



University of Hohenheim
Faculty of Agricultural Sciences
Institute of Plant Production and Agroecology in the Tropics and Subtropics
Section Agroecology in the Tropics and Subtropics
Prof. Dr. J. Sauerborn

**UNDERSTANDING THE ROLE OF PLANT GROWTH
PROMOTING BACTERIA ON SORGHUM GROWTH AND
BIOTIC SUPPRESSION OF *Striga* INFESTATION**

Dissertation

Submitted in fulfillment of the requirements for the degree of
“Doktor der Agrarwissenschaften”
(Dr. sc. agr./Ph.D. in Agricultural Sciences)

to the
Faculty of Agricultural Sciences

presented by

LENARD GICHANA MOUNDE

Stuttgart, 2014

Summary

Witchweeds (*Striga* sp.) are parasitic weeds of great agricultural significance, parasitizing the roots of their hosts. *Striga*, like all other root parasitic weeds, drain essential organic and inorganic resources from their hosts leading to poor crop development and low yield. In Africa, about 50 million ha in over 30 countries are infested by *Striga* spp. causing grain loss of cereals. Estimated yield losses of maize, sorghum, millets and upland rice are between 30 and 90%. The parasite, therefore, is ranked as the leading biotic constraint to cereal production in the continent.

Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) are promising components for integrated solutions to agro-environmental problems because inoculants possess the capacity to promote crop growth and reduce the population of deleterious microbes in the rhizosphere. Although there are numerous studies on crop growth promotion and biological control of diseases, weeds, nematodes and parasitic weeds using PGPR, little is known about the potential of some *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens* and *Burkholderia phytofirmans* strains in sorghum growth promotion and resistance against *Striga* infection. The main objective of the study was to assess the effect of *B. subtilis* Bsn5, *B. subtilis* GBO3, *B. amyloliquefaciens* FZB42 and *Burkholderia phytofirmans* PsJN on growth promotion of sorghum crop and suppression of *Striga* development, thus providing a basic understanding on the sorghum-PGPR-*Striga* interaction.

This study opens with an elaborate review of the state-of-the-art knowledge on the tripartite interactions between *Striga*, sorghum and different species of PGPR. Prior to this, bipartite relationship between sorghum and *Striga*, PGPR-sorghum and PGPR-*Striga* are reviewed with a focus on understanding *Striga* impact on sorghum, sorghum defence responses to infection, plant growth and disease suppression benefits by PGPR on sorghum, and the effect of PGPR on *Striga* development. Knowledge gaps in both bipartite and tripartite relationships are described, and future research recommendations given. A key recommendation from the review is to conduct experiments under controlled environmental conditions using *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens* and *Burkholderia phytofirmans* strains in order to understand their relationship with sorghum and *Striga* at bipartite and tripartite levels.

Petri dish bioassays and root chamber experiments under controlled conditions were conducted at the Institute of Plant Production and Agroecology in the Tropics and

Subtropics, University of Hohenheim between 2012 and 2014. *B. subtilis* Bsn5, *B. subtilis* GBO3, *B. amyloliquefaciens* FZB42 and *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN inocula and their corresponding cell culture supernatants were evaluated for their growth promotion potential on sorghum and suppressiveness on *Striga* development. Sorghum root exudates and synthetic stimulant GR24 were used to induce *Striga* seed germination. *Bacillus subtilis* Bsn5 supernatant, which showed the greatest inhibitory activity on *Striga* germination and radicle elongation, was separated by ethyl acetate into lipophilic and hydrophilic phases. The purpose of this extraction was to try and identify the polarity of the inhibitor. Protein composition by mass spectrometry (MS) was also done on the supernatant with a view of establishing the presence of peptides because peptides have been associated with *Orobanchaceae* germination and radicle inhibition in previous studies. In addition, determination of plant growth hormones in bacteria supernatants was also conducted using Radio-Immuno-Assay (RIA) in order to relate PGPR hormone production and sorghum growth enhancement.

Burkholderia phytofirmans PsJN significantly (<0.05) induced a higher vigor index (VI) on sorghum seedlings ($>18,000$) compared to other PGPR and control treatments. The lowest VI (7626) was recorded in seeds inoculated with *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. Complete *Striga* germination inhibition (0% germination) occurred in seeds exposed to all PGPR inocula suspended while the highest germination ($>60\%$) occurred in control treatments (10% Luria Bertani (LB) + GR24 and sterile distilled water (SDW) + GR24). The effect of bacterial supernatants on the germination percentage and radicle length of *Striga* seeds was also significantly (<0.05) different among treatments. The least germination (7.4 %) was observed in *Bacillus subtilis* Bsn5 + GR24 while the highest (66 %) was observed in SDW + GR24 control. *Bacillus subtilis* Bsn5 supernatant produced the lowest mean radicle lengths (0.1 mm) while the highest radicle lengths were observed in SDW + GR24 (2.2 mm). Therefore, *Bacillus subtilis* Bsn5 supernatant was selected for further investigation of compounds causing inhibition of *Striga* germination and preventing radicle elongation. The supernatant was separated into hydrophilic and hydrophobic fractions using ethyl acetate. Each fraction was then prepared in 1%, 25%, 50%, 75% and 100% concentrations before being evaluated for their inhibitory activity in *Striga* germination and radicle elongation. The highest germination percentage (63%) and radical length (2.9 mm) was observed in SDW + GR24 control treatment. The ethyl acetate (lipophilic) fraction at both 100% and 1% concentration + GR24 produced a germination

percentage of >40% which was similar to 10% LB + GR24 and ethyl acetate + GR24 controls. There was complete inhibition of *Striga* seed germination after exposure to either *Bacillus subtilis* Bsn5 supernatant + GR24 or 100% hydrophilic fraction of the supernatant + GR24. However, at 25% and 1% concentration + GR24, *Striga* germination percentage increased to 34% and 49%, respectively. Light microscopy examination of *Striga* radicles exposed to *Bacillus subtilis* Bsn5 supernatant + GR24 revealed that stunting of the radicles was due to reduction in cell sizes at the radicle elongation zone. Extended agar gel assays (EAGA) experiments showed a similar trend of results with *B. subtilis* Bsn5 showing the highest inhibitory activity on *Striga* germination and radicle elongation compared to other PGPR and control treatments.

Results from root chamber experiments demonstrated significant ($p < 0.05$) differences in biomass production between *Striga*-free and *Striga*-infected sorghum. Total biomass yield in uninoculated *Striga*-free plants was 40% higher than uninoculated *Striga*-infected sorghum plants. *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42, *B. subtilis* GBO3 and *Burkholderia phytofirmans* PsJN inoculated *Striga*-free sorghum showed a 75%; 142% and 158% increase in biomass yield, respectively, compared to uninoculated *Striga*-free sorghum. There were no significant differences in biomass yield observed between inoculated and uninoculated *Striga*-infected plants. All PGPR supernatants and 10% LB media showed production of phytohormones cytokinin, IAA, GAs and ABA. Cytokinin content in PGPR supernatants was significantly (> 0.05) higher than blank 10% LB control media. There was a significant negative correlation ($r = -0.96$) between IAA and cytokinins. However, there was no significant positive correlation between any phytohormone and sorghum plant height, SPAD values, biomass production, *Striga* germination, attachment and tubercle death.

Finally, this study shows that *Bacillus subtilis* Bsn5, *B. subtilis* GBO3, *B. amyloliquefaciens* FZB42 and *Burkholderia phytofirmans* PsJN might accelerate sorghum growth and suppress key stages of *Striga* development under laboratory conditions. Greenhouse and field experiments are recommended to better understand these interactions under natural conditions where other biotic and abiotic factors come into play. These findings could contribute to a better understanding of sorghum and beneficial bacteria interactions and provide novel information of the long-term effects of a PGPR on sorghum development, opening new avenues for *Striga* control and sustainable, ecofriendly sorghum production.

Zusammenfassung

Pflanzen der Gattung *Striga* sind parasitäre, die Wurzeln ihres Wirtes befallende Unkräuter mit einer großen landwirtschaftlichen Bedeutung. *Striga* entzieht ihrem Wirt essentielle organische und anorganische Ressourcen. Dies führt zu einem verschlechterten Wachstum und zu geringeren Erträgen bei der Wirtspflanze. Über 50 Millionen Hektar landwirtschaftlicher Nutzfläche in über 30 Ländern Afrikas sind von *Striga* befallen. Dies führt zu Ertragsverlusten bei Mais, Sorghum, Hirse und Reis von geschätzten 30 bis 90 Prozent, je nach Ackerfrucht und Befallsstärke. Deswegen wird *Striga* auch als maßgebliches biotisches Hemmnis bei der Getreideproduktion des Kontinents gewertet.

Ein vielversprechender Bestandteil für eine integrative Lösung zur Kontrolle von *Striga* könnten pflanzenwachstumsfördernde Bakterien (plant growth promoting rhizobacteria, PGPR) sein, die im Allgemeinen im Wurzelraum verschiedenster Pflanzen zu finden sind. Bodenimpfungen mit diesen Bakterien zeigten Wirksamkeit bei der Unterstützung des Wachstums von Feldfrüchten sowie eine Reduktion der Populationen von schädlichen Mikroorganismen in der Rhizosphäre. Obwohl sich schon eine Vielzahl von Studien mit der Unterstützung des Pflanzenwachstums und der biologischen Kontrolle von Krankheiten, Unkräutern, Nematoden und Parasiten durch PGPR befasst haben ist relativ wenig über das Potential einiger Bakterienstämme (*Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens* und *Burkholderia phytofirmans*) bei der Unterstützung des Wachstums von Sorghum und der Resistenz gegen *Striga*- Infektionen bekannt. Das vorrangige Ziel der hier vorgestellten Studie war es die Auswirkungen von *B. subtilis* Bsn5, *B. subtilis* GBO3, *B. amyloliquefaciens* FZB42 und dem *Burkholderia phytofirmans* Stamm PsJN auf das Wachstum von Sorghum und die Entwicklung von *Striga* zu erfassen, um damit ein grundlegendes Verständnis für die Interaktionen zwischen Sorghum-*Striga*-PGPR zu erhalten.

Zu Beginn dieser Arbeit steht eine ausführliche Literaturübersicht zum aktuellen Stand des Wissens auf dem Gebiet der dreiteiligen Interaktionen zwischen *Striga*, Sorghum und verschiedenen Arten von PGPR. Zuerst werden dafür die zweiteiligen Interaktionen zwischen Sorghum und *Striga*, PGPR und Sorghum sowie zwischen PGPR und *Striga* erörtert. Dies soll einen Einblick darüber verschaffen wie *Striga* Sorghum beeinflusst und wie die Verteidigungsmechanismen von Sorghum gegen eine solche Interaktion aussehen. Gleichzeitig wird die Unterstützung diskutiert, die PGPR bei Pflanzenwachstum und bei

der Unterdrückung von Krankheiten in Sorghum leisten kann. Abschließend wird beleuchtet wie sich PGPR auf die Entwicklung von *Striga* auswirken. Sowohl für die zweiteiligen als auch für die dreiteiligen Interaktionen werden Wissenslücken aufgezeigt und Vorschläge für zukünftige Forschungsansätze gegeben. Eine der grundlegenden Empfehlungen dieser Übersicht ist es Experimente unter kontrollierten Umweltbedingungen durchzuführen, die es erlauben Rückschlüsse auf die Wechselwirkungen zwischen den oben genannten PGPR Stämmen und Sorghum sowie *Striga* bei zweiteiliger und dreiteiliger Interaktion zu schließen.

Zwischen 2012 und 2014 wurden am Institut für Pflanzenproduktion und Agrarökologie der Tropen und Subtropen an der Universität Hohenheim sowohl Labore Experimente als auch versuche in Wurzelgefäßen unter kontrollierten Bedingungen durchgeführt. Inokulate (und die zugehörigen Überstände der Zellkulturen) von *B. subtilis* Bsn5, *B. subtilis* GBO3, *B. amyloliquefaciens* FZB42 und *Burkholderia phytofirmans* Stamm PsJN wurden auf ihr Potential als Wachstums promotoren in Sorghum und ihrer Wirkung auf die Entwicklung von *Striga* hin bewertet. Sowohl Wurzelsekrete von Sorghum als auch das synthetische Keimstimulanz GR24 wurden benutzt, um eine Keimung von *Striga* Samen zu induzieren. Während der Versuche zeigten die Überstände der *Bacillus subtilis* Bsn5 Kulturen den größten inhibitorischen Effekt sowohl auf die Keimung von *Striga* als auch auf die Verlängerung der Keimwurzel. Deswegen wurde der Überstand durch Hinzugabe von Essigsäureethylester in eine hydrophobe und eine hydrophile Phase gespalten, um die Polarität dieser Inhibierung aufzeigen zu können. Die Proteinzusammensetzung des Überstandes wurde mit Hilfe eines Massenspektrometers (MS) untersucht um das Vorhandensein von Peptiden abschätzen zu können. Peptide wurden in früheren Studien mit der Keimung von verschiedenen Orobanchearten, insbesondere im Hinblick auf die Verkürzung der Keimwurzel, in Verbindung gebracht. Mit Hilfe eines Radioimmunoassays (RIA) wurden Pflanzenwachstumshormone im Überstand bestimmt, um die Produktion dieser Hormone durch PGPR mit den Auswirkungen auf die Verbesserung des Wachstums von Sorghum in Verbindung setzen zu können.

Durch die Behandlung mit *Burkholderia phytofirmans* PsJN konnte ein signifikant (<0.05) höherer Vitalitäts Index (VI > 18000) an Sorghumkeimlingen erreicht werden als in den Kontrollbehandlungen oder in Behandlungen mit anderen PGPR. Den niedrigsten VI erreichten Keimlinge in der Behandlung mit *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 (VI 7626). Komplette Keimungsunterdrückung von *Striga* wurde bei allen PGPR Inokulaten erreicht,

wenn die Samen in 10 prozentiger Luria Bertani Lösung suspendiert wurden. Die höchsten Keimprozentage (>60%) wurden in den zwei Kontrollversuchen (10% Luria Bertani (LB) + GR 24, sowie in sterilem destilliertem Wasser (SDW) + GR24) beobachtet.

Ebenso konnte ein signifikanter Effekt (<0.05) des bakteriellen Überstandes auf die Länge der Keimwurzel von *Striga* bei den verschiedenen Behandlungen festgestellt werden. Die niedrigsten Keimprozentage (7.4%) wurden bei der Behandlung mit *Bacillus subtilis* Bsn5 + GR 24 beobachtet, die höchsten (66%) bei der Kontrollbehandlung mit SDW + GR24. Die Überstände aus den *Bacillus subtilis* Kulturen ergaben die niedrigste Durchschnittslänge bei Keimwurzeln (0.1 mm), während die höchste durchschnittliche Länge (2.2 mm) bei SDW + GR24 beobachtet wurde. Aus diesem Grund wurde der Überstand von *Bacillus subtilis* Bsn5 für die weiterführenden Untersuchungen herangezogen, die Einblicke zu den ursächlichen Bestandteilen der Unterdrückung der Keimung von *Striga* sowie der Verhinderung der Elongation der Keimwurzel liefern sollten.

Der Überstand wurde mit Hilfe von Essigsäureethylester in eine hydrophile und eine hydrophobe Fraktion aufgetrennt. Jede Fraktion wurde dann zu Konzentrationen von 1%, 25%, 50%, 75% und 100% aufbereitet und auf ihre inhibitorische Aktivität auf die Keimung von *Striga* und die Elongation der Keimwurzel getestet. Die höchsten Keimprozentage (63%) und Keimwurzellänge (2.9 mm) wurde bei den Kontrollbehandlungen mit SDW + GR24 beobachtet. Beide Essigsäureethylester Fraktionen von 100% und 1%, jeweils + GR24, zeigten Keimprozentage von >40%, vergleichbar zu den Kontrollen mit 10% LB und Essigsäureethylester, auch jeweils + GR24. Eine komplette Inhibierung der Keimung von *Striga* Samen zeigte sich bei der Exposition sowohl zum gesamten Überstand von *Bacillus subtilis* Bsn5 + GR24 oder zur 100 % hydrophilen Fraktion des Überstandes (+ GR24). Allerdings zeigte sich auch eine Erhöhung der Keimprozentage von *Striga* bei den Konzentrationen von 25% und 1% + GR24 (jeweils auf 34% und 49%). Lichtmikroskopische Untersuchungen der Keimwurzel zeigten das bei der Behandlung mit dem Überstand der *Bacillus subtilis* Kulturen + GR24 eine Reduktion der Zellgröße im Bereich der Elongationszone ausschlaggebend für die kürzere Keimwurzel ist. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch während Extended Agar Gel Assays (EAGA), wo *Bacillus subtilis* Bsn5 die höchste inhibitorische Aktivität auf die Keimung und Keimwurzelelongation von *Striga*, verglichen zu anderen PGPR und den Kontrollversuchen, hatte.

Signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) bei der Biomasseproduktion konnten bei den Versuchen in Wurzelgefäßen zwischen *Striga* freien und *Striga* infizierten Sorghumpflanzen. Die Gesamtbiomasse nicht beimpfter *Striga* freier sorghumpflanzen war 40% höher als bei gleich behandelten mit *Striga* befallenen Pflanzen. Unter Abwesenheit von *Striga* zeigten Behandlungen mit *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42, *B. subtilis* GBO3 und *Burkholderia phytofirmans* PsJN eine Zunahme der Biomasse um jeweils 75, 142 und 158%, verglichen mit den nicht beimpften Pflanzen. Bei *Striga* befallenen Pflanzen konnte kein signifikanter Unterschied in der Biomasseproduktion zwischen den Behandlungen mit PGPR oder gänzlich ohne festgestellt werden.

Es konnte die *in-vitro* Produktion von Phytohormonen (Cytokinin, Auxin, Abscisinsäure und Gibberellinsäure) sowohl in den Überständen der PGPR als auch im 10% LB Medium festgestellt werden. Der Gehalt an Cytokinin war in den PGPR Überständen signifikant (> 0.05) höher als in den Kontrollen mit 10% LB Medium. Es konnte eine signifikante negative Korrelation ($r = -0.96$) zwischen Auxin und Cytokinin festgestellt werden. Allerdings gab es keine signifikante positive Korrelation zwischen einem der Phytohormone und Faktoren wie Sorghum Wuchshöhe, SPAD Werten und Biomasse Produktion oder der Keimung, Anheftung oder Absterben der Keimwurzel von *Striga*. Abschließend zeigt diese Studie auf, dass unter Laborbedingungen, Behandlungen mit *Bacillus subtilis* Bsn5, *B. subtilis* GBO3, *B. amyloliquefaciens* FZB42 und *Burkholderia phytofirmans* PsJN die Entwicklung von Sorghum beschleunigen und Schlüsselstadien bei der *Striga* Entwicklung unterdrücken können. Um diese Erkenntnisse weiter unter natürlichen Bedingungen verstehen zu können werden Gewächshaus- und Freilandversuche empfohlen, da hier weitere biotische und abiotische Faktoren ins Spiel kommen. Die hier vorgestellten Ergebnisse tragen zu einem besseren Verständnis der komplexen Interaktionen zwischen Sorghum und nutzbringenden Mikroorganismen bei. Gleichzeitig konnten neue Erkenntnisse zu den mittelfristigen Auswirkungen von PGPR auf die Entwicklung von Sorghum gefunden werden, die neue Möglichkeiten für die Bekämpfung von *Striga* in einer nachhaltigen, umweltfreundlichen Sorghumproduktion aufzeigen.