

Institute of Phytomedicine
University of Hohenheim
Department of Phytopathology
Prof. Dr. Heinrich Buchenauer

**Development of Alternative Strategies for the Control
of the Important Phytopathogens
Phytophthora infestans (Mont.) and *Erwinia amylovora* (Burrill)**

Dissertation
Submitted in fulfilment of the requirements for the degree 'Doktor der Agrarwissenschaften'
(Dr. sc. Agr. / Ph.D. in Agriculture Sciences)

To the
Faculty of Agricultural Sciences

Presented by
Ihsan Qasim Swaidat

Jordan

2007

VI SUMMARY

Within the framework of two projects, financed by DBU (Deutsche Bundesstiftung Umwelt) and ProInno ("Förderung der Erhöhung der Innovationskompetenz mittelständischer Unternehmen"), respectively, in co-operation with an industrial partner, alternative phytosanitary compounds from natural sources have been screened. High throughput screening systems were developed and used for testing of large numbers of extracts of Actinomycetes in 96-well multiplates against *Phytophthora infestans* and *Erwinia amylovora*, the causal agents of tomato late blight and apple fire blight, respectively. These important phytopathogens were chosen as models.

According to the Pflanzenschutzgesetz (PflSchG) §2 Nr. 10a, plant strengthening compounds (Pflanzenstärkungsmittel) should not act directly against the pathogen, but via an induction of plant resistance mechanisms. Therefore, one of the projects (DBU) aimed to exclude direct action on *P. infestans*. Based on the GFP-fluorescence of the *P. infestans* transformant 208m2, a fluorescence optical measurement of mycelium growth respectively growth inhibition was developed, to test the influence of the extracts and extract fractions. Only 52 out of 8335 extracts significantly inhibited the mycelium growth (Pi+) in this test, and thus had to be excluded according to §2 Nr.10a PflSchG for a potential commercial application. Searching for resistance inducing activity, all extracts were re-tested in parsley cell culture as a model for putative resistance induction characterised by formation of furanocoumarin phytoalexins. Only 42 out of the whole set of extracts tested, induced furanocoumarins (Pc+) significantly. In order to test if the induction correlates with a successful defence of host tissue against *P. infestans*, detached tomato leaves were treated with these Pc+ extracts. Only one extract resulted in formation of small sharp necrosis symptoms after pathogen inoculation, leading to strongly reduced infection and inhibited sporulation. The identification of the active ingredient is currently performed.

When comparing the 52 direct acting substances (Pi+) with the potentially resistance inducing compounds (Pc+), three were also found actively inhibiting *P. infestans* in the host tissue.

These three extracts also induced limited dark brown necrosis, suggesting an induction of hypersensitive reaction (HR). Infection area and sporulation level were reduced to levels below 25% of total leaf area. Microscopic investigations showed non-germinated or abnormally shaped germinated sporangia. Promising extracts were fractionated by the cooperation partner. Fraction 1 of one Pi+-extract (014 008-2) reduced the

sporulation level and the size of the infection area to 5 and 25%, respectively, compared to the control. Application of fraction 2, although less effective than fraction 1, produced sporangiophores that were morphologically abnormal carrying no sporangia, indicating a possible highly specific action on a certain developmental step of the pathogen.

In case of the extracts tested *in vitro* against *E. amylovora*, only 60 out of 5236 extracts inhibited bacterial growth. Only extracts showing a similar effect as the streptomycin positive control (12 extracts), were also tested in the cell culture of parsley for a potential resistance induction. The effect of such promising extract (000 391 CF) was compared in *in vitro* apple plantlets with two purified substances identified in the *in vitro* growth inhibition screening (tubercidin and streptothricin) and two commercially available resistance inducers (Prohexadion-Calcium, Bion®) in addition to streptomycin as control. Streptothricin was found nearly as effective as the streptomycin control (2 and 0% diseased shoots, respectively). 000 391 CF with chuanghsinmycin as active ingredient in unknown concentration, however, was less effective together with tubercidin; both compounds were originally classified effective in the *in vitro* screening (approximately 20 and 30%, respectively). The resistance inducers showed a maximal effectiveness of 20-25% approximately; however, in the highest concentration applied, they caused phytotoxic effects.

As an alternative strategy of plant defence, an experiment was performed to silence the GFP-fluorescence of transformant 208m2 as a model for silencing fungal genes responsible for plant infection via the transgenic host. Two types of 'T0' transgenic tomato plants were produced from 'Hellfrucht' cultivar, one carrying the *gfp*-gene and the other carrying inverted repeat fragment of the *gfp*-gene (*gpg*). GFP-expressing plants could be identified by their green fluorescence under UV-A light. *gpg*-transformants were verified by PCR analysis of their genomic DNA and the formation of siRNAs by Northern blotting. In order to test the silencing effects in the plants *Agrobacterium* harbouring the *gfp*-gene or *gpg*-construct in a binary vector were infiltrated into tomato leaves. Leaves of agro-infiltrated (*gfp*) wild type plants were found to fluoresce, but no green fluorescence appeared when *gpg*-tomato leaves were infiltrated, due to the production of siRNAs resulting in gene silencing. The green fluorescence of *gfp*-tomato leaves disappeared gradually starting from the major vein expanding to small veins after infiltration of *gpg*-*Agrobacterium* due to the same phenomenon. However, no systemic silencing over the whole plant was observed; this

may be due to the comparatively low expression of the *gfp*-gene in the 'T0' plants used. However, the GFP in the *P. infestans* transformant 208m2 was not found to be silenced when leaves of *gpg*-plants were infected; this might be due to unsuccessful passing of siRNAs through haustorium's membrane system, or due to the comparatively low amount of siRNAs in the *gpg*-tomato tissues.

VII ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen zweier Projekte, finanziert durch die DBU (Deutsche Bundesstiftung Umwelt) und ProInno ("Förderung der Erhöhung der Innovationskompetenz mittelständischer Unternehmen") und in Kooperation mit einem industriellen Partner sollten alternative Substanzen natürlicher Herkunft für den Einsatz im Pflanzenschutz in einem Screening untersucht werden. Dazu wurden "high throughput" Biotestsysteme entwickelt und eingesetzt, um eine große Anzahl von Extrakten aus Actinomyceten in 96-well Microtiterplatten gegen *Phytophthora infestans* und *Erwinia amylovora* den Erregern der Kartoffelfäule bzw. Braunfäule und des Feuerbrands, zu testen. Wegen ihrer problematischen Bekämpfung waren diese wichtigen Phytopathogene als Modelle ausgewählt worden.

Entsprechend § 2 Nr. 10a des Pflanzenschutzgesetzes (PflSchG) dürfen Pflanzenstärkungsmittel keine direkte Wirkung gegen das Pathogen zeigen, sondern müssen durch die Aktivierung pflanzeigener Abwehrmechanismen wirken. Aufgrund dessen zielte eine der Projektvorgaben (DBU) daraufhin, die direkte Wirkung der Extrakte auf das Wachstum von *P. infestans* auszuschließen. Basierend auf der GFP-Fluoreszenz der transgenen *P. infestans* Linie 208m2 wurde ein Verfahren zur fluoreszenzoptischen Erfassung des Mycelwachstums bzw. der Wachstumshemmung entwickelt, um den Einfluss von Extrakten und Extraktfraktionen darauf zu untersuchen. Von 8335 untersuchten Extrakten hemmten nur 52 das Mycelwachstum signifikant (Pi+) in diesem Test und mussten deshalb entsprechend § 2 Nr. 10a PflSchG für eine potentielle kommerzielle Verwendung als Pflanzenstärkungsmittel ausgeschlossen werden. Um eine potentiell resistenzinduzierende Eigenschaft zu finden, wurden alle Extrakte in einer Petersilie-Zellkultur getestet, einem Modell für eine mögliche Resistenzinduktion charakterisiert durch die Bildung von Furanocumarin-Phytoalexinen. Dabei wurden nur 42 Extrakte gefunden, welche die Furanocumarinbiosynthese signifikant induzierten (Pc+).

Um zu überprüfen, ob diese Furanocumarininduktion mit einer erfolgreichen Abwehr gegen *P. infestans* im Wirtsgewebe korreliert, wurden isolierte Tomatenblätter mit diesen Pc+-Extrakten behandelt. Bei nur einem Extrakt fand sich die Bildung kleiner scharf konturierter Nekrosen nach Pathogeninokulation, was zu einer stark reduzierten Infektion und gehemmter Sporulation führte. Die Identifikation der aktiven Komponente wird aktuell durchgeführt.

Bei Vergleich der 52 direkt wirkenden Extrakte (Pi+) mit den potentiell resistenzinduzierenden (Pc+), wurden drei Extrakte gefunden, die auch im Wirtsgewebe

das Pathogenwachstum hemmten. Diese drei Extrakte induzierten ebenfalls kleine braun gefärbte Nekrosen, was die Induktion einer hypersensitiven Reaktion (HR) vermuten lässt. Die Fläche der Infektion und die Stärke der Sporulation waren gegenüber der Kontrolle auf ca. 25 % der Gesamtblattfläche reduziert. Mikroskopische Untersuchungen dieser Ansätze zeigten nicht gekeimte Sporangien und abnorm geformte Keimhyphen. Die Erfolg versprechenden Extrakte wurden durch den Kooperationspartner einer weiteren Fraktionierung unterworfen. Die Fraktion 1 von einem der Pi+-Extrakte (014 008-2) reduzierte die Sporulationsstärke und die Größe der infizierten Blattfläche auf 5% bzw. 25 % verglichen mit der Kontrolle. Fraktion 2 desselben Extraktes bewirkte trotz geringerer Effizienz der Infektionshemmung, daß morphologisch abnorme Sporangioophore gebildet wurden, die keine Sporangien trugen, was möglicherweise auf eine hochspezifische Wirkung auf einen Entwicklungsschritt des Pathogens schließen lässt.

Von den Extrakten, die *in vitro* gegen *E. amylovora* getestet wurden, hemmten nur 60 von 5236 das Bakterienwachstum. Nur Extrakte, die einen der Positivkontrolle vergleichbaren Effekt aufwiesen wurden ebenfalls in der Petersiliezellkultur auf eine potentielle Resistenzinduktion getestet.

Der Effekt eines solchen als positiv bewerteten Extrakts (000 391 CF) wurde auf *in vitro*-Apfelpflanzen mit zwei aufgereinigten Substanzen, die ebenfalls positiv im Screening auf Wachstumshemmung waren (Tubercidin und Streptothricin), verglichen. Ebenfalls getestet wurden zwei käufliche Resistenzinduktoren (Bion und Prohexadion-Calcium) und die Positivkontrolle Streptomycin. Streptothricin war fast so effektiv wie die Streptomycin-Kontrolle (2 % bzw. 0% erkrankte Sprosse). Der Extrakt (000 391 CF) enthält Chuangsinmycin als aktive Substanz in unbekannter Konzentration, war jedoch weniger effektiv zusammen mit Tubercidin (ca. 20% bzw. 30% erkrankte Sprosse); beide Substanzen waren ursprünglich im *in vitro*-Screening als positiv bewertet. Die Resistenzinduktoren zeigten eine maximale Effizienz von 20-25%, waren jedoch in den höchsten Konzentrationen phytotoxisch.

Um "Gene Silencing" als eine alternative Strategie des Pflanzenschutzes zu testen, wurde versucht, die GFP-Fluoreszenz der transgenen *P. infestans* Linie 208m2 zu unterdrücken, als ein Modell für das Silencing pilzlicher, für die Infektion notwendiger Gene, durch den transgenen Wirt. Zwei Typen transgener Tomaten ("T0") wurden hergestellt aus dem Kultivar 'Hellfrucht', einer transformiert mit einem *gfp*-Gen, ein anderer mit einem inverted repeat Fragment von *gfp* (*gpg*). Die GFP-exprimierenden Pflanzen konnten anhand ihrer grünen Fluoreszenz unter UV-A Strahlung identifiziert werden. Die *gpg*-Transformanten

konnten mittels PCR-Analyse ihrer genomischen DNA identifiziert und die Bildung der entsprechenden siRNAs mittels Northern Blot verifiziert werden.

Um zuerst das Gene Silencing in den Pflanzen zu testen, wurden Agrobakterien, die mit binären Vektoren die entweder das *gfp*-Gen oder das *gpg*-Konstrukt beinhalteten, in einige ihrer Blätter infiltriert. Blätter von agro-infiltrierten (*gfp*) Wildtyp Pflanzen fluoreszierten danach an den Infiltrationsstellen. Keine Fluoreszenz konnte jedoch in Blättern infiltrierter *gpg*-Pflanzen beobachtet werden, was auf das Vorhandensein von siRNAs und somit gene silencing beruht. Die Grünfluoreszenz von *gfp*-Tomatenblättern verringerte sich allmählich von der zentralen Blattader ausgehend nach der Infiltration mit *gpg*-Agrobakterien aufgrund desselben Phänomens. Es konnte jedoch kein systemisches silencing d.h. über die infiltrierten Blätter hinaus beobachtet werden, was auf die relativ geringe Expression des *gfp*-Gens in den vorhandenen 'T0'-Pflanzen zurückzuführen sein könnte.

Die GFP-Fluoreszenz in 208m² konnte nicht erkennbar `gesilenced` werden, wenn Blätter von *gpg*-Pflanzen infiziert wurden. Dies könnte entweder auf der nicht möglichen Passage von siRNAs durch das Membransystem der Haustorien beruhen, oder in einer nicht ausreichenden Menge von siRNAs im *gpg*-Blattgewebe begründet sein.