

USO DE ENDÓFITOS COMO ESTRATEGIA PARA BIOCONTROL

TREVOR JACKSON¹ AND FEDERICO RIVAS²

¹AGRESEARCH, LINCOLN, NEW ZEALAND
²BIOPROTECTION RESEARCH CENTRE, LINCOLN UNIVERSITY, NEW ZEALAND - INIA, LAS BRUJAS, URUGUAY



QUÉ Y QUIÉNES SON ENDÓFITOS MICROBIANOS?

Microbios que durante alguna parte de su ciclo de vida, habitan los tejidos vivos de la planta sin causar síntomas visibles (De Wilson 1995)

La definición más amplia:

Microorganismos que se desarrollan dentro de los tejidos vivos vegetales, distinguiendo como "patógenos" a aquellos que por su presencia causan un efecto negativo en el desempeño del hospedero, mientras que los **que en general causan efectos neutros o positivos** pueden considerarse "endófitos clásicos".



TIPOS DE ENDÓFITOS



- **Endófitos fúngicos Tipo I (A):**
Clavicipitaceae: *Neotyphodium*
(Transmisión vertical)
- **Endófitos fúngicos Tipo II (A):**
Trichoderma, Beauveria, Fusarium
(Transmisión horizontal)
- **Bacterias (B y C):**
Fijadoras de N₂ (*Rhizobium*)
Biocontroladores (*Bacillus, Pseudomonas*)
Biorremediadoras (*Herbaspirillum, Pseudomonas*)
- **Micorrizas (D)**
Ectomicorrizas
Micorrizas arbusculares

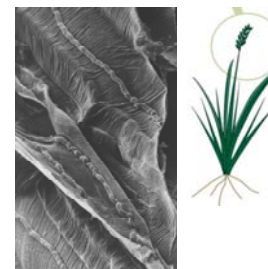
La presencia de endófitos, en hojas y asociados a raíces, confieren a las plantas de ventajas adaptativas contra factores bióticos y abióticos.



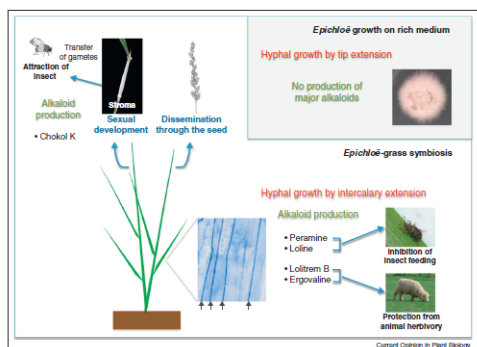
Tomado de: The microbe-free plant: an artifact
 Frontiers in Plant Sciences, Dec (2011) Vol. 2

EJEMPLO CLASSICO – EPICHLÖE Y GRAMINAE

Epichlöe festucae y *Neotyphodium lolii* (derivados asexuales) son simbiontes mutualistas de gramíneas como *Festuca* y *Lolium*

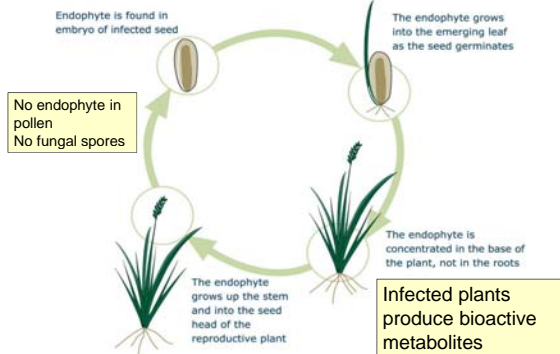


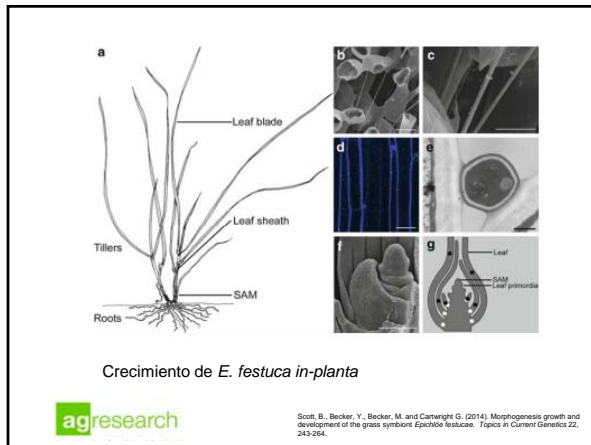
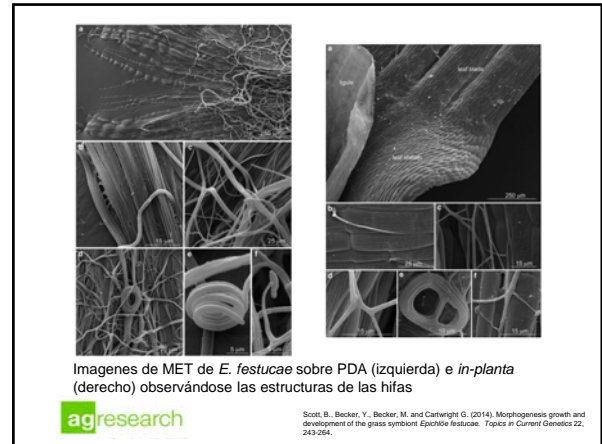
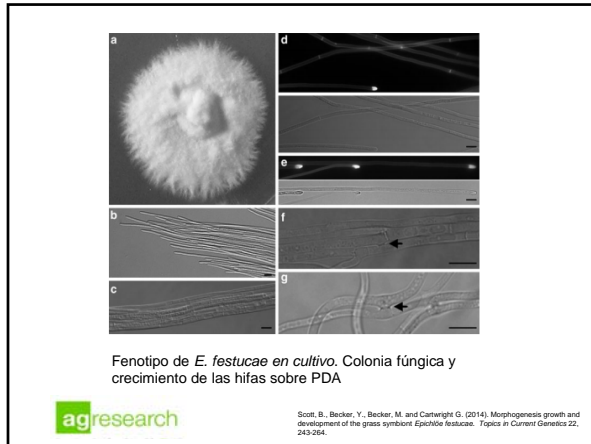
Tanaka, A., Takemoto, D., Chujo, T., & Scott, B. (2012). Fungal endophytes of grasses. *Current Opinion in Plant Biology*, 15(4), 462-468



Tanaka, A., Takemoto, D., Chujo, T., & Scott, B. (2012). Fungal endophytes of grasses. *Current Opinion in Plant Biology*, 15(4), 462-468

The Endophyte Life Cycle





POR QUÉ SON IMPORTANTE

Symbiontes – protegen la planta contra los herbívoros

Ayudan a la planta a tolerar períodos de estrés

agresearch

Metabolitos Secundarios

Toxinas de mamíferos

- Fescue toxicus
- Ryegrass staggers

Toxinas de insectos

- Feeding deterrents
- Toxins

agresearch

TOXINAS DE MAMÍFEROS - STAGGERS & HEAT STRESS

agresearch



Daño por insectos – Como afecta el desempeño de la planta?



agresearch

Argentine stem weevil (*Listronotus bonariensis*)



agresearch

Larvas consumidores de raíces - Scarabaeidae



agresearch

Pulgón de la raíz (*Aploneura lentisci*)

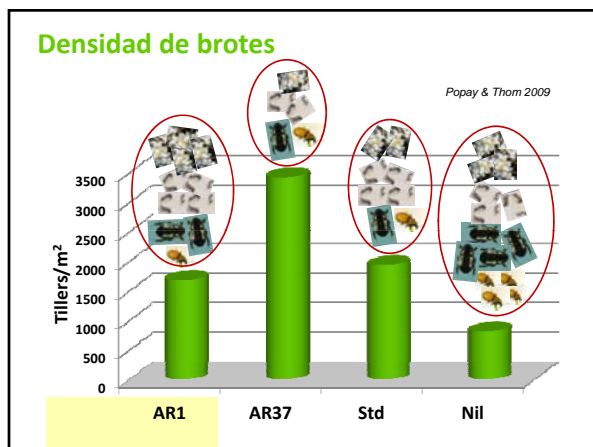
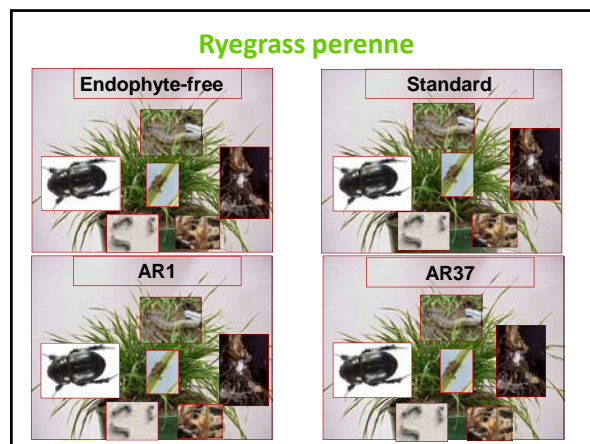


agresearch

Porina (*Wiseana* spp., Hecialidae)



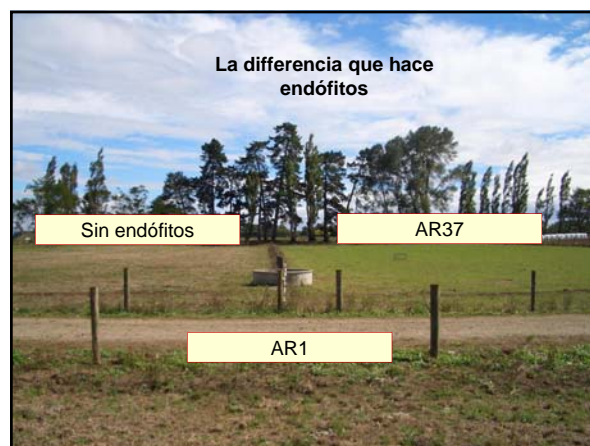
agresearch



Endófitos en *Festuca* y alcaloides del tipo lolina

- Endófitos en *Festuca* producen lolina (alcaloide)
- La lolina afecta un gran variedad de insectos
- Se trasloca por la planta hasta las raíces

agresearch





agresearch

PGGWS Trial Woodstock

En Nueva Zelanda

➤ Los endófitos mejoran el rendimiento de ryegrass y *Festuca* porque -

- Afectan negativamente los insectos
- Ayudan a la planta a tolerar el estrés abiótico



agresearch

OPPORTUNITIES FOR ENDOPHYTES

Review Trends in Biotechnology May 2012, Vol. 30, No. 5

Box 3. Endophytes in pest management

Endophytes are fungi or bacteria that occur and develop inside plant tissues without causing any apparent symptoms in the plant. Recently, an enormous diversity of microbes capable of endophytic colonization have been identified [2], including microbes known to have biocontrol capabilities against insect pests and plant diseases [2]. For example, bacteria (including *Bacillus* spp.) are known to be endophytic in a wide

range of plant species, and the suppression of a range of woody trunk diseases caused by fungi such as *Botryotinia* and *Phymotrichum* [http://www.leproulxlab.com/wordpress/wp-content/uploads/BrochureVineauBiocontrol.pdf]. A significant industry has developed to exploit the fungal endophyte, *Neotyphodium* spp., which form mutualistic associations with several grass genera. These fungi produce a range of bioactives, some of

"The occurrence of endophytic microbes with pesticidal abilities is leading to exciting new opportunities because it overcomes delivery issues often associated with biopesticides"

interactions. The chemical and biological mechanisms of these interactions are still poorly understood. Several commercially available products have already been developed that exploit endophytic abilities of pesticial microbes. One version of *Vineau[®]* is a mixture of strains of *Trichoderma harzianum* formulated as a dust that is inserted into holes drilled into the trunks of grapevines which enabled internal colonization of tissue and

significant promise for control of pests such as larvae, weevils, nematodes and *Puccinia* with disease [30,31]. Cases in another crop where a range of endophytic microbes (e.g. *Bacillus* spp., *Trichoderma* spp., *Betais* bacterial) are showing potential to control diseases and insect pests [32-35].

agresearch

Glare et al. 2012

TIPOS DE ENDÓFITOS

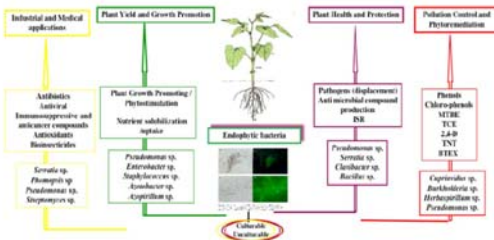


La presencia de endófitos, en hojas y asociados a raíces, confieren a las plantas de ventajas adaptativas contra factores bióticos y abióticos.

agresearch

Tomado de: The microbe-free plant: an artefact Frontiers in Plant Sciences, Dec. (2011) Vol. 2

EJEMPLOS DE OTROS ENDÓFITOS REPORTADOS



agresearch

Tomado de Ryan et al., 2008

EJEMPLOS DE OTROS ENDÓFITOS REPORTADOS

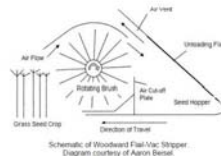
Especies	Hospedero	Efecto	Referencia
<i>Beauveria bassiana</i> ^{1,2} , <i>Metarhizium anisopliae</i> ²	Maíz ² , Cacao ² , Amapola ² , Café ² y Tomate ² , <i>Picea abies</i> ²	Biocontrol del taladro Europeo del maíz ² , BVW <i>Otiorynchus sulcatus</i> ²	Inglis et al. 2001; Meyling & Eilenberg 2007 ² ; Bruck 2009 ²
<i>M. robertsii</i> ² , <i>Piriformospora indica</i> ²	<i>Panicum virgatum</i> (switchgrass) ² ; cebada ²	Promoción del desarrollo radicular	Sasan and Bidochka 2012 ² ; Waller et al. 2007 ²
<i>Lecanicillium longisporum</i>	Pepinos		
<i>B. bassiana</i> ² ; <i>L. dimorphum</i> ² , <i>L. psalliotae</i> ² ; <i>L. muscarium</i> ² , <i>P. indica</i> ² , <i>Trichoderma harzianum</i> ²	Algodón, Palma datilera ² , Pepino ² , cebada ²	Resistencia sistémica inducida	Owens et al. 2010 ² ; Gomez-Vidal 2006 ² ; Hirano et al. 2008 ² ; Waller et al. 2007 ² ; Harman 2011 ²
<i>M. anisopliae</i>	Maíz	Promoción del crecimiento	Bruck 2009 ² ; Kabaluk y Ericsson 2007
<i>B. bassiana</i> ^{2,3,4} ; <i>P. indica</i> ² , <i>T. harzianum</i> ²	Trigo, cebolla ² , tomate ² , algodón ² , cebada ² , Vid ²	Control de enfermedades: <i>Gaeumannomyces graminis</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Rhizotonia solani</i> ² , <i>Pythium myriostylum</i> ² , <i>F. culmorum</i> ² , <i>Botryosphaeria</i> , <i>Phaeoaniella</i> ²	Owens 2010; Waller et al. 2007 ² ; Harman 2011 ²
<i>M. robertsii</i> ² , <i>Trichoderma n</i>	Switchgrass ² ,	Transferencia de nutrientes	Behie et al., 2012 ² ;
<i>T. harzianum</i> ² ; <i>P. indica</i> ² ,	Tomate ² , cebada ²	Resistencia abiótica	Harman 2011 ² ; Waller et al., 2007 ² .

ESTRATEGIAS DE USO

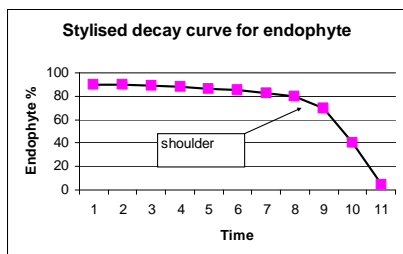
- *In planta*, transmisión vertical – ryegrass, festuca
- Cobertura de semillas, inoculación – rhizobium con leguminosas
- Apliques en heridas, Implantes – Tricodowels
- Incorporación al suelo – Mycorrhiza
- Application foliar o en raíces sprays – (*Beauveria*, *Metarhizium*)



LA TRANSMISION VERTICAL - COSECHA DE LOS ENDÓFITOS CON LA SEMILLA



PERDIDA DE ENDÓFITOS CON TIEMPO



ALMACENAMIENTO PARA PRESERVAR LOS ENDÓFITOS EN LA SEMILLA

Storage between seasons

Not all seed can be sold in the year it is harvested, due to the limited time between harvest (particularly of late heading cultivars) and farmer pasture sowing requirements.

Endophyte levels are easily maintained between seasons in low humidity, low temperature storage. All seed with AR37 or NEAL endophyte carried over is placed in cool storage as soon as possible after cleaning, and endophyte levels are re-tested prior to sale.

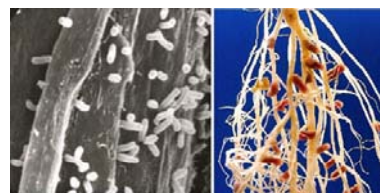


ENDÓFITOS EN PRADERAS DE NUEVA ZELANDA



- 80% del ryegrass o de la festuca sembrada en NZ contiene endófitos
- Representa aproximadamente 400,000 ha anualmente
- Un proceso "invisible" porque es incorporada en el sistema de producción de semillas

RHIZOBIUM COMO ENDÓFITO DE LEGUMINOSAS



COBERTURA DE SEMILLAS – TECNOLOGIA DE BIOPOLIMEROS



- Alta densidad de microorganismos viables en volúmenes bajos
- Incremento de termotolerancia
- Extensión de sobrevivencia en almacenamiento
- Facilidad de almacenar y transportar




EnCoate
agresearch

Patents
Johnson and Pearson, WO 0215702 A1
Swaminathan and Jackson, WO2009061221A2

ENDOPHYTES FOR WOODY PLANTS

Natural Protectant Bio-Fungicide



vinevax
Pruning wound dressing

Stage	Preparation	Application	Timing	Other Comments
Seed	1. Mix 100g of vinevax with 100g of water in a bucket. 2. Dip seeds in the mixture for 10-15 minutes. 3. Shake off excess liquid.	Apply to the seed.	APPLY AT THE END OF THE DAY	0000070000
Pruning Wound	1. Mix 100g of vinevax with 100g of water in a bucket. 2. Dip the pruning cut in the mixture for 10-15 minutes. 3. Shake off excess liquid.	Apply to the pruning cut.	APPLY AFTER CUTTING	0000000000

vinevax
Living barrier protection for pruning wounds

agresearch

vinevax BIO-DOWEL IMPLANT

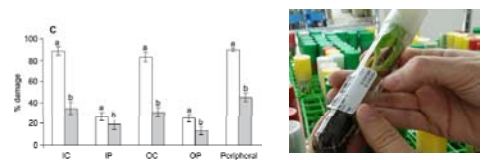


Method of application for Vinevax Bio-implant.

Control of *Eutypa* dieback (*Eutypa lata*)

agresearch

BEAUVERIA ENDOPHYTES ADDED DURING TISSUE CULTURE FOR WEEVIL CONTROL

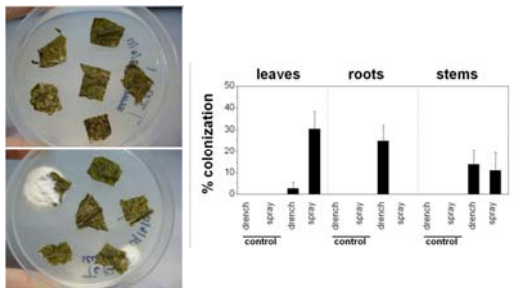


Treatment	% Damage
IC	~85
IP	~25
OC	~85
OP	~25
Poriferal	~85

Agallo, Dubois, Coyne and Kyamanywa (2008). Effect of endophytic *Beauveria bassiana* on populations of the banana weevil and their damage in tissue cultured banana plants. Ent. Exper. et Appl. 129 157-165

agresearch

INFECTION OF BEANS BY SPRAY OR DRENCH



Part	Treatment	% Colonization
leaves	drench control	~0
	spray control	~0
	drench	~30
roots	drench control	~0
	spray control	~0
	drench	~25
stems	drench control	~0
	spray control	~0
	drench	~15

Parsa S, Ortiz V & Vega FE (2013). Establishing fungal entomopathogens as endophytes: towards endophytic biological control. J. Vis. Exp. Apr 11;74.

agresearch

CONCLUSIONES

- Los microbios endófitos beneficiosos pueden ser usados para proporcionar protección contra el ataque de plagas y enfermedades
- Nuevos métodos de aplicación deben ser desarrollados con conocimiento de la biología de la interacción entre el endófito y la planta hospedera
- Los endófitos transmitida verticalmente puede ser aplicado para colonizar la planta hospedera y ser multiplicado con las semillas
- Los endófitos transmitida horizontalmente deben ser cultivados y aplicados a la planta creciente - a través del tratamiento de semilla, aplicación a la planta creciente en viveros o colonización de tejido de la planta.
- Una gran variedad de endófitos han sido descubiertos y la gran mayoría esperan desarrollo y uso.

agresearch

ACKNOWLEDGEMENTS

Research teams at AgResearch and the Lincoln University Bio-Protection Centre
Especially Drs Alison Popay and Phil Rolston for supply of information

