

FACULTY OF AGRICULTURAL SCIENCES

Institute of Agricultural Sciences in the Tropics (Hans-Ruthenberg-Institute)

University of Hohenheim

Field: Biological Plant Protection and Resilience of Soil Microbial Communities

Prof. Dr. Georg Cadisch



**The biocontrol agent *Fusarium oxysporum* f. sp. *strigae* -
Monitoring its environmental fate and impact on indigenous fungal
communities in the rhizosphere of maize**

Dissertation

Submitted in fulfilment of the requirement for the degree

“Doktor der Agrarwissenschaften”

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

to the

Faculty of Agricultural Sciences

Presented by:

Judith Franziska Zimmermann

Born in:

Schwäbisch Gmünd, Germany

2016

Summary

The fungal biocontrol agent (BCA) *Fusarium oxysporum* f. sp. *strigae* strain “Foxy-2” has proven to be effective in the suppression of the parasitic weed *Striga hermonthica*, which causes substantial yield losses in cereals in Sub-Saharan Africa. A prerequisite for widespread implementation of the biocontrol technology is the official registration of the BCA “Foxy-2” by country authorities in Sub-Saharan Africa. The FAO and OECD institutions established international registration regulations to ensure the environmental safety of microbial BCAs. The present thesis aimed on assessing the potential of the BCA “Foxy-2” to meet these registration requirements and was, therefore, based on the following two major objectives: (1) A specific monitoring tool for the BCA “Foxy-2” was developed which allows its identification and quantification in inoculated environments and (2) risk assessment studies were conducted to assess potential side effects of “Foxy-2” on non-target organisms. “Foxy-2” is applied via seed coating and establishes in the rhizosphere of the crop where it propagates saprophytically waiting for its host *S. hermonthica*. The intentional introduction of microbial BCAs, such as “Foxy-2”, into the rhizosphere might induce alterations in indigenous plant-beneficial rhizosphere microbial communities (i.e. arbuscular mycorrhizal fungi (AMF)) with subsequent adverse effects on crop yield and health. Therefore, risk assessment studies within the frame of this thesis focused on rhizosphere microbial community dynamics with emphasis on rhizosphere fungi as these may compete for similar resources in the rhizosphere as the fungal BCA “Foxy-2”. Specific considerations were given on AMF community dynamics since this fungal group is acknowledged to maintain important ecosystem services and, hence, can serve as valuable risk indicator in the evaluation of the BCA “Foxy-2”. The methodological approach comprised a combination of rhizobox and field experiments, including contrasting tropical soils inoculated with and without *S. hermonthica* seeds and planted with maize seeds coated with and without “Foxy-2”. Rhizosphere soils obtained from maize plants were subjected to molecular (i.e. quantitative PCR (qPCR) and terminal restriction fragment length polymorphism (TRFLP)), soil physico-chemical and statistical analyses. The impact of “Foxy-2” on indigenous soil fungal communities was traded off against natural environmental impacts, such as soil type (i.e. sandy Ferric Alisol versus clayey Humic Nitisol), crop growth stage (i.e. early leaf development stage, flowering stage and senescence stage) and seasonality (i.e. short and long rain seasons), which are acknowledged to highly influence soil fungal community

abundance and composition. Furthermore, an organic fertilization treatment with nitrogen-rich organic residues (i.e. *Tithonia diversifolia*) was included in the experimental set up to compensate for the hypothesized resource competition between “Foxy-2” and indigenous rhizosphere fungi. The envisaged monitoring tool was further implemented in identifying favoured environmental conditions for the BCA “Foxy-2”, which will facilitate the improvement of soil conditions in favour of the BCA for sustained and consistent *S. hermonthica* control under contrasting environmental conditions.

The first research study focused on the development and validation of a specific molecular monitoring tool for the BCA “Foxy-2”, which was based on AFLP fingerprinting and subsequent quantitative PCR (qPCR). The specificity of the AFLP-marker to “Foxy-2” was confirmed on basis of comparison of *Fusarium* isolates of differing relatedness to “Foxy-2”. The robustness of the AFLP-marker for monitoring “Foxy-2” was validated in a controlled rhizobox experiment revealing that soil type and organic resource availability exhibited distinct effects on abundance of inoculated “Foxy-2”. Negative PCR signals, which confirmed the specificity of the developed AFLP-marker, were retrieved from control soils not inoculated with “Foxy-2”.

The same rhizobox experiment was implemented in the second research study to investigate the impact of “Foxy-2” on total indigenous rhizosphere fungal community abundance and composition with specific emphasize on AMF taxa abundance, using molecular approaches such as qPCR and TRFLP fingerprinting. In both soils, “Foxy-2” occasionally promoted total fungal abundance, while the community composition was mainly altered by *T. diversifolia* and *S. hermonthica*. Notably, “Foxy-2” stimulated AMF *Gigaspora margarita* abundance, while *G. margarita* was suppressed by *S. hermonthica*. Total fungal and AMF abundance were promoted by *T. diversifolia* residues. In conclusion, “Foxy-2” exposed no adverse effects on indigenous rhizosphere fungal communities substantiating its environmental safety as BCA against *S. hermonthica*.

The third research study emphasized on monitoring “Foxy-2” proliferation and its impact on indigenous soil fungal communities at two contrasting field sites in western Kenya (i.e. Busia and Homa Bay) during two cropping seasons. “Foxy-2” proliferated stronger in the soils from Busia (sandy clay) than Homa Bay (loamy sand) and revealed slightly higher abundance in the second season. “Foxy-2” had only a transient suppressive effect on total indigenous fungal abundance, which ceased in the second season and was further markedly compensated after

addition of *T. diversifolia* residues. Likewise, community structure of the indigenous fungal community was significantly altered by maize growth stages, but not by “Foxy-2”. In conclusion, no major adverse effects of “Foxy-2” inoculation on indigenous fungal rhizosphere communities were observed corroborating the safety of this BCA.

The fourth research study emphasized the potential of AMF taxa abundance and total AMF community composition to serve as reliable risk indicators in environmental safety studies of microbial BCAs. Our results revealed taxon- and site-specific responses of AMF abundance to “Foxy-2” inoculation. Natural environmental factors such as seasonality and plant growth stage clearly superimposed the effect of “Foxy-2” on AMF. However, the detected AMF taxon-specific responses to “Foxy-2” inoculation but also natural environmental impacts imply that AMF taxa diverge in their functional traits, thereby varying in their interference potential with microbial BCAs. Conclusively, risk assessment studies should not solely rely on monitoring AMF taxa abundance in response to BCA inoculation but further include analyses on AMF community composition and other plant-beneficial microbial communities such as nitrifying prokaryotes, to draw conclusions on the safety of a microbial BCA.

Within this thesis frame, the development of a DNA-based monitoring tool for the fungal BCA “Foxy-2” was achieved which allows following its population kinetics in soils as driven by contrasting environmental impacts, such as soil type, plant growth stage and seasonality. The developed monitoring tool is essential for official registration of the BCA by country authorities in Sub-Saharan Africa and furthermore enables to identify favoured environmental conditions of the BCA, by this contributing to consistent and sustained efficacy of the biocontrol approach against the parasitic weed *S. hermonthica*. The gathered data from the risk assessment studies corroborated the environmental safety of the BCA “Foxy-2” and highlighted the driving factors of rhizosphere microbial community dynamics, with this contributing to ongoing and future research concerning the resistance and resilience of soil microbial communities to disturbance. Finally, the potential of AMF taxa abundance to serve as suitable risk indicator in environmental safety studies of microbial BCAs was critically assessed, thereby reinforcing the need of deciphering the diverging functional traits within AMF communities, which potentially determine the interference potential of distinct AMF taxa towards microbial BCA strains.

German Summary

Der pilzliche Biokontrollagent (BKA) *Fusarium oxysporum* f. sp. *strigae* Stamm „Foxy-2“ stellt eine wirksame Kontrollmöglichkeit gegen das parasitäre Unkraut *Striga hermonthica* dar, welches beachtliche Getreideverluste in Sub-Sahara Afrika verursacht. Voraussetzung für den großflächigen Einsatz dieser biologischen Unkrautkontrolle ist die offizielle Registrierung des BKA „Foxy-2“ durch Länderbehörden in Sub-Sahara Afrika. Die FAO und OECD entwickelten internationale Regularien für die Registrierung von mikrobiellen BKA um die Umweltverträglichkeit dieser biologischen Pestizide zu gewährleisten. Die Hauptziele der vorliegenden Dissertation basierten deshalb auf den Anforderungen dieser internationalen Regularien: (1) Eine spezifische Detektionsmethode wurde entwickelt, durch die der BKA in inokulierten Umgebungen identifiziert und quantifiziert werden kann. (2) Risikoanalysen wurden durchgeführt um nachteilige Effekte auf nicht-Ziel Organismen durch die Inokulation mit dem BKA auszuschließen. Der BKA „Foxy-2“ wird durch Saatgutbeschichtung in den Boden ausgebracht, wo er sich in der Rhizosphäre der Getreidepflanze etabliert und saprophytisch überdauern kann. Die Etablierung des inokulierten BKA in der Rhizosphäre könnte sich nachteilig auf einheimische pflanzennützliche Rhizosphärenmikroorganismen auswirken mit entsprechend negativen Folgen für den Pflanzenertrag und die Pflanzengesundheit. Deshalb konzentrierten sich die Risikoanalysen innerhalb dieser Dissertation auf die Dynamiken von Rhizosphärenmikroorganismen mit Fokus auf Rhizosphärenpilze, da diese um die gleichen Ressourcen wie der pilzliche BKA „Foxy-2“ konkurrieren. Ein besonderer Fokus wurde auf die Dynamiken von arbuskulären Mykorrhiza gelegt, da diese für ihren Beitrag zu wichtigen Ökosystemleistungen anerkannt sind und deshalb als wertvolle Risikoindikatoren in der Bewertung des BKA „Foxy-2“ miteinbezogen werden können. Der methodische Ansatz beinhaltete eine Kombination aus Rhizobox – und Feldversuchen unter Einbezug von zwei unterschiedlichen Böden welche jeweils mit oder ohne *S. hermonthica* inokuliert wurden und mit Mais, mit oder ohne „Foxy-2“ Beschichtung, bepflanzt wurden. Bodenproben aus der Rhizosphäre der Maispflanzen wurden molekularbiologischen (quantitative PCR (qPCR) und terminalem Restriktionslängenpolymorphismus (TRFLP)), bodenchemischen und statistischen Analysen unterzogen. Der Einfluss von „Foxy-2“ auf einheimische Rhizosphärenpilze wurde gegen natürliche Einflüsse abgewägt (z.B. Bodentyp, Pflanzenwachstumsstadien und Saisonalität) welche nachweislich einen entscheidenden Einfluss auf die bodenpilzliche Abundanz und Gemeinschaftsstruktur haben können. Außerdem wurde eine Behandlung mit organischer

Düngung (stickstoffreiche organische Pflanzenrückstände, z.B. *Tithonia diversifolia*) miteinbezogen um die angenommene Ressourcenkonkurrenz zwischen „Foxy-2“ und einheimischen Rhizosphärenpilzen auszugleichen. Die angestrebte Detektionsmethode wurde desweiteren angewendet um günstige Bodenbedingungen zu identifizieren, welche zu einer erfolgreichen Etablierung und anhaltende Effektivität des BKA „Foxy-2“ gegen das parasitäre Unkraut *S. hermonthica* beitragen.

Die erste wissenschaftliche Studie befasste sich mit der Entwicklung und Validierung eines spezifischen DNA-basierten molekularen Detektionssystems für den BKA „Foxy-2“, welches auf AFLP Fingerprinting und anschließender quantitativer PCR beruhte. Die Spezifität des AFLP-Markers wurde anhand pilzlicher Vergleichsisolate und genetischer Datenbanken bestätigt. Die Eignung des AFLP-Markers „Foxy-2“ spezifisch in Böden zu detektieren und quantifizieren wurde in einem Rhizobox-Versuch unter kontrollierten Bedingungen untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass „Foxy-2“ Abundanz im Boden durch den Bodentyp und die Verfügbarkeit organischer Ressourcen beeinflusst wird. Es wurde keine qPCR Amplifikation in den Kontrollböden detektiert, wodurch die Spezifität des AFLP-Markers bestätigt werden konnte.

Derselbe Rhizobox-Versuch wurde in der zweiten wissenschaftlichen Studie verwendet um die Auswirkung der „Foxy-2“ Inokulation auf die einheimische Gesamtpilzabundanz und -struktur zu untersuchen. Ein spezifischer Fokus wurde hierbei auf die Abundanz bestimmter arbuskulärer Mykorrhiza Taxa gelegt. In beiden Böden wurde eine kurzzeitige Stimulation der Gesamtpilzabundanz durch „Foxy-2“ beobachtet, während die pilzliche Gemeinschaftsstruktur vorwiegend durch Zugabe von *T. diversifolia* und *S. hermonthica* beeinflusst wurde. Außerdem wurde das Mykorrhiza Taxon *Gigaspora margarita* durch die Inokulation mit „Foxy-2“ stimuliert und durch die Zugabe von *S. hermonthica* unterdrückt. Die Gesamtpilzabundanz und Mykorrhiza Taxonabundanz wurden durch die Zugabe von *T. diversifolia* stimuliert. Zusammenfassend wurde bestätigt, dass die Inokulation mit „Foxy-2“ keine nachteiligen Effekte auf die einheimische Pilzgemeinschaft in der Rhizosphäre ausübte, wodurch die Umweltverträglichkeit des BKA „Foxy-2“ untermauert werden konnte.

Die dritte wissenschaftliche Studie konzentrierte sich auf die Quantifizierung des BKAs „Foxy-2“ und seiner Effekte auf einheimische Bodenpilze in zwei verschiedenen Feldstandorten in West-Kenia (Busia und Homa Bay) während zwei aufeinanderfolgender Ernteperioden. Die

Ergebnisse zeigten eine höhere „Foxy-2“ Abundanz am Standort Busia (sandig-toniger Boden) im Vergleich zu als Homa Bay (lehmig-sandiger Boden). Außerdem wurde eine leicht erhöhte Abundanz des BKA in der zweiten Ernteperiode detektiert. Die Inokulation mit „Foxy-2“ zeigte eine kurzzeitig unterdrückende Wirkung auf die einheimische Pilzabundanz, welche allerdings in der zweiten Ernteperiode nicht mehr detektiert werden konnte. Dieser kurzzeitig unterdrückende Effekt wurde außerdem durch die Zugabe von *T. diversifolia* kompensiert. Die Gesamtpilzstruktur wurde hauptsächlich durch das Pflanzenentwicklungsstadium beeinflusst, während „Foxy-2“ keine Wirkung zeigte. Zusammenfassend wurden keine anhaltend nachteiligen Effekte der „Foxy-2“-Inokulation auf einheimische Bodenpilzgemeinschaften festgestellt, wodurch die Umweltsicherheit des BKA weiter bekräftigt werden konnte.

Die vierte wissenschaftliche Studie untersuchte die Eignung von Mykorrhiza Taxaabundanz und Gemeinschaftsstruktur als Risikoindikatoren in Umweltverträglichkeitsstudien von mikrobiellen BKA. Die Ergebnisse zeigten Taxon- und Standort-spezifische Reaktionen der Mykorrhizaabundanz auf die Inokulation mit „Foxy-2“. Natürliche Umweltfaktoren, wie z.B. Saisonalität und Pflanzenentwicklungsstadien, exhibierten deutlich stärkere Effekte auf die Mykorrhizagemeinschaft im Vergleich zu „Foxy-2“. Die Taxon-spezifischen Reaktionen zu den untersuchten Faktoren implizieren, dass sich Mykorrhiza Taxa in ihren Funktionseigenschaften unterscheiden und dadurch auch in ihrem Interferenzpotential mit mikrobiellen BKA. Deshalb sollten Umweltverträglichkeitsstudien nicht ausschließlich auf Taxa Abundanzstudien basieren, sondern zusätzlich die Mykorrhiza Gemeinschaftsstruktur oder andere pflanzennützliche mikrobielle Gemeinschaften (z.B. nitrifizierende Prokaryoten), miteinbeziehen.

Innerhalb dieser Dissertation wurde eine spezifische Detektionsmethode für den BKA „Foxy-2“ entwickelt, welche die Quantifizierung des BKA in Böden unter dem Einfluss verschiedenster Umweltfaktoren ermöglicht. Diese Detektionsmethode ist außerdem Voraussetzung für die erfolgreiche Registrierung des BKA durch Länderbehörden in Sub-Sahara Afrika und ermöglicht die Identifizierung günstiger Umwelbedingungen für eine anhaltende Effektivität des BKAs gegen *S. hermonthica*. Desweiteren wurde der Einfluss des BKA „Foxy-2“ auf die einheimische Bodenpilzgemeinschaft untersucht, welcher gegen natürliche Umwelteinflüsse abgewägt wurde. Innerhalb dieser Umweltverträglichkeitsstudien wurde ein spezifischer Fokus auf arbuskuläre Mykorrhiza gelegt, da diese Pilzgruppe für ihre pflanzennützliche Funktion im Boden anerkannt ist. Die Eignung der Mykorrhizaabundanz als Risikoindikator für Umweltverträglichkeitsstudien wurde kritisch evaluiert und untermauerte

den Bedarf zukünftiger Studien, welche die verschiedenen Funktionseigenschaften innerhalb der Mykorrhizagemeinschaft entschlüsseln. Die erhaltenen Ergebnisse aus den Umweltverträglichkeitsstudien bestätigen die Sicherheit des BKA „Foxy-2“ und veranschaulichen den Einfluss verschiedenster Umweltfaktoren auf die Dynamiken der Bodenpilzgemeinschaft. Dies liefert einen wichtigen Beitrag für zukünftige Forschungsstudien zur Widerstandsfähigkeit und Resilienz bodenmikrobieller Gemeinschaften gegen Störfaktoren.

.