
Sektion 50

Endophyten

50-1 - Integration of fungal endophytes in a greenhouse environment to control insect pests

Integration endophytischer Pilze in Gewächshäuser zur Kontrolle von Insektenschädlingen

Julia Eschweiler¹, Gerben Messelink², Tina Kasal¹, Damaris Maina¹, Florian Grundler¹, Alexander Schouten¹

¹INRES-Molekulare Phytomedizin, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Karlrobert-Kreiten-Straße 13, 53115 Bonn, Deutschland

²Plant Research International (PRI), Wageningen UR Greenhouse Horticulture, Violierenweg 1, 2665MV, Bleiswijk, Netherlands

Insect pests, like whitefly, can be a major problem in greenhouse environments. To restrict these pest populations by means of non-chemical approaches, predators and parasites are currently being used.

As part of a large EU Interreg program aimed at further optimizing greenhouse production by using state-of-the art technologies, we are studying the application of specific fungal endophytes that have the potential to initiate defense responses in plants with the aim of further minimizing the build-up of pest populations, in particular the green house white fly, *Trialeurodes vaporariorum*. At the same time, the effect of the endophyte on plant development, fruit yield and quality and white fly predation by the frequently applied omnivore *Macrolophus pygmaeus* is monitored. Biochemical and molecular analyses are used to unravel the underlying mechanisms resulting in the endophyte-induced changes in tomato, such as the initiation of defense pathways and alterations in the production of volatiles, which can affect both the white fly and omnivorous predator. The latest results regarding this integrative approach and plant responses are being presented and discussed.

50-2 - Interaktion des endophytisch etablierten entomopathogenen Pilzes *Beauveria bassiana* mit Reben (*Vitis vinifera*) und deren Schaderregern

Interaction between the entomopathogen Beauveria bassiana, grapevine plants and its pests and pathogens

Yvonne Rondot, Annette Reineke

Hochschule Geisenheim University

Im integrierten und ökologischen Pflanzenschutz stellen entomopathogene Pilze bei der Bekämpfung verschiedener Arthropoden eine gute Alternative zu chemischen Pflanzenschutzmitteln dar. Dieses Potential wird allerdings bislang nur unzureichend ausgeschöpft. Insbesondere ist über die Fähigkeit dieser Pilze, sich endophytisch in Pflanzen zu etablieren nur wenig bekannt. Durch eine endophytische Etablierung könnten entomopathogene Pilze zum einen eine Infektionsquelle für Schädlinge darstellen und zum anderen über Mechanismen der induzierten Resistenz Abwehrreaktionen gegen Schaderreger in der Pflanze aktivieren. Ein verbessertes Wissen über diese Interaktionen unterstützt damit eine vermehrte und effizientere Nutzung entomopathogener Pilze in biologischen Pflanzenschutzstrategien.

Vor diesem Hintergrund wurde ein Verfahren für die endophytische Etablierung des entomopathogenen Pilzes *Beauveria bassiana* in Reben *Vitis vinifera* entwickelt und das antagonistische Potential von *B. bassiana* gegenüber Schmierläusen (*Planococcus ficus*) und dem Gefurchten Dickmaulrüssler (*Otiorhynchus sulcatus*) an Topfreben im Gewächshaus bewertet. Die Untersuchungen erfolgten mit zwei Stämmen des Pilzes (ATCC 74040 und GHA), welche in Anhang 2 (Positivliste für Wirkstoffe) der EG-Verordnung Nr. 1107/2009 (früher Anhang I der EU-Richtlinie 91/414) gelistet sind und in den Präparaten Naturalis[®] sowie Botanigard[®] formuliert sind. Zusätzlich wurde das protektive Potential des *B. bassiana* Stammes ATCC 74040 gegenüber dem Erreger des Falschen Rebenmehltaus *Plasmopara viticola* an Topfreben untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass sich *B. bassiana* endophytisch in Reben über einen Zeitraum von mindestens drei Wochen etablieren kann und auch nach endophytischer Besiedelung weiterhin entomopathogene Wirkungsweise besitzt. Als Endophyt hatte *B. bassiana* einen signifikanten Einfluss auf die Mortalität und das Wachstum von *P. ficus* in der ersten Woche nach der anfänglichen Festsetzungsphase junger Larven. In Wahlversuchen wählten adulte *O. sulcatus* signifikant häufiger die Kontrollpflanzen als Wirtspflanze verglichen mit Reben mit endophytisch etabliertem *B. bassiana*. Bei einer protektiven Behandlung von Reben mit *B. bassiana* 3 und 7 Tage vor einer Inokulation mit *P. viticola* konnte eine signifikante Reduktion der Befallsstärke mit *P. viticola* an Blättern von Topfreben beobachtet werden.

Parallel zu diesen Untersuchungen wurden mittels Microarray- und quantitativen real-time PCR-Analysen grundlegende Aspekte zur Interaktion zwischen Reben und endophytisch wachsendem *B. bassiana* erarbeitet, die Schlussfolgerungen auf eine erhöhte Aktivierung von Abwehrgenen der Rebe durch eine endophytische Etablierung von *B. bassiana* erlauben.

50-3 - Different endophytic fungi change volatile organic compound emissions in tomato plants

Sandra Aragon^{1,2}, Alba Marina Cotes, Stefan Vidal²

Biotechnology and Bioindustry Center, Colombian Corporation for Agricultural Research (Corpoica), Mosquera, Colombia. saragon@gwdg.de, saragon@corpoica.org.co

²Georg-August-University Göttingen, Department of Crop Sciences, Section of Agricultural Entomology, Grisebachstrasse 6, 37077 Göttingen, Germany

Beauveria bassiana is an entomopathogenic fungus used as a biocontrol agent against different insect herbivores that attack a wide range of crops. However, some *Beauveria bassiana* strains have also been reported as endophytic colonizer of plant tissues of economically important crops such as coffee, grass, maize, sorghum and others. Nevertheless, no report has been published about the induced responses of this fungus on the volatile organic compounds (VOCs) profile of tomato plants. The present research will show the effect of three different strains of *Beauveria bassiana* on the emissions of VOCs compared to those profiles emitted when plants are colonized by the endophytic plant pathogen biocontrol agent *Trichoderma koningiopsis*. Tomato plants *Solanum lycopersicon* (Mill.) were root inoculated with spore suspensions of 1X10⁸ (CFU) prior to transplanting. Four weeks after inoculation and aphid attack, the headspace volatile of each plant was collected using a close loop method and TDS traps and analyzed by GC-MS. The chromatograms showed a spectrum of about 52 compounds emitted by non-inoculated plants. Suppressed peaks of volatiles directly involved in the repellency of herbivorous insects were detected in *Beauveria bassiana* treated plants. While those plants that were inoculated with the endophyte *Trichoderma koningiopsis* showed an increase in the relative abundance of Caryophyllene as well as α -Caryophyllene. It is also important to highlight that volatile profiles of plants treated with either *B. bassiana* or *T. koningiopsis* increased the relative abundance of most of the compounds expressed during the retention times between 14 to 25 min., which were mostly identified as essential oils reported as toxic compounds for insect herbivores.

50-4 - Molecular quantification of the endophytic entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* and impact of water stress on colonization success

*Molekulare Quantifizierung der endophytischen entomopathogenen Pilze (*Beauveria bassiana* und *Metarhizium anisopliae*) und die Wirkung von Trockenstress auf den Erfolg der Kolonisation*

Dalia Muftah Alkhatay, Petr Karlovsky, Stefan Vidal

Georg-August Universität, Fakultät für Agrarwissenschaft, Department für Nutzpflanzenwissenschaften, Fachgebiet für Pflanzenpathologie und Pflanzenschutz, Abteilung Agrarentomologie

Several strains of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* are reported to endophytically colonize different crop plants, including tomato. In this research we designed strain specific primers to quantify the colonization of the tomato plants by one strain of *Beauveria bassiana* and two strains of *Metarhizium anisopliae* to the level of femtograms with real-time PCR, and assessed the influence of water stress conditions on colonization rates of *Beauveria bassiana* EAb04/01-Tip. The experiment was conducted under greenhouse conditions with two plant's groups, control and root inoculated plants, where each group, consisting of forty plants, was divided into two sub-groups for different watering regimes. At flowering stage, roots and newly emerged leaves were sampled to compare the fungal colonization rate using real-time PCR.

Literatur

- LANDA, B. B., LOPEZ-DIAZ, C., JIMENEZ-FERNANDEZ, D., MONTES-BORREGO, M., MUNOZ-LEDESMA, F. J., ORTIZ-URQUIZA, A., QUESADA-MORAGA, E., 2013: In-planta detection and monitorization of endophytic colonization by a *Beauveria bassiana* strain using a new-developed nested and quantitative PCR-based assay and confocal laser scanning microscopy. *J. Inverteb. Pathol.* **114** (2), 128-138.
- OWNLEY, BONNIE H., GRIFFIN, MARY R., KLINGEMAN WILLIAM E., GEWINN, KEMBERLY D., MOULTON, J. KEVIN, PEREIRA, ROBERTO M., 2008: *Beauveria bassiana*: Endophytic colonization and plant disease control. *J. Inverteb. Pathol.* **98** (3), 267-270.
- QUESADA-MORAGA, E., LOPEZ-DIAZ, C., LANDA, B. B., 2014: The hidden habit of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: First demonstration of vertical plant transmission. *Journal.pone.* 0089278, open access, PLOS ONE.
- SASAN, RAMANPREET K., BIDOCHKA, MICHAEL J., 2012: The insect pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* (Clavicipitaceae) is also an endophyte that stimulates plant root development. *Am. J. Bot.* **99** (1), 101-107.

50-5 - Entwicklung einer neuartigen Sprühformulierung für endophytische entomopathogene Nutzpilze gegen Schadinsekten

Development of novel spray formulations for endophytic entomopathogenic fungi against insect pests

Desiree Jakobs-Schönwandt, Rieke Lohse, Peter Spieth, Annika Lemke, Anant Patel

Fachhochschule Bielefeld, Ingenieurwissenschaften und Mathematik, AG Fermentation und Formulierung von Zellen und Wirkstoffen

Eine innovative Möglichkeit Kulturpflanzen wie Tomate und Raps auf biologische Weise vor dem Befall von Schadinsekten zu schützen, besteht in der Nutzung von endophytischen entomopathogenen Pilzen wie *Beauveria bassiana* und *Metarhizium anisopliae*. Das Ziel unserer Forschung liegt in der Entwicklung geeigneter Sprühformulierungen, um die Pilze bei der Applikation zu schützen und um die Penetration und Kolonisierung der Pflanzen zu verbessern. Zur Entwicklung optimaler Sprühformulierungen wurden der Einfluss von Benetzungsmitteln, Nährstoffen, UV-Schutzmitteln und weiterer Adjuvantien auf die Reduktion der Oberflächenspannung sowie des Kontaktwinkels untersucht. Ebenso wurde die Steigerung der Keimfähigkeit der Sporen, die Verbesserung der Kolonisierung der Pflanzen und die Erhöhung der Wirksamkeit gegen verschiedene Schaderreger bei der Entwicklung berücksichtigt. Zum Nachweis der endophytischen Pilze in Pflanzengewebe wurden verschiedene sich ergänzende Methoden wie Mikroskopie, Resolierung, molekularbiologische Analysen und Mortalitätstests eingesetzt. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass durch die Wahl einer optimierten Sprühformulierung bestehend aus NIS3,

Melasse, Titandioxid und Sporen die Penetration der Rapsblätter verbessert werden kann (Abbildung. 1)

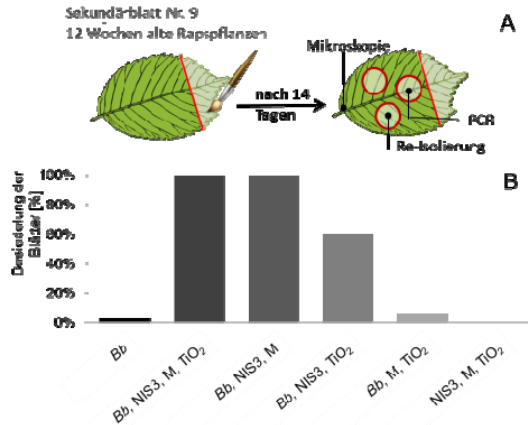


Abb. 1 A: Versuchsdurchführung; B: Einfluss der Formulierung auf die Penetration von Rapsblättern detektiert mittels Lichtmikroskopie.

NIS3 Benetzungsmittel, M Melasse, TiO₂ UV-Schutzmittel, Bb = 10 Sporen/ml

Darüber hinaus konnte auch die endophytische Kolonisierung der Pflanzen durch die Verwendung von Sprühformulierungen ermöglicht werden. So wuchs *B. bassiana* im Rahmen von Re-isolierungsexperimenten aus 16 % bzw. 24 % der neu gewachsenen Blätter aus. Dieses Ergebnis wurde durch die Verwendung von *B. bassiana* spezifischen PCR Primern verifiziert. Mittels Lichtmikroskopie konnten in 100 % aller behandelten Rapspflanzen Pilzhyphen nachgewiesen werden.

Verschiedene Ergebnisse zu Penetrationsmechanismus und Wirksamkeitstests an Tomate, Raps und Wein werden gezeigt.

50-6 - Defense responses in *Arabidopsis* against root-knot nematode, initiated by an endophytic *Fusarium oxysporum*

Einfluss eines endophytischen Fusarium oxysporum auf die pflanzliche Abwehr von Arabidopsis gegen Wurzelgallennematoden

Alexander Schouten, Catherine Bogner, Getaneh Zewdu, Matheus Kuska, Alfonso Martinuz, Florian Grundler

Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, INRES - Molekulare Phytomedizin

Endophytic *Fusarium oxysporum* isolates can systemically repress the infection of both sedentary and burrowing nematodes in various plant species. Genome array studies in tomato show that such endophytes can significantly modify the plant gene expression profile. This modification is more dramatic when compared to applying methyl jasmonate or salicylic acid, which are known for eliciting induced systemic resistance (ISR) or systemic acquired resistance (SAR), respectively. In *Arabidopsis* too, *F. oxysporum* endophytes can develop endophytically and systemically reduce infection by the sedentary root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. Because of the extensive molecular knowledge and the availability of a significant number of well-characterized mutants,

the *Arabidopsis* model system is therefore also suitable for further studying endophyte-induced molecular and biochemical changes that take place inside the plant affecting nematode infection and development.

Literatur

- Martinuz, A., A. Schouten, R. A. Sikora, 2013: Post-infection development of *Meloidogyne incognita* on tomato treated with the endophytes *Fusarium oxysporum* strain Fo162 and *Rhizobium etli* strain G12. *BioControl* 58, 95-104.
- Martinuz, A., G. Zewdu, N. Ludwig, F. Grundler, R. A. Sikora, A. Schouten, 2014: The application of *Arabidopsis thaliana* in studying tripartite interactions among plants, beneficial fungal endophytes and biotrophic plant-parasitic nematodes. *Planta*, submitted.