

Advances in Crop Research

edited by Jürgen Kroschel

**Potential of Rhizobacteria
to Control Parasitic Weeds of the
Genus *Orobanche***

Nadjia Zermane



Margraf Publishers

8. SUMMARY

Parasitic weeds of the genus *Orobancha* constitute a major constraint to several crop production systems in many parts of the world including North Africa. The aim of the present study was to gain insight into the distribution and incidence of *Orobancha* in faba bean production in Tunisia, to assess the farmers' knowledge and perceptions of the *Orobancha* problem and to evaluate bacteria from the faba bean-*Orobancha* rhizosphere for their potential as biocontrol agents for the parasitic weed.

Field surveys were carried out during the growing season of the years 2000-01 in three major faba bean growing areas in northern Tunisia, the districts of Nabeul, Beja and Bizerte. A total of 152 randomly selected faba bean fields were investigated and the intensity of the *Orobancha* infestation and yield losses were assessed. In addition, 90 legume-growing farmers were randomly selected in the survey region and interviewed. Results indicated that both *O. crenata* Forsk. and *O. foetida* Poirlet infested faba bean in the survey region with a markedly separated geographical distribution. Infestation with *Orobancha* was recorded in 45% of the surveyed faba bean fields, 40% in Nabeul, 53% in Beja and 43% in Bizerte. Infestation levels among infested fields varied from low (43% of the infested fields), to moderate or strong (28%), to very strong (30%). Yield losses in faba bean production in the survey region was estimated to amount 25.3% representing a total production loss of 3966 t. The monetary loss was estimated at about 2 million Tunisian Dinar equivalent to 1.3 million US \$.

Farmers cited pests, drought and lack of pest management knowledge as the main constraints upon crop production. *Orobancha* was perceived by 70% of the farmers questioned to be a very serious limiting factor to faba bean production. Due to the parasite, 49% of the farmers changed crop rotation and 40% completely abandoned faba bean cultivation. There was considerable ignorance about the biology of the parasitic weed. Eighty percent of the farmers questioned were not aware that *Orobancha* propagates by or even produces seeds, whilst 38% have never seen the underground stages of the parasite. In general, no control methods are applied by farmers except hand-pulling in case of low infestations. Asked about their interest to test some control measures, 100% of farmers opted for chemicals, 74% for trap and catch crops and 72% for resistant varieties, even small-seeded cultivars.

Faba bean - *Orobancha* rhizosphere associated bacteria were isolated and 337 strains evaluated for their antagonistic potential towards *O. crenata* and *O. foetida* under controlled conditions. Upon preliminary screen using *Lactuca sativa* L. seedlings bioassay, 37 rhizobacterial isolates showing growth inhibitory effect and 18 isolates with growth stimulatory activity were selected. Rhizobacteria with inhibitory effect were further screened in root chambers and 70.3% and 83.8% of them also showed a significant suppressive activity on the underground developmental stages of *O. foetida* and *O. crenata*, respectively. Among five bacterial isolates selected for pot trials, strain Bf7-9 of *Pseudomonas fluorescens* was the most suppressive one for both *Orobancha* species. The bacterium reduced shoot

emergence of *O. crenata* and *O. foetida* by 63.1% and 75.9% and their dry weight by 38.7% and 63%, respectively, compared with non-inoculated controls. *P. marginalis* strains Nc1-2 and Bzf9-1 ranked second in their efficacy against *O. crenata* and *O. foetida*, respectively. Application of the five rhizobacterial isolates during the preconditioning phase resulted in up to 42.1-84.1% reduction of germination of *O. crenata* seeds.

Rhizobacteria with stimulatory activity were evaluated for their ability to induce and/or enhance the germination of *O. crenata* seeds. Ten out of the 15 isolates assayed enhanced the stimulating effect of lentil root exudates resulting in an up to 43% increase of *Orobanche* seed germination after treatment with *Ralstonia pickettii* strain Bzc76 over the non-inoculated control: However, none of the isolates had a germination inducing effect in the absence of the root exudates. *R. pickettii* Bzc76 not only enhanced germination of *O. crenata* seeds but also significantly increased by 48% the distance of occurrence of *Orobanche* seed germination. In pot experiments, application of the bacterium as preplant treatments in association with Egyptian clover (*Trifolium alexandrinum* L.) considerably reduced *O. crenata* seed bank and thereby decreased *Orobanche* parasitism on subsequently planted faba bean. Hence, counts of emerged shoots and dry weight of *O. crenata* significantly decreased by 80.4% and 70.1%, respectively compared to the control with only *Orobanche*.

Ralstonia pickettii Bzc76 also has been shown to promote plant growth when tested on lentil and exhibited supremacy over plant growth promoting isolates, in terms of promotion of the root growth. Treatment of faba bean seeds with Bzc76 significantly promoted by 26% and 68% the germination rate and seedlings root length of the treated seeds, respectively over the non-bacterized control. Furthermore, the bacterium survived one year storage at 4°C of treated faba bean seeds. In *in-planta* experiments, the bacterium significantly increased by up to 280% the number of flowers in the faba bean treated plants with the time of flowering advanced by 7 to 10 days compared to the untreated plants. Treatment with Bzc76 yielded also a significantly higher fruit dry biomass (49%), number of seeds per pod (60%) and grain yield (52.6%) than observed in the untreated control. Some plant growth promoting rhizobacterial isolates were shown to provide protection against *O. crenata* on faba bean in pot experiments.

The observed efficacy reached up to 55.3% and 24.3% with respect to shoot emergence and dry weight of *Orobanche*, respectively. Strain Bzf5-1 of *P. putida* and strain Bf7-8 of *R. pickettii* were found to be the most effective isolates.

Characterization of the selected rhizobacteria demonstrated that the most promising isolates failed to produce lytic enzymes and cyanide suggesting that mechanisms other than the production of these metabolites are likely to trigger their biocontrol activity. Using a two compartments split-root-chamber system, the ability of *Pseudomonas fluorescens* Bf7-9 and *P. marginalis* Nc1-2 to induce systemic resistance in lentil against *O. crenata* was investigated. The results indicated that induced resistance was triggered by vital and heat-killed bacterial cells of both isolates to a varying degree. On the rhizobacteria-free side of the system, the *Orobanche* seed germination was reduced within a range of 13% to 32%

compared to the control. Attachment of the germinated seeds to the lentil roots was also significantly decreased by up to the half (51-52%) after treatment with vital cells of Bf7-9 and heat-killed cells of Nc1-2 and between 21% and 38% less tubercles were obtained in the different treatments compared to the control. Consequently, the total number of different *Orobanche* underground stages per split root chamber including tubercles, buds and plantlets as well as the dry weight of the parasite were significantly reduced mainly after treatment with strain Bf7-9 of *P. fluorescens*.

Synergistic use of some selected rhizobacterial isolates and the *Orobanche*-specific biocontrol fungus *Fusarium oxysporum* Tn01 for suppression of *O. crenata* was investigated. Results indicated that the rhizobacterial isolates were generally compatible with the fungus and some of them even enhanced the fungal growth in terms of mycelium biomass production and microconidia germination. In *in-planta* root chamber experiments, treatments with *F. oxysporum* alone or in combination with *P. marginalis* Nc1-2 or *R. pickettii* Bzc76 significantly suppressed the *Orobanche* underground development. However, the rhizobacteria had no additive effect on the control achieved by the fungus applied alone. Conversely, biocontrol effectiveness of the rhizobacteria significantly increased, when co-applied with the fungus, above that provided by each isolate applied individually. In conclusion, results of the present study clearly suggest that naturally occurring rhizosphere bacteria, particularly fluorescent Pseudomonads and some strains of *Ralstonia pickettii*, are of great interest for being effective candidates for biocontrol of *Orobanche* spp. and / or plant growth promotion.

9. ZUSAMMENFASSUNG

Parasitische Unkräuter der Gattung *Orobanche* stellen einen wichtigen produktionsbegrenzenden Faktor in verschiedenen Agrarproduktionssystemen in vielen Teilen der Welt einschließlich Nordafrikas dar. Ziel der gegenwärtigen Studie war es, die aktuelle Verbreitung und Bedeutung von *Orobanche* spp. im Ackerbohnenanbau Tunesiens zu bestimmen, das Wissen der Bauern und Wahrnehmungen vom *Orobanche* Problem zu beurteilen, und Bakterien, die mit der *Orobanche*-Ackerbohne Rhizosphäre assoziiert sind, für die Kontrolle von *Orobanche* zu evaluieren.

Felderhebungen zum Befall von *Orobanche* an Ackerbohne wurden während der Vegetationsjahre 2000 und 2001 in drei Ackerbohnenanbauregionen Nord-Tunesiens, den Provinzen Nabeul, Beja und Bizerte, durchgeführt. Insgesamt wurden 152 Ackerbohnenfelder untersucht und deren Befallsstärke sowie Ertragsverluste ermittelt. Parallel zu den Felderhebungen wurden in diesen Regionen 90 Landwirte, die Leguminosen anbauen, befragt. Die Ergebnisse zeigten, dass Ackerbohnen sowohl von *O. crenata* Forsk. als auch von *O. foetida* Poiret befallen werden. Die Verbreitung der Arten hängt von der geografischen Lage ab. Bei den untersuchten Ackerbohnenfelder wurde ein durchschnittlicher *Orobanche*-Befall von 40% in Nabeul, 53% in Beja und 43% in Bizerte festgestellt. 43% der befallenen Felder wiesen einen geringen Befall (Befallsstärke 1 und 2), 28% einen mäßigen Befall (Befallsstärke 3 und 4) und 30% einen sehr hohen Befall mit *Orobanche* (Befallsstärke 5 und 6) auf. Ertragsverluste bei der Ackerbohnenproduktion lagen im Untersuchungsgebiet bei 25,3%, was einen monetären Verlust von ungefähr 1.3 Millionen US \$ bedeutet.

Landwirte führten bei der Befragung vor allem Dürre, Schädlinge sowie mangelnde Kenntnisse im Schädlingsmanagement als hauptsächliche Begrenzungen in der Pflanzenproduktion auf. *Orobanche* wurde von 70% der Befragten als ein bedeutender limitierender Faktor beim Anbau von Ackerbohnen empfunden. Bedingt durch das Auftreten des Parasiten wechselten 49% der Landwirte die Fruchtfolge und 40% verzichteten komplett auf den Anbau von Ackerbohnen. Hinsichtlich der Biologie des Parasiten herrschte bei den Landwirten eine erhebliche Unwissenheit vor. Während 80 % der befragten Landwirte sich nicht bewusst waren, dass *Orobanche* sich samenbürtig fortpflanzt, haben 38% noch nie die unterirdischen Stadien des Parasiten gesehen. Generell werden von den Landwirten, abgesehen von einer mechanischen Beseitigung des Parasiten bei geringen Befall, keine Kontrollmaßnahmen durchgeführt. Auf die Frage nach sie interessierenden Kontrollverfahren wählten alle Befragten den Einsatz von Chemikalien, 74 % von Ihnen entschieden sich für Fang- u. Feindpflanzen und 72 % für resistente Sorten sowie kleinsamige Varietäten.

In einem weiteren Versuch wurden 337 Bakterienisolate, die in der Rhizosphäre mit Ackerbohnen-*Orobanche* assoziiert sind, isoliert und auf ihr antagonistisches Potential gegenüber *O. crenata* und *O. foetida* evaluiert. Nach Anwendung eines *screening*-Verfahrens mit Hilfe eines Biotests mit Sämlingen von *Lactuca sativa*, konnten 37 Isolate mit einer suppressiven Wirkung und 18 Isolate mit

einer wachstumsfördernden Wirkung selektiert werden. Rhizobakterien mit hemmenden Effekten wurden darüber hinaus in Wurzelkammern getestet. Dabei zeigten der Reihenfolge nach 70,3 % und 83,8 % eine signifikante suppressive Aktivität gegenüber den unterirdischen Entwicklungsstadien von *O. foetida* und *O. crenata*. Unter den fünf Isolaten, welche zusätzlich für Topfversuche ausgewählt wurden, zeigte der Stamm Bf7-9 von *Pseudomonas fluorescens* die höchste suppressive Wirkung gegenüber beide *Orobanchen*-Arten. Das Bakterium reduzierte im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle das Auflaufen von *O. crenata* um 63,1 % und von *O. foetida* um 75,9 % sowie dessen Trockengewicht um 38,7 % bei *O. crenata* und um 63 % bei *O. foetida*. Die Stämme Nc1-2 und Bzf9-1 von *P. marginalis* rangierten in ihrer Effizienz gegenüber *O. crenata* und *O. foetida* an zweiter Stelle. Applikationen der fünf Isolate während einer Vorbehandlungsphase ergaben bei Samen von *O. crenata* eine Reduktion der Keimung von 42.1-84.1 %.

Hinsichtlich ihrer Fähigkeit, die Keimung von *O. crenata* zu induzieren und/oder zu steigern, wurden Rhizobakterien mit stimulierender Aktivität evaluiert. Verglichen mit einer nicht inokulierten Kontrolle, steigerten 10 von 15 untersuchten Isolaten den stimulierenden Effekt von Linsen-Wurzelexsudaten, was sich in einer bis zu 43 %igen Steigerung der Keimung von *Orobanchen*-Samen äußerte, wenn auch keine der Isolate in Abwesenheit von Wurzelexsudaten einen induzierenden Effekt auf die Keimung besaß. *R. pickettii* Bzc76 steigerte nicht nur die Keimungsrate von *Orobanchen*, sondern vergrößerte auch die Keimdistanz zur Wurzel. In Topfversuchen reduzierte die Anwendung dieses Bakteriums assoziiert mit der Vorfrucht Alexandriner Klee (*Trifolium alexandrinum* L.) die Samenbank von *O. crenata* erheblich und damit einhergehend die Parasitierung der Folgefrucht Ackerbohne. Im Vergleich zur Kontrolle ausschließlich mit *Orobanchen* verminderte sich bei *O. crenata* dementsprechend die Anzahl der ausgetriebenen Sprosse um 80,4 % und das Trockengewicht um 70.1 %.

Darüber hinaus zeigte sich, dass der Stamm Bzc76 von *Ralstonia pickettii* das Pflanzenwachstum förderte und den anderen wachstumsstimulierenden Isolaten hinsichtlich seiner Wirkung auf das Wurzelwachstum deutlich überlegen war. Bei mit Bzc76 behandelten Ackerbohnen kam es im Vergleich zur Kontrolle zu einer Erhöhung der Keimungsrate von 26% und der Wurzellänge von 68 %. Ferner überlebte das Bakterium an Ackerbohnen eine einjährige Lagerung bei 4°C.

In Topfversuchen steigerte das Bakterium im Vergleich zu unbehandelten Pflanzen die Anzahl der Blüten um 280% verbunden mit einem um 7-10 Tage früheren Blühbeginn. Weiterhin erzielte eine Behandlung mit Bzc76 in signifikanter Weise eine höhere Frucht-Trockenmasse (49 %), eine höhere Anzahl Samen pro Hülse (60 %) und einen höheren Samenertrag (52,6 %) als die unbehandelte Kontrolle. Es zeigte sich, dass einige wachstumsfördernde Isolate den Ackerbohnen einen wirksamen Schutz gegenüber *O. crenata* verschafften. Das Auflaufen von *Orobanchen* wurde um 55.3% und das Trockengewicht um 24,3% reduziert. Die Stämme Bzf5-1 von *P. putida* und Bf7-8 von *R. pickettii* stellten sich als die effektivsten Isolate heraus.

Eine Charakterisierung der selektierten Rhizobakterien zeigte, dass die effektivsten Isolate keine Enzyme und Zyanide produzierten. Von daher scheinen andere Mechanismen für die Auslösung ihrer biologischen Aktivität verantwortlich zu sein. Über ein Spalt-Wurzel-Kammer-System mit zwei Kompartimenten wurde die Fähigkeit von *Pseudomonas fluorescens* Bf7-9 und von *P. marginalis* Nc1-2, eine systemische Resistenz bei Linsen gegen *Orobanche* zu induzieren, festgestellt. Die systemische Resistenz konnte sowohl durch lebende als auch durch Hitze-getötete bakterielle Zellen induziert werden. In dem von Rhizobakterien freiem Kompartiment des Systems erfolgte im Vergleich zur Kontrolle eine Reduzierung der Keimung von *Orobanche* von 13-32 %. Ebenso lag nach Behandlung mit vitalen Zellen von Bf7-9 und abgetötete Zellen von Nc1-2 eine signifikante Verringerung (51-52 %) von anhaftenden gekeimten Samen an den Linsenwurzeln vor. Darüber hinaus wurden verglichen mit der Kontrolle bei Bf7-9 mit 21 % und bei Nc1-2 mit 38 % weniger Tuberkel gebildet. Folglich waren vor allem nach Behandlung mit dem Stamm Bf7-9 von *P. fluorescens* sämtliche unterirdische Entwicklungsstadien wie Tuberkel, Knospen und Sprosse wie auch das Trockengewicht des Parasiten signifikant vermindert.

Ein weiterer Versuch zielte darauf ab die synergistische Wirkung zwischen ausgewählten Rhizobakterien und dem Pilz *Fusarium oxysporum* Tn01, ein bezüglich der *Orobanche* Kontrolle spezifischer Pilz, auf die Hemmung von *Orobanche crenata* zu untersuchen. Die Ergebnisse weisen auf eine generelle Kompatibilität zwischen Rhizobakterien und Pilz hin. Einige Bakterien förderten sogar das Wachstum des Pilzmyceliums und die Keimung der Mikrokonidien. In Wurzelkammerversuchen verminderten Behandlungen nur mit *F. oxysporum* oder aber in Kombination mit *P. marginalis* Nc1-2 oder *R. pickettii* Bzc76 die unterirdische Entwicklung von *Orobanche*, jedoch verstärkten die Rhizobakterien die Wirkung des Pilzes nicht. Umgekehrt kam es zu einem signifikanten Anstieg der biologischen Wirksamkeit der Rhizobakterien, wenn sie mit dem Pilz zusammen appliziert wurden.

Insgesamt weisen die Ergebnisse dieser Studie darauf hin, dass einige in der Rhizosphäre natürlich vorkommende Bakterien insbesondere fluoreszierende *Pseudomonas*-Arten und einige Stämme von *Ralstonia pickettii* von großem Interesse hinsichtlich ihres Einsatzes für die Biokontrolle von *Orobanche* spp. und/oder zur Förderung des Pflanzenwachstums sind.