

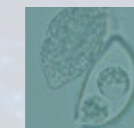
Sección IV

El futuro del control biológico



Capítulo 19

Los hongos endófitos en el control biológico de fitopatógenos e insectos plagas



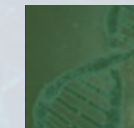
Capítulo 20

Nuevas estrategias para el control biológico de fitopatógenos



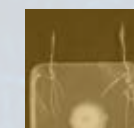
Capítulo 21

Nuevas estrategias para el control biológico de insectos



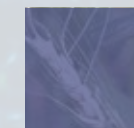
Capítulo 22

Las ómicas en el control biológico



Capítulo 23

Los volátiles microbianos y su potencial en el control biológico de fitopatógenos e insectos



Capítulo 24

Cambio climático, epidemiología vegetal y control biológico de fitopatógenos



Capítulo 25

Cambio climático y control biológico de insectos: visión y perspectiva de la situación

Capítulo 19

Los hongos endófitos en el control biológico de fitopatógenos e insectos plaga

Chapter 19

Endophytic fungi in biological control of phytopathogens and insect pests

Sandra M. Aragón,¹ Camilo Beltrán-Acosta¹

¹ Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA)

Contenido

Introducción.....854

Biología de los hongos endófitos854

Mecanismos de acción855

 Control biológico de fitopatógenos856

 Control biológico de insectos plaga858

Patrones de colonización862

 Técnicas tradicionales de reaislamiento de hongos endófitos863

 Técnicas moleculares para la detección de endófitos *in planta*864

Casos exitosos865

 Productos comerciales a base de hongos endófitos866

 Formulación y técnicas de aplicación869

Conclusiones y perspectivas871

Agradecimientos872

Referencias873

Resumen

Los endófitos constituyen un grupo de microorganismos que viven dentro de las plantas, los cuales mantienen asociaciones ligeramente perceptibles con sus plantas hospederas por al menos parte de su ciclo de vida. Su amplia biodiversidad, así como su capacidad de síntesis de metabolitos secundarios, promoción de crecimiento e inducción de resistencia sistémica, entre otras características, hacen de los hongos endófitos una alternativa de alto potencial para su aplicación en el manejo de insectos plaga y enfermedades en cultivos de importancia agrícola en Colombia y en el resto del mundo. Sin embargo, el estudio de microorganismos endófitos es un área relativamente nueva en la investigación: su biología y las bases moleculares de la interacción planta-endófito se encuentran aún poco exploradas para el caso de los hongos que colonizan plantas vasculares, lo cual reduce el espectro de desarrollo de nuevos productos a base de endófitos, dada la dificultad de generar una formulación que garantice la permanencia del hongo fuera de la planta hospedera y permita la penetración del mismo en diferentes momentos de desarrollo de esta. En este capítulo, se tratarán temas relacionados con su mecanismo de acción, patrones de colonización, formulación y técnicas de aplicación en campo y algunos casos exitosos del uso de hongos endófitos comercialmente disponibles para el manejo de algunos fitopatógenos e insectos plaga.

Palabras clave

Agente de control biológico, formulación, interacción planta-endófito, mecanismos de acción

Abstract

The endophytes constitute a group of microorganisms living inside plant tissues which maintain slightly perceptible associations with their host plants for at least part of their life cycle. Its wide biodiversity, as well as its ability to synthesize secondary metabolites, growth promotion, systemic induced resistance, among other characteristics, make endophytic fungi as a high potential alternative for its application in the management of pests and diseases in crops of agricultural importance in Colombia and the rest of the world. However, the study of endophytic microorganisms is a relatively new area in research, and its biology and the molecular basis of the plant-endophyte interaction are still hardly explored for the case of those fungi that can colonize vascular plants, which in turn reduces the spectrum of fungal species used for the development of new products based on endophytes given the difficulty of developing a formulation that guarantees the permanence of the fungus outside the plant and allows the penetration at different times of development of the host plant. In this chapter, issues related to endophytes mechanisms of action, colonization patterns, formulation and application techniques in the field and some successful cases of the use of endophyte fungi commercially available for the management of some phytopathogens and insect pests will be addressed.

Keywords

Biological control agent, formulation, mechanisms of action, plant-endophyte interaction

Introducción

En la década de los noventa, el comité de micología de la Sociedad Americana de Fitopatología (APS, por su sigla en inglés) organizó una de las primeras sesiones de discusión acerca de la aparición de hongos endófitos en plantas leñosas y gramíneas (Backman & Sikora, 2008). Esta discusión dio inicio a una serie de publicaciones que buscaban darle visibilidad ante la comunidad científica al fenómeno del endofitismo en estas especies.

Es así como en 1996 se publicó el libro acerca de la ecología y evolución de los endófitos editado por Scott y Carris (1996). Para ese entonces, la mayoría de la información recopilada hacía referencia a los hongos clavicipitáceos, los cuales, con frecuencia, se relacionaron con la reducción de la herbivoría en

pastos, producida por insectos y algunos mamíferos (Saikkonen et al., 1996).

Los endófitos se definen como microorganismos que viven durante todo o parte de su ciclo de vida dentro de los tejidos de plantas vivas sin ocasionar ningún síntoma o efecto negativo en su planta hospedera y cuya colonización interna es demostrable (Rodríguez, White, Arnold, & Redman, 2009; Saikkonen, Faeth, Helander, & Sullivan, 1998; Schulz & Boyle, 2006; Stone, Bacon, & White, 2000). Los hongos endófitos pueden distinguirse de las micorrizas por la ausencia de estructuras externas como hifas o micelio (Saikkonen et al., 1998); además, cuentan con capacidad para explotar diferentes fuentes nutricionales (Ownley, Gwinn, & Vega, 2010).

Biología de los hongos endófitos

Los hongos endófitos representan un continuo de hongos con respecto a su estado fisiológico, modo de infección, patrón de colonización, metabolismo secundario, estrategia de historia de vida y etapas de desarrollo y evolución, pero también con respecto a la categoría taxonómica del hongo y del hospedero implicados en la simbiosis (Schulz & Boyle, 2005). Las interacciones endófito-hospedero no son neutras, sino que implican un equilibrio de antagonismos que es independiente del órgano de la planta que esté infectado (Schulz & Boyle, 2005).

La clasificación funcional de los endófitos se basó en la filogenia y las características del ciclo de vida, y fueron asociados en dos grupos: los endófitos clavicipitáceos que se recuperan de algunas gramíneas y los endófitos no clavicipitáceos que se recuperan de tejidos asintomáticos de plantas no vasculares, helechos y plantas relacionadas, coníferas y angiospermas (Rodríguez et al., 2009).

Los endófitos clavicipitáceos (o clase 1) constituyen un pequeño número de especies de hongos dentro de la familia Clavicipitaceae que están

relacionados filogenéticamente y cuya transmisión es principalmente vertical, donde las plantas madre transmiten los hongos a las plantas hijas a través de semillas infectadas (Saikkonen, Ion, & Gyllenberg, 2002). Estos se limitan a algunas gramíneas de zonas templadas, se encuentran dentro de los brotes de las plantas y forman infecciones intercelulares sistémicas (Bischoff & White, 2005).

Los hongos endófitos de la clase 1 frecuentemente estimulan el desarrollo de la biomasa de la planta, le confieren tolerancia a la sequía y producen compuestos químicos que son tóxicos para los animales que las consumen, reduciendo así la herbivoría (Clay & Schardl, 2002). Sin embargo, los beneficios conferidos por estos hongos parecen depender de la especie huésped, de su genotipo y de las condiciones ambientales (Faeth et al., 2006; Faeth & Sullivan, 2003; Saikkonen, Helander, Faeth, Schulthess, & Wilson, 1999). Clay y Schardl (2002) dividen los endófitos clavicipitáceos en tres tipos:

- Tipo I: su ciclo de vida incluye especies sintomáticas y patogénicas, e implica la propagación del hongo

por ascosporas y la esterilización reproductiva del huésped. Los hongos son heterotálicos y requieren transferencia de espermacios entre tipos de apareamiento para una reproducción exitosa (Clay & Schardl, 2002).

- Tipo II: la reproducción de endófitos que infectan las gramíneas puede ser extremadamente plástica. En plantas individuales colonizadas, se pueden producir simultáneamente cuerpos fructíferos del hongo e inflorescencias de la planta y se describe como un mecanismo de interacción mixta (Clay & Schardl, 2002). Los hongos endófitos que producen este estado mixto se denominan *simbiontes pleiotrópicos* porque se transmiten verticalmente a través de semillas y horizontalmente por esporas (Schardl et al., 1997, citado por Clay & Schardl, 2002).
- Tipo III: estos permanecen dentro del tejido vegetal durante toda su vida, incluso durante la floración del hospedero, y presentan ciclo de vida asintomático. No producen esporas sexuales (ascosporas), por lo que no existe un mecanismo regular de recombinación genética para el hongo (Clay & Schardl, 2002). Los linajes de genotipos únicos de hongos se transmiten verticalmente a través de semillas por crecimiento de hifas en óvulos en desarrollo, proporcionando mayores oportunidades para las interacciones coevolutivas (Freeman, 1904, citado por Clay & Schardl, 2002).

Mecanismos de acción

Diferentes mecanismos de acción y aplicaciones de los microorganismos endófitos han sido descritos en la última década. Algunos de los beneficios de los endófitos en sus plantas hospederas se encuentran resumidos en la figura 19.1.

Los microorganismos endófitos pueden inducir la expresión de genes en las plantas para la producción de metabolitos secundarios en estas o en el medio donde se desarrollan, los cuales pueden ser extraídos para diferentes propósitos. Adicionalmente, estas sustancias pueden interferir con organismos potencialmente

De igual manera, los endófitos no clavicipitáceos (ENC) son altamente diversos y se subdividen en tres clases funcionales según los patrones de colonización del hospedero, su mecanismo de transmisión entre las generaciones del huésped (características del ciclo de vida), los niveles de biodiversidad *in planta* y los beneficios e interacción aportados al hospedero (importancia y función ecológica) (Rodríguez et al., 2009).

Los ENC de la clase 2 pueden crecer extensamente tanto en tejidos por encima como por debajo del nivel del suelo, pero su diversidad es limitada (Rodríguez et al., 2009). En la clase 3 los ENC están altamente localizados y restringidos a los tejidos que se encuentran encima del suelo, pero su diversidad es alta (> 20 especies registradas a partir de una hoja) (Arnold et al., 2003). La clase 4 coloniza extensamente la raíz y su diversidad no ha sido determinada (Rodríguez et al., 2009).

También existen diferencias en la colonización del hospedero y en el modo de transmisión. La clase 2 se transmite verticalmente (por semillas y sus partes, o por rizomas) y horizontalmente; además tiene capacidad de conferirle tolerancia a la planta hospedera frente al estrés específico del hábitat (pH, temperatura y salinidad) y de mejorar su crecimiento y la tolerancia al estrés hídrico (tolerancia a la sequía), así como ante factores no específicos del hábitat (Rodríguez et al., 2009). En contraste, las clases 3 y 4 solamente se transmiten de manera horizontal y le confieren beneficios al hospedero, ya que mejoran su crecimiento y su tolerancia a la sequía (Rodríguez et al., 2009).

patógenos de la planta hospedera y pueden inducir resistencia a enfermedades, mayor tolerancia a factores abióticos y cambio en la calidad de los productos de la planta.

Por lo tanto, los hongos endófitos pertenecen al grupo de agentes de control biológico microbianos en la regulación EU 1107/200 (Camino-Sánchez et al., 2011). Estos se definen como cualquier ente microbiológico, incluidos los virus y los hongos inferiores, celulares o no celulares, capaces de replicarse o de transferir material genético (Feldmann & Hommes, 2013).

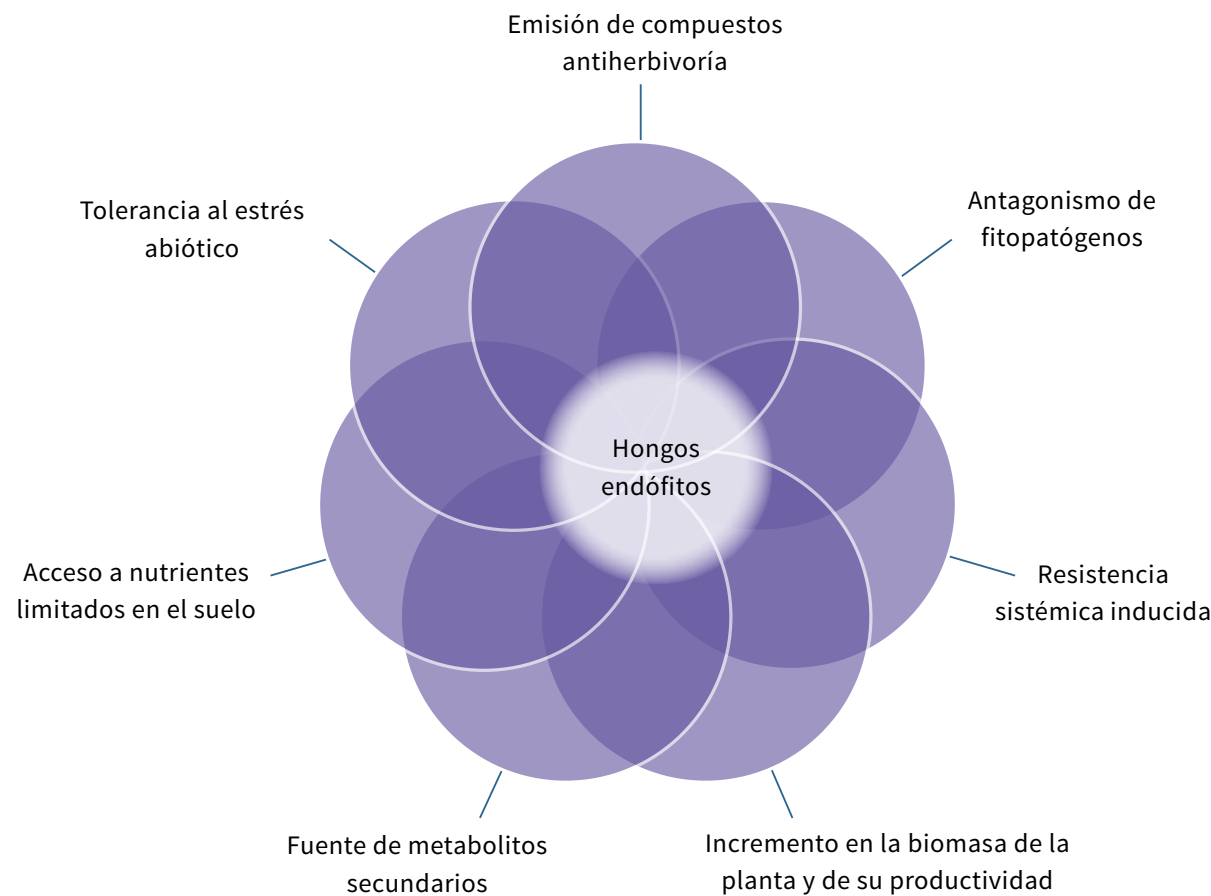


Figura 19.1. Efectos de la inoculación de plantas con hongos endófitos.

Fuente: Elaboración propia

Frente a un insecto plaga o un patógeno específico, los microorganismos endófitos pueden presentar uno o más mecanismos de acción que están relacionados con su capacidad como agentes de control biológico. Se agrupan principalmente en *mecanismos químicos o indirectos*, los cuales se dan por la producción de metabolitos primarios, metabolitos secundarios, enzimas o por compuestos orgánicos volátiles (VOC, por su sigla en inglés) efectivos que limitan e inhiben a un patógeno en particular u otros hongos endófitos competidores (Herre et al., 2007). Dentro de esta categoría se encuentran tres mecanismos específicos: 1) antibiosis, 2) competencia y 3) inducción de resistencia (Card, Johnson, Teasdale, & Caradus, 2016; Herre et al., 2007). El segundo grupo son los *mecanismos físicos o directos* que se generan por las interacciones de contacto entre hifas y células, conocido como *parasitismo directo* o *micoparasitismo* (Card et al., 2016; Herre et al., 2007).

Control biológico de fitopatógenos

Los endófitos pueden producir metabolitos secundarios que le confieren resistencia al hospedero contra factores bióticos como enfermedades causadas por nematodos, bacterias y hongos patógenos (Rodríguez et al., 2009).

Mecanismo indirecto, efecto de los VOC en el manejo de fitopatógenos

Un ejemplo de mecanismo indirecto es el caso de *Muscador yucatanensis*, hongo endófito aislado de hojas del árbol *Bursera simaruba* (Burseraceae), que

produce una mezcla de VOC identificados como octano, 2-pentilfurano, cariofileno, aromadendreno y derivados del naftaleno (Macías-Rubalcava et al., 2010), obtenidos de los extractos orgánicos del medio de cultivo y del micelio de 15 días de crecimiento. Estos compuestos fueron efectivos contra diferentes microorganismos fitopatógenos, como *Colletotrichum* sp., *Phomopsis* sp., *Alternaria solani*, *Rhizoctonia* sp., *Phytophthora capsici* y *Phytophthora parasitica*. Algunos de los VOC presentan también efectos aleloquímicos que generan inhibición en el crecimiento de la raíz de algunas especies vegetales como amaranto y tomate (Sánchez-Fernández et al., 2013; Macías-Rubalcava et al., 2010).

Tolerancia al estrés biótico y abiótico

El endófito *Piriformospora indica*, aislado de una espora de una micorriza arbuscular obtenida del suelo rizosférico de los arbustos *Prosopis juliflora* y *Ziziphus nummularia* en arenas del desierto en la India (Verma et al., 1998), indujo tolerancia al estrés salino moderado (100 mM de NaCl) en plántulas de cebada (*Hordeum vulgare*) luego de cuatro semanas de haberlas inoculado con el endófito. Estas plántulas, además, fueron más resistentes a los patógenos *Fusarium culmorum* y *Cochliobolus sativus* que afectan la raíz y causan importantes pérdidas económicas (Kumar et al., 2002). Dicho tratamiento, además, estimuló la producción de biomasa en comparación con el control, lo que dio lugar a un aumento general en el rendimiento de grano (Waller et al., 2005).

Así mismo, las raíces de las plantas colonizadas por *P. indica* mostraron mayor capacidad antioxidante debido a que las concentraciones de ácido ascórbico y de dehidroascorbato reductasa aumentaron sistemáticamente en las tres primeras semanas, lo cual sugiere que los niveles altos de estos antioxidantes, y en especial del ascorbato presente en las raíces, las protegen de la muerte celular provocada por los patógenos *F. culmorum* y *C. sativus* (Waller et al., 2005).

P. indica generó respuestas de defensa por resistencia sistémica inducida que se expresó en las hojas de cebada en las que se observó un 58 % de reducción de la infección causada por el mildew polvoso, causado por *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (Erysiphales), y se

encontraron frecuencias más altas de respuesta de reacción celular hipersensible, incluyendo muerte celular, lo que confirma que el patógeno evaluado fue controlado por una respuesta activa de la planta (Waller et al., 2005).

Competencia por nichos y nutrientes

Bolwerk, Lagopodi, Lugtenberg y Bloemberg (2005) evaluaron la cepa no patógena Fo47 de *Fusarium oxysporum*, la cual inhibe a *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* reduciendo los síntomas de la pudrición de la raíz y el cuello del tallo, observados simultáneamente en la raíz del tomate, para lo cual se necesita una concentración 50 veces mayor de esporas del biocontrolador que del patógeno. Esto asegura la germinación preferencial de las esporas de Fo47 por los componentes del exudado de las raíces, lo que reduce el crecimiento del patógeno hacia la raíz porque más hifas de Fo47 pueden competir por los nutrientes del exudado radicular y, por ende, reducir los nutrientes que podría utilizar el patógeno, a pesar de tener una pobre colonización (Bolwerk et al., 2005).

F. oxysporum Fo47 puede ocupar y reducir el número de sitios en que se fijan las esporas del patógeno para infectar y así reduce la colonización del patógeno *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, lo que resulta en un menor número de lesiones sintomáticas que las que presenta el testigo. La mayor concentración de inóculo de Fo47 compensa su crecimiento menos agresivo y, en consecuencia, contribuye a la competencia efectiva de nichos y nutrientes en la raíz del tomate. También es probable que la resistencia inducida desempeñe un papel en el manejo de la pudrición de la raíz y el cuello del tallo. El recubrimiento de semillas, como una estrategia de introducción del agente de control y plántulas con esporas Fo47, resultó en una reducción de la incidencia de la enfermedad del 100 al 75 % (Bolwerk et al., 2005).

De otra parte, la inoculación de tomate con Fo47 se correlacionó con niveles aumentados de PR-1, quitinasa, β -1,3-glucanasa y β -1,4-glucosidasa (Duijff, Pouhair, Olivain, Alabouvette, & Lemanceau, 1998; Fuchs, Moënné-Loccoz, & Défago, 1997), lo que indica que Fo47 actúa a través de un mecanismo

similar a la resistencia sistémica adquirida (SAR). Fo47 no causó síntomas visibles, mientras que la necrosis se asoció con la SAR inducida por patógenos. Por lo tanto, la reducción de la incidencia de la enfermedad pudo ser el resultado de Fo47 en la inducción de resistencia en el tomate.

Control biológico de insectos plaga

La colonización endófito, además de actuar en el control de fitopatógenos, es conocida por su capacidad de mejorar la resistencia contra insectos herbívoros debido a la modulación que ejerce en el sistema de defensa de las plantas que acompaña el proceso de inoculación (Dicke, Van Loon, & Soler, 2009; Pieterse, Poelman, Van Wees, & Dicke, 2013; Poelman et al., 2012). Adicionalmente, induce cambios en la calidad nutricional de las plantas y en la producción de varios compuestos de defensa de la planta, de tipo alcaloide (Thakur, Kaur, Kaur, & Singh, 2013).

Existe una amplia evidencia de la capacidad de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Lecanicillium lecanii* de colonizar tejidos vegetales de algunas especies, lo cual, dependiendo de la especie de planta y de la cepa del hongo, puede determinar si la interacción genera un beneficio para ambos, la planta y el hongo, o si por el contrario la interacción es neutra e incluso antagónica (Vidal & Jaber, 2015). Vidal y Jaber (2015) mencionan que existen algunos efectos adversos sobre los insectos que se alimentan de plantas colonizadas por estos endófitos, sin embargo, los datos son altamente variables e inconsistentes, lo cual no permite determinar los mecanismos que explican tales efectos. Por su parte, Vega (2008) reportó que, de una colecta de hongos endófitos en plantas de café, el hongo entomopatógeno *B. bassiana* y el antagonista de fitopatógenos *Clonostachys rosea*, a pesar de haber sido aislados de tejidos vegetales, fueron capaces de ocasionar patogenicidad en individuos de la broca del café *Hypothenemus hampei*.

Beauveria bassiana ha sido reportado colonizando exitosamente tejidos vegetales como hojas, raíces y tallos de plantas de fríjol *Phaseolus vulgaris* como

resultado de una inoculación artificial por medio de aspersión foliar o aplicación en el sustrato con una suspensión de sus esporas (Parsa, Ortiz, & Vega, 2013), al igual que en tallos de plantas de café (Posada, Aime, Peterson, Rehner, & Vega, 2007), en *Papaver somniferum* cv. *nigrum* (Quesada-Moraga et al., 2006a) y también en cultivos *in vitro* de banano *Musa* spp. En estos últimos se presentó un detrimento en la sobrevivencia de larvas de *Cosmopolites sordidus* (Akello, Dubois, Coyne, & Kyamanywa, 2008). De otra parte, la colonización endófito de plántulas de tomate y algodón con *B. bassiana* proporcionó una mayor protección contra los fitopatógenos *Rhizoctonia solani* y *Pythium myriotylum* a mayor concentración aplicada en semilla (Ownley et al., 2008).

Producción de metabolitos secundarios

Una de las principales características de los microorganismos endófitos es la producción de metabolitos secundarios. Algunos de estos compuestos son antibióticos con propiedades antifúngicas, antibacteriales e insecticidas, los cuales pueden inhibir eficazmente el desarrollo de otros microorganismos, incluyendo fitopatógenos (Gunatilaka, 2006). Estas propiedades hacen que la bioprospección de microorganismos endófitos haya tomado fuerza en los últimos años, dado su potencial de manejo dual de insectos plaga y de enfermedades, así como los diferentes mecanismos de acción que permiten obtener plantas con mayor producción de biomasa gracias a la promoción de crecimiento que confieren algunos de estos microorganismos (Strobel & Daisy, 2003).

En los sistemas planta-insecto-hongo endófito, la producción de metabolitos secundarios es importante para mantener la relación simbiótica entre la planta y el hongo debido a la capacidad de los hongos endófitos para alterar el comportamiento de alimentación de los invertebrados, así como la reducción de la tasa de desarrollo de los insectos que protege, a su vez, a la planta hospedera de la herbivoría (Rohlf & Churchill, 2011).

En el caso de los metabolitos tóxicos producidos por hongos endófitos se encuentran los emitidos por *Epicroë* spp. y *Neotyphodium* spp., los cuales, cuando colonizan pasturas de importancia agronómica, contribuyen en

la reducción de poblaciones de insectos asociados, mejorando así la aptitud ecológica de la planta y reduciendo la del insecto (Clay & Schardl, 2002). Uno de los compuestos producidos por el hongo *Epicroë*, la pernamina, actúa como un disuasivo de insectos, por lo tanto, las plantas inoculadas con este hongo cuentan con una protección frente a la herbivoría. Tanaka, Tapper, Popay, Parker y Scott (2005) encontraron que las plantas inoculadas con una cepa transgénica de *Epicroë festucae* que no podía producir el compuesto pernamina eran tan atractivas ante el gorgojo argentino del raigrás (*Listronotus bonariensis*) como aquellas que no contenían el endófito.

Los hongos entomopatógenos más estudiados son *Metarhizium* spp., *Lecanicillium* spp., *Isaria* spp., *Sporothrix* spp., *Hirsutella* spp., *Aschersonia* spp., *Paecilomyces* spp., *Tolypocladium* spp., *Nomuraea* spp. y *B. bassiana* (Vega et al., 2009), cada uno de los cuales produce una serie de metabolitos secundarios que presentan amplia variedad de actividades biológicas contra mamíferos, insectos, microorganismos y células vegetales (Rohlf & Churchill, 2011). En estudios realizados sobre la virulencia de *M. anisopliae* en relación con la producción del compuesto serinociclina y el compuesto mutagénico NG-391 se comprobó que ninguno de los dos está involucrado en la virulencia de este hongo contra larvas de *Spodoptera exigua* (Moon et al., 2008). En contraposición, compuestos como la dextruxina, producidos por muchas especies del complejo de *Metarhizium* spp., han demostrado que juegan un papel importante en el incremento de la susceptibilidad de insectos como *Drosophila* spp. a la infección por otros entomopatógenos de origen bacteriano. Sin embargo, es importante tener en cuenta que no todos los metabolitos secundarios emitidos por entomopatógenos actúan como toxinas o factores de virulencia, lo cual aumenta la relevancia de los estudios que permitan elucidar cómo los metabolitos secundarios emitidos por los entomopatógenos contribuyen al proceso de infección, desarrollo y comportamiento de los insectos hospederos (Rohlf & Churchill, 2011).

Beauveria bassiana es considerado uno de los hongos entomopatógenos más empleados para el manejo de poblaciones de insectos plaga, sin embargo, este mismo hongo presenta diferentes funciones en la naturaleza, por ejemplo, cuando se obtiene logra establecer una

colonización constante del endófito en la planta, es antagonista de algunos patógenos de plantas, promotor del crecimiento vegetal y puede colonizar la rizosfera de algunas especies; sin embargo, para alcanzar el potencial biocontrolador del endófito es necesario realizar estudios que permitan conocer sus modos de acción (Jaber & Ownley, 2018).

Estudios recientes han demostrado que aplicaciones foliares con los hongos *B. bassiana* (EABb 04/01-Tip, EABb 01/33-Su, Bb04a) y *Metarhizium brunneum* (EAMb 09/01-Su) sobre plantas de alfalfa, tomate y melón conducen a una colonización endófito transitoria de los tejidos de las plantas tratadas. Este endofitismo causa un incremento en las tasas de mortalidad de las larvas del gusano soldado *Spodoptera littoralis* cuando se alimentan directamente de las plantas tratadas con el endófito, comparado con larvas inoculadas directamente con el hongo entomopatógeno (Resquín-Romero, Garrido-Jurado, Delso, Ríos-Moreno, & Quesada-Moraga, 2016). Al evaluar las mismas cepas de *B. bassiana* y *M. brunneum* y una cepa adicional de este último (EAM 01/58-Su) en hojas de plantas de melón, se observó una mortalidad adicional en ninfas de mosca blanca *Bemisia tabaci*, que varió del 53,4% en individuos tratados directamente con los entomopatógenos a un 96% en ninfas alimentadas con plantas inoculadas con los endófitos. En los tratamientos con *M. brunneum* se observó que el 43% de las ninfas melanizadas presentó dextruxina A, un metabolito secundario que posiblemente es responsable de la mortalidad de los insectos (Garrido-Jurado et al., 2017).

A pesar de los diferentes ejemplos en los que la aplicación de hongos entomopatógenos endófitos ha resultado en el control de poblaciones de insectos plaga, solo en algunos casos se ha reportado que el efecto sobre los insectos se debió a una micosis directa del entomopatógeno (Akello et al., 2008; Garrido-Jurado et al., 2017; Lopez & Sword, 2015; Vidal & Jaber, 2015), y en la mayoría de los casos es atribuible a la acción indirecta de productos emitidos por el endófito que afectan el desarrollo o comportamiento del insecto, lo cual es sustentado por la ausencia de esporulación del hongo en los insectos recuperados después de consumir tejido vegetal colonizado por hongos entomopatógenos endófitos (Jaber & Ownley, 2018).

Efectos adversos de algunos endófitos

La producción de metabolitos secundarios por los hongos endófitos no solamente es conocida por su efecto en la protección de las plantas frente a ataques de herbívoros, sino también por los efectos negativos que puede tener la emisión de ciertos alcaloides, lo cual ha sido asociado al aumento del número de herbívoros y a su riqueza en especies, y sugiere que las grandes cantidades de alcaloides medidas en especies de pastos nativos podrían afectar negativamente la acción de los enemigos naturales de los invertebrados y no conferir ninguna protección a la planta (Jani, Faeth, & Gardner, 2010).

En cuanto a la emisión de voc, está documentado que las plantas se comunican con su entorno por medio de la emisión de este tipo de semioquímicos, los cuales,

a su vez, son reconocidos por diferentes organismos asociados con las plantas, como los insectos herbívoros y sus enemigos naturales (figura 19.2). Se ha demostrado que esta comunicación multitrófica puede ser interrumpida o cambiada cuando la planta se encuentra colonizada por uno o más microorganismos endófitos (Battaglia et al., 2013; Jaber & Vidal, 2009; Jallow, Dugassa-Gobena, & Vidal, 2008; Rodríguez-Saona, Blaauw, & Isaacs, 2012; Zhang, 2014) y que estas variaciones, a su vez, pueden modular la interacción de las plantas con algunos insectos plaga y sus enemigos naturales; esta interacción depende directamente de la cepa evaluada (Aragón, 2016).

Por ejemplo, Battaglia et al. (2013) estudiaron el modelo de interacción multitrófica entre la planta de tomate *Solanum lycopersicum* var. San Marzano Nano, el hongo biocontrolador *Trichoderma longibrachiatum*

cepa MK1, el áfido *Macrosiphum euphorbiae* y sus enemigos naturales, el parasitoide *Aphidius ervi* y el depredador *Macrolophus pygmaeus*. Evaluaron los efectos de la colonización con el hongo endófito sobre la emisión de compuestos orgánicos volátiles de la planta de tomate y sus potenciales efectos sobre el desarrollo y la reproducción del áfido *M. euphorbiae* y sus enemigos naturales, y encontraron que, en comparación con las plantas testigo, aquellas plantas colonizadas por *T. longibrachiatum* permitieron mayores índices de crecimiento de poblaciones del áfido, mayor atracción de los dos enemigos naturales y un desarrollo más rápido del depredador de áfidos.

Aragón (2016) observó que inoculaciones con el hongo endófito *B. bassiana* afectan la composición de compuestos volátiles emitidos por la planta de tomate bajo condiciones de invernadero y reducen la cantidad emitida de m-cimeno, un compuesto emitido constitutivamente por la planta que le permite repeler insectos como los áfidos. Al evaluar diferentes cepas de *B. bassiana*, observó que la variación en la composición de volátiles es especie-específica, de igual forma que la respuesta de atracción de áfidos de la especie *Myzus persicae*, los cuales presentaron mayor atracción hacia plantas de inoculadas con *Beauveria bassiana* EABb 04/01-Tip que hacia las plantas no inoculadas. Así mismo, cuando la colonización endófitica se realizó con *Trichoderma koningiopsis*, un hongo benéfico conocido por su capacidad de controlar el marchitamiento vascular causado por *F. oxysporum* (Jaimes, Moreno, & Cotes, 2009), se observó que la atracción de áfidos de la misma especie *M. persicae* fue mayor que hacia las plantas testigo (Aragón, 2016).

Adicionalmente, estudios acerca del comportamiento de oviposición de las hembras de la especie *Helicoverpa armigera* frente a plantas inoculadas con *B. bassiana*, *M. brunneum* o *T. koningiopsis* demostraron que este insecto es capaz de reconocer diferencialmente las plantas de acuerdo con la composición de sus volátiles, y presenta una clara preferencia de oviposición en plantas tratadas con *B. bassiana* EABb 04/01-Tip, de manera similar a lo que sucede con los áfidos (figura 19.3) (Aragón, 2016).

Un caso contrario se presentó en los resultados obtenidos por Jallow et al. (2008), quienes observaron que plantas de tomate inoculadas con el hongo endófito

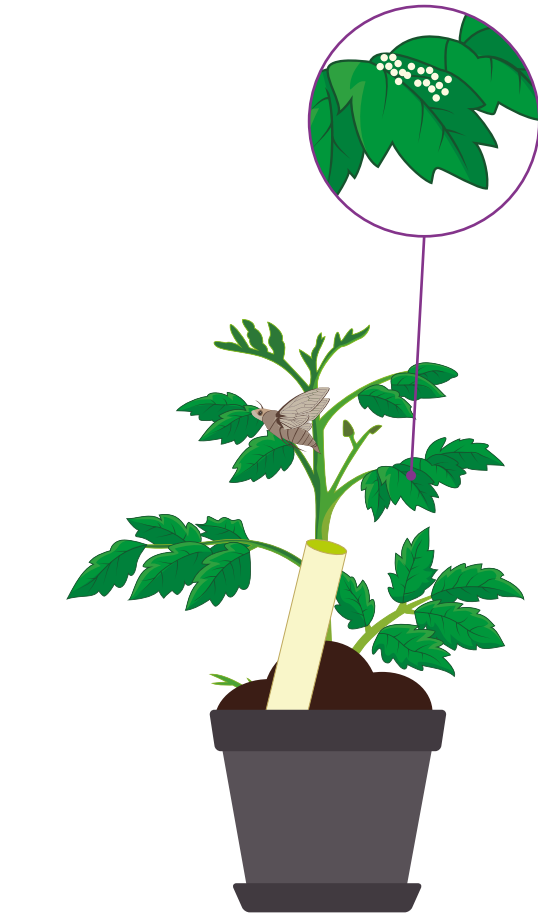


Figura 19.3. Plantas de tomate *Solanum lycopersicum* inoculadas con el endófito *Beauveria bassiana* EABb 04/01-Tip que modificaron la composición de los compuestos orgánicos volátiles emitidos, lo cual aumentó directamente el comportamiento de oviposición de *Helicoverpa armigera* en comparación con plantas no inoculadas o inoculadas con otros endófitos.

Fuente: Elaboración propia

Acremonium strictum redujeron significativamente la producción del mismo compuesto, m-cimeno, pero al evaluar el comportamiento de oviposición de *H. armigera* observaron que las plantas inoculadas con el endófito presentaron un menor número de oviposiciones que aquellas no tratadas con el hongo, lo cual confirma la especificidad de la relación planta-endófito y las consecuencias sobre la interacción con insectos.

El reconocimiento de las señales emitidas por las plantas depende de la estrategia de alimentación del insecto evaluado, pues en algunos casos el reconocimiento de

Figura 19.2. La emisión de compuestos orgánicos volátiles (voc) de una planta puede ser modificada por la colonización con hongos endófitos que producen cambios en la comunicación química entre la planta y los demás organismos que interactúan con ella, como los insectos herbívoros.

Fuente: Elaboración propia

estos semioquímicos se realiza a corta distancia para insectos chupadores con distancias de distribución cortas, mientras que insectos voladores, con distancias largas de distribución, son capaces de reconocer las señales desde largas distancias (Szendrei & Rodríguez-Saona, 2010).

Efecto dual de los hongos endófitos

Uno de los primeros reportes acerca de protección de plantas otorgada por algunos microorganismos endófitos fue el de Webber (1981), que abordó el caso del hongo *Phomopsis oblonga* y su control sobre poblaciones del insecto plaga *Physocnemum brevilinenu*. La interacción entre el hongo endófito *P. oblonga* y árboles de olmo holandés contribuyó indirectamente a la disminución en la dispersión del hongo patógeno

Ceratocystis ulmi, agente causal de la enfermedad, debido al manejo de las poblaciones de su insecto vector, *P. brevilinenu*, lo cual se relacionó con alcaloides y micotoxinas emitidas por el endófito (Dutta, Puzari, Gogoi, & Dutta, 2014).

El control biológico dual de insectos y fitopatógenos ha sido reportado para los hongos entomopatógenos *B. bassiana* y *Lecanicillium* spp. El endófito *B. bassiana* produce una serie de metabolitos bioactivos que limitan el crecimiento de algunos hongos fitopatógenos en condiciones *in vitro*, mientras que, en experimentos *in planta*, *B. bassiana* reduce la enfermedad causada por los patógenos del suelo *Pythium* spp., *Rhizoctonia* spp. y *Fusarium* spp. En el caso de *Lecanicillium* spp. se ha reportado que es inductor de resistencia sistémica contra el mildew polvoso, sin embargo, se conoce que este hongo también actúa por micoparasitismo en el control de dicha enfermedad (Ownley et al., 2010).

Patrones de colonización

Los microorganismos endófitos pueden presentar diferentes preferencias de colonización en los tejidos de la planta hospedera; así mismo, la movilidad de los endófitos a lo largo de la planta ha sido ampliamente documentada. Es el caso de *B. bassiana*, que en condiciones de campo ha sido aislado de diferentes órganos de las plantas, tales como raíces, hojas, tallos e incluso del hipocótilo (Aragón, 2016; Zhang, 2014), mientras que *Metarhizium* sp. se ha observado casi exclusivamente en las raíces (Aragón, 2016; Behie, Jones, & Bidochka, 2015; Vidal & Jaber, 2015; Zhang, 2014). *B. bassiana* ha sido principalmente asociado con insectos o hábitats de insectos, incluyendo suelos. Sin embargo, también ha sido descrito como simbionte de plantas, capaz de colonizar un amplio rango de monocotiledóneas y dicotiledóneas, como café, banano, maíz y trigo, lo cual da cuenta de su baja especificidad (Ownley et al., 2008; Vega, 2008). Aunque poco se ha reportado respecto al mecanismo por el cual este microorganismo se distribuye a lo largo de la planta, se sugiere que *B. bassiana* es capaz de colonizar de manera sistémica su planta hospedera, y a pesar de que su estilo de vida endófito es facultativo, dado que no siempre se desarrolla en el interior de los tejidos de su planta hospedera, sí es conocido por formar

asociaciones de largo plazo que sugieren un alto grado de mutualismo (Biswas, Dey, Satpathy, & Satya, 2012; Ownley et al., 2008).

Los microorganismos endófitos, como cualquier otro organismo, tienen requerimientos nutricionales, por lo cual su infección genera algún costo a la planta hospedera. Este es probablemente balanceado por algunas capacidades del hongo que contribuyen con funciones ecológicas o fisiológicas específicas que resultan en un beneficio para el hospedero bajo condiciones ambientales particulares, como la interacción con organismos de otros niveles tróficos (Michaud, Pell, & Vega, 2017).

El efecto de las interacciones entre hongos endófitos e insectos herbívoros ha sido reportado principalmente para pastos usados en agricultura, los cuales, en principio, se encontraban colonizados por hongos endófitos clavicipitáceos (Ascomicota: Hypocreales: Clavicipitaceae), que son capaces de colonizar de manera sistémica la mayoría de pastos de las familias Poaceae, Juncaceae y Cyperaceae. Los pastos inoculados han demostrado una alta resistencia al consumo foliar por insectos debido a su contenido de alcaloides

biológicamente activos, los cuales pueden alterar el ciclo de vida de algunos insectos que consumen este tipo de material vegetal (Anjitha, 2017). Los ejemplos más comunes citados en la literatura son los de las especies *Lolium perenne* y *Festuca arundinacea* infectadas con el hongo endófito *Neotyphodium*, que causa un efecto negativo en más de 40 especies de insectos distribuidos en seis órdenes (Azevedo, Maccheroni Jr, Pereira, & De Araújo, 2000).

El cultivo de cacao se ve afectado por diferentes e importantes enfermedades que atacan sus partes vegetativas, sus frutos o ambos (Ten Hoopen, Deberdt, Mbenoun, & Cilas, 2012). Una de las enfermedades más importantes es la moniliasis causada por *Moniliophthora roreri*, que puede llegar a producir pérdidas del 40 % de la producción del fruto (Jaimes & Aranzazu Hernández, 2010). Varios factores pueden estar involucrados en la susceptibilidad a la enfermedad, como el ciclo de fructificación, el tamaño de la fruta, la edad, la posición en el árbol y el genotipo del cacao, por lo que su control químico no es muy efectivo debido al rápido desarrollo y el crecimiento longitudinal del fruto (promedio de 3 mm diarios) (Ten Hoopen et al., 2012); además, puede contaminar aguas y suelos.

En consecuencia, se han explorado y evaluado hongos endófitos para el control de algunas enfermedades del cacao, los cuales, aunque no producen efectos visibles en su hospedero, han demostrado actividad, ya que tienen diferentes mecanismos que ayudan a proteger a su hospedero, como el parasitismo, la antibiosis y la competencia por sustrato; pueden tener efectos genéticos y fenotípicos que resulten en un incremento de la resistencia a los patógenos (Herre et al., 2007; Mejía et al., 2014), y que además conserven la estabilidad y la biodiversidad del suelo en el ecosistema particular del cultivo al reducir el uso de agroquímicos (Crowder & Harwood, 2014).

Hace relativamente poco tiempo que se ha reconocido el papel esencial que algunos de estos simbiontes microbianos pueden desempeñar en la ecología de su huésped, y su éxito evolutivo ha llevado a la investigación sobre la exploración de esta relación para el control de diferentes enfermedades (Backman & Sikora, 2008; Mejía et al., 2014).

Endófitos aislados de las hojas de cacao, como *Colletotrichum tropicale* (muy común y dominante como

endófito foliar), pueden inducir cambios consistentes en la expresión de cientos de genes del huésped, algunos de ellos con funciones de inducción de defensas (Mejía et al., 2014). También la colonización por diferentes endófitos como *Colletotrichum* sp., *Fusarium/Nectria* spp. y *Xylaria* sp., aislados de hojas de *T. cacao*, y de especies como *Ouratea lucens* y *Heisteria concinna*, puede reducir la necrosis y la mortalidad de hojas de *T. cacao* al ser infectados naturalmente con *Phytophthora* sp., mediante la interacción directa de los endófitos con el patógeno foliar e indirectamente por la química de la hoja (Arnold et al., 2003).

En la evaluación *in vitro* de 15 aislamientos de *Trichoderma* representados en siete especies endófitas aisladas del tallo y de fruto de *T. cacao* y de ocho especies aisladas de *Theobroma bicolor*, *T. speciosum*, *T. grandiflorum*, *T. gileri* y *Theobroma* sp., se observaron diferentes niveles de control, como su capacidad para inhibir y parasitar *M. roreri*. Los aislamientos de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma asperellum* endófitos de tallo y los aislamientos de *T. harzianum* y *Trichoderma hamatum* aislados de frutos son los más destacados en su capacidad de colonización y control del patógeno, mientras que los aislamientos de *Trichoderma spirale* y *Trichoderma stromaticum* fueron poco eficientes en la colonización del patógeno (Bailey et al., 2008) (figura 19.4).

Técnicas tradicionales de reaislamiento de hongos endófitos

La observación de microorganismos endófitos se realiza por medio de dos técnicas básicas: observación directa y métodos dependientes de cultivo. En la observación directa, las estructuras de los microorganismos que crecen dentro del tejido vegetal son examinadas directamente bajo microscopía de luz o electrónica. Esta técnica permite observar la microbiota que no es posible cultivar en medios de cultivo estándar. Sin embargo, la mayoría de hongos endófitos, cuando se desarrollan dentro del tejido vegetal, solo presentan hifas, lo que dificulta su identificación taxonómica debido a la falta de estructuras de reproducción sexuales o asexuales (conidios y esporas) (Sun & Guo, 2012).

Las técnicas dependientes de cultivo han sido usadas tradicionalmente para el reaislamiento de microorganismos endófitos en diferentes plantas (Parsa et al., 2013; Posada et al., 2007; Quesada-Moraga, Landa, Muñoz-Ledesma, Jiménez-Díaz, & Santiago-Álvarez, 2006a). Con esta técnica, el material vegetal debe pasar por diferentes procesos de esterilización superficial para remover todos los organismos que se encuentran en la superficie del tejido y garantizar que se aislen los microorganismos que se están desarrollando en el interior de los tejidos (Sun & Guo, 2012).

El proceso, que depende de un subcultivo en medio nutritivo, generalmente incluye los siguientes pasos: 1) lavado del material vegetal con agua corriente para remover la mayoría de partículas que se encuentran en la superficie del tejido, por ejemplo, residuos de suelo y microorganismos epífitos, entre otros; 2) una esterilización superficial para eliminar microorganismos que aún queden en la superficie del tejido; los protocolos de esterilización superficial pueden

variar dependiendo del tipo de tejido; 3) aislamiento del hongo endófito proveniente del material, que se desarrolla en el medio de cultivo nutritivo; 4) purificación y crecimiento hasta esporulación de los aislamientos endófitos bajo diferentes condiciones de incubación y 5) identificación del hongo endófito basada en características morfológicas en el medio de cultivo (Quesada-Moraga, Ruiz-García, & Santiago-Alvarez, 2006b; Sun & Guo, 2012; Wang & Guo, 2007).

Técnicas moleculares para la detección de endófitos in planta

Debido a las limitantes de las técnicas tradicionales de aislamiento de hongos endófitos, es muy probable que muchos de los microorganismos endófitos no puedan ser aislados, ya que en algunos casos se trata de microorganismos no cultivables o su desarrollo

en medio nutritivo es muy lento y son superados por otros microorganismos con tasas de desarrollo más rápidas (Sun & Guo, 2012).

Las técnicas moleculares permiten detectar cantidades de hongos endófitos que difícilmente pueden ser encontradas con los métodos tradicionales de aislamiento. Generalmente un proceso de estudio molecular incluye: 1) extracción del ADN genómico, incluyendo el de la planta y el hongo; 2) amplificación de los fragmentos de ADN usando primers específicos del hongo; 3) separación de los productos por PCR, por medio de electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante y la escisión de diferentes bandas del gel

que representan diferentes taxa; (4) clonación de los productos directamente en plásmidos y transferencia a *E. coli* DH5α; 5) búsqueda de clones positivos para los diferentes taxa usando técnicas de fingerprinting como PCR-RFLP; 6) secuenciación de los clones representativos y 7) identificación basada en análisis filogenético (Sun & Guo, 2012). Si el propósito del estudio es cuantificar el ADN de un hongo endófito conocido, entonces bastará con realizar un PCR cuantitativo usando primers específicos.

Los protocolos, en este caso, varían de acuerdo con el microorganismo que se desea cuantificar (Landa et al., 2013).

Casos exitosos

El desarrollo de productos a base de microorganismos endófitos es una estrategia relativamente reciente, sin embargo, países como Nueva Zelanda se encuentran entre los mayores productores de material vegetal inoculado con microorganismos endófitos, los cuales son integrados en las semillas de coberturas vegetales usadas principalmente para campos deportivos. Estos pastos que contienen hongos endófitos favorecen la liberación de algunos alcaloides que previenen el

ataque de herbívoros vertebrados e invertebrados. Así mismo, existen productos de pasturas que contienen endófitos y un bajo contenido de alcaloides, lo cual permite su uso en el pastoreo de especies productoras de leche o carne.

En la tabla 19.1 se muestran algunos factores que, de acuerdo con Card et al. (2016), se deben tener en cuenta para obtener un producto exitoso comercialmente.

Tabla 19.1. Factores que se deben tener en cuenta para que un microorganismo endófito sea comercialmente exitoso

Característica	Descripción
Modo de aplicación	El agente de control biológico debe ser de fácil aplicación, de tal manera que no se requieran equipos especializados para su diseminación en los cultivos. Adicionalmente, debe ser especie-específico para evitar una transmisión a los cultivos aledaños y potenciales consecuencias de incompatibilidad en las nuevas interacciones biológicas que se puedan generar.
Modo de acción	El microorganismo debe tener uno o más mecanismos de acción efectivos, por ejemplo, compuestos bioactivos que puedan ser movilizados hacia el lugar donde se requiere de su efecto. Sin embargo, se debe propender por una bioactividad especie-específica que no presente efectos antagónicos sobre especies benéficas no blanco, como abejas polinizadoras, avispas parasitoides o insectos depredadores.
Protección del material genético	El producto comercialmente disponible debe estar protegido, de tal forma que las cepas individuales puedan ser identificadas y comercializadas sin que sea posible su propagación a partir del material comercial.
Costo biológico	En ninguna circunstancia, el producto a base de microorganismos endófitos debe causar síntomas o crear un costo biológico significativo en su planta hospedera.

Fuente: Adaptado de Card et al. (2016)

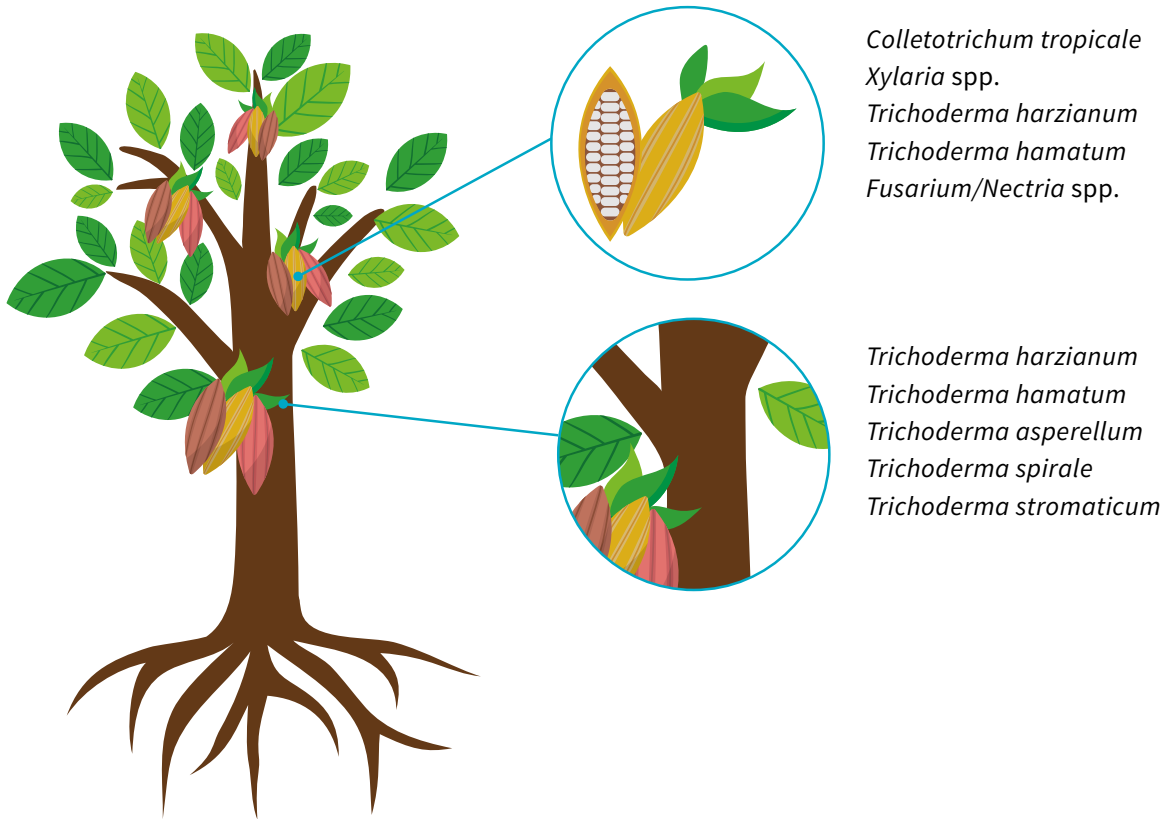


Figura 19.4. Microorganismos endófitos aislados de diferentes órganos de la planta de cacao.

Fuente: Elaboración propia

Productos comerciales a base de hongos endófitos

Como ejemplo, se describen tres hongos filamentosos con características de endófitos, dos de estos microorganismos con actividad bioinsecticida y uno con blanco en un hongo fitopatógeno; estos ingredientes activos cumplieron un sinnúmero de pasos de evaluación e investigación para llegar a ser un producto aplicable con uso en agricultura. El desarrollo de un bioproducto generalmente incluye el hallazgo del microorganismo, el descubrimiento de sus propiedades, su multiplicación y producción en diferentes escalas, el desarrollo del producto, cumplir diferentes pruebas de eficacia, realizar su registro y finalmente la comercialización (Ravensberg, 2015).

Bipesco *Metarhizium brunneum*

M. brunneum Petch (sin. *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*) cepas 5 y F52 son subcultivos de la cepa individual M.a. 43, y constituyen el ingrediente activo de los productos a base de Bipesco 5/F52, formulados como polvo mojado (WP), originalmente aislado de la carpocapsa o polilla de la manzana (*Cydia pomonella*, lepidoptera: Tortricidae) en Austria en 1967 (Ríos-Moreno et al., 2016b; Singh, Gill, & Tuteja, 2011). Este bioplaguicida tiene una amplia gama de hospederos naturales o “agrícolas” que se encuentran en y sobre el suelo, como áfidos, trips, mosca blanca, escarabajos (Coleoptera: Melolonthidae), gorgojos (Coleoptera: Curculionidae), ácaros y mosquitos (European Food Safety Authority [EFSA], 2012).

El biocontrolador causa la muerte del insecto debido a varios procesos, incluyendo el agotamiento de nutrientes, la obstrucción física, la parálisis o la invasión de órganos y toxicosis (EFSA, 2012). Además, produce al menos 15 toxinas destruxinas (A, B, C, D, E, Ed, Ed1, A2, B2, D2, E2, CL, DesmA, DesmB, DH-A). La destruxina A es el metabolito más abundante (Ríos-Moreno et al., 2016a; Ríos-Moreno et al., 2016b) y uno de los principales metabolitos secundarios producidos por el género

Metarhizium, importante para la actividad insecticida y el desempeño de roles claves en la patogénesis (Hu & Leger, 2002).

Los conidios de Bipesco 5 y F52 germinan en la superficie del hospedero, pueden diferenciarse al formar apresorios e invaden por penetración directa del exoesqueleto o la cutícula. Una hifa infectiva penetra a través de la cutícula del hospedero y eventualmente emerge en el hemocelo, donde el hongo produce células flotantes que son pasivamente transportadas y las toxinas pueden ser producidas. Después de la muerte del insecto, bajo condiciones húmedas, el micelio penetra en la cutícula del insecto y produce conidios infecciosos en el exterior del cadáver (EFSA, 2012). Bajo condiciones secas, el hongo puede sobrevivir en la fase micelial, pero no produce conidios en el exterior del cuerpo. La producción de conidios requiere temperaturas óptimas para la esporulación de 25-30 °C. *M. brunneum* puede crecer *in vitro* en el rango de pH de 3,3-8,5, pero por debajo de 10 °C y por encima de 35 °C no esporula (EFSA, 2012).

Adultos de las especies *Strophosoma melanogrammum* y *Strophosoma capitatum* tratados con una suspensión de conidios no formulados de Bipesco a 1×10^7 conidios. mL⁻¹, bajo condiciones de laboratorio (20 °C con fotoperiodo de 16:8 h luz: oscuridad), presentaron una patogenicidad del 100% a los 21 días, con un tiempo medio de supervivencia (TMS) de 13,5 días para *S. melanogrammum* y de 96,5% a los 32 días, y un TMS de 22,6 días con *S. capitatum*, demostrando así su capacidad de infectar y causar micosis (Nielsen, Vestergaard, Harding, Wolsted, & Eilenberg, 2006).

En condiciones de campo se realizaron dos aplicaciones de conidios no formulados de Bipesco, con un intervalo de 15 días, al suelo de un cultivo de pino o abeto rojo (*Abies procera*) de ocho años de edad con antecedentes de daño por *Strophosoma* spp., a una concentración de 1×10^7 (200 mL $\times$ m² = aprox. 1×10^{14} conidios. ha⁻¹). Cada individuo adulto capturado semanalmente durante tres años de evaluación y en los períodos de mayor actividad (primavera [abril-junio] y otoño [agosto-octubre]) fue evaluado en laboratorio durante cuatro semanas (20 °C, 16:8 h luz: oscuridad) para registrar la mortalidad. Se alcanzó una prevalencia del hongo del 90% y del 78% en adultos de *S. melanogrammum* y *S. capitatum* respectivamente en los

dos primeros meses después de aplicación (primavera del primer año). En las parcelas del tratamiento testigo, la prevalencia de otros hongos entomopatógenos (*M. anisopliae*, *B. bassiana*, *P. farinosus* y *Lecanicillium*) fue menor al 8% en *S. melanogrammum* y nula en *S. capitatum*. Para el otoño del mismo periodo evaluado, la reducción en *S. melanogrammum* fue de 52% y 54% para *S. capitatum* en parcelas tratadas en comparación con las parcelas testigo (Nielsen et al., 2006).

En el otoño del segundo año de evaluación, la densidad de *S. melanogrammum* y *S. capitatum* fue significativamente menor en las parcelas tratadas vs. las parcelas testigo, que presentaron una reducción en *S. melanogrammum* del 20% y en *S. capitatum* del 33%. En el año tres no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos en primavera, pero en otoño la población tanto de *S. melanogrammum* como de *S. capitatum* fue significativamente menor en las parcelas tratadas comparadas con las parcelas testigo (Nielsen et al., 2006).

El estudio demostró que la aplicación del principio activo de Bipesco desempeña un papel principal en la supresión de la población de *Strophosoma* spp. y que puede presentar un efecto acumulativo y prevenir un aumento de la población en la siguiente generación, actuando sobre la mortalidad de hembras en periodo de oviposición o generando efectos subletales que causan disminución en la fecundidad y la eclosión de huevos, además de la infección de larvas neonatas (Nielsen et al., 2006).

En otro estudio, Bipesco 5 fue recuperado como endófito de las hojas, los tallos, los tubérculos y las raíces de plantas de papa previamente inoculadas con una suspensión de 10^8 conidios. mL⁻¹ y evaluadas posteriormente a las 24, 48, 72, 96 y 120 h. Se observó una colonización diferenciada en los porcentajes y tiempos de colonización, donde el porcentaje de colonización de las hojas fue ligeramente superior al de los tallos y en estos, a su vez, fue significativamente mayor que el porcentaje de colonización en los tubérculos y las raíces. La colonización en las hojas por Bipesco 5 a las 24 h fue del 76,6%, presentó la colonización máxima a las 96 h con un 81,6% y se observó una tendencia a la disminución de la colonización al final del ensayo. A las 24 h, los tallos tuvieron una colonización de 65%, y su valor máximo fue de 73,3% a las 72 y 96 h. Se observó

colonización en el tubérculo y en las raíces, aunque el aumento en el porcentaje de colonización no fue muy alto: a las 72 h fue del 11,6% en tubérculos y 13,3% en raíces, lo cual refleja ligeramente más colonización de la raíz comparada con el tubérculo (Ríos-Moreno et al., 2016b).

Esta investigación confirmó que las concentraciones de destruxina A difieren en el tubérculo a las 24 h y en la raíz a las 48 h ($6,8 \pm 4,8$ y $2,1 \pm 1,4$ µg / kg, respectivamente) y no se observó en hojas y tallos. Su concentración en los tejidos vegetales fue muy baja en comparación con los niveles de colonización, lo que sugiere que la producción de destruxina A por el hongo puede ser temporal y que el compuesto podría degradarse rápidamente (Ríos-Moreno et al., 2016b).

El éxito de los tratamientos con entomopatógenos radica en comprender con precisión cuándo es el momento adecuado de realizar cada aplicación y conocer la persistencia del principio activo bajo ciertas condiciones ambientales, además de tener claro el ciclo de vida (p. ej., el ciclo de vida de dos años de los picudos) y la etología de la plaga (Nielsen et al., 2006).

Naturalis-L *Beauveria bassiana*

El ingrediente activo del bioinsecticida Naturalis-L es la cepa ATCC 74040 de *B. bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Deuteromycetes, Moniliales) formulada en aceite. Esta fue originalmente aislada del gorgojo del algodón *Anthonomus grandis* (Boheman) (Coleoptera: Curculionidae) en el valle del Bajo Río Grande, Texas, EE. UU. (Mayoral, Benuzzi, & Ladurner, 2006). El bioplaguicida se recomienda para el control de etapas larvianas y adultas de especies de mosca blanca (Hemiptera) que pertenecen a la familia Aleyrodidae, incluidas las moscas blancas de invernadero *Trialeurodes vaporariorum* y *Bemisia* spp., plagas agrícolas con una alta tasa de reproducción, muy importantes en cultivos bajo invernadero y en campo, con una amplia gama de hospederos, incluyendo malezas, y que además actúan como vectores de varios virus importantes de plantas (Martin, Mifsud, & Rapisarda, 2000; EFSA, 2013). El biocontrolador también actúa sobre estadios larvales y adultos de trips, como *Frankliniella occidentalis* (Jacobson, Chandler, Fenlon, & Russell, 2001).

El excesivo uso de moléculas químicas en ambientes semicontrolados o de invernadero ha aumentado los casos de resistencia de las moscas blancas y disminuido sus agentes naturales de control (Mayoral et al., 2006). Con el propósito de buscar métodos alternativos y eficaces de manejo de la mosca blanca, se evaluó la eficacia del bioinsecticida aplicado en diferentes dosis, en ensayos bajo condiciones de invernadero, sobre cultivos de tomate *Solanum lycopersicum* cv. Naomi y berenjena *Solanum melongena* cv. Cristal. En tomate, todos los tratamientos con Naturalis-L, independientemente de la dosis (de 125, 250 y 300 mL/L) y aplicados semanalmente durante la etapa de maduración del fruto (siete semanas), redujeron significativamente la infestación de mosca blanca mediante la reducción de ninfas vivas, con una eficacia entre el 72 % y el 82,8 % en comparación con el testigo no tratado. Para el tratamiento con el insecticida químico neonicotinoide se presentó el mayor número de ninfas muertas, considerando que la resistencia a este compuesto no se presentó en la población blanco de la mosca blanca (Mayoral et al., 2006).

En berenjena, todos los tratamientos con el bioinsecticida (aplicados dos veces, cada 14 días desde el inicio de la floración) redujeron significativamente la infestación de adultos de mosca blanca en comparación con el testigo no tratado: al aplicar 200 mL/L se observó un efecto dosis-respuesta inferior al del insecticida químico neonicotinoide evaluado (igual forma de aplicación a 75 mL/L), pero usando la misma dosis en mezcla con un coadyuvante o usándolo de manera individual a 300 mL/L su eficacia fue similar al compararlo con el testigo químico.

Esto demuestra que las aplicaciones del producto Naturalis a base de *B. bassiana* son una herramienta altamente eficaz para el control de infestaciones naturales de mosca blanca en cultivos bajo cubierta y que su eficacia podría ser mejorada si es usado en conjunto con un coadyuvante que sea compatible con el endófito o que mejore su adherencia al tejido vegetal y su estabilidad en condiciones de campo. Adicionalmente, al ser incluido en estrategias de manejo integrado de moscas blancas puede ayudar a desarrollar estrategias efectivas de manejo de la resistencia a la plaga y evitar la presencia de niveles inadecuados de residuos de agroquímicos, lo cual contribuye a la inocuidad del producto final (Mayoral et al., 2006).

Vidal y Jaber (2015) evaluaron el potencial del Naturalis-L para crecer y colonizar endófitamente plantas de canola (*Brassica napus* var. Favorite) y de haba (*Vicia faba* cv. Hangdown Grünkernig) aplicando 4 mL de una suspensión de 1×10^8 conidios.mL⁻¹ en el haz y el envés de dos hojas opuestas de canola y en el tercer par de hojas verdaderas de haba. Siete días después de la inoculación, confirmaron la colonización endofítica al reaislar el hongo de 12 discos (2 mm²) estériles de tejido de hojas preinoculadas sembradas en medio de un cultivo selectivo para *B. bassiana* (incubación de 14 días a 25 °C). El porcentaje de colonización se calculó según el número de segmentos colonizados evaluados y dio como resultado que la colonización de plantas de *B. napus* por Naturalis® (83,6 %) fue mayor que en plantas de haba (68,1 %), lo que demostró una alta variabilidad del efecto en diferentes especies de plantas, tanto en la eficacia de colonización como en los posibles efectos adversos sobre insectos herbívoros (Vidal & Jaber, 2015).

En otro ensayo, se evaluó la virulencia del Naturalis-L en plantas de habichuela preinoculadas de manera endofítica sobre larvas de tercer estadio del gusano cogollero (*H. armigera*). Las plantas fueron tratadas como se describió, y siete días después de la inoculación una jaula de sujeción que contenía una sola larva fue unida a una hoja no inoculada de cada planta para asegurar que cualquier efecto contra las larvas introducidas fuera consecuencia de crecimiento de hongos dentro de los tejidos de las plantas. Las larvas se evaluaron diariamente registrando la mortalidad (dispuestas en cámara húmeda durante 14 días) o la formación de pupa. Se obtuvo como resultado una mortalidad larvaria del 25 %, una micosis del 22 % y un tiempo de supervivencia de 21,1 días, comparado con todas las larvas de *H. armigera* alimentadas con plantas del tratamiento control que permanecieron vivas hasta la formación de la pupa. Esto confirma la colonización endofítica por Naturalis-L y el efecto de la interacción endófito-planta-herbívoro, pero se requiere comprender qué produce el efecto de la interacción planta-hongo sobre los insectos herbívoros. La forma de inoculación, las condiciones ambientales y climáticas y el estado nutricional de las plantas pueden desempeñar un papel crucial en la interacción y en el establecimiento. También las plantas hospederas pueden aumentar su metabolismo de defensa al percibir los organismos endofíticos como intrusos hostiles (Vidal & Jaber, 2015).

Tricovab *Trichoderma stromaticum*

La escoba de bruja del cacao (*Moniliophthora perniciosa*) es una enfermedad importante en Suramérica, Centroamérica y el Caribe, ya que ocasiona bajos rendimientos en la producción y alteraciones en el balance hormonal del hospedero, como hipertrofia e hiperplasia y posterior necrosis en el tejido (Wheeler, 1985, citado por De Souza et al., 2006). Después de su llegada en 1989 al estado de Bahía, Brasil pasó de ser el tercer productor mundial de cacao (entre 1988 y 1990) a ser un importador neto en pocos años (1998-2000), demostrando así la severidad del patógeno (Meinhardt et al., 2008). Las basidiosporas del hongo infectan los tejidos meristemáticos y ocasionan diferentes tipos de síntomas, dependiendo del órgano infectado (brotes, botones florales, flores y frutos en desarrollo): en los meristemos apicales, el síntoma es el crecimiento hipertrófico (proliferación vegetativa); en los botones florales induce filodia y formación de frutos partenocárpicos, y cuando la infección ocurre en frutos, las semillas se pudren. La producción de basidiocarpos en la fase saprofítica del hongo y la formación de esporas ocurre a partir del tejido necrótico (Silva et al., 2002, citado por De Souza et al., 2008).

Un solo método de control de la enfermedad es ineficiente, por lo tanto, entre las prácticas de manejo integrado para la escoba de bruja se encuentran el uso de fungicidas de cobre, la eliminación de tejidos enfermos, conocida como *poda fitosanitaria*, que se deben realizar en época seca, y el control biológico (De Souza et al., 2006). Por el momento, el único producto biocontrolador de la escoba de bruja es Tricovab, cuyo ingrediente activo es la cepa AM7 de *T. stromaticum* (De Souza et al., 2006). Esta cepa fue aislada de basidiocarpos de escoba de bruja que afectan plantas de cacao en Belén (Brasil) y es usada en el estado de Bahía (Brasil) de manera masiva (Ten Hoopen & Krauss, 2016).

T. stromaticum solo se encuentra en América Latina y en estrecha asociación como endófito del cacao y de especies relacionadas, como copoazú (*T. grandiflorum*) y *Herrania* spp., lo que sugiere que probablemente coevolucionó como micoparásito del patógeno *M. perniciosa* o como endófito en la planta hospedera (Hjorth et al., 2003, citado por De Souza et al., 2008). Los frutos enfermos y muertos son colonizados por *T.*

stromaticum y causan reducción de la producción de basidiocarpos; por lo tanto, también reducen los niveles de inóculo de basidiosporas y limitan la propagación de la enfermedad en el tejido, además de presentar parasitismo directo sobre el micelio del patógeno (De Souza et al., 2008). *T. stromaticum* se produjo inicialmente a escala piloto y posteriormente de manera comercial, y es utilizado experimentalmente desde 1999 como parte del manejo integrado del cacao (De Souza et al., 2008; De Souza et al., 2006). Sin embargo, el uso comercial de *T. stromaticum* ha presentado resultados variables en campo debido a las condiciones del medio ambiente del cultivo (variabilidad de temperaturas y humedad) que pueden favorecer en ocasiones el desarrollo del patógeno y disminuir el establecimiento del biocontrolador (Meinhardt et al., 2008).

Formulación y técnicas de aplicación

La formulación de microorganismos endófitos enfrenta muchos de los problemas que se presentan en la formulación de otros agentes de control biológico de origen microbiano. Sin embargo, para aquellas especies de endófitos que son transmitidos vía semilla existe una ventaja adicional para su comercialización: no requieren del desarrollo de formulaciones complicadas ni de sistemas especializados de entrega del producto que lo protejan de las diferentes condiciones bióticas y abióticas que pueden afectar su sobrevivencia o eficacia como agente de control biológico, y que generalmente afectan las formulaciones que deben ser aplicadas en campo (Card et al., 2016).

El éxito en la comercialización de microorganismos endófitos se encuentra estrechamente relacionado con algunas de sus características, que, de acuerdo con Card et al. (2016), son importantes durante el desarrollo de un agente de control biológico a base de microorganismos endófitos:

- El tipo de interacción biológica: mutualismo vs. comensalismo.
- El nivel de simbiosis: obligada vs. facultativa.
- El patrón de colonización *in planta*: sistémica vs. local.

- d. El grado de especificidad con la planta hospedera: baja vs. alta.
- e. El medio de transmisión: horizontal vs. vertical.
- f. El mecanismo de acción por el cual ejercen el control: antibiosis vs. competencia vs. parasitismo directo vs. resistencia inducida.

El método de aplicación de microorganismos endófitos por revestimiento de semillas, aspersión o encapsulación representa varios retos científicos y técnicos relacionados con la formulación, la cual debe garantizar que el microorganismo se establezca en el suelo, cerca de la planta o sobre la misma, además de permitir la penetración y la colonización del hospedero y, a su vez, manejar dosis mínimas y bajo costo (Krell, Jakobs-Schoenwandt, Vidal, &

Patel, 2018). Para superar estos retos es necesario entender el ambiente físico-químico y biológico de la filósfera, el suelo, la superficie de la semilla y la rizosfera (Patel, 2014). En el caso de micorrizas, se han reportado suficientes estudios que describen la interacción molecular planta-microorganismo, los cuales permiten el desarrollo de formulaciones novedosas y técnicas de aplicación apropiadas. Lo contrario sucede con los hongos entomopatógenos endófitos, de los cuales se cuenta con muy poca información acerca de los mecanismos de penetración e inoculación de sus plantas hospederas y, en consecuencia, las investigaciones básicas, en su mayoría, se realizan aún mediante la aplicación de suspensiones de esporas en lugar de formulaciones sofisticadas y métodos de aplicación efectivos (Patel, 2014).



Conclusiones y perspectivas

Existen factores limitantes para la producción y la comercialización de productos a base de microorganismos endófitos, dado que el desarrollo de estos productos y su estabilidad en el tiempo requieren de un proceso de investigación bastante largo y, en algunos casos, costoso. En Colombia se evidencia que, a pesar de su condición de país megadiverso, la investigación relacionada con el desarrollo de productos a base de hongos endófitos se encuentra en un nivel poco explorado. En muchos trabajos se aíslan nuevas cepas de endófitos de diferentes sistemas, pero son pocos los casos en que los resultados han llevado al desarrollo de bioproductos de interés comercial.

El potencial de los endófitos para el manejo de insectos plaga y de enfermedades en cultivos de importancia agrícola, la obtención de moléculas de interés en la industria farmacéutica y la bioprospección de estos microorganismos solo se podrá realizar en la medida en que se realicen estudios en campo y se utilicen técnicas precisas para su identificación y su producción a escala industrial.

Para esto se requiere continuar con el descubrimiento de aislamientos endofíticos y la identificación taxonómica de cepas que cuenten con atributos superiores que las hagan candidatas a un proceso de producción y formulación a gran escala, ya sea para su aplicación como microorganismos benéficos o para la obtención de moléculas de interés particular en diferentes industrias.

Así mismo, se requiere incrementar el conocimiento acerca de la interacción ecológica entre la planta hospedera, el hongo endófito, los insectos plaga, los insectos benéficos y los hongos patógenos en diferentes modelos de importancia científica y económica que permitan incrementar la confianza en la aplicación de estas técnicas de manejo de plagas y enfermedades en la agricultura. De esta manera se podrán identificar los potenciales efectos adversos de la aplicación de esta estrategia en diferentes sistemas de producción.

Usando el enfoque del manejo de problemas fitosanitarios mediante la implementación de hongos endófitos se pueden obtener beneficios adicionales en el desarrollo de las plantas, lo cual permitiría un potencial uso de estos microorganismos con propósitos de nutrición vegetal, inducción de resistencia y tolerancia a estrés bióticos y abióticos. Esto, potencialmente, proporcionaría beneficios adicionales al ser incluidos en las etapas tempranas de desarrollo de un cultivo, al tratar las semillas y los sustratos de siembra para obtener un incremento en la proporción de la emergencia en las semillas, mejor establecimiento de las plántulas en los viveros por la inducción del crecimiento de las plantas, así como mejor adaptación en condiciones de campo.

Debido al reciente auge de las investigaciones relacionadas con la aplicación de hongos endófitos en la agricultura y su aceptación en algunos sectores, como la producción de forrajes para ganadería, se han iniciado investigaciones para profundizar el conocimiento acerca del alcance y la persistencia de los hongos endófitos dentro de su hospedero con miras a estructurar la base científica que permita determinar aspectos como los tiempos y las mejores estrategias de aplicación, así como establecer el grado de protección de las plantas y otros beneficios conferidos por estos hongos, lo cual permitirá que esta estrategia se adopte como una herramienta suplementaria en los programas de manejo integrado de plagas y enfermedades.

El desafío en este campo es contribuir al desarrollo del máximo potencial de los microorganismos endófitos mediante investigaciones multidisciplinarias que permitan afrontar diferentes problemas aún no resueltos respecto a las interacciones presentadas bajo condiciones de campo y poder construir herramientas efectivas en el manejo integrado de los diferentes insectos plaga y las enfermedades que afectan a las plantas. El rango de interacciones en que los endófitos asociados con una planta interfieren es muy amplio, por lo que los estudios de la interacción endófito-endófito y endófito-planta hospedera que utilizan herramientas moleculares (genómica, proteómica, metabolómica, secretómica y transcriptómica), biotecnológicas y bioinformáticas de última generación serán claves para comprender su acción mutualista y el aprovechamiento de los metabolitos secundarios.

La interacción de los hongos endófitos con la planta hospedera y entre sí es muy versátil, por lo que pequeñas variaciones en las condiciones del medio ambiente en que se presenta la interacción o en las condiciones y parámetros del cultivo *in vitro* en que se multiplican los endófitos pueden causar variación en la respuesta de la planta hospedera, en los diferentes metabolitos secundarios que se producen durante la interacción, así como en la emisión de semioquímicos usados para mediar en la comunicación de las plantas con los demás organismos de su entorno. Por lo tanto, los estudios que propongan la descripción de las diferentes rutas de comunicación afectadas entre la planta colonizada endofíticamente y su entorno, utilizando para esto las herramientas disponibles y emergentes, permitirán entender el rol de estos microorganismos en el manejo de poblaciones de plagas y el desarrollo de enfermedades en cultivos de importancia comercial. Así mismo, permitirían el desarrollo y la producción industrial de agentes de control biológico para el manejo de problemas fitosanitarios en campo y también de otros metabolitos secundarios, desentrañando así el potencial completo de los endófitos.

Agradecimientos

Los autores agradecen al doctor Stephane Compant, del Instituto Austriaco de Tecnología en Tulln, por su asesoría en la toma de la foto de portada mediante el uso de microscopía confocal. Esta foto es una sección transversal de tejido radicular de maíz donde se muestra un microorganismo endófito marcado con gfp (*green fluorescent protein*) y analizado con el software Imaris (modelación 3D).

Referencias

Akello, J., Dubois, T., Coyne, D., & Kyamanywa, S. (2008). Endophytic *Beauveria bassiana* in banana (*Musa* spp.) reduces banana weevil (*Cosmopolites sordidus*) fitness and damage. *Crop Protection*, 27(11), 1437-1441. doi:10.1016/j.cropro.2008.07.003.

Anjitha, G. (2017). Role of endophytes in insect control. *Acta Scientific Agriculture*, 1(4), 1-3. Recuperado de <https://actascientific.com/ASAG/pdf/ASAG-01-0025.pdf>.

Aragón, S. M. (2016). *How entomopathogenic endophytic fungi modulate plant-insect interactions* (tesis doctoral). Universidad de Gotinga, Gotinga, Alemania.

Arnold, A. E., Mejía, L. C., Kyllo, D., Rojas, E. I., Maynard, Z., ... Herre, E. A. (2003). Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(26), 15649-15654. doi:10.1073/pnas.2533483100.

Azevedo, J. L., Maccheroni Jr, W., Pereira, J. O., & de Araújo, W. L. (2000). Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic Journal of Biotechnology*, 3(1) 15-16. doi:10.4067/s0717-34582000000100004.

Backman, P. A., & Sikora, R. A. (2008). Endophytes: An emerging tool for biological control. *Biological Control*, 46(1), 1-3. doi:10.1016/j.biocontrol.2008.03.009.

Bailey, B., Bae, H., Crozier, J., Thomas, S., Samuels, G. J., Vinyard, B. T., & Holmes, K. (2008). Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*. *Biological Control*, 46(1), 24-35. doi:10.1016/j.biocontrol.2008.01.003.

Bagtaglia, D., Bossi, S., Cascone, P., Digilio, M. C., Prieto, J. D., Fanti, P., ... Trotta, V. (2013). Tomato below ground–above ground interactions: *Trichoderma longibrachiatum* affects the performance of *Macrosiphum euphorbiae* and its natural antagonists. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26(10), 1249-1256. doi:10.1094/MPMI-02-13-0059-R.

Behie, S. W., Jones, S. J., & Bidochka, M. J. (2015). Plant tissue localization of the endophytic insect pathogenic fungi *Metarhizium* and *Beauveria*. *Fungal Ecology*, 13, 112-119. doi:10.1016/j.funeco.2014.08.001.

Bischoff, J., & White, J.F., Jr. (2005). Evolutionary development of the Clavicipitaceae. En: J. Dighton, J. F. White, & P. Oudemans (Eds.), *The fungal community: Its organization and role in the ecosystem* (pp. 505-518, 3.ª ed.). Boca Raton, EE. UU.: Taylor & Francis.

Biswas, C., Dey, P., Satpathy, S., & Satya, P. (2012). Establishment of the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* as a season long endophyte in jute (*Corchorus olitorius*) and its rapid detection using SCAR marker. *BioControl*, 57(4), 565-571. doi:10.1007/s10526-011-9424-0.

Bolwerk, A., Lagopodi, A. L., Lugtenberg, B. J. J., & Bloembergen, G. V. (2005). Visualization of interactions between a pathogenic and a beneficial *Fusarium* strain during biocontrol of tomato foot and root rot. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18(7), 710-721. doi:10.1094/MPMI-18-0710.

Camino-Sánchez, F. J., Zafra-Gómez, A., Ruiz-García, J., Bermúdez-Peinado, R., Ballesteros, O., Navalón, A., & Vilchez, J. L. (2011). UNE-EN ISO/IEC 17025:2005 accredited method for the determination of 121 pesticide residues in fruits and vegetables by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(3), 427-440. doi:10.1016/j.jfca.2010.11.009.

Card, S., Johnson, L., Teasdale, S., & Caradus, J. (2016). Deciphering endophyte behaviour: the link between endophyte biology and efficacious biological control agents. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(8), fiw114. doi:10.1093/femsec/fiw114.

Clay, K., & Schardl, C. L. (2002). Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *The American Naturalist*, 160(Suppl. 4), 99-127. doi:10.1086/342161.

Crowder, D. W., & Harwood, J. D. (2014). Promoting biological control in a rapidly changing world. *Biological Control*, 75, 1-7. doi:10.1016/j.biocontrol.2014.04.009.



De Souza, J. T., Bailey, B. A., Pomella, A. W. V., Erbe, E. F., Murphy, C. A., Bae, H., & Hebbar, P. K. (2008). Colonization of cacao seedlings by *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of the witches' broom pathogen, and its influence on plant growth and resistance. *Biological Control*, 46(1), 36-45. doi:10.1016/j.biocontrol.2008.01.010.

De Souza, J. T., Pomella, A. W. V., Bowers, J. H., Pirovani, C. P., Loguercio, L. L., & Hebbar, K. P. (2006). Genetic and biological diversity of *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of the cacao witches'-broom pathogen. *Phytopathology*, 96(1), 61-67. doi:10.1094/PHTO-96-0061.

Dicke, M., Van Loon, J. J. a., & Soler, R. (2009). Chemical complexity of volatiles from plants induced by multiple attack. *Nature Chemical Biology*, 5(5), 317-324. doi:10.1038/nchembio.169.

Duijff, B. J., Pouhair, D., Olivain, C., Alabouvette, C., & Lemanceau, P. (1998). Implication of systemic induced resistance in the suppression of *Fusarium* wilt of tomato by *Pseudomonas fluorescens* WCS417r and by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47. *European Journal of Plant Pathology*, 104(9), 903-910. doi:10.1023/A:1008626212305.

Dutta, D., Puzari, K.C., Gogoi, R., & Dutta, P. (2014). Endophytes: exploitation as a tool in plant protection. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57(5), 621-629. doi:10.1590/S1516-8913201402043.

European Food Safety Authority (EFSA). (2012). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* Bipesco 5/F52. *European Food Safety Authority Journal*, 10(1), 2498. doi:10.2903/j.efsa.2012.2498.

European Food Safety Authority (EFSA). (2013). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substances *Beauveria bassiana* strains ATCC-74040 and GHA1. *European Food Safety Authority Journal*, 11(1), 3031. doi:10.2903/j.efsa.2013.3031.

Faeth, S. H., Gardner, D. R., Hayes, C. J., Jani, A., Wittlinger, S. K., & Jones, T. A. (2006). Temporal and spatial variation in alkaloid levels in *Achnatherum robustum*, a native grass infected with the endophyte *Neotyphodium*. *Journal of Chemical Ecology*, 32(2), 307-324. doi:10.1007/s10886-005-9003-x.

Faeth, S. H., & Sullivan, T. J. (2003). Mutualistic asexual endophytes in a native grass are usually parasitic. *The American Naturalist*, 161(2), 310-325. doi:10.1086/345937.

Feldmann, F., & Hommes, M. (2013). Endophytes for plant protection: the registration process at a glance. En: C. Schneider, C. Leifert, & F. Feldmann (Eds.), *Endophytes for plant protection: the state of the art* (pp. 214-222). Braunschweig, Alemania: Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft.

Fuchs, J. G., Moënné-Loccoz, Y., & Défago, G. (1997). Nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain Fo47 induces resistance to *Fusarium* wilt in tomato. *Plant Disease*, 81(5), 492-496. doi:10.1094/PDIS.1997.81.5.492.

Garrido-Jurado, I., Resquín-Romero, G., Amarilla, S. P., 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(1), 319-330. doi:10.1007/s10340-016-0767-2.

Gunatilaka, A. A. L. (2006). Natural products from plant-associated microorganisms: Distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. *Journal of Natural Products*, 69(3), 509-526. doi:10.1021/np058128n.

Herre, E. A., Mejía, L. C., Kyllö, D. A., Rojas, E., Maynard, Z., Butler, A., & Van Bael, S. A. (2007). Ecological implications of anti-pathogen effects of tropical fungal endophytes and mycorrhizae. *Ecology*, 88(3), 550-558. doi:10.1890/05-1606.

Hu, G., & Leger, R. J. S. (2002). Field studies using a recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(12), 6383-6387. doi:10.1128/AEM.68.12.6383.

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

Jaber, L. R., & Vidal, S. (2009). Interactions between an endophytic fungus, aphids and extrafloral nectaries: Do endophytes induce extrafloral-mediated defences in *Vicia faba*? *Functional Ecology*, 23(4): 707-714. doi:10.1111/j.1365-2435.2009.01554.x.

Jacobson, R. J., Chandler, D., J. Fenlon, J., & Russell, K. M. (2001). Compatibility of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin with *Amblyseius cucumeris* Oudemans (Acarina: Phytoseiidae) to control *Frankliniella occidentalis* Pergande (Thysanoptera: Thripidae) on Cucumber plants. *Biocontrol Science and Technology*, 11(3), 391-400. doi:10.1080/09583150120055808.

Jaimes, Y. Y., Moreno, C. A., & Cotes, A. M. (2009). Inducción de resistencia sistémica contra *Fusarium oxysporum* en tomate por *Trichoderma koningiopsis* th003. *Acta Biológica Colombiana*, 14(3), 111-120. Recuperado de https://revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/view/1344/14224.

Jaimes, Y., & Aranzazu, F. (2010). Manejo de las enfermedades del cacao (*Theobroma cacao* L.) en Colombia, con énfasis en monilia (*Moniliophthora roreri*). Recuperado de http://www.fedecacao.com.co/site/images/recourses/pub_doctecnicos/fedecacao-pub-doc_04A.pdf.

Jallow, M. F. A., Dugassa-Gobena, D., & Vidal, S. (2008). Influence of an endophytic fungus on host plant selection by a polyphagous moth via volatile spectrum changes. *Arthropod-Plant Interactions*, 2(1), 53-62. doi:10.1007/s11829-008-9033-8.

Jani, A. J., Faeth, S. H., & Gardner, D. (2010). Asexual endophytes and associated alkaloids alter arthropod community structure and increase herbivore abundances on a native grass. *Ecology Letters*, 13(1), 106-117. doi:10.1111/j.1461-0248.2009.01401.x.

Krell, V., Jakobs-Schoenwandt, D., Vidal, S., & Patel, A. V. (2018). Encapsulation of *Metarhizium brunneum* enhances endophytism in tomato plants. *Biological Control*, 116, 62-73. doi:10.1016/j.biocontrol.2017.05.004.

Kumar, J., Schafer, P., Huckelhoven, R., Langen, G., Baltruschar, H., Stein, E., Nagarajan, S., & Kogel, K.-H. (2002). Bipolaris sorokiniana, a cereal pathogen of global concern: cytological and molecular approaches towards better control. *Molecular Plant Pathology*, 3(4), 185-195. doi:10.1046/j.1364-3703.2002.00120.x.

Landa, B. B., López-Díaz, C., Jiménez-Fernández, D., Montes-Borrego, M., Muñoz-Ledesma, F. J., Ortiz-Urquiza, A., & Quesada-Moraga, E. (2013). In-plant 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(2), 128-138. doi:10.1016/j.jip.2013.06.007.

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

Macías-Rubalcava, M. L., Hernández-Bautista, B. E., Oropeza, F., Duarte, G., González, M. C., Glenn, A. E., Hanlin, R. T., & Anaya, A. L. (2010). Allelochemical Effects of Volatile Compounds and Organic Extracts from *Muscador yucatanensis*, a Tropical Endophytic Fungus from *Bursera simaruba*. *Journal of Chemical Ecology*, 36(10), 1122-1131. doi:10.1007/s10886-010-9848-5.

Martin, J. H., Mifsud, D., & Rapisarda, C. (2000). The whiteflies (Hemiptera: Aleyrodidae) of Europe and mediterranean basin. *Bulletin of Entomological Research*, 90(5), 407-448. doi:10.1017/S0007485300000547.

Mayoral, F., Benuzzi, M., & Ladurner, E. (2006). Efficacy of the *Beauveria bassiana* strain ATCC 74040 (Naturalis®) against whiteflies on protected crops. *IOBC/wprs Bulletin*, 29(4), 83-88.

Mejía, L. C., Herre, E. A., Sparks, J. P., Winter, K., García, M. N., Van Bael, S. A., ... Bulgheresi, S. (2014). Pervasive effects of a dominant foliar endophytic fungus on host genetic and phenotypic expression in a tropical tree. *Frontiers in Microbiology*, 5, 479. doi:10.3389/fmicb.2014.00479.

Michaud, J. P., Pell, J. K., & Vega, F. E. (2017). When insect endosymbionts and plant endophytes mediate biological control outcomes. *Biological Control*, 116, 1-2. doi:10.1016/j.biocontrol.2017.11.003.

Moon, Y. -S., Donzelli, B. G. G., Krasnoff, S. B., McLane, H., Griggs, M. H., Cooke, P., ... Churchill, A. C. L. (2008). *Agrobacterium*-mediated disruption of a nonribosomal peptide synthetase gene in the invertebrate pathogen *Metarhizium anisopliae* reveals a peptide spore factor. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(14), 4366-4380. doi:10.1128/AEM.00285-08.

Nielsen, C., Vestergaard, S., Harding, S., Wolsted, C., & Eilenberg, J. (2006). Biocontrol science and technology biological control of *Strophosoma* spp. (Coleoptera : Curculionidae) in greenery (*Abies procera*) plantations using Hyphomycetes. *Biocontrol Science and Technology*, 16(6), 583-598. doi:10.1080/09583150500532824.

Ownley, B. H., Griffin, M. R., Klingeman, W. E., Gwinn, K. D., Moulton, J. K., & Pereira, R. M. (2008). *Beauveria bassiana*: endophytic colonization and plant disease control. *Journal of Invertebrate Pathology*, 98(3), 267-270. doi:10.1016/j.jip.2008.01.010.

Ownley, B. H., Gwinn, K. D., & Vega, F. E. (2010). Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: Ecology and evolution. *BioControl*, 55(1), 113-128. doi:10.1007/s10526-009-9241-x.

Parsa, S., Ortiz, V., & Vega, F. E. (2013). Establishing fungal entomopathogens as endophytes: Towards endophytic biological control. *Journal of Visualized Experiments*, 74, e50360. doi:10.3791/50360.

Patel, A. (2014). Introduction. En: Jakobs-Schönwandt, D., Döring, M., Patel, A., (Eds.), *Application Techniques of Endophytes* (pp. 17-22). Bielefeld, Alemania: Fachhochschule Bielefeld.

Pieterse, C. M. J., Poelman, E. H., Van Wees, S. C. M., & Dicke, M. (2013). Induced plant responses to microbes and insects. *Frontiers in Plant Science*, 4, 475. doi:10.3389/fpls.2013.00475.

Poelman, E. H., Bruinsma, M., Zhu, F., Weldegergis, B. T., Boursault, A. E., Jongema, Y., ... Dicke, M. (2012). Hyperparasitoids use herbivore-induced plant volatiles to locate their parasitoid host. *Plos Biology*, 10(11), e1001435. doi:10.1371/journal.pbio.1001435.

Posada, F., Aime, M. C., Peterson, S. W., Rehner, S. A., & Vega, F. E. (2007). Inoculation of coffee plants with the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota:

Hypocreales). *Mycological Research*, 111(6), 748-757. doi:10.1016/j.mycres.2007.03.006.

Quesada-Moraga, E., Landa, B. B., Muñoz-Ledesma, J., Jiménez-Díaz, R. M., & Santiago-Álvarez, C. (2006a). Endophytic colonisation of opium poppy, *Papaver somniferum*, by an entomopathogenic *Beauveria bassiana* strain. *Mycopathologia*, 161(5), 323-329. doi:10.1007/s11046-006-0014-0.

Quesada-Moraga, E., Ruiz-García, A., & Santiago-Alvarez, C. (2006b). Laboratory evaluation of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against puparia and adults of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology*, 99(6), 1955-1966. doi:10.1603/0022-0493-99.6.1955.

Ravensberg, W. J. (2015). Commercialisation of microbes: Present situation and future prospects. En: B. Lugtenberg (Ed.), *Principles of plant-microbe interactions: Microbes for sustainable agriculture* (pp. 309-317). Leiden, Holanda: Springer International Publishing. doi:10.1007/978-3-319-08575-3_32.

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., Carpio, A., Garrido-Jurado, I., Arroyo-Manzanares, N., Lozano-Tovar, M. D., & Arce, L. (2016a). Production of destruxins by *Metarhizium* strains under different stress conditions and their detection by using UHPLC-MS/MS. *Biocontrol Science and Technology*, 26(9), 1298-1311. doi:10.1080/09583157.2016.1195336.

Ríos-Moreno, A., Garrido-Jurado, I., Resquín-Romero, G., Arroyo-Manzanares, N., Arce, L., & Quesada-Moraga, E. (2016b). Destruxin A production by *Metarhizium brunneum* strains during transient endophytic colonization of *Solanum tuberosum*. *Biocontrol Science and Technology*, 26(11), 1574-1585. doi:10.1080/09583157.2016.1223274.

Rodriguez-Saona, C., Blaauw, D. R., & Isaacs, R. (2012). Manipulation of natural enemies in agroecosystems: Habitat and semiochemicals for sustainable insect pest control. En: M. L. Larramendy & S. Soloneski (Eds.), *Integrated Pest Management and Pest Control – Current and Future Tactics* (pp. 89-126). Rijeka, Croacia: InTech.

Rodriguez, R. J., White, J. F., Arnold, A. E., & Redman, R. S. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *The new Phytologist*, 182(2), 314-330. doi:10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x.

Rohlf, M., & Churchill, A. C. L. (2011). Fungal secondary metabolites as modulators of interactions with insects and other arthropods. *Fungal Genetics and Biology*, 48(1), 23-34. doi:10.1016/J.FGB.2010.08.008.

Saikkonen, K., Faeth, S. H., Helander, M., & Sullivan, T. J. (1998). Fungal endophytes: A continuum of interactions with host plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 29, 319-343. doi:10.1146/annurev.ecolsys.29.1.319.

Saikkonen, K., Helander, M., Faeth, S. H., Schulthess, F., & Wilson, D. (1999). Endophyte-grass-herbivore interactions: the case of *Neotyphodium* endophytes in Arizona fescue populations. *Oecologia*, 121(3), 411-420. doi:10.1007/s004420050946.

Saikkonen, K., Helander, M., Ranta, H., Neuvonen, S., Virtanen, T., Suomela, J., & Vuorinen, P. (1996). Endophyte-mediated interactions between woody plants and insect herbivores? *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 80, 269-271. doi:10.1111/j.1570-7458.1996.tb00932.x.

Saikkonen, K., Ion, D., & Gyllenberg, M. (2002). The persistence of vertically transmitted fungi in grass metapopulations. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 269(1498), 1397-1403. doi:10.1098/rspb.2002.2006.

Sánchez-Fernández, R. E., Sánchez-Ortiz, B. L., Sandoval-Espinosa, Y. K., Ulloa-Benítez, Á., Armendáriz-Guillén, B., García-Méndez, M. C., & Macías-Rubalcava, M. L. (2013). Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *TIP: Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 16(2), 132-146. doi:10.1016/S1405-888X(13)72084-9.

Scott, R., & Carris, L. (1996). *Endophytic fungi in grasses and woody plants: systematics, ecology, and evolution*. Minnesota, EE. UU.: APS Press.

Schulz, B., & Boyle, C. (2005). The endophytic continuum. *Mycological Research*, 109(6), 661-686. doi:10.1017/S095375620500273X.

Schulz, B., & Boyle, C. (2006). What are Endophytes? En: B. Schulz, C. Boyle, & T. Sieber (Eds.), *Microbial Root Endophytes* (Soil Biology, vol. 9, pp. 1-14). Berlín, Alemania: Springer. doi:10.1007/3-540-33526-9.

Singh, L. P., Gill, S. S., & Tuteja, N. (2011). Unraveling the role of fungal symbionts in plant abiotic stress tolerance. *Plant Signaling & Behavior*, 6(2), 175-191. doi:10.4161/psb.6.2.14146.

Stone, J. K., Bacon, C. W., & White Jr, J. F. (2000). An overview of endophytic microbes: Endophytism defined. En: C. W. Bacon & J. F. White (Eds.), *Microbial Endophytes* (pp. 4-5). Nueva York, EE. UU.: Marcel Dekker.

Strobel, G., & Daisy, B. (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 491-502. doi:10.1128/MMBR.67.4.491-502.2003.

Sun, X., & Guo, L. G. (2012). Endophytic fungal diversity: review of traditional and molecular techniques. *Mycology*, 3(1), 65-76. doi:10.1080/21501203.2012.656724.

Szendrei, Z., & Rodriguez-Saona, C. (2010). A meta-analysis of insect pest behavioral manipulation with plant volatiles. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 134(3), 201-210. doi:10.1111/j.1570-7458.2009.00954.x.

Tanaka, A., Tapper, B. A., Popay, A., Parker, E. J., & Scott, B. (2005). A symbiosis expressed non-ribosomal peptide synthetase from a mutualistic fungal endophyte of perennial ryegrass confers protection to the symbiotum from insect herbivory. *Molecular Microbiology*, 57(4), 1036-1050. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04747.x.

Ten Hoopen, G. M., Deberdt, P., Mbenoun, M., & Cilas, C. (2012). Modelling cacao pod growth: implications for disease control. *Annals of Applied Biology*, 160(3), 260-272. doi:10.1111/j.1744-7348.2012.00539.x.

Ten Hoopen, G. M., & Krauss, U. (2016). Biological control of cacao diseases. En: B. A. Bailey & L. W. Meinhardt (Eds.), *Cacao diseases* (pp. 511-566). Cham, Suiza: Springer. doi:10.1007/978-3-319-24789-2_17.

Thakur, A., Kaur, S., Kaur, A., & Singh, V. (2013). Enhanced resistance to *Spodoptera litura* in endophyte infected cauliflower plants. *Environmental Entomology*, 42(2), 240-246. doi:10.1603/EN12001.

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

Vega, F. E., Goettel, M. S., Blackwell, M., Chandler, D., Jackson, M. A., Keller, S., ... Roy, H. E. (2009). Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. *Fungal Ecology*, 2(4), 149-159. doi:10.1016/J.FUNECO.2009.05.001.

Verma, S., Varma, A., Rexer, K.-H., Hassel, A., Kost, G., Sarbhoy, A., ... Franken, P. (1998). *Piriformospora indica*, gen. et sp. nov., a New root-colonizing fungus. *Mycologia*, 90(5), 896-896. doi:10.2307/3761331.

Vidal, S., & Jaber, L. R. (2015). Entomopathogenic fungi as endophytes: plant–endophyte–herbivore interactions and prospects for use in biological control. *Current Science*, 109(1), 46-54.

Waller, F., Achatz, B., Baltruschat, H., Fodor, J., Becker, K., Fischer, M., ... Kogel, K. -H. (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 United States of America*, 102(38), 13386-13391. doi:10.1073/pnas.0504423102.

Wang, Y., & Guo, L. (2007). A comparative study of endophytic fungi in needles, bark, and xylem of *Pinus tabulaeformis*. *Canadian Journal of Botany*, 85(10), 911-917. doi:10.1139/B07-084.

Webber, J. (1981). A natural control of Dutch elm disease. *Nature*, 292, 449-451. doi:10.1038/292449a0.

Zhang, L. (2014). *Colonization pattern of crop plants by endophytic fungi* (tesis doctoral). Universidad de Gotinga, Gotinga, Alemania.