

**Isolation and characterisation of novel nematophagous fungi from
eggs of the cereal cyst nematode *Heterodera filipjevi* and
identifying their secondary metabolites with nematicidal activity**

Dissertation

Zur Erlangung des Akademischen Grades eines Doktors
der Agrarwissenschaften (Dr. agr.)

Eingereicht am Fachbereich Ökologische Agrarwissenschaften
der Universität Kassel

Von

Samad Ashrafi

February 2018

Summary

Parasitism caused by cereal cyst nematodes (CCNs) is a major limiting biotic factor in cereal cropping systems. CCNs attack cereal crops and can lead to significant yield reductions. Field observations in experimental wheat fields of the International Maize and Wheat Improvement Centre (CIMMYT) in Turkey had revealed a sharp decline in nematode populations of the cereal cyst nematode *Heterodera filipjevi*. Microscopic studies of the cyst samples obtained from these fields regularly demonstrated the presence of fungi colonising nematode cysts and eggs. It was hypothesised that these or other fungi could be involved in the reduction of the population size of *H. filipjevi*. The present study therefore aimed at (i) isolating fungi from cysts of *H. filipjevi*; (ii) specifically isolating symptom-causing fungi from single eggs by establishing a specific isolation technique; (iii) classifying the fungal isolates of interest by morphological studies and multi-locus molecular phylogenetic analyses; (iv) studying the nematode-fungus interaction microscopically; (v) fulfilling Koch's postulates for the fungi isolated from the nematodes; (vi) isolating and identifying secondary metabolites produced by the fungal isolates of interest.

Two screening approaches were applied to isolate a maximum number of fungi associated with nematode eggs: In a general screening, field-collected cyst samples and their contents were cultured without prior selection. In a focused screening approach, only those nematode eggs exhibiting symptoms of fungal infection were individually cultured. This approach resulted in finding six new fungal species, three of which are described here: *Ijuhya vitellina* sp. nov., *Monocillium gamsii* sp. nov., and *Polyphilus sieberi* nom. prov. *Ijuhya vitellina*, *M. gamsii* belong to the families of Bionectriaceae and Niessliaceae, respectively and are the first reports of nematophagous fungi within the genera *Ijuhya* and *Monocillium*. The fungal genus *Polyphilus* nom. prov. was proposed to accommodate two species (*P. sieberi* nom. prov. and *P. frankenii* nom. prov.), of which only *P. sieberi* was isolated from nematode eggs. This is the first case where a dark septate endophyte (DSE) was shown to parasitise nematode eggs. In addition to the species described here, three hitherto undescribed pleosporalean species were isolated, two of which were also DSEs. All the new fungal species could be successfully re-isolated from the eggs of artificially infected nematode cysts *in vitro*, and Koch's postulates were thus fulfilled. Additionally, their antagonistic interactions with nematode eggs were documented in detail using light microscopy: After penetrating the eggshell and the body cuticle of developing juveniles inside the eggs, hyphae of *I. vitellina* and *M. gamsii* developed and formed microsclerotia. These microsclerotia were rich in oil-like droplets and germinated on artificial media. They are interpreted as long-term survival structures. Parasitism of nematode eggs caused by *P. sieberi* as a DSE suggests a multifunctional lifestyle that could potentially benefit the plant host by killing nematodes as well as by transferring nutrients from colonised nematodes.

Summary

The isolated fungi were screened for secondary metabolites, and their chemical structures were elucidated. Chaetoglobosin A and its derivative 19-*O*-acetylchaetoglobosin A were isolated from *I. vitellina*, which is a new source for this compound with broad bioactivity that also showed inhibiting activity against the second-stage juvenile of *H. filipjevi*. These compounds were not present in the plant-associated species of the genus *Ijuhya* investigated here. From a so-far undescribed nematode-egg parasitic pleosporalean species several novel compounds were identified. Two of these are cyclodepsipeptides, a class of compounds known for their anthelmintic effects. Taken together, these results suggest that nematode-antagonistic fungi represent a promising source for finding new natural compounds with nematocidal activity.

The discovery of several novel fungal species is intriguing given that cyst nematodes have been intensively screened for nematophagous fungi since the pioneering studies of Julius Kühn for over 150 years. The new findings became possible by applying a new isolation technique that can be used in future to discover even more fungi from other plant parasitic nematodes or in other geographic regions.

Zusammenfassung

Die Getreidezystennematoden sind ein wichtiger limitierender biotischer Faktor im Getreideanbau. Sie parasitieren die Getreidepflanzen und verursachen dadurch signifikante Einbußen in der Getreideproduktion. Beobachtungen in Versuchsweizenfelder des „International Maize and Wheat Improvement Centre“ (CIMMYT) in der Türkei zeigten eine starke Reduktion in der Population der Getreidezystennematoden zwischen zwei aufeinanderfolgenden Probenahmen. Mikroskopische Untersuchungen der Nematodenzysten von diesen Versuchsfeldern ergaben, dass die Cysten und Eier häufig von Pilzen kolonisiert wurden. Diese Beobachtungen führten zu der Hypothese, dass Pilze für die beobachtete Reduktion der Population von *Heterodera filipjevi* verantwortlich sein könnten. Die vorliegende Studie verfolgte deshalb die folgenden Ziele: 1. Pilze sollten von den Zysten von *H. filipjevi* isoliert werden. 2. Mit Hilfe einer neu etablierten Isolationsmethode sollten spezifisch die symptomverursachenden Pilze von einzelnen Eiern isoliert werden. 3. Die isolierten Pilze sollten durch morphologische und molekularphylogenetische Analysen, die auf mehreren Genregionen beruhen, klassifiziert werden. (4) Die Nematoden-Pilz-Interaktion sollte mikroskopisch untersucht werden. (5) Die Kochschen Postulate sollten für die isolierten Pilze erfüllt werden. (6) Von den nachgewiesenermaßen parasitischen Pilzen produzierte Sekundärmetaboliten sollten isoliert und charakterisiert werden.

In der Studie wurden zwei verschiedene Isolationsmethoden angewandt, um eine möglichst große Zahl von Pilzen, die mit Nematodeneiern assoziiert sind, zu isolieren. In der sogenannten „Allgemeinen Untersuchung“ wurden in den Versuchsfeldern gesammelte Cysten zufällig ausgewählt und kultiviert. In der sogenannten „Spezifischen Untersuchung“ wurden nur Nematodeneier, die Symptome einer pilzlichen Infektion zeigten, einzeln auf Nährmedium kultiviert. Mit dieser Methode wurden sechs neue Arten gefunden, von denen drei in der vorliegenden Arbeit beschrieben werden: *Ijuhya vitellina* sp. nov., *Monocillium gamsii* sp. nov. und *Polyphilus sieberi* nom. prov. *Ijuhya vitellina* und *M. gamsii* gehören zur Familie der Bionectriaceae bzw. der Niessliaceae. Beide Arten sind die ersten nematophagen Arten innerhalb ihrer Gattungen. Die Gattung *Polyphilus* nom. prov. wurde eingeführt mit den zwei Arten *P. sieberi* nom. prov. und *P. frankenii* nom. prov., von der allerdings nur *P. sieberi* von Nematodeneiern isoliert wurde. Dies ist gleichzeitig das erste Mal, dass ein Pilz der Formgruppe „Dunkle septierte Wurzelpilze (DSE)“ als Nematodeneierparasit nachgewiesen wurde. Zusätzlich zu den drei hier neu beschriebenen Arten, wurden drei weitere bislang noch unbekannte Arten isoliert, die zur Ordnung der Pleosporales gehören und von denen zwei ebenfalls zu den DSEs gehören. Die drei neuen von Nematodeneiern isolierten Pilzarten konnten *in vitro* wiederum gesunde Nematodeneier und –cysten infizieren und von diesen re-isoliert werden, wodurch die Kochschen Postulate erfüllt wurden. Ihre antagonistische Interaktion mit Nematodeneiern wurden mittels Lichtmikroskopie im

Detail untersucht: Hyphen von *I. vitellina* und *M. gamsii* penetrieren zunächst die Eischale, dann die Kutikula des darin befindlichen Nematodenembryos und bilden schließlich Mikrosklerotien. Diese Mikrosklerotien sind reich in ölreichen Vesikeln und keimen auf künstlichen Nährmedien und werden als „Langzeit-Überdauerungsstrukturen“ interpretiert. Das Parasitieren von Nematodeneiern durch den als DSE bestätigten *P. sieberi* zeigt, dass dieser einen komplexen Lebenszyklus aufweist: Möglicherweise nutzt er einer besiedelten Pflanze, indem Nematoden an der Wurzel parasitiert und Nährstoffe aus den Nematoden an die Pflanze transloziert werden.

Die isolierten Pilze wurden auf Sekundärmetabolite untersucht und ihre chemische Struktur aufgeklärt. Chaetoglobosin A und sein Derivat 19-O-acetylchaetoglobosin A wurden aus *I. vitellina* isoliert, welche eine neue Quelle für diese Naturstoffe darstellt, und die *in vitro* hemmende Aktivität gegen Juvenile des zweiten Stadiums (J2-Juvenile) von *H. filipjevi* zeigten. Diese Biomoleküle kommen nur in *I. vitellina* vor aber nicht in den pflanzenassoziierten Arten der Gattung *Ijuhya*. Einige neue Naturstoffe wurden von einer bislang unbeschriebenen pleosporalen Art identifiziert, von denen zwei Cyclodepsipeptide sind, einer Gruppe von Naturstoffen die unter anderem für ihre anthelminthischen Eigenschaften bekannt sind.

Die Isolierung von einigen neuen Pilzarten aus Weizenzystennematoden ist erstaunlich, insbesondere vor dem Hintergrund, dass Zystennematoden schon seit über 150 Jahren, seit den bahnbrechenden Untersuchungen von Julius Kühn, sehr intensiv auf potentiell nematodenparasitische Pilze untersucht wurden. Diese neuen Entdeckungen wurden durch die Entwicklung einer neuen Isolationsmethode ermöglicht, die in Zukunft genutzt werden kann, um weitere bislang unbekannte Pilze von anderen pflanzenparasitischen Nematoden oder anderen geographischen Regionen zu entdecken.