

ABSTRACT

Biopriming seeds with beneficial fungal endophytes provide an innovative, cost-effective and environmentally sound solution for improving crop health and attaining better yields. This study investigated the diversity of fungal endophytes associated with Kenyan maize, sorghum and Napier grass and their potential role in insect pest management.

From the mycological meta-survey, a total of 6887 endophytic strains were isolated from different plant parts. Based on morphological and molecular sequence analysis of 150 leaf and stem isolates, 32 fungal species and 16 genera were identified. Species of *Fusarium* (40.6%), *Gibberella* (30.1%) and *Penicillium* (11.3%) were the commonest; while *Trichoderma*, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Beauveria*, *Bionectria*, *Cochliobolus*, *Daldinia*, *Gaeumannomyces*, *Hypocrea*, *Metarhizium*, *Phoma* and *Talaromyces* were only found sporadically. Species occurrence, richness and distribution depended on host genotype, rainfall and elevation; with the highest diversity observed in maize and in the tropical highland region. For the first time, *Metarhizium anisopliae* was isolated as an endophyte of maize.

In vitro screening of 320 fungal strains against second larval instars of *Chilo partellus* or *Liriomyza* spp. demonstrated that < 10% of the isolates were able to cause high mortality when the insects were confronted directly with the fungi. Among these were: *M. anisopliae* (N1LT6 and S4ST7), *Beauveria bassiana* (S4SU1 and G1LU3), *Fusarium oxysporum* (M7SF3), *Trichoderma asperellum* (M2RT4), *Gibberella moniliformis* (E3RF20) and *Hypocrea lixii* (F3ST1) isolates, which caused mortality rates of 60-100%. Based on their virulence and level of sporulation, these were selected as promising candidates for studying the effects of biopriming on insect pests.

Biopriming maize and bean seeds for 4 h with spores of these endophytic fungi did not affect seed germination and therefore proved harmless to seeds or seedlings during the early stages of crop establishment. Assessment of endophytic colonization showed that M2RT4, E3RF20, S4ST7 and S4SU1 can successfully re-colonize endorhiza of maize and bean seedlings following seed treatment. The most efficient plant tissue colonizers were M2RT4 and E3RF20 isolates (> 80% root, stem and leaf colonization).

Irrespective of insect species, larvae fed on cereal or legume seedlings following seed treatment exhibited prolonged development time, retarded growth and higher mortality rates that led to a reduction in insect population densities. For instance, the leaf miner fly population density was reduced by 50% when fed on bean seedlings treated with M2RT4, S4SU1 and G1LU3. Inoculation of faba beans with these isolates also suppressed the pea aphid population density by 70% over the controls. After feeding *Acyrtosiphon pisum* and *Aphis fabae* offspring on endophyte treated seedlings for two generations, fecundity was reduced by a factor of 1.6 – 14.6. Exposing *C. partellus* neonates to E3RF20, S4ST7 or G1LU3 bioprimed maize seedlings resulted in reduced weight gain by 30-50% and a decrease in leaf damage by ~ 30%. A 70% reduction in the frequency of deadhearts was also observed among E3RF20 and S4ST7 treated maize seedlings. Some of the antagonistic endophytic fungi *in vitro* also proved to be excellent extracellular enzyme secretors, toxic secondary metabolite producers and to possess beneficial properties that lead to plant growth promotion.

KURZFASSUNG

Biodiversität pilzlicher Endophyten in Mais, Sorghumhirse und Napiergras und die Wirkung biologischer Vorbehandlung auf die Resistenz gegen blattminierende, stängelbohrende und saftsaugende Schadinsekten

Die Behandlung von Samen mit pilzlichen Endophyten ("Biopriming") bietet Möglichkeiten für eine innovative, kosteneffektive und umweltfreundliche Lösung zur Verbesserung von Pflanzengesundheit und Erträgen im landwirtschaftlichen Anbau. Die Diversität von pilzlichen Endophyten an kenianischem Mais, Hirse und Napiergras, sowie deren potentielle Rolle bei der biologischen Bekämpfung von Schadinsekten wurde in dieser Studie untersucht.

Durch eine mykologische Erfassung wurden insgesamt 6887 Endophyten aus verschiedenen Pflanzenteilen isoliert. Auf Grundlage der morphologischen und molekularen Analyse von 150 Blatt- und Stängelisolaten wurden 32 Pilzarten aus 16 Gattungen identifiziert. Die Arten *Fusarium* (40.6%), *Gibberella* (30.1%) and *Penicillium* (11.3%) waren am häufigsten vertreten. Desweiteren aber in geringerer Häufigkeit kamen vor: *Trichoderma*, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Beauveria*, *Bionectria*, *Cochliobolus*, *Daldinia*, *Gaeumannomyces*, *Hypocrea*, *Metarhizium*, *Phoma* und *Talaromyces*. Artenvorkommen, -reichtum und -verteilung waren von Wirtsgenotyp, Niederschlag und Höhenlage abhängig. Der Artenreichtum war bei Endophyten aus Mais höher als bei Hirse ($\times 2$) und Napiergras ($\times 1.5$) und am vielfältigsten in der tropischen Hochlandregion. Zum ersten Mal wurde *Metarhizium anisopliae* als Endophyt aus Mais isoliert.

In einem *in vitro* Screening von 320 Pilzstämmen gegen *Chilo partellus* bzw. zwei *Liriomyza*-Arten. im zweiten Larvenstadium zeigte sich, dass weniger als 10% der Isolate zu hohen Mortalitätsraten der Schädlinge führten. Die vielversprechendsten Isolate waren *M. anisopliae* (N1LT6 and S4ST7), *Beauveria bassiana* (S4SU1 und G1LU3), *Fusarium oxysporum* (M7SF3), *Trichoderma asperellum* (M2RT4), *Gibberella moniliformis* (E3RF20) und *Hypocrea lixii* (F3ST1). Diese ergaben Mortalitätsraten von 60-100% an den untersuchten Insekten. Auf der Grundlage ihrer Virulenz und Sporulationsfähigkeit wurden sie als vielversprechende Isolate für das "Biopriming" gegen Schadinsekten gewählt.

Die Saatgutbehandlung von Mais- und Bohnensamen für 4 Stunden mit diesen Endophyten hatte keine Auswirkungen auf die Keimfähigkeit und zeigte auch sonst keine negativen Effekte auf Samen und Keimlinge während des frühen Stadiums der Pflanzenentwicklung. Eine Untersuchung der Wiederbesiedlung der Pflanzen durch die Endophyten ergab, dass die Isolate M2RT4, E3RF20, S4ST7 Mais- und Bohnenkeimlinge nach der Behandlung erfolgreich wiederbesiedeln konnten. Am besten besiedelten die Isolate M2RT4 und E3RF20 die Pflanzen. Sie waren in mehr als 80% des untersuchten Pflanzengewebes wieder zu finden.

Unabhängig von der Insektenart wurden Larven, die mit endophytisch besiedelten Getreide- und Leguminosen Samen ernährt wurden, verlangsamtes Wachstum und höhere Mortalitätsraten festgestellt. Diese führten dann zur Abnahme