

Diss. ETH No. 17129

**RISK ASSESSMENT OF FUNGAL BIOCONTROL
AGENTS PRODUCING TOXIC METABOLITES:**

**A CASE STUDY WITH THE BINDWEED
BIOCONTROL AGENT *STAGONOSPORA
CONVOLVULI* LA39**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY, ZURICH
for the degree of
DOCTOR OF SCIENCES

presented by

DÉSIRÉE NICOLE BOSS

Dipl. Natw. ETH
born May 18th, 1978
citizen of Winterthur, ZH and Sigriswil, BE

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Geneviève Défago, examiner
Prof. Dr. Bruce McDonald, co-examiner
Dr. Monika Maurhofer, co-examiner
Dr. Hermann Strasser, co-examiner

2007

SUMMARY

Field bindweed (*Convolvulus arvensis*) and hedge bindweed (*Calystegia sepium*) are noxious perennial weeds which can only partially be controlled by chemical or mechanical methods. Biological control as an alternative is therefore of increasing public and commercial interest.

However, to ensure the safe use of biocontrol methods, strategies to assess the possible risks need to be developed. Even though there are regulations about placing biocontrol products based on microorganisms on the market and about the risk assessment of biocontrol agents (BCAs), these regulations are, especially in the EU, not clearly defined regarding exactly what kind of information should be included in a comprehensive risk assessment, in particular with respect to relevant metabolites. The high amount of risk assessment data demanded by the EU today is a major hurdle in the commercialization of microbial biocontrol products.

The most important aim of this thesis was to develop a general strategy to assess the risks of fungal BCAs which produce toxic metabolites and to implement this strategy using the bindweed biocontrol fungus *Stagonospora convolvuli* LA39 and its most important toxic metabolites as a model. The strategy developed in this thesis helps to clarify what risk assessment procedures are necessary for registration and can be used as a guideline for the registration process of other fungal BCAs producing toxic metabolites. For a comprehensive risk assessment it is also necessary to gain information about spread and survival of the BCA. Another aim of this thesis was therefore to develop molecular tools to monitor LA39 after its release into the environment. A further objective was to optimize the application strategy and efficacy of an *S. convolvuli* LA39 based mycoherbicide under field conditions.

In Chapter Two a newly developed strategy for the risk evaluation of toxic metabolites is presented, by means of which the entire risk scenario is calculated for a specific case. In the process, the risks of elsinochrome A (ELA) and leptosphaerodione production by the fungus *S. convolvuli* LA39 were evaluated. First of all, the toxicity of the two metabolites to bacteria, protozoa, fungi, and plants was evaluated in *in vitro* assays. The most sensitive bacteria and fungi were already affected at 0.01–0.07 μM ELA, whereas plants were far less sensitive. Leptosphaerodione was less toxic than ELA. Subsequently tests were carried out to determine whether ELA is present in the applied biocontrol product or in bindweeds and crop plants treated with LA39. In plants ELA was never detected and in the biocontrol product the ELA

concentration was far too low to have toxic effects on even the most sensitive organisms. Worst case calculations of possible environmental toxin concentrations were made using the data obtained. It can be conclusively stated that the production of ELA by biocontrol strain LA39 does not pose a risk to the environment or to the consumer.

The results obtained in Chapter Two allowed the risks of one specific toxic metabolite produced by one specific fungal BCA to be estimated. The strategy presented is easily applicable to other BCAs. Model studies like this will make it easier to fulfil the EU's requirements for registration procedures of BCAs.

In Chapter Three a molecular identification method was developed which allows tracking of *S. convolvuli* LA39 after field release. This method is based on similarity coefficients using ISSR fingerprints. The spread and survival of LA39 in the field were monitored in two experiments. First, in a release-recapture experiment a defined area with natural bindweed infestation was treated with LA39 and the fungus was re-isolated from infected bindweed leaves at the end of the growing season. The frequency of recovery of LA39 decreased quickly as the distance to the inoculation plot increased. The maximum distance where an isolate identical to LA39 could be found was 4 m. Second, the environmental persistence of LA39 was assessed in a survival (overwintering) experiment. Although it was possible to re-isolate the fungus from infected bindweed in the following year, the frequency of occurrence was very low. The developed ISSR fingerprinting method proved to be suitable to distinguish LA39 from resident *Stagonospora* spp. and therefore to track the environmental fate of this fungal strain after field application. The results strongly suggest that LA39 is a suitable BCA for controlling bindweed because it has only minimal environmental impact due to its restricted mobility, poor proliferation, and poor persistence over seasons.

In Chapter Two and Three it has been demonstrated that the use of *S. convolvuli* LA39 as a BCA for bindweed control is free of any risks for the consumer and the environment. Consequently the last part of the thesis consisted in the further development of a biocontrol product with LA39 as the active ingredient, and the verification of its efficacy in the field. As demonstrated in Chapter Four, an LA39 based mycoherbicide efficiently controls bindweed infestations in three non-crop field trials conducted at different locations in two different years. The application strategy of the mycoherbicide was optimized regarding the number and date of applications and the application rate. The results suggest that spores of LA39 should be applied two to five times from the beginning of May to the beginning of July. The number of applications needs to be adapted to the size and density of bindweed infestation each year. For efficient bindweed control the mycoherbicide has to be applied at 40–160 ml m⁻² and

5×10^6 spores ml^{-1} . Since pathogenic fungi often lose their aggressiveness upon continuous *in vitro* subcultivation, the influence of subcultivation on the virulence of LA39 was monitored over 30 vegetative generations. LA39 lost aggressiveness against both bindweed species between the third and the ninth vegetative generation. However, the virulence of the fungus was fully restored after a single host plant contact. Thus continuous subcultivation should be avoided when using LA39 as a BCA.

Within this thesis, a strategy for a comprehensive risk assessment for fungal BCAs producing toxic metabolites was developed in order to impact on the simplification of the EU registration process for microbial biocontrol agents. The feasibility and suitability of this strategy was verified by applying it to the bindweed biocontrol agent *S. convolvuli* LA39. The results showed that an LA39 based mycoherbicide is a safe alternative to chemical herbicides regarding product toxicity and environmental impact. Moreover, LA39 is highly effective against field and hedge bindweeds, as demonstrated in several field trials, and is therefore a promising candidate for the development of a successful commercial mycoherbicide.

ZUSAMMENFASSUNG

Ackerwinden (*Convolvulus arvensis*) und Zaunwinden (*Calystegia sepium*) sind schädliche, mehrjährige Unkräuter, welche mit chemischen und mechanischen Mitteln nur unvollständig kontrolliert werden können. Das Interesse der Öffentlichkeit an Alternativen wie der biologischen Kontrolle nimmt zu, auch in kommerzieller Hinsicht.

Um aber eine sichere Anwendung von Biokontrolltechniken zu gewährleisten, müssen zuerst Strategien entwickelt werden, wie potentielle Risiken abgeschätzt werden können. Obwohl Reglemente existieren, welche sich mit der Kommerzialisierung und der Risikoanalyse von Biokontroll-Organismen beschäftigen, gibt es vor allem in der EU, gerade in Bezug auf toxische Metaboliten, nach wie vor keine genauen Angaben darüber, welche Daten eine umfassende Risikoanalyse genau enthalten muss. Die grosse Menge an zurzeit von der EU geforderten Risikoanalyse Daten ist ein Haupthindernis bei der Kommerzialisierung eines mikrobiellen Biokontrollproduktes.

Das wichtigste Ziel dieser Arbeit war, eine generelle Strategie zu entwickeln, mit Hilfe derer die Risiken beurteilt werden können, welche von pilzlichen Biokontroll-Organismen, die toxische Metaboliten produzieren, ausgehen. Diese Strategie sollte dann modellhaft auf den zur Windenbekämpfung eingesetzten Biokontroll-Pilz *Stagonospora convolvuli* LA39 und dessen wichtigste toxischen Metaboliten angewendet werden. Die in dieser Doktorarbeit entwickelte Strategie trägt dazu bei, zu klären, welche Methoden zur Risiko-Analyse für eine Registrierung nötig sind und kann als Richtlinie für den Registrierungsprozess anderer pilzlicher Biokontroll-Organismen, welche toxische Metaboliten produzieren, dienen.

Zu einer umfassenden Risiko-Analyse gehören auch Studien über die Verbreitung und das Überleben der Biokontroll-Organismen. Deshalb war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, molekularbiologische Identifikationsmethoden zu entwickeln, um *S. convolvuli* LA39 nach seiner Freisetzung im Feld verfolgen zu können. Eine weitere Zielsetzung war die Optimierung der Applikationsstrategie und der Wirksamkeit eines auf *S. convolvuli* LA39 basierenden Mykoherbizides unter Feldbedingungen.

Eine neu entwickelte Strategie, wie die von toxischen Metaboliten ausgehenden Risiken analysiert werden können, wird im zweiten Kapitel dieser Arbeit präsentiert. Mittels dieser Strategie wurde das ganze Risiko-Szenario anhand eines Beispiels durchgerechnet. Dabei wurden die Risiken, welche von der Elsinochrom A- (ELA) und der Leptosphaerodion-Produktion durch *S. convolvuli* LA39 ausgehen, evaluiert. Zuerst wurde ihre toxische Wirkung auf Bakterien, Protozoen, Pilze und Pflanzen anhand von *in vitro* Tests untersucht.

Die Vermehrung beziehungsweise das Wachstum der empfindlichsten Bakterien und Pilze wurde bereits bei 0.01 – 0.07 μM ELA beeinträchtigt, währenddessen Pflanzen viel weniger empfindlich reagierten. *Leptosphaerodion* erwies sich als weniger toxisch als ELA.

Anschliessend wurde untersucht, ob ELA im angewendeten Biokontroll-Produkt oder in damit behandelten Winden oder Nutzpflanzen nachgewiesen werden kann. In Pflanzen konnte ELA nie nachgewiesen werden und die im Mykoherbizid gefundene ELA-Konzentration war sogar bei weitem zu tief, um den sensitivsten Organismus beeinträchtigen zu können. Mit den erhaltenen Daten wurden worst case-Berechnungen von möglichen in der Umwelt erreichbaren Toxin-Konzentrationen gemacht. Die Resultate zeigen, dass von der ELA Produktion durch den Biokontroll-Stamm LA39 keinerlei Risiko für die Umwelt oder den Konsumenten ausgeht.

Mit Hilfe der im zweiten Kapitel erhaltenen Resultate können die Risiken, welche von einem bestimmten toxischen Metaboliten, der von einem bestimmten pilzlichen Biokontroll-Organismus produziert wird, abgeschätzt werden. Die vorgestellte Strategie ist einfach auf andere Biokontroll-Organismen anzuwenden. Modellstudien wie diese werden das Erfüllen der von der EU formulierten Erfordernisse bezüglich des Registrierungsprozesses von Biokontroll-Organismen vereinfachen.

Im dritten Kapitel dieser Arbeit wurde eine molekularbiologische Identifikationsmethode entwickelt, welche es ermöglicht, *S. convolvuli* LA39 nach einer Freisetzung im Feld zu verfolgen. Die entwickelte Methode basiert auf mittels ISSR-Fingerprinting ermittelten Ähnlichkeitskoeffizienten. Mittels zweier verschiedener Experimente wurden die Verbreitung und das Überleben von LA39 untersucht. Das erste war ein Freisetzung- und Rückisolierungs-Experiment. Dabei wurde ein Areal mit natürlicher Windenbedeckung mit LA39 behandelt und der Pilz dann am Ende der Wachstumsperiode aus infizierten Windenblättern rückisoliert. Die Rate, mit welcher LA39 rückisoliert werden konnte, sank sehr schnell mit zunehmender Distanz zum ursprünglich behandelten Areal. Die maximale Distanz zum inokulierten Gebiet, bei der ein mit LA39 identisches Isolat gefunden werden konnte, betrug 4 m. In einem Überwinterungsexperiment wurde die Beständigkeit von LA39 in der Umwelt untersucht. Der Pilz konnte zwar im folgenden Jahr aus infizierten Windenblättern rückisoliert werden, aber sein Vorkommen war sehr selten. Die entwickelte ISSR Fingerprinting - Methode erwies sich als geeignet, um LA39 von einheimischen *Stagonospora* spp. zu unterscheiden und demzufolge das Verhalten dieses Pilzstammes in der Umwelt zu verfolgen. Aus den dadurch erhaltenen Resultaten lässt sich schliessen, dass LA39 aufgrund seines minimalen Einflusses auf die Umwelt, seiner stark eingeschränkten Mobilität,

seiner langsamen Vermehrung und seiner schwachen Beständigkeit in der Umwelt ein zur Windenbekämpfung geeigneter Biokontroll-Organismus ist.

In den Kapiteln zwei und drei wurde gezeigt, dass die Anwendung von *S. convolvuli* LA39 in der biologischen Windenbekämpfung mit keinerlei Risiken für die Umwelt oder den Konsumenten behaftet ist. Folglich beschäftigt sich der letzte Teil dieser Arbeit mit der Weiterentwicklung eines auf LA39 basierenden Biokontrollproduktes und der Bestätigung von dessen Wirksamkeit unter Feldbedingungen. Wie in diesem vierten Kapitel anhand dreier Feldversuche gezeigt werden konnte, ist ein auf dem Pilz *S. convolvuli* LA39 basierendes Mykoherbizid in der Lage, Windenbewuchs wirksam zu bekämpfen. Diese Versuche wurden an drei verschiedenen Orten und in zwei verschiedenen Jahren durchgeführt. Ein verfolgtes Ziel war die Anwendung des Mykoherbizides bezüglich Anzahl und Zeitpunkt der Applikationen und auch der Applikationsmenge zu optimieren. Unseren Resultaten zufolge sollten die LA39 Sporen je nach Dichte des Windenbewuchses zwei bis fünfmal zwischen Anfang Mai und Anfang Juli appliziert werden. Um die Winden wirksam zu bekämpfen muss das Mykoherbizid mit einer Sporenkonzentration von 5×10^6 Sporen ml^{-1} und $40\text{-}60 \text{ ml m}^{-2}$ angewendet werden. Da pilzliche Pathogene bei längerdauernder *in vitro* Kultivierung bekanntermaßen oft ihre Pathogenität verlieren, wurde der Einfluss einer solchen Subkultivierung über 30 vegetative Generationen hinweg untersucht. Die Aggressivität von LA39 gegenüber beiden Windenarten ging bereits zwischen der dritten und der neunten Generation verloren. Seine Virulenz konnte aber mittels eines einzigen Wirtspflanzenkontaktes vollständig regeneriert werden. Wird LA39 als Biokontrollstamm genützt, so soll möglichst auf fortlaufende *in vitro* Kultivierung verzichtet werden.

In dieser Dissertation wurde mit dem Ziel, Einfluss auf die Vereinfachung des EU Registrierungsprozesses für Biokontroll-Organismen zu nehmen, eine Strategie für eine umfassende Risikoanalyse von pilzlichen Biokontroll-Organismen, welche toxische Metaboliten produzieren, entwickelt. Die Machbarkeit und Tauglichkeit dieser Strategie wurde anhand ihrer Anwendung auf den der Windenbekämpfung dienenden Biokontroll-Pilz *S. convolvuli* LA39 verifiziert. Dabei stellte sich ein auf LA39 basierendes Mykoherbizid hinsichtlich der Produkttoxizität und der Auswirkung auf die Umwelt als sichere Alternative zu chemischen Herbiziden heraus. Wie in mehreren Feldversuchen gezeigt werden könnte, wirkt LA39 effektiv gegen Zaun- und Ackerwinden und ist demzufolge ein vielversprechender Kandidat für die Entwicklung eines erfolgreichen kommerziellen Mykoherbizides.