

FACULTY OF AGRICULTURAL SCIENCES

Institute of Agricultural Sciences in the Tropics

(Hans-Ruthenberg Institute)

University of Hohenheim

Field: Crop production and Food security

Prof. Dr. Georg Cadisch



Impacts of the fungal bio-control agent *Fusarium oxysporum* f.sp. *strigae* on plant beneficial microbial communities in the maize rhizosphere

Dissertation

Submitted in fulfillment of the requirements for the degree

“Doktor der Agrarwissenschaften”

(Dr.sc.agr./ Ph.D. in Agricultural Sciences)

to the

Faculty of Agricultural Sciences

Presented by:

Mary Kamaa Musyoki

born in Machakos County, Kenya

Stuttgart-Hohenheim, 2016

Summary

Striga hermonthica is a major threat to cereal production and food security in Sub-Saharan Africa. Integrated *Striga* management (ISM) has been proposed as one of the best options to control *Striga* weeds. Consistent with this proposal, the integration of resistant crop varieties and biological control agents (BCAs) including *Fusarium oxysporum* f.sp. *strigae* (“Foxy-2”) has been proven as an effective and environmental friendly management strategy. Despite being promoted as a critical component of ISM, the use of “Foxy-2” as a *striga* BCA has thus far not been subjected to risk assessment analysis on non-target microorganisms, yet such an assessment is a prerequisite for its large-scale field application. Moreover, the use of *Striga* BCAs such as “Foxy-2” has been criticized for wide differences in their performances in *Striga* control between laboratory/greenhouse and field conditions; differences which have been attributed to variation in biotic and abiotic factors prevailing where the BCAs have been introduced. Hence, this thesis focused on determining the non-target effects of “Foxy-2” on key microorganisms involved in soil nitrogen (N) cycling (i.e., nitrification, proteolysis) in the maize rhizosphere. Specific objectives were to; 1) investigate the non-target effects of “Foxy-2” on the abundance of ammonia-oxidizing archaea (AOA) and bacteria (AOB) as well total archaea and bacteria. This was performed in a rhizobox experiment using two contrasting soils (i.e., sandy Ferric Alisol versus clayey Humic Nitisol) derived from non *Striga* infested field sites in the central highlands of Kenya (Embu and Machanga), 2) determine the extent to which soil type, crop growth (i.e., early leaf development stage (EC30), flowering (EC60) and senescence stage (EC90)) stage and seasonality (i.e. short and long rain seasons) contribute to the dynamics of abundance and structure of nitrifying prokaryotes relative to the effects of “Foxy-2” inoculation on nitrifying prokaryotes in two contrasting agro-ecological sites (Busia and Homabay) in Western Kenya, 3) develop quantitative polymerase chain reaction (qPCR) protocols for quantifying proteolytic bacteria (i.e. *npr* gene encoding neutral metalloproteases) in tropical soils, and 4) use the developed protocols to determine if “Foxy-2” has non-target effects on proteolytic bacteria abundance (qPCR) and potential enzyme activity (i.e. *npr* gene specific Suc-Ala-Ala-Phe-AMC). The methodological approach entailed a combination of rhizobox and field experiments planted with and without *Striga* seeds in combination with maize seeds coated with and without “Foxy-2”. Since the study hypothesized that “Foxy-2” induces N resource competition,

consequently threatening N cycling microorganisms, an additional treatment with high quality organic input (*Tithonia diversifolia*) was added. Rhizosphere soils obtained from the experimental maize plants were subjected to molecular (i.e. qPCR) and terminal restriction fragment length polymorphism (TRFLP), biochemical (enzymatic and soil physico-chemical analysis) and statistical analysis.

The results from a rhizobox study showed that “Foxy-2” inoculation leads to an increase in the abundance of total archaea and AOA in the sandy soil but has no effect on the abundance of both micro-organisms in the clayey soil. This suggests that the effect of “Foxy-2” inoculation on nitrifying prokaryotes, particularly the archaeal community, is interactive with soil type. Moreover, AOA abundance remained stable and higher in the control treatments in the clayey soil where *Striga hermonthica* seeds had been applied without “Foxy-2” inoculation further suggesting that AOA are able to surmount nutritional resource limitations caused by the *Striga* weed.

A subsequent field based study demonstrated strong influences of soil type, crop growth stage and seasonality on the abundance and community composition of total and nitrifying prokaryotes but no major effect of “Foxy-2”. This implies that these “natural” factors masked the promotive effect of “Foxy-2” on the archaeal community abundance observed in the rhizobox experiment; a phenomenon that was linked to variation in soil organic carbon content mediated by seasonality and crop growth stages.

The third part of the study, which focused on the influence of the quality of organic inputs on the abundance and community composition of proteolytic bacteria, showed that high quality organic inputs (i.e. *Tithonia diversifolia*) caused a reduction in the abundance of proteolytic bacteria. The suppressive effect of *Tithonia diversifolia* on proteolytic bacteria abundance was linked to low lignin and polyphenol composition. Based on the major finding that *Tithonia diversifolia* reduced the abundance of proteolytic bacteria, additional investigations were carried out using the rhizobox soils from the control, “Foxy-2” and “Foxy-2” + *Tithonia diversifolia* treatments to determine if the application of “Foxy-2” and its combination with high quality inputs further depressed the abundance and potential activity of enzymes of proteolytic bacteria. “Foxy-2” showed a minor reduction effect (i.e. transitory) on the abundance of proteolytic bacteria in the sandy and clayey soils. The transient reduction in abundance of *npr* genes signified a “Foxy-2” induced competition effect on the abundance of proteolytic bacteria which was compensated for by the application of high quality organic input *Tithonia diversifolia*. The “Foxy-2” reduction effect was not reflected in the measured

potential proteolytic enzyme activity, indicating that the functionality of proteolytic bacteria was not affected by “Foxy-2” inoculation.

Overall, the PhD study showed that, “Foxy-2” is compatible with nitrifying and proteolytic prokaryotes and has no adverse non-target risks on the abundance and community composition of key genes involved in N cycling. To mask the transient reduction effects of “Foxy-2” on proteolytic bacteria abundance, combining high quality organic inputs with “Foxy-2” inoculation is recommended. The field study indicated that crop growth stage, seasonality and soil type were stronger determinants of the abundance and community structure of nitrifying prokaryotes than “Foxy-2”, reinforcing the importance of considering site-specific factors in risk assessment studies. It could also be assumed that similar factors play significant roles in determining the efficacy of “Foxy-2” in *Striga* control; hence future efficacy studies should evaluate the influence of such factors. Careful examination of the interaction between BCAs and specific sites would be especially useful for improving the efficacy of *Fusarium oxysporum* f.sp. *Strigae* isolates through more research on local isolates which may be better adapted to local soil and climatic conditions than the foreign strain (Ghana isolate) used in this study. Finally, future studies should consider a wide range of microorganisms such as plant growth promoting bacteria with *Striga* suppression potential. The compatibility of such bacteria with biotic suppression potential in combination with “Foxy-2” or other strains may be helpful as they may be harnessed in the future to enhance the performance of *Striga* BCAs.

Zusammenfassung

Striga hermonthica ist ein wichtiger limitierender Faktor der Getreideproduktion und Ernährungssicherheit im subsaharischen Afrika. Die integrierte Kontrolle wird als eine der aussichtsreichsten Möglichkeiten zur Bekämpfung parasitischer *Striga*-Arten angesehen. Dabei hat sich die Kombination resistenter Getreidesorten und mikrobiologischer Nutzorganismen wie *Fusarium oxysporum* f. sp. *strigae* („Foxy-2“) als effiziente und umweltfreundliche Bekämpfungsstrategie bewährt. Obwohl die Anwendung von „Foxy-2“ als wichtige Komponente in der integrierten *Striga*-Kontrolle propagiert wird, wurde bisher keine Risikoanalyse hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf Nicht-Ziel-Mikroorganismen durchgeführt. Eine solche Risikoanalyse ist jedoch unabdingbar für Feldapplikationen im größeren Maßstab. Außerdem wurde ein stark variierender Wirkungsgrad von „Foxy-2“ auf *Striga* unter Labor, Gewächshaus- und Feldbedingungen beobachtet, was auf unterschiedliche biotische und abiotische Standortfaktoren zurückzuführen ist.

Deshalb zielte die vorliegende Arbeit darauf ab mögliche Nebenwirkungen von „Foxy-2“ auf Schlüsselmikroorganismen des Stickstoffkreislaufes (z.B. Nitrifikation und Proteolyse) in der Maisrhizosphäre zu bestimmen. Spezifische Ziele waren (1) mögliche Nebenwirkungen von „Foxy-2“ auf die Abundanz von Ammonium-oxidierenden Archaeen (AOA) und Bakterien (AOB) sowie auf Gesamtarchaeen und -bakterien zu untersuchen. Dazu wurde ein Rhizobox-Versuch mit zwei unterschiedlichen Böden (sandiger Ferric Alisol bzw. toniger Humic Nitisol) von nicht *Striga*-infizierten Standorten im zentralen Hochland von Kenia (Embu und Machanga) angelegt; (2) Effekte von Bodeneigenschaften, Pflanzenwachstum (frühes Blattentwicklungsstadium (EC 30), Blüte (EC 60) und Seneszenz (EC 90)) und Saisonalität (kurze und lange Regenzeit) auf die Dynamik der Abundanz und Struktur von Gesellschaften nitrifizierender Prokaryoten relativ zum Effekt der Inokulation mit „Foxy-2“ an zwei unterschiedlichen agrarökologischen Standorten (Busia und Homa Bay) in West-Kenia zu quantifizieren; (3) die methodische Entwicklung spezifischer Polymerasekettenreaktionen (qPCR) zur Quantifizierung proteolytischer Bakterien (z.B. neutrale Metalloproteasen kodierende *npr* Gene) in tropischen Böden; (4) Identifizierung von Nebenwirkungen von „Foxy-2“ auf die Abundanz proteolytischer Bakterien (qPCR) und deren Enzymaktivität (z.B. *npr* Gen spezifische Suc-ala-Ala-Phe-AMC) mittels der neu entwickelten Methoden.

Der Versuchsansatz basierte auf einer Kombination von Rhizobox- und Feldversuchen, in denen Behandlungen mit und ohne „Foxy-2“ beschichtetes Maissaatgut sowie mit und ohne *Striga*-Saatgut getestet wurden. Unter der Annahme, dass „Foxy-2“ N-Konkurrenz induziert und die Entwicklung N-umsetzender Mikroorganismen hemmt, wurde eine zusätzliche Behandlung mit einer leicht verfügbaren organischen N-Quelle (*Tithonia diversifolia* Pflanzenmaterial) angesetzt. Rhizosphären-Boden der Maisversuche wurde anhand molekularer (qPCR und terminaler Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (TRFLP)), biochemischer (enzym- und bodenchemische Analysen) und statistischer Verfahren analysiert. Der Rhizoboxversuch zeigte, dass „Foxy-2“ Inokulation zu einem Anstieg der Abundanzen von Gesamtarchaeen und AOA im sandigen Boden, nicht jedoch im tonigen Boden führte. Demnach bestehen Wechselwirkungen zwischen Effekten von „Foxy-2“ auf nitrifizierende Prokaryoten, insbesondere der Archaeengemeinschaft, und Bodentyp. Außerdem blieb die AOA Abundanz stabil und höher in den Kontrollbehandlungen des tonigen Bodens mit *Striga* ohne „Foxy-2“-Inokulation der Maissaat. Dies lässt darauf schließen, dass AOA in der Lage sind *Striga*-induzierten Ressourcenmangel zu überstehen.

Die anschließenden Feldversuche zeigten starken Einfluss von Bodentyp, Pflanzenentwicklungsstadium und Saisonalität, jedoch keine nennenswerten Effekte von „Foxy-2“ auf die Abundanz und Struktur der Gesamt- und nitrifizierenden Prokaryotenpopulationen. Demnach überdeckten diese „natürlichen“ Faktoren den im Rhizoboxversuch beobachteten stimulierenden Effekt von „Foxy-2“ auf die Abundanz der Archaeengemeinschaft. Dies lässt sich durch Variabilität im organischen Bodenkohlenstoffgehalt unter Einfluss von Saisonalität und Pflanzenentwicklungsstadium erklären.

Der dritte Teil der Studie befasste sich mit dem Einfluss pflanzlicher N-Inputs auf die Abundanz und Artenzusammensetzung proteolytischer Bakterien. Leicht abbaubares Pflanzenmaterial (*Tithonia diversifolia* mit niedrigem Lignin- und Polyphenolgehalt) induzierte einen Rückgang der Abundanz proteolytischer Bakterien, was eine unterdrückende Wirkung von *Tithonia diversifolia* nahelegt. Auf diesen Ergebnissen basierend wurden weitere Rhizobox-Versuche mit Böden aus den Kontroll-, „Foxy-2“- und „Foxy-2“ + *Tithonia*-Behandlungen angelegt, um festzustellen ob „Foxy-2“ in Kombination mit *Tithonia* die Abundanz und Enzymaktivität proteolytischer Bakterien zusätzlich unterdrückt. „Foxy-2“ führte zu leichter (d.h. vorübergehender) Unterdrückung der Abundanz proteolytischer Bakterien im sandigen und tonigen Boden. Die vorübergehende Reduzierung der Abundanz

der npr Gene durch „Foxy-2“ deutet auf Ressourcenkonkurrenz, die durch die Applikation von hochqualitativem Pflanzenmaterial (*Tithonia diversifolia*) kompensiert werden kann. Dieser suppressive Effekt von „Foxy-2“ spiegelte sich nicht in den gemessenen proteolytischen Enzymaktivitäten wider, was darauf hinweist, dass die Funktionalität der proteolytischen Bakterien durch „Foxy-2“ nicht beeinflusst wurde.

Zusammenfassend zeigt diese Dissertation, dass die Anwendung von „Foxy-2“ mit nitrifizierenden und proteolytischen Prokaryoten vereinbar ist und keine nachteiligen Wirkungen auf die Abundanz und Struktur wichtiger Gene des N-Kreislaufs der untersuchten Bodenmikroorganismen hat. Um den vorübergehenden suppressiven Effekt von „Foxy-2“ auf die Abundanz proteolytischer Bakterien zu kompensieren, ist die Kombination von „Foxy-2“ Inokulation mit leicht abbaubarem Pflanzenmaterial empfehlenswert. Im Feldversuch beeinflussten Pflanzenentwicklungsstadium, Saisonalität und Bodentyp die Abundanz und Struktur der nitrifizierenden Prokaryoten stärker als „Foxy-2“. Dies unterstreicht die Notwendigkeit der Berücksichtigung standortspezifischer Faktoren in Risikoanalysen zum biologischen Pflanzenschutz. Es kann außerdem angenommen werden, dass vergleichbare Faktoren einen signifikanten Einfluss auf die Effektivität von „Foxy-2“ bei der Kontrolle von *Striga* haben, was in zukünftigen Studien berücksichtigt werden sollte. Eine gründliche Untersuchung von Interaktionen zwischen „Foxy-2“ und Standortfaktoren ist insbesondere notwendig, um die Wirksamkeit von *Fusarium oxysporum* f. sp. *strigae* durch weitere Forschung zu lokalen Isolaten, die möglicherweise besser an lokale Boden- und Klimabedingungen angepasst sind als das hier verwendete ghanaische Isolat, zu verbessern. Außerdem sollten zukünftige Studien eine große Bandbreite an Mikroorganismen, z.B. pflanzenwachstumsfördernde Bakterien, mit Kontrollpotential gegen *Striga* untersuchen. Eine Kompatibilität solcher *Striga* unterdrückender Bakterien in Kombination mit „Foxy-2“ oder anderen Isolaten könnte die Wirksamkeit mikrobieller Kontrollstrategien gegen *Striga* weiter verbessern.