

non-sterilized calcareous soils and *M. brunneum* applied to the surface (Sánchez-Rodríguez et al., 2016).

Although *B. bassiana* is seemingly a more efficient endophyte than *M. brunneum* (Landa et al., 2013), our results do not support this assumption. In fact, *M. brunneum* was re-isolated to a greater extent from most plant tissues and in most samplings. The differences in persistence between *M. brunneum* and *B. bassiana* after inoculation may have resulted from the inoculation method, fungal strain, host plant genotype and sandy substrate in use. In fact, the re-isolation of *B. bassiana* from the sorghum plants inoculated by seed dressing, soil treatment and leaf spraying was previously found to be strongly influenced by the particular substrate (viz., sterile soil, non-sterile soil or vermiculite) (Tefera and Vidal, 2009). Consequently, these factors influenced the success of the plant-endophyte associations (i.e., the re-isolation percentage) (Quesada-Moraga et al., 2014).

Our re-isolation results are consistent with those of previous studies in which *B. bassiana* and *M. brunneum* successfully colonized various plant tissues as endophytes, both in wheat inoculated with the two fungal strains (Sánchez-Rodríguez et al., 2017) and in cassava roots inoculated with *B. bassiana* and *M. anisopliae* (Greenfield et al., 2016). As suggested by Tefera y Vidal (2009) for pot-grown sorghum, a successful colonization may have relied on the hyphal motion and growth in the internal structures of the plants. Additionally, as suggested by Quesada-Moraga et al. (2006) for *Papaver somniferum*, and by Landa et al. (2013), García et al. (2011) and Resquín-Romero et al. (2016) for tomato, melon and alfalfa plants, the re-isolation of the fungus at a fairly long distance from the inoculation point indicates that the circulation of the endophyte

CAPÍTULO IV

in a plant is due to a passive movement within the xylem and to the development of hyphae in vascular elements.

The plant inoculation method was also critical in the pot experiment because it governed the colonization of the plant tissues during the cropping period and had a differential effect on the plant growth (plant height and root) and LCC. Consistent with previous results (Tefera and Vidal, 2009), the three inoculation methods (viz., seed dressing, soil treatment and leaf spraying) enabled the colonization of the leaves, stems and roots of the sorghum plants. The re-isolation results were similar to those obtained previously in similar assays (Schwertmann and Cornell, 2000), in which they found leaf spraying and soil treatment to lead to endophytic colonization by 80% in bean plants (*Phaseolus vulgaris* cv. Calima) that were inoculated with *B. bassiana*. However, the extent of colonization was dependent on the particular plant tissue. In previous studies, the leaves and stems responded better to leaf spraying treatments in which the fungi were applied to the above-ground plant biomass, whereas the roots were more responsive to soil treatments in which the fungi were applied to the soil (Parsa et al., 2013).

The two fungal strains and three inoculation methods used here had no effect on the dry weight of the above-ground plant biomass or plant roots; in addition, as in other trials (Akello et al., 2009; Gurulingappa et al., 2010), the fungal application did not impair the plant growth. However, the effect on the plant height was dependent on the particular inoculation method and especially marked at the end of the experiment in the plants inoculated by seed dressing with *B. bassiana* and those inoculated by soil treatment or seed dressing with *M. brunneum*. By contrast, leaf spraying with *B. bassiana* decreased the final plant height

CAPÍTULO IV

while increasing the number of leaves compared to the other three treatments with *M. brunneum*. The increase in plant growth was not reflected in the above-ground plant biomass, probably because the pots were filled with only 250 g of substrate. Our results are consistent with those of (Vega et al., 2009), who found that some species in the *Metarhizium* and *Beauveria* genera commonly colonized the rhizosphere to promote plant growth; with those of (Kabaluk and Ericsson, 2007), who reported an increase in leaf density in field corn inoculated with *M. anisopliae* via seed dressing; and with those of Sasan and Bidochka (Sasan and Bidochka, 2012), who found *M. robertsii* to promote root growth in switch grass inoculated using the same method.

The significant positive effect of inoculation on LCC at 72 DAS (with both fungi and the three inoculation methods) and 79 DAS (soil treatment with both fungi, and soil treatment and leaf spraying with *M. brunneum*), that is, when the Fe chlorosis symptoms in the control plants peaked and the LCC was lowest, reflects a clear-cut beneficial effect. The interaction of the LCC × plant height (an indicator of plant health status with respect to the Fe chlorosis) behaved similarly and led to more marked differences between the inoculated plants and the control group. The positive effect on the sorghum plants was more persistent with *M. brunneum* (from 72 to 87 DAS but only 72 and 79 DAS with the three inoculation methods) than it was with *B. bassiana* (from 72 to 79 DAS but only 72 DAS with all three inoculation methods). The inoculation method was also the key variable in the persistence of the effect on the LCC; thus, soil treatment and leaf spraying had a similar effect at 72 and 79 DAS, whereas seed dressing with *B. bassiana* was significantly influential at only 72 DAS. With *M. brunneum*, the three inoculation methods had a similar positive effect at 72 and 79

CAPÍTULO IV

DAS, but only the soil treatment extended the effect to 87 DAS. Therefore, inoculation with *B. bassiana* or *M. brunneum* increased the LCC in young leaves and increased the Fe content, irrespective of the inoculation method, in the above-ground biomass of sorghum plants grown under calcareous conditions at the end of the pot experiment. In summary, inoculation had a positive effect on the Fe nutrition. These results are consistent with those of the *in vitro* assay, in which the EPF increased the bioavailability of Fe from ferrihydrite in the calcareous medium. In addition, they are consistent with those of Sánchez-Rodríguez et al. (2015), who found that applying *B. bassiana* to wheat and tomato seeds grown in an artificial calcareous substrate to increase the LCC to an extent that was dependent on the ferrihydrite content of the substrate; and with those of Sánchez-Rodríguez et al. (2016), who found that applying *M. brunneum* to calcareous soils to alleviate the Fe chlorosis symptoms in sorghum and wheat plants.

Overall, the three inoculation methods were effective at promoting root growth in relation to the control group, with the soil treatment being the most effective method in terms of the SRL, SRA and fine roots with both fungi. The fine roots (less than 0.2 mm in diameter), SRA and total root length were related to the ability of the plants to explore the soil and obtain water and nutrients from it (Garnier and Growth, 1992; Ryser and Lambers, 1995; Wahl and Ryser, 2000; Hummel et al., 2007). These findings are highly significant for the uptake of nutrients such as Fe, Mn and Cu by plants, especially when they are scant. Our results are consistent with those of Jaber and Erkerly (Jaber and Enkerli, 2016), who found that applying *M. brunneum* and *B. bassiana* via seed dressing would systematically colonize different parts of bean plants (*Vicia faba*), and they

CAPÍTULO IV

increased the root lengths 7 days after inoculation, thereby resulting in improved plant growth (plant height, number of leaves, fresh root weight and shoot weight) at 14 and 28 days after inoculation.

Soil treatment was the inoculation method that produced the largest amounts of CFU with both fungi, but particularly *M. brunneum*, in our experiment. This result may have influenced the re-isolation of the fungi, which was similar to that observed with seed dressing and greater with *M. brunneum* than with *B. bassiana* in the roots. Liao et al. (2014) used corn (*Zea mays*), and Parsa et al. (2016) used common bean (*Phaseolus vulgaris*), and they both found a beneficial effect of *Metarhizium* spp. on the plant growth and root promotion to rely on the success of the fungus-plant association. Their results suggest that physical root colonization is a prerequisite for many of the beneficial effects of these fungi, which could partly explain our results. Additionally, Liao et al. (2014) found that the *Metarhizium* strains used in their study could promote plant growth and auxin production. Some evidence also likely exists that may explain why soil treatment was the most efficient inoculation method. Thus, as reported by Mukherjee et al. (2013) and Harman and Shoresh (2007) for the *Trichoderma* species, we believe that the mechanisms by which *Metarhizium* stimulates plant growth are probably multifactorial and include the promotion of plant growth through antibiotic, antiparasitic and host resistance-inducing effects. In any case, our insect-free pot experiment revealed that the EPFs studied here had direct positive effects on their plant hosts.

In general, the mineral element concentrations fell within the normal ranges (Benton et al., 1991). An overall increase in the Fe, Mn and Cu mean contents of the above-ground plant biomass in the inoculated

CAPÍTULO IV

plants relative to the control plants was observed (especially with seed dressing and soil treatment). By contrast, inoculation with the fungi slightly decreased the Zn contents. This detrimental effect on Zn may have resulted from the potential adsorption of the metal onto Fe oxides, diminishing its uptake by plants (Montilla et al., 2003). We hypothesize that the alterations in root parameters (total root length and increased SRL, SRA and fine roots) in inoculated plants facilitated the exploration of the substrate, thereby resulting in increased contents of micronutrients (primarily Fe) and had positive effects on the LCC and plant growth (in the form of plant height) in our Fe-limiting calcareous substrate.

5. Conclusions

The three EPF strains used in the *in vitro* assay increased the Fe availability under different conditions with respect to the Fe source (three Fe oxides of different crystallinities and solubilities) and growing substrate (calcareous or non-calcareous). *Metarhizium brunneum* was the most effective fungus, seemingly as a result of its increase of the Fe availability by releasing organic acids to lower the pH of the calcareous media. Both *B. bassiana* and *M. brunneum* alleviated the Fe chlorosis symptoms in inoculated sorghum plants grown on an artificial calcareous substrate. Although the three inoculation methods used in this experiment had positive effects on the plants, the soil treatment was the most effective method. Thus, it resulted in the increased persistence of the fungus in the substrate (CFU), re-isolation from different plant tissues to an extent comparable to that of seed dressing, a more persistent effect on the chlorophyll concentration of young leaves and plant growth relative to the other two inoculation

CAPÍTULO IV

methods, and a similar ability to increase the Fe uptake by sorghum plants. As revealed by the root parameter values, the soil treatment also resulted in a better exploration of the substrate. Therefore, the inoculation method is a key factor to consider in designing sustainable agricultural strategies based on EPF. The results of this work expand on the existing knowledge of plant–EPF–soil relations, and they underscore the importance of the inoculation method and the use of EPF to improve plant Fe nutrition in calcareous substrates beyond their role as biocontrol agents.

6. Acknowledgments

We thank the *Research Support Service* (SCAI) of the University of Córdoba for technical assistance in using its X–ray diffractometer and transmission electron microscope.

CAPÍTULO IV

7. Supplementary data

S1 Table. Fe_{DTPA} and pH (mean ± standard error, n = 4) Of the culture medium after 35 days of fungal growth in the presence of different sources of Fe (0 or 250 mg L⁻¹) and the presence or absence of CaCO₃ (0 or 300 mg L⁻¹).

	With CaCO ₃		Without CaCO ₃	
	Fe _{DTPA} (mg L ⁻¹)	pH _{KCl}	Fe _{DTPA} (mg L ⁻¹)	pH _{KCl}
No Fungus				
Control ^(a)	0.0 ± 0.0c	8.4 ± 0.1a	0.0 ± 0.0b	5.2 ± 0.1b
Ferrihydrite	2.0 ± 0.2a	6.8 ± 0.0b	5.1 ± 0.4a	5.2 ± 0.0b
Hematite	0.3 ± 0.0bc	8.4 ± 0.0a	0.4 ± 0.1b	5.7 ± 0.1a
Goethite	0.5 ± 0.1b	8.4 ± 0.1a	0.4 ± 0.0b	5.4 ± 0.0ab
p value	<0.001	<0.001	<0.001	0.008
<i>B. bassiana</i>				
Control ^(a)	0.0 ± 0.0b	7.9 ± 0.0c	0.0 ± 0.0c	7.5 ± 0.3b
Ferrihydrite	20.2 ± 2.7a	8.5 ± 0.0a	32.3 ± 1.2a	8.5 ± 0.0a
Hematite	3.7 ± 0.1b	8.3 ± 0.1b	9.7 ± 1.0b	7.9 ± 0.1b
Goethite	3.7 ± 0.1b	8.0 ± 0.1c	7.4 ± 0.7b	8.0 ± 0.2ab
p value	<0.001	<0.001	<0.001	0.014
<i>I. farinosa</i>				
Control ^(a)	0.0 ± 0.0c	8.4 ± 0.1ab	0.0 ± 0.0c	7.3 ± 1.0
Ferrihydrite	24.2 ± 1.5a	8.5 ± 0.1a	29.7 ± 1.4a	8.3 ± 0.1
Hematite	8.0 ± 0.6b	8.3 ± 0.1bc	14.5 ± 1.2b	8.3 ± 0.0
Goethite	7.6 ± 0.4b	8.3 ± 0.0c	13.6 ± 0.7b	8.0 ± 0.1
p value	<0.001	0.023	<0.001	0.491
<i>M. brunneum</i>				
Control ^(a)	0.0 ± 0.0c	6.5 ± 0.4b	0.0 ± 0.0c	4.8 ± 0.1d
Ferrihydrite	32.5 ± 3.3a	7.3 ± 0.3a	94.6 ± 17.5a	6.8 ± 0.1a
Hematite	14.6 ± 2.4b	7.1 ± 0.1ab	34.8 ± 1.6b	6.4 ± 0.0b
Goethite	11.6 ± 6.3bc	6.8 ± 0.3ab	28.7 ± 7.3bc	6.0 ± 0.0c
p value	<0.001	0.203	<0.001	<0.001

^(a) Control (0 mgFe L⁻¹)

Different letters indicate significant differences between the levels of each factor according to the LSD *post hoc* test at *p* <0.05

CAPÍTULO IV

S2 Table. Chlorophyll total concentration (CTC). Chlorophyll total concentration (CTC) extracted from the two youngest leaves of each plant (mean \pm standard error, $n = 4$) according to the combination of fungus and inoculation method at the end of the experiment (93 DAS).

	<i>B. bassiana</i>	<i>M. brunneum</i>
	CTC ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	CTC ($\mu\text{g cm}^{-2}$)
Seed dressing	19.4 \pm 2.0ab	16.6 \pm 1.1bc
Soil treatment	21.8 \pm 2.5a	19.0 \pm 1.5ab
Leaf spraying	14.3 \pm 1.4b	21.5 \pm 1.3a
Control	14.6 \pm 0.9b	14.6 \pm 0.9c
<i>p</i> value	0.029	0.011

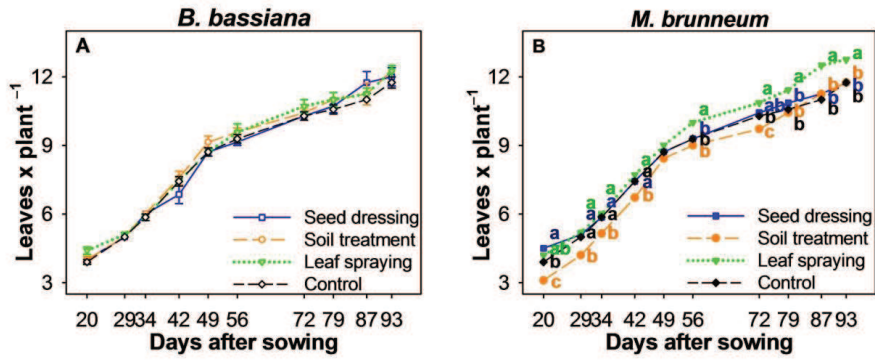
Different letters indicate significant differences between the levels of each factor according to the LSD *post hoc* test at $p < 0.05$

S3 Table. Total macronutrient contents of plant biomass and root parameters. Analysis of variance of macronutrient contents in the above-ground biomass, root dry weight and root length of sorghum (mean \pm standard error, $n = 4$) as a function of the fungus and inoculation method at the end of the experiment (93 DAS).

	Above-ground plant biomass				Root		
	<i>B. bassiana</i>	K	P	Ca	Mg	Root dry weight	Root length
		(g kg^{-1})	(g kg^{-1})	(g kg^{-1})	(g kg^{-1})	(g)	(m)
Seed dressing		40.1 \pm 3.1	2.93 \pm 0.35	3.9 \pm 0.4	4.0 \pm 0.3	0.65 \pm 0.08	21.15 \pm 2.39a
Soil treatment		36.5 \pm 2.5	2.92 \pm 0.42	4.1 \pm 0.0	4.1 \pm 0.2	0.82 \pm 0.11	21.59 \pm 1.37a
Leaf spraying		32.2 \pm 3.2	2.10 \pm 0.05	4.3 \pm 0.3	3.2 \pm 0.1	1.00 \pm 0.09	22.53 \pm 2.75a
Control		39.9 \pm 1.7	2.95 \pm 0.26	4.0 \pm 0.3	3.7 \pm 0.3	0.83 \pm 0.07	12.16 \pm 1.26b
<i>p</i> value		0.188	0.187	0.775	0.137	0.106	0.031
<i>M. brunneum</i>							
Seed dressing		37.5 \pm 2.1	2.69 \pm 0.29	4.0 \pm 0.3	3.5 \pm 0.3	0.90 \pm 0.08	18.21 \pm 2.67bc
Soil treatment		36.0 \pm 1.7	2.33 \pm 0.22	3.6 \pm 0.3	3.0 \pm 0.0	0.80 \pm 0.11	26.54 \pm 0.81a
Leaf spraying		34.7 \pm 2.0	2.48 \pm 0.12	3.8 \pm 0.2	3.1 \pm 0.1	0.92 \pm 0.06	21.34 \pm 2.27ab
Control		39.9 \pm 1.7	2.95 \pm 0.26	4.0 \pm 0.3	3.7 \pm 0.3	0.83 \pm 0.07	12.16 \pm 1.26c
<i>p</i> value		0.278	0.560	0.647	0.136	0.728	0.004

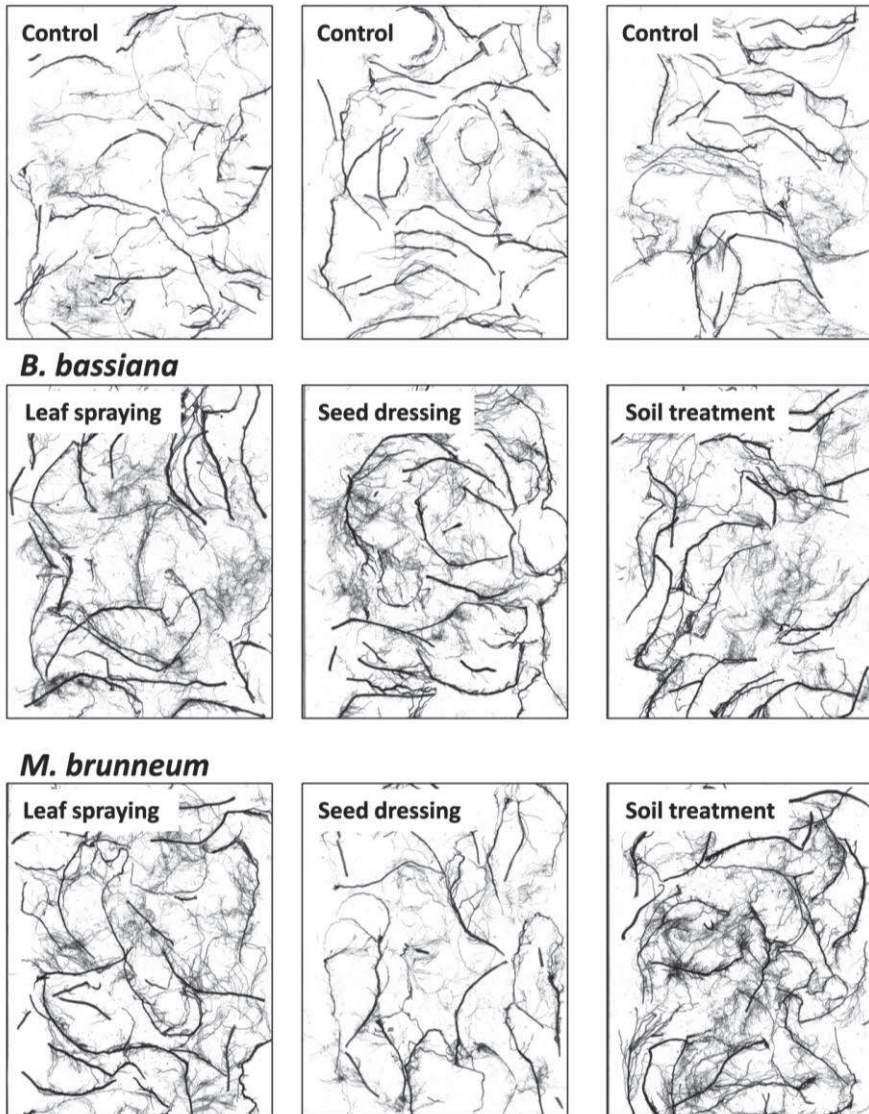
Different letters indicate significant differences between the levels of each factor according to the LSD *post hoc* test at $p < 0.05$

CAPÍTULO IV



S1 Fig.. Number of leaves. Number of plant leaves for each treatment (mean \pm standard error, $n = 4$) applied to *B. bassiana* (A) and *M. brunneum* (B). Different letters indicate significant differences between different levels of each factor according to an LSD *post hoc* test at $p < 0.05$.

CAPÍTULO IV



S2 Fig. Images of the roots of plants that were inoculated with the fungi by using different inoculation methods.

CAPÍTULO IV

8. References

- Akello J, Dubois T, Coyne D, Kyamanywa S. 2009. The effects of *Beauveria bassiana* dose and exposure duration on colonization and growth of tissue cultured banana (*Musa* sp.) plants. *Biological Control* 49: 6–10. doi: 10.1016/j.biocontrol.2008.06.002
- Akutse KS, Maniania NK, Fiaboe KKM, Van den Berg J, Ekesi S. 2013. Endophytic colonization of *Vicia faba* and *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae) by fungal pathogens and their effects on the life–history parameters of *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae). *Fungal Ecology* 6: 293–301. doi: 10.1016/j.funeco.2013.01.003
- Bayat F, Mirlohi A, Khodambashi M. 2009. Effects of endophytic fungi on some drought tolerance mechanisms of tall fescue in a hydroponics culture. *Russian Journal of Plant Physiology* 56:510–516. doi: 10.1134/S1021443709040104
- Behie S, Bidochka M. 2014. Ubiquity of insect–derived nitrogen transfer to plants by endophytic insect–pathogenic fungi: an additional branch of the soil nitrogen cycle. *Applied and Environmental Microbiology* 80: 1553–1560. doi: 10.1128/AEM.03338–13
- Behie S, Zelisko P, Bidochka M. 2012. Endophytic insect–parasitic fungi translocate nitrogen directly from insects to plants. *Science* 336: 1576–1577. doi: 10.1126/science.1222289
- Behl R, Ruppel S, Kothe E, Narula N. 2007. Wheat x *Azotobacter* x VA Mycorrhiza interactions towards plant nutrition and growth—a review. *Journal of Applied Botany and Food Quality* 81: 95–109.
- Bennett A, Leifert C, Whipps J. 2003. Survival of the biocontrol agent *Coniothyrium munitans* and *Bacillus subtilis* MBI 600 introduced into pasteurised, sterilised and non–sterile soils. *Soil Biology and Biochemistry* 35: 1565–1573. doi: 10.1016/j.soilbio.2003.08.001
- Benton J, Wolf B, Mills H. 1991. *Plant Analysis Handbook* Georgia, USA: Micro–Macro Publishing, Inc. Athens. ISBN: 1–878148–001
- Bidochka M, Kamp A, Lavender T, Dekoning J, De Croos J. 2001. Habitat association in two genetic groups of the insect–pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: Uncovering cryptic species? *Applied and Environmental Microbiology* 67: 1335–1342. doi: 10.1128/AEM.67.3.1335–1342.2001
- Bing L, Lewis L. 1991. Suppression of *Ostrinia–nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera, Pyralidae) by endophytic *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. *Environmental Entomology* 20: 1207–1211. doi: 10.1093/ee/20.4.1207
- Bouma T, Nielsen K, Koutstaal B. 2000. Sample preparation and scanning protocol for computerised analysis of root length and diameter. *Plant and Soil* 218: 185–196. doi: 10.1023/A:1014905104017
- Brunauer S, Emmet P, Teller E. 1938. Adsorption of gases in multimolecular layers. *Journal of the American Chemical Society* 60: 309–319. doi: 10.1021/ja01269a023

CAPÍTULO IV

- Chen Y, Barak P. 1982. Iron nutrition of plants in calcareous soils. *Advances in Agronomy* 35: 217–240. doi: 10.1016/S0065–2113(08)60326–0
- Colombo C, Barrón V, Torrent J. 1994. Phosphate adsorption and desorption in relation to morphology and crystal properties of synthetic hematites. *Geochimica Cosmochimica Acta* 58: 1261–1269. doi:10.1016/0016–7037(94)90380–8
- Cornelissen J, Lavorel S, Garnier E, Diaz S, Buchman N, Gurvich D. 2003 A handbook of protocols for standardized and easy measurement of plant functional traits worldwide. *Australian Journal of Botany*. 51(4): p. 335–380. doi: 10.1071/BT02124
- del Campillo M, Torrent J. 1992. Predicting the influence of iron chlorosis in calcareous soils of southern Spain. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 23: 399–416. doi: 10.1080/01904168809363910
- Felice MR, de Domenico I, Li L, Ward D, Bartok B, Musci G, Kaplan J. 2005. Post-transcriptional Regulation of the Yeast High Affinity Iron Transport System. *The Journal of Biological Chemistry* 280: 22181–22190. doi: 10.1074/jbc.M414663200
- Fitter A. 2002. Characteristics and Functions of Root Systems. In Kafkafi U, Waisel Y, Eshel A (Eds.). *Plant Roots: The Hidden Half*: CRC Press; pp: 15–32. doi: 10.1201/9780203909423.ch2
- Fomina M, Hillier S, JM C, Melville K, Alexander I, Gadd G. 2005. Role of Oxalic Acid Overexcretion in Transformations of Toxic Metal Minerals by *Beauveria caledonica*. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 371–381. doi:10.1128/AEM.71.1.371–381.2005
- García JE, Posadas JB, Peticari, A, Lecuona, RE. 2011. *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin promotes growth and has endophytic activity in tomato plants. *Advances in Biological Research* 5: 22–27.
- Garnier E. 1992. Growth Analysis of Congeneric Annual and Perennial Grass Species. *Journal of Ecology*. 80(4): p. 665–675. doi: 10.2307/2260858
- Garrido–Jurado I, Torrent J, Barron V, Corpas A, Quesada–Moraga E. 2011. Soil properties affect the availability, movement, and virulence of entomopathogenic fungi conidia against puparia of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Biological Control* 58: 277–285. doi: 10.1016/j.biocontrol.2011.05.017
- Georgatsou E and Alexandraki D. 1994. Two distinctly regulated genes are required for ferric reduction, the first step of iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 14: 3065–3073.
- Greenfield M, Gómez–Jiménez M, Ortiz V, Vega F, Kramer M, Parsa S. 2016. *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* endophytically colonize cassava roots following soil drench inoculation. *Biological Control* 95: 40–48. doi:10.1016/j.biocontrol.2016.01
- Gruber B, Kosegarten H. 2002. Depressed growth of non–chlorotic vine grown in calcareous soil is an iron deficiency symptom prior to leaf chlorosis. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 165: 1–119. doi: 10.1002/1522–2624(200202)165:1<111::AID–JPLN111>3.0.CO;2–B

CAPÍTULO IV

Grusak M, Pearson J, Marentes E. 1999. The physiology of micronutrient homeostasis in field crops. *Field Crops Research* 60: 41–56. doi: 10.1016/S0378–4290(98)00132–4

Gurulingappa P, Sword G, Murdoch G, Mcgee P. 2010. Colonization of crop plants by fungal entomopathogens and their effects on two insect pests when in planta. *Biological Control* 55: 34–41. doi: 10.1016/j.biocontrol.2010.06.011

Harman G, Shoshitashvili M. 2007. The mechanisms and applications of symbiotic opportunistic plant symbionts. Vurro M, Gressel J (Eds.). Netherlands: Springer

Hider R, Kong X. 2010. Chemistry and biology of siderophores. *Natural Product Reports* 27: 637–657. doi: 10.1039/b906679a

Humber R. 1997. Identification of entomopathogenic fungi. In *Manual of Techniques in Insect Pathology*. Washington, USA: Lacey, L. (Eds.); pp. 153–185. ISBN : 978–0–12–386899–2

Hummel I, Vile D, Violle C, Devaux J, Ricci B, Blanchard A, Garnier E, Roumet C. 2007. Relating root structure and anatomy to whole-plant functioning in 14 herbaceous Mediterranean species. *New Phytologist* 173: 313–321. doi: 10.1111/j.1469–8137.2006.01912.x

Hussein Rana H, Ezzat S, Nabil H. 2014. Effects of Some Abiotic Factors on Mycelial Growth Rates of *Isaria fumosorosea* Wize and Laboratory Evaluation against *Planococcus citri* (Risso). *Journal of Entomology* 11: 338–344. doi:10.3923/je.2014.338.344

Imsande J. 1998. Iron, sulfur, and chlorophyll deficiencies: A need for an integrative approach in plant physiology. *Physiologia Plantarum* 103: 139–144. doi: 10.1034/j.1399–3054.1998.1030117.x

Issaly N, Chauveau H, Aglevor F, Durand A. 2005. Influence of nutrient, pH and dissolved oxygen on the production of *Metarhizium flavoviride* Mf189 blastospores in submerged batch culture. *Process Biochemistry* 40: 1425–1431. doi: 10.1016/j.procbio.2004.06.029

Jaber L, Enkerli J. 2016. Effect of seed treatment duration on growth and colonization of *Vicia faba* by endophytic *Beauveria bassiana* and *Metarhizium brunneum*. *Biological Control* 103: 187–195. doi: 10.1016/j.biocontrol.2016.09.008

Jiménez C, Arias D. 2004. Fine roots biomass and density distribution in a sucesional gradient in the Costa Rican northern region. *Kurú: Revista Forestal*. Vol. 1

Joseph E, Cario S, Simon A, Wörle M, Mazzeo R, Junier P, Job D. 2012. Protection of metal artifacts with the formation of metal–oxalates complexes by *Beauveria bassiana*. *Frontiers in Microbiology* 2: 270. doi: 10.3389/fmicb.2011.00270

Kabaluk J, Ericsson J. 2007. *Metarhizium anisopliae* seed treatment increases yield of field corn when applied for wireworm control. *Agronomy Journal*. 99: 1377–1381. doi: 10.2134/agronj2007.0017N

Kaplan C, Kaplan J. 2009. Iron acquisition and transcriptional regulation. *Chemical Reviews* 109: 4536–4552. doi: 10.1021/cr9001676

CAPÍTULO IV

Katznelson H. 1940. Survival of microorganisms inoculated into sterilized soil. *Soil Science* 49: 211–218.

Klepper B. 1991. Root–shoot relationships. In Marcel Dekker I (Eds.) *Plant roots: the hidden half*. New York; pp: 265–286. ISBN 0–8247–8393–X

Korcak R. 1987. *Iron deficiency chlorosis*: John Wiley y Sons, Ltd. doi: 10.1002/9781118060827.ch5

Landa BB, López–Díaz C, Jiménez–Fernández D, Montes–Borrego M, Muñoz–Ledesma FJ, Ortiz–Urquiza A, Quesada–Moraga E. 2013. In–planta detection and monitorization of endophytic colonization by a *Beauveria bassiana* strain using a new–developed nested and quantitative PCR–based assay and confocal laser scanning microscopy. *Journal of Invertebrate Pathology* 114: 128–138. doi: 10.1016/j.jip.2013.06.007

Lesuisse E, Blaiseau P, Dancis A, Camadro J. 2001. Siderophore uptake and use by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 147: 289–298. doi:10.1099/00221287–147–2–289

Li Z, Bai T, Dai L, Hu S. 2016. A study of organic acid production in contrast between two phosphate solubilizing fungi: *Penicillium oxalicum* and *Aspergillus niger*. *Scientific Reports* 6: 25313. doi: 10.1038/srep25313

Liao X, O'Brien T, Fang W, St Leger R. 2014. The plant beneficial effects of *Metarhizium* species correlate with their association with roots. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98: 7089–7096. doi: 10.1007/s00253–014–5788–2

Liaud N, Giniés C, Navarro D, Fabre N, Crapart S, Herpoël–Gimbert I. 2014. Exploring fungal biodiversity: organic acid production by 66 strains of filamentous fungi. *Fungal Biology and Biotechnology* 1: 1. doi:10.1186/s40694–014–0001–z

Lindsay W, Norvell W. 1978. Development of DTPA soil test for zinc, iron, manganese and copper. *Soil Science Society of America Journal* 42: 421–428. doi: 10.2136/sssaj1978.03615995004200030009x

Maniania N, Sithanatham S, Ekesi S, Ampong–Nyarko K, Baumgartner J, Lohr B. 2003. Field trial of the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* for control of onion thrips, *Thrips tabaci*. *Crop Protection* 22: 553–559.

Marschner H. 1995. *Mineral nutrition of higher plants* London: Academic Press; ISBN: 9780124735439

Mehra O, Jackson M. 1958. Iron Oxide Removal from Soils and Clays by a Dithionite–Citrate System Buffered with Sodium Bicarbonate. *Clays Clay Miner* 7: 317–327. doi: 10.1346/CCMN.1958.0070122

Montilla I, Parra M, Torrent J. 2003. Zinc phytotoxicity to oilseed rape grown on zinc–loaded substrates consisting of Fe oxide–coated and calcite sand. *Plant and Soil* 257: 227–236. doi: 10.1023/A:1026289807917

CAPÍTULO IV

Mukherjee P, Horwitz B, Herrera–Estrella A, Schmoll M, Kenerley C. 2013. *Trichoderma* Research in the Genome Era. Annual Review of Phytopathology 51: 105–129. doi: 10.1146/annurev-phyto-082712-102353

Murphy J, Riley JP. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. Analytica Chimica Acta 27: 31–36. doi: 10.1016/S0003-2670(00)88444-5

Olsen S, Watanabe F, Cospser H, Larson W, Nelson L. 1954. Residual phosphorus availability in long-time rotations on calcareous soils. Soil Science 78: 141–151. doi: 10.1097/00010694-195408000-00008

Otgonjargal K, Purevjargal G, Enkhbold N, Battur B. 2015. Optimum and Tolerance pH Range, Optimal Temperature of the Local Strain *Beauveria bassiana*–G07. International Journal of Agriculture Innovations and Research. Vol. 4

Padmavathi J, Uma Devi K, Uma Maheswara Rao C. 2003. The optimum and tolerance pH range is correlated to colonial morphology in isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* – a potential biopesticide. World Journal of Microbiology and Biotechnology 19: 469–477. doi:10.1023/A:1025151000398

Parsa S, Ortiz V, Gómez–Jiménez M, Kramer M, Vega F. 2016. Root environment is a key determinant of fungal entomopathogen endophytism following seed treatment in the common bean, *Phaseolus vulgaris*. Biological Control. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.09.001>

Parsa S, Ortiz V, Vega F. 2013. Establishing Fungal Entomopathogens as Endophytes: Towards Endophytic Biological Control. Journal of Visualized Experiments. 74: p. 1 – 5. doi:10.3791/50360

Philpott C, Protchenko O. 2008. Response to Iron Deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*. Eukaryotic Cell. 7: 20–27. doi: 10.1128/EC.00354-07

Posada F, Vega F. 2005. Establishment of the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota; Hypocreales) as an endophyte in cocoa seedlings (*Theobroma cacao*). Mycologia 97: 1195–1200. doi: 10.3852/mycologia.97.6.1195

Quesada–Moraga E, Herrero–Asensio N, Zabalgoageazcoa I. 2014. Entomopathogenic and nematophagous fungal endophytes. In Verma VC, Gange AC (Eds.). Advances in Endophytic Research. India: Springer; pp: 85–99. doi: 10.1007/978-81-322-1575-2_4

Quesada–Moraga E, Landa B, Muñoz Ledesma J, Jiménez Díaz R, Santiago Álvarez C. 2006. Endophytic colonisation of opium poppy, *Papaver somniferum*, by an entomopathogenic *Beauveria bassiana* strain. Mycopathologia 161: 323–329. doi: 10.1007/s11046-006-0014-0

Quesada–Moraga E, Navas–Cortés JA, Maranhao EAA, Ortiz–Urquiza A, Santiago–Álvarez C. 2007. Factors affecting the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in natural and cultivated soils. Mycological Research 111: 947–966. doi: 10.1016/j.mycres.2007.06.006

CAPÍTULO IV

Rahmatullah, Torrent J. 2000. Phosphorus dynamics and uptake by wheat in a model calcite–ferrihydrite system. *Soil Science* 165: 803–812. doi: 10.1097/00010694–200010000–00005

Resquín–Romero G, Garrido–Jurado I, Delso C, Ríos–Moreno A, Quesada–Moraga E. 2016. Transient endophytic colonizations of plants improve the outcome of foliar applications of mycoinsecticides against chewing insects. *Journal of Invertebrate Pathology* 136: 23–31. doi: 10.1016/j.jip.2016.03.003

Reyes I, Torrent J. 1996. Citrate–ascorbate as a highly selective extractant for poorly crystalline iron oxides. *Soil Science Society of America Journal* 61: 1647–1654. doi:10.2136/sssaj1997.03615995006100060015x

Rombolà A, Tagliavini M. 2006. Iron nutrition of fruit tree crops. In Barton L, Abadia J, editors. *Iron Nutrition in Plants and Rhizospheric Microorganisms*: Springer; pp: 61–83. doi: 10.1007/1–4020–4743–6_3

Ryser P and Lambers H. 1995. Root and leaf attributes accounting for the performance of fast– and slow– growing grasses at different nutrient supply. *Plant and Soil* 170: 251–265.

Salazar A, Gerding M, France A, Sandoval M. 2007. Displacement of conidia of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* in columns of three soil series. *Agricultura Tecnica* 67: 236–243. Available from: <http://hdl.handle.net/1807/36672>

Sánchez–Rodríguez A, Barrón V, del Campillo MC, Quesada–Moraga E. 2016. The entomopathogenic fungus *Metarhizium brunneum*: a tool for alleviating Fe chlorosis. *Plant and Soil* 406: 1–17. doi: 10.1007/s11104–016–2887–0

Sánchez–Rodríguez A, del Campillo, MC, Quesada–Moraga E. 2015. *Beauveria bassiana*: An entomopathogenic fungus alleviates Fe chlorosis symptoms in plants grown on calcareous substrates. *Scientia Horticulturae* 197: 193–202. doi: 10.1016/j.scienta.2015.09.029

Sánchez–Rodríguez AR, Raya–Díaz S, Zamarreño AM, García–Mina JM, del Campillo MC, Quesada–Moraga E. 2017. An endophytic *Beauveria bassiana* strain increases spike production in bread and durum wheat plants and effectively controls cotton leafworm (*Spodoptera littoralis*) larvae. *Biological Control*. doi: 10.1016/j.biocontrol.2017.01.012

Sanvisens N and Puig S. 2011. Causes and consequences of nutritional iron deficiency in living organisms. En: *Biology of starvation in humans and other organisms*. Nova Science Publishers, pp: 245–276. ISBN: 978–1–61122–546–4

Sasan R, Bidochka M. 2012. The insect–pathogenic fungus *Metarhizium reberthsii* (Clavicipitaceae) is also an endophyte that stimulates plant root development. *American Journal of Botany* 99: 101–107. doi: 10.3732/ajb.1100136

Sazanova K, Osmolovskaya N, Schiparev S, Yakkonen K, Kuchaeva L, Vlasov D. 2015. Organic acids induce tolerance to zinc– and copper–exposed fungi under various growth conditions. *Current Microbiology* 70: 520–527. doi: 10.1007/s00284–014–0751–0

Scheepmaker J, Butt T. 2010. Natural and released inoculum levels of entomopathogenic fungal biocontrol agents in soil in relation to risk assessment and in accordance with EU

CAPÍTULO IV

regulations. *Biocontrol Science and Technology* 20: 503–552. doi: 10.1080/09583150903545035

Schwertmann U. 1964. Differenzierung der Eisenoxide des Bodens durch Extraktion mit Ammoniumoxalat-Lösung. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. 105: 194–202. doi: 10.1002/jpln.3591050303

Schwertmann U, Cornell R. 2000. *Iron Oxides in the laboratory: Preparation and characterization*. Second, Revised (Eds.): WILEY-VCH Verlag GmbH; ISBN: 978-3-527-29669-9

Soundarapandian P, Chandra R. 2007. Mass Production of Endomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycota; Hyphomycetes) in the Laboratory. *Research Journal of Microbiology* 2: 690–695. doi: 10.3923/jm.2007.690.695

Stenico E, Hansen PFT, Mazza J, Tsai S. 2005. Growth and siderophore production of *Xylella fastidiosa* under iron-limited conditions. *Microbiological Research* 160: 429–436. doi: 10.1016/j.micres.2005.03.007

St. Leger R. 2008. Studies on adaptations of *Metarhizium anisopliae* to life in the soil. *Journal of Invertebrate Pathology* 98: 271–276. doi:10.1016/j.jip.2008.01.007

Tagliavini M, Rombolà A. 2001. Iron deficiency and chlorosis in orchard and vineyard. *European Journal of Agronomy* 15: 71–92. doi: 10.1016/S1161-0301(01)00125-3

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

Torrent J, Barrón V. 2003. Iron oxides in relation to the colour of Mediterranean soils. In Rodríguez JLP (Eds.) *Applied study of cultural heritage and clays*. Madrid. CL.: Consejo Superior de Investigaciones Científicas; pp. 377–386. ISBN: 978-84-00-08197-3

Torrent J, Barrón V, Schwertmann U. 1990. Phosphate adsorption and desorption by goethites differing in crystal morphology. *Soil Science Society of America Journal*. 54: 1007–1012. doi:10.2136/sssaj1990.03615995005400040012x

Trevors J. 1996. Sterilization and inhibition of microbial activity in soil. *Journal of Microbiological Methods*. 26: 53–59. doi: 10.1016/0167-7012(96)00843-3

Vega, FE, Goettel MS, Blackwell M, Chandler D, Jackson MA, Keller S, Koike M. 2009. Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. *Fungal Ecology* 2: 149–159. doi: 10.1016/j.funeco.2009.05.001

Vega FE, Meyling N, Luangsa-ard J, Blackwell M. 2012. Fungal entomopathogens. In: Vega FE y Kaya HE (Eds.) *Insect Pathology*. Second Edition ed. San Diego: Academic Press, pp: 171–220. doi:10.1016/B978-0-12-384984-7.00006-3

Vempati R, Loeppert R. 1986. Synthetic ferrihydrite as a potential iron amendment in calcareous soils. *Journal of Plant Nutrition* 9: 1039–1052. doi: 10.1080/01904168609363504

CAPÍTULO IV

Villegas J, Williams R, Nantais L, Archambault J, Fortin J. 1996. Effects of N source on pH and nutrient exchange of extramatrical mycelium in a mycorrhizal Ri T-DNA transformed root system. *Mycorrhiza* 6: 247–251. doi: 10.1007/s005720050132

Wahl S, Ryser P. 2000. Root tissue structure is linked to ecological strategies of grasses. *New Phytologist*. 148(3): p. 459–471. doi: 10.1046/j.1469–8137.2000.00775.x

Waller F, Achatz B, Baltruschat H, Fodor J, Becker K, Fischer M, Heier T, Hückelhoven R, Neumann C, von Wettstein D, Franken P, Kogel KH. 2005. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 102: 13386–13391. doi: 10.1073/pnas.0504423102

Warcup J. 1950. Effect of partial sterilization by steam or formalin on the fungus flora of an old forest nursery soil. *Transactions of the British Mycological Society* 34:519–533. doi: 10.1016/S0007–1536(51)80036–6.

Wintermans J, de Mots A. 1965. Spectrophotometric characteristics of chlorophylls a and b and their pheophytins in ethanol. *Biochimica et Biophysica Acta* 109: 448–453. doi: 10.1016/0926–6585(65)90170–6

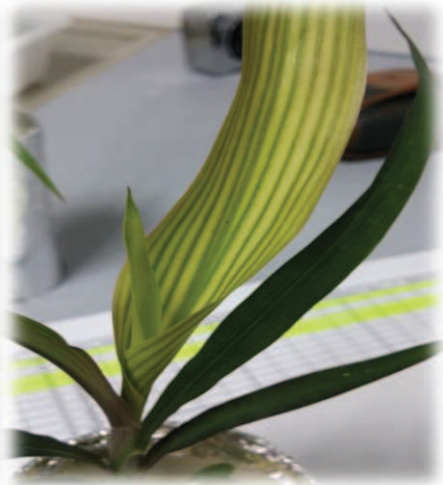
Wraight S, Jackson M, Kock S. 2001. Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents. In Butt T, Jackson C, Magan N. *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential*. Wallingford, UK; pp. 253–287. doi: 10.1079/9780851993560.0253

Wyrebek M, Huber C, Sasan R, Bidochka, M. 2011. Three sympatrically occurring species of *Metarhizium* show plant rhizosphere specificity. *Mycrobiology Society* 157: 2904–2911. doi: 10.1099/mic.0.0511102–0

Zasoski R, Bureau R. 1977. A rapid nitric-perchloric acid digestion method for multielement tissue analysis. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 8: 425–436. doi: 10.1080/00103627709366735

CAPÍTULO V:

Discusión general



CAPÍTULO V

Desde la llegada del siglo XXI son numerosos los trabajos que revelan el gran potencial de los ascomicetos mitospóricos entomopatógenos (AME) para el control de plagas y para su desarrollo como micoinsecticidas. Su modo de acción por contacto los hace muy efectivos contra fitófagos masticadores, con aparato picador chupador, contra plagas de insectos del suelo, e incluso frente a insectos sinantrópicos (Quesada–Moraga et al., 2006a; Ortiz–Urquiza et al., 2009; Garrido–Jurado et al., 2011). El carácter endofítico de estos hongos extiende sus posibilidades, pues pueden ser utilizados para la protección sistémica de la planta frente a insectos barrenadores e incluso frente a insectos picadores y masticadores que se alimentan de los tejidos colonizados de la planta (Schulz et al., 2002; Quesada–Moraga et al., 2006a; Sree y Padmaja, 2008; Rohlf s y Churchill, 2011; Ríos–Moreno et al., 2016). Las cepas seleccionadas para la presente tesis doctoral, EAMa 01/58–Su de *M. brunneum* y EABb 04/01–Tip de *B. bassiana* han mostrado alta virulencia para distintas plagas de insectos, en tratamientos aéreos y de suelo, así como capacidad de colonizar a la planta de forma endofítica, y de protegerla frente al ataque de insectos barrenadores e insectos ectófitos masticadores y picadores–chupadores (Quesada–Moraga et al., 2006a; Resquín–Romero et al., 2016). Los resultados de esta tesis doctoral enfatizan los beneficios del comportamiento endofítico de cepas de AME sobre distintas plantas cultivadas, no sólo por su ya demostrado impacto en el control de plagas, sino también sobre su crecimiento y nutrición férrica (Tabla 1).

El capítulo II pone de manifiesto el doble beneficio que aportan los AME, por un lado, como herramienta eficaz para el control de insectos y ácaros, pero además, sobre la producción del cultivo, lo que les aporta un gran potencial para ser desarrollados en programas de Control Integrado

CAPÍTULO V

de Plagas y Producción Integrada de Cultivos. Trabajos realizados dentro de nuestro grupo de investigación ya habían informado de que la colonización endofítica transitoria asociada a la aplicación por pulverización foliar de la cepa EABb 04/01–Tip de *B. bassiana* a plantas de alfalfa, tomate y melón, origina porcentajes significativos de mortalidad del 10 al 50% en larvas de *S. littoralis* alimentadas con las hojas colonizadas de estos cultivos (Resquín–Romero et al., 2016). Nuestros resultados con plantas de trigo blando, extienden este efecto a esta gramínea, con mortalidades larvarias de *S. littoralis* del 56.7% cuando las larvas se alimentaron con hojas colonizadas endofíticamente con la cepa EABb 04/01–Tip, tanto vía pulverización, como mediante la aplicación al suelo o a la semilla, con porcentajes de mortalidad del 53.3% y del 30.0% respectivamente, valores de mortalidad adicionales a los que produciría el hongo aplicado de forma directa sobre las larvas del fitófago, que se aproxima al 80% (Ríos–Moreno et al., 2017a). Llama la atención que nunca se observó crecimiento fúngico a partir de los cadáveres de las larvas infectadas, lo que sugiere que la mortalidad causada por estos hongos en insectos masticadores, cuando los ciclos de infección se inician por la vía digestiva, al ingerir tejido vegetal colonizado endofíticamente, podría estar asociada a la producción de metabolitos insecticidas (Ríos–Moreno et al., 2016; 2017a; 2017b).

En este capítulo se demostró también que *B. bassiana* fue capaz de establecerse endofíticamente en raíces, tallos y hojas mediante diferentes métodos de inoculación, e incluso su transmisión en trigo blando y trigo duro, descrita por primera vez en adormidera (Quesada–Moraga et al., 2006b), con porcentajes de colonización de alrededor del 13.5%. Las aplicaciones al suelo y a la semilla incrementaron la producción de espigas,

CAPÍTULO V

obteniéndose rendimientos un 40% más altos que en las plantas control, especialmente en la primera cosecha con el tratamiento a la semilla.

En los últimos años, el interés por la agricultura sostenible ha dado lugar al creciente desarrollo y uso de bioinoculantes comerciales (bacterias y/o hongos) para aumentar la movilización de nutrientes y aumentar su disponibilidad para el cultivo de plantas (Owen et al., 2014). En condiciones de deficiencia de Fe, las mejoras en el crecimiento de las plantas y las concentraciones de nutrientes (Fe, Mn y Cu) que hemos observado en esta tesis están directamente relacionadas con un efecto beneficioso general debido a la inoculación con las cepas de AME utilizadas (Sánchez-Rodríguez et al., 2015).

En este sentido, en los capítulos III y IV se profundiza mediante ensayos *in vitro* en los mecanismos o estrategias que utilizan los AME para solubilizar nutrientes y aumentar su biodisponibilidad, destacando la importancia del Fe. Para ello, se han utilizado como sustratos de análisis diferentes óxidos de Fe de diferente naturaleza, cristalinos como la goethita o hematites, de solubilidad muy baja, o amorfos o poco cristalinos como la ferrihidrita, que son fuentes de Fe más solubles (Vempati y Loeppert, 1988). En respuesta a la baja disponibilidad de Fe, la mayoría de los hongos desarrollan mecanismos específicos para obtener Fe para su propia supervivencia (Behie y Bidochka, 2014). Los hongos poseen sistemas de adquisición de Fe muy eficientes, tales como la producción de sideróforos con una alta afinidad por el ion Fe^{3+} que median la absorción de Fe (Lesuisse et al., 2001; Philpott y Protchenko, 2008; Kaplan y Kaplan, 2009; Sanvisens y Puig, 2011). Además, los hongos también tienen mecanismos de reducción de Fe (ferroxidación y permeación) para la reducción extracelular de Fe^{3+} inorgánico a Fe^{2+} mediante la producción de

CAPÍTULO V

metaloreductasas que incrementan su solubilidad (Georgatsou y Alexandraki, 1994; Felice et al., 2005; Sanvisens y Puig, 2011). Finalmente, también tienen la capacidad de producir ácidos orgánicos (p.ej. ácido cítrico, ácido tartárico, ácido oxálico, ácido succínico, etc.) que favorecen la solubilidad del Fe (Bidochka y Khachatourians, 1991; Fomina et al., 2005). Nuestros resultados ponen de manifiesto que las cepas EABb 04/01–Tip, EAMa 01/58–Su y EAIf 10/04–Msp son capaces de adaptar sus estrategias de asimilación a las condiciones ambientes. La predominancia de una u otra estrategia se evidencia con el hecho de que *M. brunneum* fue capaz de reducir el pH del medio de cultivo en condiciones calcáreas (en presencia de CaCO_3), pero no fue así en ausencia de CaCO_3 , probablemente porque la solubilidad del Fe no se vio afectada por el pH alcalino del sustrato calizo, ni tampoco en presencia de ferrihidrita como fuente de Fe, condiciones bajo las cuales el Fe estaba más disponible (por ser un óxido de Fe con mayor superficie específica en comparación con los otros utilizados). En estas situaciones, el hongo no necesita producir ácidos orgánicos, y puede escoger como estrategia dominante la producción de sideróforos.

La combinación de factores tales como la dosis y método de aplicación es muy importante a la hora de seleccionar la cepa fúngica, ya que determinará no sólo el porcentaje de colonización en la planta, sino la capacidad de persistir en el ambiente durante un período de tiempo deseable, sin que produzca un efecto perjudicial para la salud o el medio ambiente, como indica la normativa reguladora (ej. Reglamento (CE) Nº 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo de 21 de octubre de 2009). Las dosis habituales que se suelen utilizar en los tratamientos de campo están alrededor de 10^6 – 10^8 conidios g^{-1} de suelo, además estas

CAPÍTULO V

dosis son las más recomendadas para el control biológico en los ensayos de laboratorio (Scheepmaker y Butt, 2010), sin embargo, se sabe que el efecto de la dosis de hongo depende del cultivo en particular (Gurulingappa et al., 2010).

De esta forma, los capítulos III y IV profundizan en la importancia de la dosis y método de aplicación en diferentes especies de plantas (monocotiledóneas y dicotiledóneas) en condiciones de cultivo variable (suelos arcillosos o arenosos, y sustratos calizos), y sobre el efecto de la colonización endofítica en la nutrición férrica de la planta. Aunque *M. brunneum* sea un hongo competente en la rizosfera (Bidochka et al., 2001) y *B. bassiana* sea un componente importante de la microbiota edáfica (Quesada–Moraga et al., 2007), se ha constatado que sus propágulos en el suelo están sometidos a los normales procesos de lixiviación y translocación, con una reducción en el tiempo en el número de UFC después de un tratamiento por inundación (Garrido–Jurado et al., 2011; Yousef et al., 2013). Nuestros resultados muestran que las dosis de 5×10^6 y 5×10^8 conidios ml^{-1} son las más adecuadas para aplicar al suelo y producir efectos positivos significativos sobre el crecimiento y la nutrición de las plantas. En el capítulo III fue muy evidente la mejora del estatus nutricional del sorgo, muy sensible a la clorosis en suelo calizo. Además, pudimos apreciar claramente el efecto de promoción del crecimiento en las plantas de girasol, con una mayor altura de la planta y una aceleración de la floración que se reflejó en un incremento del diámetro y el peso seco de las inflorescencias lo que se traduce en una mayor producción.

En el capítulo IV se observaron los mismos resultados positivos en la promoción del crecimiento y la mejora de la nutrición que veníamos obteniendo a lo largo de los diferentes ensayos. Pero en este caso, el

CAPÍTULO V

método de inoculación fue el factor decisivo; los tres métodos de inoculación (tratamiento de semilla, aplicación al suelo y pulverización foliar) fueron eficaces para promover el crecimiento de las raíces en relación con el grupo control, pero el tratamiento del suelo resultó más eficaz ya que se alcanzó una mayor longitud radicular y también del número de raíces finas. Las raíces finas (<0.2 mm de diámetro) se han relacionado con la capacidad de las plantas para explorar el suelo y obtener agua y nutrientes de ella (Garnier, 1992; Ryser y Lambers, 1995; Wahl y Ryser, 2000; Hummel et al., 2007). Estos hallazgos son altamente significativos para la absorción de nutrientes como Fe, Mn y Cu por las plantas, especialmente cuando son escasos.

Aunque los tres métodos de inoculación utilizados tuvieron efectos positivos sobre el crecimiento y estatus nutricional de las plantas, el tratamiento del suelo resultó ser el método más efectivo, relacionado posiblemente a la mayor persistencia del hongo en el sustrato, lo que puede explicar también los mayores porcentajes de re-aislamiento del hongo en los diferentes tejidos vegetales. Los efectos positivos en el cultivo fueron diversos, por un lado se observó un incremento en la concentración de clorofila (SPAD) de hojas jóvenes y por tanto, disminución de los síntomas de clorosis férrica; una mayor altura de las plantas de sorgo y girasol, mayor floración en girasol, y mayor número de espigas en trigo, lo que se traduce finalmente en un mayor rendimiento del cultivo. Como pusieron de manifiesto los parámetros relacionados con la raíz, el tratamiento del suelo además resultó en una mejor exploración del sustrato. Por lo tanto, el método de inoculación es un factor clave a considerar en el diseño de estrategias agrícolas sostenibles basadas en la aplicación de AME.

CAPÍTULO V

Los resultados de este trabajo amplían el conocimiento existente sobre la relación planta–AME–suelo y subrayan la importancia del método de inoculación y el uso de AME para mejorar la nutrición del Fe en sustratos calcáreos más allá de su papel como agentes de biocontrol. Esta Tesis doctoral ha aportado un conocimiento más amplio sobre los beneficios del uso de los AME para la Producción Integrada de Cultivos, no sólo por ser una herramienta eficaz para el control biológico, sino también para explotar nuevos roles relacionados con el alivio o mejora frente a síntomas producidos por estreses abióticos que afectan a los cultivos. La capacidad de los AME para promover el crecimiento de las plantas y aumentar los rendimientos, mejorando su nutrición férrica, al mismo tiempo que las protege de insectos dañinos, dibuja un horizonte nuevo en la producción y protección integrada de cultivos, pero además, lanza fantásticos retos científicos para revelar la naturaleza de la relación planta–endófito–fitófago.

CAPÍTULO V

Tabla 1. Resumen de los resultados obtenidos. Continua 1/4

Capítulo	Hongo	Sustrato	Planta	Inoculación	Tejido colonizado	Efectos sobre estrés ABIÓTICO
CAP. II	EABb 04/01– Tip	Suelo arenoso	Trigo blando (*)	Semilla	Hoja, tallo, raíz, grano	Incrementó número de espigas Incrementó un 40% el rendimiento del grano Incrementó longitud de la raíz
				Suelo	Hoja, tallo, raíz, grano	Incrementó número de espigas
				Foliar	Hoja, tallo	
			Trigo duro	Semilla	Hoja, tallo, raíz, grano	
				Suelo	Hoja, tallo, raíz, grano	Incrementó número de espigas
				Foliar	Hoja, tallo, raíz	

(*) En este ensayo con trigo blando se realizó un control de larvas del fitófago *Spodoptera littoralis*, obteniendo unos porcentajes de mortalidad del 30% con el tratamiento de semilla, 53.3% con el tratamiento al suelo y 56.7 % con la pulverización foliar. Obteniendo un tiempo de supervivencia medio de 3 días.

CAPÍTULO V

Tabla 1. Resumen de los resultados obtenidos. Continúa 2/4

Capítulo	Hongo	Sustrato	Planta	Inoculación	Tejido colonizado	Efectos sobre estrés ABIÓTICO	
CAP. III	EABb 04/01–Tip	Czapek–dox + óxidos de Fe	<i>in vitro</i>			Incrementó pH Aumentó disponibilidad de Fe	
	EAMa 01/58–Su	Czapek–dox + óxidos de Fe	<i>in vitro</i>			Sin efecto en pH Aumentó disponibilidad de Fe	
	EAlf 10/01–Msp	Czapek–dox + óxidos de Fe	<i>in vitro</i>			Incrementó pH Aumentó disponibilidad de Fe	
	EAMa 01/58–Su			Sorgo	Suelo	No evaluado	Incrementó SPAD
				Girasol	Suelo	No evaluado	No hubo diferencias en SPAD Incrementó altura de la planta Aumentó diámetro y peso fresco de las inflorescencias Aceleró periodo de floración
				Sorgo	Suelo	No evaluado	No hubo diferencias en SPAD
				Girasol	Suelo	No evaluado	No hubo diferencias en SPAD Incrementó altura de la planta Aumentó diámetro y peso fresco de las inflorescencias Aceleró periodo de floración

CAPÍTULO V

Tabla 1. Resumen de los resultados obtenidos. Continúa 3/4

Capítulo	Hongo	Sustrato	Planta	Inoculación	Tejido colonizado	Efectos sobre estrés ABIÓTICO
CAP. IV	EABb 04/01–Tip	Czapek–dox + óxidos de Fe + CaCO ₃	<i>in vitro</i>			Incrementó pH Aumentó disponibilidad de Fe
	EAMa 01/58–Su	Czapek–dox + óxidos de Fe + CaCO ₃	<i>in vitro</i>			Disminuyó pH Aumentó disponibilidad de Fe
	EAlf 10/01–Msp	Czapek–dox + óxidos de Fe + CaCO ₃	<i>in vitro</i>			Incrementó pH Aumentó disponibilidad de Fe
	EABb 04/01–Tip	Czapek–dox + óxidos de Fe	<i>in vitro</i>			Incrementó pH Aumentó disponibilidad de Fe
	EAMa 01/58–Su	Czapek–dox + óxidos de Fe	<i>in vitro</i>			Sin efecto en pH Aumentó disponibilidad de Fe
	EAlf 10/01–Msp	Czapek–dox + óxidos de Fe	<i>in vitro</i>			Incrementó pH Aumentó disponibilidad de Fe
	EABb 04/01–Tip	Sustrato calizo	Sorgo	Semilla	Hoja, tallo, raíz	Incrementó SPAD Incrementó altura Incrementó SRL raíces Incrementó Fe, Mn y Cu
				Suelo	Hoja, tallo, raíz	Incrementó SPAD Incrementó altura Incrementó SRL raíces Incrementó Fe, Mn y Cu
				Foliar	Hoja, tallo, raíz	Incrementó SPAD Redujo altura Incrementó SRL raíces Incrementó Fe, Cu

CAPÍTULO V

Tabla 1. Resumen de los resultados obtenidos. Continúa 4/4						
Capítulo	Hongo	Sustrato	Planta	Inoculación	Tejido colonizado	Efectos sobre estrés ABIÓTICO
CAP. IV	EAMa 01/58–Su	Sustrato calizo	Sorgo	Semilla	Hoja, tallo, raíz	Incrementó SPAD Incrementó altura Incrementó SRL raíces Incrementó Fe y Mn, disminuyó Zn
				Suelo	Hoja, tallo, raíz	Incrementó SPAD Incrementó altura Incrementó SRL raíces Incrementó Fe, Mn y Cu, disminuyó Zn
				Foliar	Hoja, tallo, raíz	Incrementó SPAD Redujo altura Incrementó SRL raíces Incrementó Fe, Mn, disminuyó Zn

Referencias

Behie S y Bidochka MJ. 2014. Nutrient transfer in plant–fungal symbioses. *Trends in Plant Science* 19: 734–740. doi.org/10.1016/j.tplants.2014.06.007

Bidochka M, Kamp A, Lavender T, Dekoning J, De Croos J. 2001. Habitat association in two genetic groups of the insect–pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: Uncovering cryptic species? *Applied and Environmental Microbiology* 67: 1335–1342. doi: 10.1128/AEM.67.3.1335–1342.2001

Bidochka MJ y Khachatourians G. 1991. The implication of metabolic acids produced by *Beauveria bassiana* in pathogenesis of the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. *Journal of Invertebrate Pathology* 58: 106–117. doi.org/10.1016/0022–2011(91)90168–P

Felice MR, de Domenico I, Li L, Ward D, Bartok B, Musci G, Kaplan J. 2005. Post–transcriptional Regulation of the Yeast High Affinity Iron Transport System. *The Journal of Biological Chemistry* 280: 22181–22190. doi: 10.1074/jbc.M414663200

Fomina M, Hillier S, JM C, Melville K, Alexander I, Gadd G. 2005. Role of Oxalic Acid Overexcretion in Transformations of Toxic Metal Minerals by *Beauveria caledonica*. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 371–381. doi:10.1128/AEM.71.1.371–381.2005

Garnier E. 1992. Growth Analysis of Congeneric Annual and Perennial Grass Species. *Journal of Ecology*. 80(4): p. 665–675. doi: 10.2307/2260858

Garrido–Jurado I, Torrent J, Barron V, Corpas A, Quesada–Moraga E. 2011. Soil properties affect the availability, movement, and virulence of entomopathogenic fungi conidia against puparia of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Biological Control* 58: 277–285. doi: 10.1016/j.biocontrol.2011.05.017

Georgatsou E and Alexandraki D. 1994. Two distinctly regulated genes are required for ferric reduction, the first step of iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 14: 3065–3073.

Gurulingappa P, Sword G, Murdoch G, Mcgee P. 2010. Colonization of crop plants by fungal entomopathogens and their effects on two insect pests when in planta. *Biological Control* 55: 34–41. doi: 10.1016/j.biocontrol.2010.06.011

Hummel I, Vile D, Violle C, Devaux J, Ricci B, Blanchard A, Garnier E, Roumet C. 2007. Relating root structure and anatomy to whole–plant functioning in 14 herbaceous Mediterranean species. *New Phytologist* 173: 313–321. doi: 10.1111/j.1469–8137.2006.01912.x

Kaplan C, Kaplan J. 2009. Iron acquisition and transcriptional regulation. *Chemical Reviews* 109: 4536–4552. doi: 10.1021/cr9001676

CAPÍTULO V

Lesuisse E, Blaiseau P, Dancis A, Camadro J. 2001. Siderophore uptake and use by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 147: 289–298. doi:10.1099/00221287-147-2-289

Ortiz–Urquiza A, Garrido–Jurado I, Santiago–Álvarez C y Quesada–Moraga E. 2009. Purification and characterisation of proteins secreted by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* with insecticidal activity against adults of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera:Tephritidae). *Pest Management Science* 65: 1130–1139. doi: 10.1002 / ps.1803.

Owen D, Williams A, Griffith G y Withers P. 2014. Use of commercial bio–inoculants to increase agricultural production through improved phosphorous acquisition. *Applied Soil Ecology* 86: 41–54. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.09.012>

Philpott C, Protchenko O. 2008. Response to Iron Deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*. 7: 20–27. doi: 10.1128/EC.00354–07

Quesada–Moraga E, Carrasco–Díaz J y Santiago–Álvarez C. 2006a. Insecticidal and antifeedant activities of proteins secreted by entomopathogenic fungi against *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera; Noctuidae). *Journal of Applied Entomology* 130: 442–452. doi. 10.1111/j.1439–0418.2006.01079.x

Quesada–Moraga E, Landa B, Muñoz Ledesma J, Jiménez Díaz R, Santiago Álvarez C. 2006b. Endophytic colonisation of opium poppy, *Papaver somniferum*, by an entomopathogenic *Beauveria bassiana* strain. *Mycopathologia* 161: 323–329. doi: 10.1007/s11046–006–0014–0

Quesada–Moraga E, Navas–Cortés JA, Maranhao EAA, Ortiz–Urquiza A, Santiago–Álvarez C. 2007. Factors affecting the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in natural and cultivated soils. *Mycological Research* 111: 947–966. doi: 10.1016/j.mycres.2007.06.006

Resquín–Romero G, Garrido–Jurado I, Delso C, Ríos–Moreno A, Quesada–Moraga E. 2016. Transient endophytic colonizations of plants improve the outcome of foliar applications of mycoinsecticides against chewing insects. *Journal of Invertebrate Pathology* 136: 23–31. doi: 10.1016/j.jip.2016.03.003

Ríos–Moreno A, Garrido–Jurado I, Resquín–Romero G, Arroyo–Manzanares AL, Quesada–Moraga E. 2016. Destruxin A production by *Metarhizium brunneum* strains during transient endophytic colonisation of *Solanum tuberosum*. *Biocintrol Science and Technology* 26: 1574–1585. <http://dx.doi.org/10.1080/09583157.2016.1223274>

Ríos–Moreno A, Garrido–Jurado I, Raya–Ortega MC, Quesada–Moraga E. 2017a. Quantification of fungal growth and destruxin A during infection of *Galleria mellonella* larvae by *Metarhizium brunneum*. *Journal of Invertebrate Pathology* 149:29–35. doi: 10.1016/j.jip.2017.06.007

Ríos–Moreno A, Garrido–Jurado, Quesada–Moraga E. 2017b. Treatment with *Metarhizium brunneum* BIPESCO5 and EAMa 01/58–Su strains (Ascomycota; Hypocreales) are low risk for the generalist predator *Chrysoperla carnea*. *Journal of Pest Science*, pp: 1–10. doi: 10.1007/s10340–017–0905–5

CAPÍTULO V

Rohlf M y Churchill ACL. 2011. Fungal secondary metabolites as modulators of interactions with insects. *Fungal Genetics and Biology* 48: 23–34. doi: 10.1016/j.fgb.2010.08.008

Ryser P and Lambers H. 1995. Root and leaf attributes accounting for the performance of fast- and slow- growing grasses at different nutrient supply. *Plant and Soil* 170: 251–265.

Sánchez-Rodríguez A, del Campillo, MC, Quesada-Moraga E. 2015. *Beauveria bassiana*: An entomopathogenic fungus alleviates Fe chlorosis symptoms in plants grown on calcareous substrates. *Scientia Horticulturae* 197: 193–202. doi: 10.1016/j.scienta.2015.09.029

Sanvisens N and Puig S. 2011. Causes and consequences of nutritional iron deficiency in living organisms. En: *Biology of starvation in humans and other organisms*. Nova Science Publishers, pp: 245–276. ISBN: 978–1–61122–546–4

Scheepmaker J, Butt T. 2010. Natural and released inoculum levels of entomopathogenic fungal biocontrol agents in soil in relation to risk assessment and in accordance with EU regulations. *Biocontrol Science and Technology* 20: 503–552. doi: 10.1080/09583150903545035

Schulz B, Boyle C, Draeger S, Römmert AK, Krohn K. 2002. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research* 106: 996–1004. doi.org/10.1017/S0953756202006342

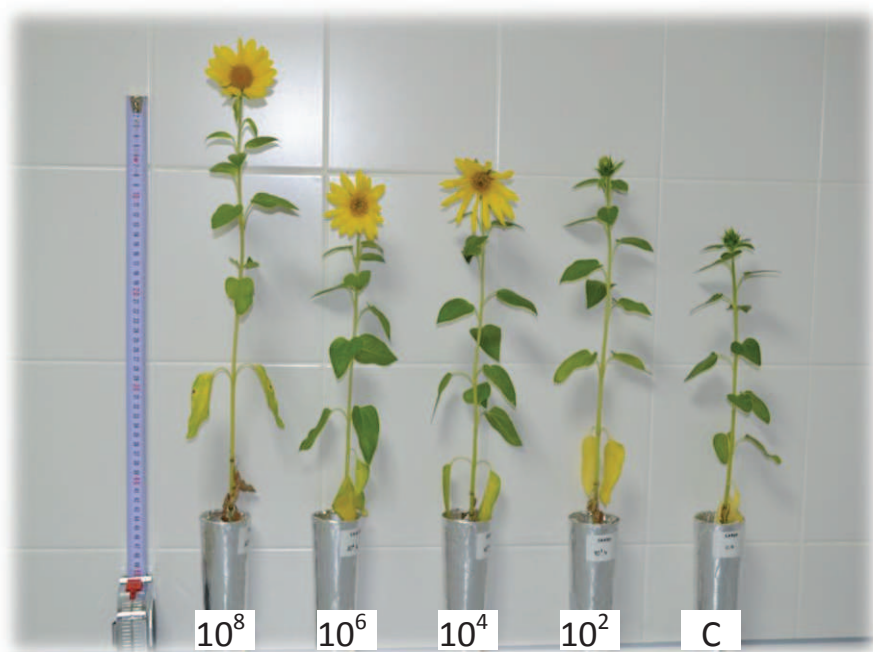
Sree KS y Padmaja V. 2008. Destruxin from *Metarhizium anisopliae* induces oxidative stress effecting larval mortality of the polyphagous pest *Spodoptera litura*. *Journal of Applied Entomology* 132: 68–78. 10.1111/j.1439–0418.2007.01239.x

Vempati RK, Loeppert RH. 1988. Chemistry and mineralogy of Fe-containing oxides and layer silicates in relation to plant available iron. *Journal of Plant Nutrition* 11:1557–1574. doi: 10.1080/01904168809363910

Wahl S, Ryser P. 2000. Root tissue structure is linked to ecological strategies of grasses. *New Phytologist*. 148(3): p. 459–471. doi: 10.1046/j.1469–8137.2000.00775.x

Yousef M, Lozano-Tovar M, Garrido-Jurado I y Quesada-Moraga E. 2013. Biocontrol of *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae) with *Metarhizium brunneum* and its extracts. *Journal of Economic Entomology* 106: 1118–1125

CAPÍTULO VI: Conclusiones



Conclusiones

A continuación se enumeran las conclusiones de los diferentes capítulos de esta Tesis Doctoral. Las conclusiones 1 y 2 pertenecen al capítulo II de la tesis, manuscrito “Sánchez-Rodríguez AR, Raya-Díaz S, Zamarreño AM, García-Mina JM, del Campillo MC, Quesada-Moraga E. 2017. An endophytic *Beauveria bassiana* strain increases spike production in bread and durum wheat plants and effectively controls cotton leafworm (*Spodoptera littoralis*) larvae. *Biological Control*, pp: 1049–9644. doi:10.1016/j.biocontrol.2017.01.012 [Factor de Impacto JCR: 2.3, Q1 (11/93) en “Entomology”]”. Las conclusiones 1, 3, 4 y 5 corresponden al capítulo III que comprende el manuscrito “Raya-Díaz S, Quesada-Moraga E, Barrón V, del Campillo MC, Sánchez-Rodríguez AR. 2017. Redefining the dose of the entomopathogenic fungus *Metarhizium brunneum* (Ascomycota, Hypocreales) to increase Fe bioavailability and promote plant growth in calcareous and sandy soils. *Plant and Soil*. 418: 387–404. doi: 10.1007/s11104-017-3303-0. [Factor de Impacto JCR: 3.1, Q1 (11/83) en “Agronomy”]. Finalmente, las conclusiones 1, 3, 4 y 6 emanan del capítulo IV, y por tanto, del manuscrito “Raya-Díaz S, Sánchez-Rodríguez AR, Segura-Fernández JM, del Campillo MC, Quesada-Moraga E. 2017. Entomopathogenic fungi-based mechanisms for improved Fe nutrition in sorghum plants grown on calcareous substrates. *PLoS ONE* 12: (e0185903). doi: 10.1371/journal.pone.0185903 [Factor de Impacto JCR: 2.8, Q1 (15/64) en “Multidisciplinary sciences”].

1. Las cepas EABb 04/01–Tip de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. y EAMa 01/58–Su de *Metarhizium brunneum* Petch fueron capaces de colonizar los

CAPÍTULO VI

diferentes tejidos vegetales y la rizosfera de plantas herbáceas monocotiledóneas, sorgo, trigo blando, trigo duro, así como dicotiledóneas, girasol.

2. La cepa EABb 04/01–Tip aplicada mediante tratamiento a la semilla, al suelo o pulverización foliar, además de controlar eficientemente la población de larvas de *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera; Noctuidae) en plantas de trigo, aumenta el peso seco y la producción de espigas de este cereal.

3. Las cepas EAMa 01/58–Su, Bb 04/01–Tip y EAIf 10/01–Msp de *Isaria farinosa* (Holmsk.) Fr. (Ascomycota, Hypocreales), aumentan la disponibilidad de Fe bajo diferentes condiciones de fuente de Fe (óxidos de Fe de diferente cristalinidad y solubilidad); substrato de cultivo (calcáreo/no calcáreo, arcilloso/arenoso); y tipo de planta (monocotiledónea/dicotiledónea).

4. Las cepas EAMa 01/58–Su, Bb 04/01–Tip y EAIf 10/01–Msp son capaces de solubilizar Fe por múltiples mecanismos que implican quelación, reducción extracelular de Fe^{3+} a Fe^{2+} y acidificación, adaptando su estrategia en función de las condiciones ambientales. La cepa EAMa 01/58–Su de *M. brunneum* fue la más efectiva a este respecto, posiblemente como resultado de la acidificación de los medios calcáreos.

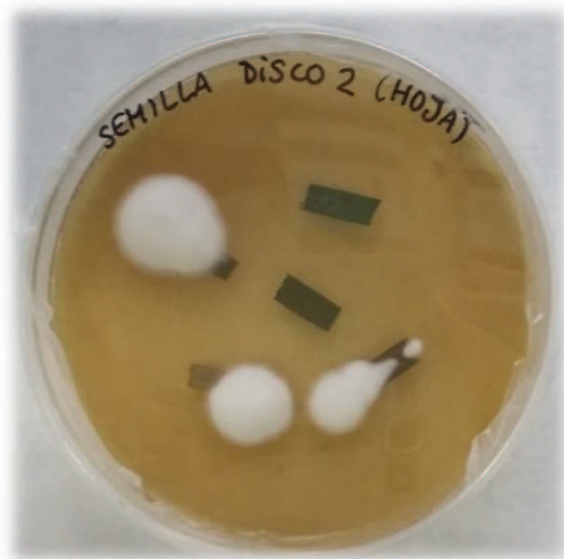
5. Las dosis 5×10^6 y 5×10^8 conidios ml^{-1} de la cepa EAMa 01/58–Su son óptimas para obtener efectos significativos en la promoción del crecimiento y observar mejoras en el estatus nutricional de las diferentes especies vegetales. Estas dosis permiten reducir la clorosis férrica en plantas de sorgo cultivadas en suelos calizos y permiten obtener mayores

CAPÍTULO VI

rendimientos en plantas de girasol, con mayor altura y peso seco de las inflorescencias.

6. Los tres métodos de inoculación (semilla, suelo o foliar) de las cepas EABb 04/01–Tip y EAMa 01/58–Su, son eficaces para conseguir la colonización endofítica en raíz, tallo y hojas de plantas de sorgo, aunque el tratamiento de suelo permite una mayor persistencia en el mismo de los conidios. Aunque todos los métodos de inoculación fueron eficaces para promover el crecimiento de las raíces en relación con el grupo control, el tratamiento del suelo destacó tanto en términos de Longitud Específica Relativa (“SRL”) como de Área Específica Relativa (“SRA”) y densidad de raíces finas.

CAPÍTULO VII: Anexos



1. Producción científica derivada de la Tesis Doctoral

1.1. Contribución a revistas internacionales de carácter científico (SCI)

- Sánchez–Rodríguez AR, Raya–Díaz S, Zamarreño AM, García–Mina JM, del Campillo MC, Quesada–Moraga E. 2017. An endophytic *Beauveria bassiana* strain increases spike production in bread and durum wheat plants and effectively controls cotton leafworm (*Spodoptera littoralis*) larvae. *Biological Control*, pp: 1049–9644. doi:10.1016/j.biocontrol.2017.01.012 [Factor de Impacto JCR: 2.3, Q1 (11/93) en “Entomology”].
- Raya–Díaz S, Quesada–Moraga E, Barrón V, del Campillo MC, Sánchez–Rodríguez AR. 2017. Redefining the dose of the entomopathogenic fungus *Metarhizium brunneum* (Ascomycota, Hypocreales) to increase Fe bioavailability and promote plant growth in calcareous and sandy soils. *Plant and Soil*. 418: 387–404. doi: 10.1007/s11104–017–3303–0. [Factor de Impacto JCR: 3.1, Q1 (11/83) en “Agronomy”].
- Raya–Díaz S, Sánchez–Rodríguez AR, Segura–Fernández JM, del Campillo MC, Quesada–Moraga E. 2017. Entomopathogenic fungi–based mechanisms for improved Fe nutrition in sorghum plants grown on calcareous substrates. *PLoS ONE* 12: (e0185903). doi:

CAPÍTULO VII

10.1371/journal.pone.0185903 [Factor de Impacto JCR: 2.8, Q1 (15/64) en “Multidisciplinary sciences”].

1.2. Aportaciones científicas en congresos:

- Autores: Raya–Díaz, Silvia; Sánchez–Rodríguez, AR; Quesada–Moraga, E. Título: *The entomopathogenic fungi Metarhizium brunneum, Beauveria bassiana and Isaria farinosa (Ascomycota, Hypocreales) increase the availability of iron*. Tipo de participación: Poster. Congreso: 15th Meeting of the IOBC–WPRS. Institución Organizadora: Working Group Microbial and Nematode Control of Invertebrate Pests. Lugar: Riga, Latvia. Fecha: 07/06/2015 – 11/06/2015.
- Autores: Raya–Díaz, Silvia; Sánchez–Rodríguez, AR; Quesada–Moraga, E. Título: *Los hongos entomopatógenos Metarhizium brunneum, Beauveria bassiana e Isaria farinosa (Ascomycota; Hypocreales) aumentan la movilización de hierro en el suelo, mejoran la nutrición y el crecimiento de la planta*. Tipo de participación: Comunicación. Congreso: IX Congreso nacional de entomología aplicada. XV Jornadas científicas de la SEEA. Institución Organizadora: Sociedad Española de Entomología Aplicada (SEEA). Lugar: Valencia, Valencia. Fecha: 19/10/2015 – 23/10/2015.
- Autores: del Campillo, M.C., Sánchez–Rodríguez, A.R., Raya–Díaz, S., Barrón, V., Torrent, J., Recena, R., Delgado, A. Título: *High level of Phosphate in soil decreases the content of zinc in wheat grain*. Tipo de participación: Poster. Congreso: 8th International

CAPÍTULO VII

Phosphorus Workshop (IPW8). Institución Organizadora: Leibniz–Institute for Baltic Sea Research Warnemuende (IOW). Lugar: Rostock, Germany. Fecha: 16/09/2016.

- Autores: Raya–Díaz, Silvia; Sánchez–Rodríguez, AR; Quesada–Moraga, E. Título: *Los hongos entomopatógenos aplicados para el control de plagas pueden aliviar la clorosis férrica y promover el crecimiento vegetal*. Tipo de participación: Comunicación. Congreso: X Congreso Nacional de Entomología Aplicada y XVI Jornadas Científicas de la SEEA. Institución Organizadora: Sociedad Española de Entomología Aplicada (SEEA). Lugar: Logroño, España. Fecha: 16/10/2017 – 20/10/2017.
- Autores: Raya–Díaz, Silvia; Sánchez–Rodríguez, AR; Quesada–Moraga, E. Título: *La disponibilidad de conidios del hongo entomopatógeno *Metarhizium brunneum* Pech (Ascomycota; Hypocreales) depende del caudal de agua y de las propiedades del suelo*. Tipo de participación: Póster. Congreso: X Congreso Nacional de Entomología Aplicada y XVI Jornadas Científicas de la SEEA. Institución Organizadora: Sociedad Española de Entomología Aplicada (SEEA). Lugar: Logroño, España. Fecha: 16/10/2017 – 20/10/2017.