



**Institut für Pflanzenkrankheiten
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn**

Diversity in Pathogenicity and Genetics of *Gibberella xylarioides* (*Fusarium xylarioides*) Populations and Resistance of *Coffea* spp. in Ethiopia

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Grades
Doktor der Agrarwissenschaften
(Dr. agr.)

der

Hohen Landwirtschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Bonn

vorgelegt am 04.05.2004

Von
Girma Adugna Senbeta (B. Sc., M. Sc.)

aus
Jimma, Äthiopien

**Institut für Pflanzenkrankheiten
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn**

**Diversity in Pathogenicity and Genetics of *Gibberella xylarioides* (*Fusarium xylarioides*)
Populations and Resistance of *Coffea* spp. in Ethiopia**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Grades

Doktor der Agrarwissenschaften

(Dr. agr.)

der

Hohen Landwirtschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

zu Bonn

vorgelegt am 04.05.2004

von

Girma Adugna Senbeta (B. Sc., M. Sc.)

aus

Jimma, Äthiopien

Bibliografische Information Der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2004

Zugl.: Bonn, Univ., Diss., 2004

ISBN 3-86537-143-4

„Diese Arbeit wurde mit finanzieller Unterstützung durch den Deutschen Akademischen Austauschdienst (DAAD) gedruckt“

Referent:

Korreferent:

Tag der mündlichen Prüfung:

Gedruckt bei:

Prof. Dr. H.-W. Dehne

Prof. Dr. K. Schellander

18.06.2004

Cuvillier Verlag, Göttingen

⊕ CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2004

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2004

Gedruckt auf säurefreiem Papier

ISBN 3-86537-143-4

To

my parents

Adugna Senbeta and Amelework Mulleta

ABBREVIATIONS

ANOVA	analysis of variance
BBA	Biologische Bundesanstalt
CA	carrot agar
CABI	CAB International
CAR	Central African Republic
CBD	coffee berry disease
CIRAD	Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour la Développement
CLR	coffee leaf rust
CORI	Coffee Research Institute
CV	coefficient of variation
CWD	coffee wilt disease
DFID	Department for International Development
DMRT	Duncun's multiple range test
DNA	deoxyribonucleic acid
EARO	Ethiopian Agricultural Research Organization
g	gram
GLM	general linear model
ha	hectare
IAR	Institute of Agricultural Research
ICO	International Coffee Organization
IMI	International Mycological Institute
JARC	Jimma Agricultural Research Center
LSD	least significance difference
m	meter
mg	milligram
ml	milliliter
mm	millimeter
mM	millimole
MYP	malt yeast peptone
ng	nanogram
°C	degree celsius
PAUP	phylogenetic analysis using parsimony
PCR	polymerase chain reaction
PDA	potato dextrose agar
PSA	potato sucrose agar
RAPD	random amplified polymorphic DNA
RCBD	randomized complete block design
SAS	statistical analysis system
SNA	synthetic low nutrient agar
TAE	tris-acetate-EDTA (ethylene diamine-tetra-acetate)
U	unit
UPGMA	unweighted pair-group method with arithmetic average
V-8	vegetable juice agar
WA	water agar
μl	microliter
μM	micromole
μm	micrometer

ABSTRACT

The coffee wilt disease (CWD) is a typical tracheomycosis caused by the fungal pathogen *Gibberella xylarioides* (*Fusarium xylarioides*). The disease in Ethiopia is endemic and widespread on Arabica coffee (*Coffea arabica*) and re-emerged as a major threat to Robusta coffee (*Coffea canephora*) in Congo, Uganda and Tanzania recently. The major objectives of the study were to assess and determine the occurrence and distribution of CWD, collect sexual and asexual forms of the pathogen and investigate the fungus population structure and biology.

CWD was prevalent in semiforest, garden and plantation coffee production systems with significantly varying incidence. The disease is more important in plantation followed by the garden-based production. There were implications of variations in resistance levels of Arabica cultivars in the field. Agronomic practices such as close spacing, replanting and slashing or hoeing were among the factors aggravating CWD. *G. xylarioides* was isolated from almost all fields being the main cause of wilting trees although other *Fusarium* spp., namely, *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. stilboides* and *F. lateritium* var. *longum* were identified. The cultural appearances of *G. xylarioides* isolated from Arabica coffee on potato sucrose agar are grayish white to bluish black or dark purplish, which varied from those strains with orange pigments from Robusta and Excelsa coffee. In mating tests, some crosses produced fertile perithecia with extruded ascospores in culture. The pathogenic diversity of *G. xylarioides* was studied by inoculating 10 isolates collected in 10 major Arabica growing districts in Ethiopia and one from Robusta coffee; in seedlings of 9 Arabica cultivars and one Robusta line in the greenhouse. All Arabica isolates were pathogenic only to seedlings of *C. arabica* with varying degrees of aggressiveness, but incompatible with seedlings of *C. canephora*. In contrast, the Robusta strain was specifically compatible with seedlings of *C. canephora* without showing any infection symptom in all *C. arabica* cultivars. This result is the first cross inoculation evidence proving host specialization of *G. xylarioides* populations to the two coffee species. There existed highly significant ($P < 0.001$) differences among cultivars, isolates and cultivar-isolate interactions. The cultivar-isolate interactions indicate vertical resistance and virulence combinations. Among cultivars, Catimor-J19 and Kurme were resistant to all isolates except one; while F-59, Caturra, Dega and Wolisho manifested susceptibility to all Arabica isolates. The isolate from garden coffee in Yirgacheffe (Gx11) was the most aggressive with being virulent to all cultivars. Jimma (Gx1), Gechi (Gx4) and Tepi (Gx7) isolates proved to be also aggressive, whereas Yayo (Gx5) and Mettu (Gx6) both from semiforest coffee were less aggressive.

RAPD-PCR analysis showed that Ethiopian Arabica isolates formed a genetically homogeneous population but distinctly polymorphic to strains from *C. canephora* and *C. excelsa*. The historic Arabica strain was slightly different from the recent collections illustrating little genetic change in the population over the last 3 decades. This in turn implies that the sexual teleomorphic state of the fungus contributed only less to diversity of the pathogen populations instead serving as survival and disseminating structure. The RAPD fingerprinting revealed that the coffee wilt pathogen populations are genetically diverse related to *Coffea* spp. and geographic origin in Africa. The present investigations employing cultural comparisons, pathogenicity tests and RAPD-PCR markers corroborated existence of host specialization into at least two pathogenic forms within *G. xylarioides* populations. Thus two *formae speciales*, namely; *Gibberella xylarioides* f. sp. *abyssiniae* (anamorph: *Fusarium xylarioides* f. sp. *abyssiniae*) for the fungus strains attacking only *C. arabica*; and *Gibberella xylarioides* f. sp. *canephorae* (anamorph: *Fusarium xylarioides* f. sp. *canephorae*) pathogenic to *C. canephora* and *C. excelsa* were proposed. This subdivision enables to design effective CWD management strategies, develop resistant cultivars/lines and formulate further breeding programs towards each population group.

KURZFASSUNG

Die Welkekrankheit des Kaffees (CWD) ist eine typische Tracheomykose, die durch den Pilz *Gibberella xylarioides* (*Fusarium xylarioides*) verursacht wird. Die Wirtspflanze wird über die Wurzel- und Stammbasis infiziert und stirbt innerhalb kurzer Zeit ab. Die Krankheit an Arabica-Kaffee (*Coffea arabica*) ist für Äthiopien endemisch, in jüngster Zeit entwickelte sie sich an Robusta-Kaffee (*C. canephora*) im Kongo, Uganda und Tansania zum größten Problem im Kaffeeanbau.

In Äthiopien tritt die Krankheit in den drei Anbausystemen Sekundärwald-, Garten- und Plantagen-Kaffee mit unterschiedlicher Intensität auf. Die Erhebungen belegen einen hohen Befall von Plantagen-Kaffee und verhältnismäßig geringen an Garten-Kaffee und ergaben deutliche Hinweise auf Unterschiede in der Resistenz der verschiedenen Herkünfte der Kaffeepflanzen. Kulturmaßnahmen wie enge Bestandesdichte, Nachpflanzen, Unkrautjäten und Hacken in Stammnähe fördern die Ausbreitung. *G. xylarioides* konnte an fast allen Standorten isoliert werden. Gleichzeitig wurden weitere *Fusarium*-Arten wie *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. stilboides* und *F. lateritium* var. *longum* bestimmt. *G. xylarioides*-Isolate, die von Arabica-Kaffee stammten, bildeten auf synthetischem Nährmedium grau-weißes, blau-schwarzes bis dunkel-violettes Luftmyzel. Sie unterscheiden sich deutlich von Isolaten mit orange-farbiger Pigmentierung, die von Robusta- und Excelsa-Kaffee stammten. In Kreuzungsversuchen *in vitro* mit verschiedenen Isolaten wurden fertile Perithezien mit reifen Ascosporen gebildet. Untersuchungen zur Pathogenität wurden mit 10 Arabica-Isolaten aus den bedeutendsten Anbaugebieten Äthiopiens und einem Robusta-Isolat an 9 Arabica-Varietäten sowie einer Robusta-Varietät im Gewächshaus durchgeführt. Die Arabica-Isolate zeigten Unterschiede in der Aggressivität gegenüber den Varietäten von Arabica-Kaffee, erwiesen sich gegenüber der Robusta-Varietät jedoch als inkompatibel. Das Isolat von Robusta-Kaffee befiel nur die Robusta-Varietät, die Sämlinge der Arabica-Varietäten blieben über einen Zeitraum von 18 Monaten ohne Symptome. Die Ergebnisse der Kreuzungsversuche ergaben Hinweise auf eine Wirtsspezifität der Pilzisolat. Hoch-signifikante Unterschiede traten auf zwischen dem Pflanzengenotyp, den Isolaten und Interaktionen von Varietäten und Isolaten. Die Varietäten Catimor-J19 und Kurme zeigten Resistenz gegenüber fast allen Isolaten, wohingegen die Varietäten F-59, Caturra, Dege und Wolisho anfällig gegenüber allen Arabica-Isolaten reagierten. Das Isolat aus Yirgachaffe (Gx1) von Garten-Kaffee erwies sich als hoch aggressiv an allen Kaffeevarietäten. Eine Abstufung in der Virulenz der Isolate aus Jimma (Gx1), Gechi (Gx4) und Tepi (Gx7) gegenüber Isolaten aus Yayo (Gx5) und Mettu (Gx6) aus dem Sekundärwald war nachzuweisen.

Mittels RAPD-PCR wurde eine hohe genetische Homogenität innerhalb der äthiopischen Pathogenpopulationen von Arabica-Kaffee nachgewiesen, während sich die Isolate von Robusta- und Excelsa-Herkünften genetisch deutlich differenzieren ließen. Das historische Isolat von *G. xylarioides* von Arabica-Kaffe aus den 1970-Jahren unterschied sich nur geringfügig von den rezenten Arabica-Isolaten, so dass nur von geringfügigen genetischen Veränderungen in den Populationen im Verlauf der letzten 30 Jahre ausgegangen werden kann. Die sexuell gebildeten Ascosporen tragen offenbar nur wenig zur Diversität der Populationen bei, gewährleisten dafür aber die Überdauerung und Ausbreitung des Pathogens. Die RAPD-Fingerprints zeigen Diversitäten in der Pilzpopulation in den unterschiedlichen geografischen Regionen und im Artenspektrum der Wirtspflanzengattung *Coffea*. Morphologische bzw. genetische Merkmale deuten auf eine Wirtsspezialisierung des Erregers hin und sollten durch unterschiedliche *formae speciales* gekennzeichnet werden. Vorgeschlagen werden *G. xylarioides* f. sp. *abyssiniae* (anamorph: *F. xylarioides* f. sp. *abyssiniae*) für alle Isolate von *C. arabica* und *G. xylarioides* f. sp. *canephorae* (anamorph: *F. xylarioides* f. sp. *canephorae*) für alle Isolate von *C. canephora* und *C. excelsa*.

CONTENTS

	Page
1 INTRODUCTION	1
2 MATERIALS AND METHODS	7
2.1 Survey and assessment of coffee wilt disease in Ethiopia	7
2.1.1 Survey areas	7
2.1.2 Disease assessment	7
2.1.3 Sample collection	7
2.2 Isolation, identification and characterization of <i>Gibberella xylarioides</i>	8
2.2.1 Isolation and identification from single coffee stems	8
2.2.2 Cultural and morphological characterization of isolates	9
2.2.2.1 Cultural colony characteristics	9
2.2.2.2 Conidial morphology	9
2.2.3 Characterization of the sexual teleomorphic state	9
2.2.4 Isolation from perithecia and segregating progeny studies	10
2.2.5 Preservation of isolates	10
2.3 Mating tests <i>in vitro</i>	10
2.4 Diversity in pathogenicity of <i>Gibberella xylarioides</i> and resistance of <i>Coffea</i> spp.	11
2.4.1 Fungal isolates	11
2.4.2 Description of coffee species, cultivars and lines	11
2.4.3 Raising of coffee seedlings	14
2.4.4 Inoculum preparation	14
2.4.5 Inoculation of coffee seedlings	14
2.4.6 Data collection and analysis	15
2.5 Random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR) analysis of <i>Gibberella xylarioides</i> isolates and other <i>Fusarium</i> spp. from <i>Coffea</i> spp.	16
2.5.1 Cultivation of the fungal isolates	16
2.5.2 DNA isolation from fungal mycelium	16
2.5.3 RAPD-PCR analysis	17
2.5.3.1 PCR components and reaction reagents	17
2.5.3.2 Agarose gel preparation and electrophoresis	18