

Suppression of bacterial wilt in *Eucalyptus* and bacterial speck in *Arabidopsis*

Longxian Ran

Op 30 september 2002 promoveerde Longxian Ran aan de Universiteit Utrecht op het proefschrift getiteld 'Suppression of bacterial wilt in *Eucalyptus* and bacterial speck in *Arabidopsis* by fluorescent *Pseudomonas* spp. strains: conditions and mechanisms'. verdedigde. Promotor was Prof. dr ir L.C. van Loon (Universiteit Utrecht), en copromotores waren Dr. P.A.H.M. Bakker (Universiteit Utrecht) en Prof. Wu Guangjin (Central South Forestry College, Zhuzhou, Hunan, P.R. China).

Bacteriële verwelkingziekte van *Eucalyptus*

Bacteriële verwelkingziekte in *Eucalyptus*-bomen, veroorzaakt door *Ralstonia solanacearum*, is sinds de jaren tachtig een ernstig probleem in plantages in Zuid China. Op deze plantages worden vrijwel uitsluitend snelgroeiende soorten en lijnen met een hoge kwaliteit voor de papierproductie geteeld. Tot deze soorten behoren *E. grandis*, *E. urophylla* en hun hybriden, waarvan de meeste zeer vatbaar zijn voor bacteriële verwelking. Bovendien verliezen sommige lijnen hun resistentie bij teelt onder andere klimaatsomstandigheden of neemt de resistentie af tijdens de meer dan drie jaar durende vermeerdering door middel van weefselkweek of stekken. Er bestaan geen effectieve beheersmaatregelen tegen bac-

teriële verwelking in *Eucalyptus*. Met financiële steun van de Stichting voor Wetenschappelijk Onderzoek van de Tropen (WOTRO) en de Natural Science Foundation van China werd een onderzoek geïnitieerd naar mogelijkheden om bacteriële verwelking in *Eucalyptus* te onderdrukken door antagonistische stammen van fluorescerende *Pseudomonas* spp. Deze niet pathogene, wortelbewonende bacteriën kunnen diverse bodemgebonden ziekten onderdrukken. Sommige *Pseudomonas* stammen zijn effectief tegen door schimmels, bacteriën en virussen veroorzaakte ziekten, waarbij verschillende mechanismen, zoals concurrentie om ijzer, productie van antibiotica, of inductie van systemische resistentie (ISR) een rol spelen. Algemeen geaccepteerde voorwaarden voor succesvolle onderdrukking van bodemgebonden ziekten door deze wortelbewonende bacteriën zijn: actieve en langdurige kolonisatie van het worteloppervlak van de plant en effectieve expressie van ziekteonderdrukkende mechanismen.

Onderdrukking van bacteriële verwelking van *Eucalyptus* door antagonistische *Pseudomonas* spp.

In dit onderzoek werd biologische bescherming door verschillende,

goed gekarakteriseerde *Pseudomonas* stammen onderzocht in twee plant - pathogeen systemen. De gebruikte stammen waren *P. putida* WCS358r, *P. fluorescens* WCS374r, WCS417r en CHA0r en *P. aeruginosa* 7NSK2. Het vermogen van deze stammen om bacteriële verwelking in *Eucalyptus* en bacteriële bladvlekkenziekte in *Arabidopsis thaliana*, veroorzaakt door *P. syringae* pv. *tomato* (Pst), te onderdrukken werd vergeleken. Eerst werd nagegaan in hoeverre de bacteriestammen bacteriële verwelking in *Eucalyptus* konden onderdrukken. Vervolgens werd nagegaan of ISR hierbij een rol speelt, door directe interacties tussen de ziekteonderdrukkende en de pathogene bacteriën uit te sluiten in een proefopzet waarbij de twee populaties van micro-organismen ruimtelijk gescheiden blijven. Dezelfde stammen werden daarna in het modelsysteem *Arabidopsis* – Pst bestudeerd om te onderzoeken in hoeverre salicylzuur (SA) productie door deze bacteriën een rol speelt bij ziekteonderdrukking.

In vitro analyse van antagonistische interacties tussen de wortelbewonende pseudomonaden en *R. solanacearum* liet zien dat de stammen WCS358r, WCS374r, WCS417r en 7NSK2 *R. solanacearum* antagoniseren door concurrentie om ijzer, terwijl groeiremming door stam CHA0r gebaseerd is op antibiose. Een mutant van WCS374r die gestoord is in de productie van het ijzerbindende siderofoor pseudobactine, remde

PROMOTIE

groei van *R. solanacearum* nog steeds onder ijzerarme omstandigheden. Dit suggereert dat een tweede siderofoor van WCS374r, pseudomonine, ook in staat is groei van het pathogeen te remmen.

Geen van de geteste stammen was in staat ziekte te onderdrukken wanneer ze samen met het pathogeen door de grond werden gemengd, of wanneer zaden met de bacteriën werden behandeld voordat de zaailingen werden overgeplant in grond, geïnoculeerd met *R. solanacearum*. Onderdrukking van de ziekte werd wel waargenomen bij behandeling van de wortels van zaailingen door dompelen in een bacteriesuspensie voor het overplanten in met het pathogeen besmette grond. Onder deze omstandigheden onderdrukte WCS417r bacteriële verwelking met 30 – 45 %. Behandeling van wortels met *P. putida* stam WCS358r verminderde de ziekte in lichte mate, terwijl een mutant van deze stam die niet langer pseudobactine produceert (PSB⁻) geen enkel effect had. Dit geeft aan dat concurrentie om ijzer door middel van siderofooren een bijdrage levert aan, maar niet voldoende is voor effectieve onderdrukking van bacteriële verwelking in *Eucalyptus*. Een genetisch gemodificeerd derivaat van WCS358r dat in staat is constitutief het antibioticum 2,4-diacetylphloroglucinol te produceren (WCS358::p_hl) onderdrukte de ziekte significant. Een combinatie van WCS417r en WCS358::p_hl verbeterde de ziekteonderdrukking echter niet in vergelijking met de effecten van de enkele stammen. Dit suggereert dat de stammen met elkaar interfereren in het wortelmilieu van de plant. Er werd geen correlatie gevonden tussen het vermogen van de *Pseudomonas* spp. stammen om *in vitro* groei van het pathogeen te remmen en *in vivo* bacteriële verwelking te onderdrukken.



Figuur 1. Bacterieslijm druipt uit een door *Ralstonia solanacearum* geïnfecteerde *Eucalyptus* zaailing.

Betrokkenheid van ISR bij de onderdrukking van bacteriële verwelking

Om de mogelijke betrokkenheid van ISR bij de ziekteonderdrukking te bestuderen, werd een bio-toets ontwikkeld waarin de *Pseudomonas* bacteriën en *R. solanacearum* niet met elkaar in contact konden komen. Omdat SA het plantenhormoon is dat verantwoordelijk is voor inductie van systemische resistentie in diverse plantensoorten, werd ook SA getest in *Eucalyptus*. Toediening van SA aan grond induceerde ISR tegen infectie door het pathogeen van de stengeltop, maar infiltratie van bladeren met een SA-bevatende oplossing niet. Daarentegen waren noch de *Pseudomonas* spp. stammen WCS374r, WCS417r, CHA0r en 7NSK2, die *in vitro* SA kunnen produceren, noch de niet SA producerende stam WCS358r, in staat ISR te induceren indien ze waren toegediend aan de grond. Twee stammen, WCS358r en WCS374r, induceerden wel ISR wanneer ze werden geïnfecteerd in bladeren onder aan de stengel. De

PSB⁻ mutant van WCS358r was niet in staat ISR te induceren. Dit suggereert dat het pseudobactine siderofoor de ISR inducerende determinant van WCS358r is in dit systeem. De ISR inducerende determinant(en) van WCS374r in dit systeem zijn vooralsnog onbekend. Productie van SA lijkt geen rol te spelen, aangezien een PSB⁻ mutant van WCS358r die getransformeerd is met het gencluster uit WCS374r dat synthese van SA bewerkstelligt, alsmede andere SA producerende bacteriestammen, niet in staat bleken resistentie te induceren.

In hoeverre kan SA productie een rol spelen bij door wortelbacteriën geïnduceerde ISR?

Of door bacteriën geproduceerd SA een rol speelt bij inductie van resistentie door de *Pseudomonas* spp. stammen werd onderzocht in het modelsysteem *Arabidopsis*-Pst. In dit systeem werden dezelfde stammen onderzocht als in de combinatie *Eucalyptus*-*R. solanacearum*. De stammen WCS374r,

PROMOTIE

WCS417r, CHA0r en 7NSK2 produceerden SA *in vitro* in standaard succinaat medium (SSM) in hoeveelheden variërend van 5 fg/cel voor WCS417r tot meer dan 25 fg/cel voor WCS374r. Het toevoegen van 200 µM FeCl₃ aan SSM onderdrukte de productie van SA door alle stammen volledig. De incubatietemperatuur had geen effect op de SA productie door WCS417r en 7NSK2. Daarentegen produceerden de stammen WCS374r en CHA0r meer SA wanneer ze bij 33 °C in plaats van bij 28 °C werden gekweekt. De door WCS417r, CHA0r en 7NSK2 geïnduceerde resistentie in *Arabidopsis* leek geassocieerd te zijn met hun vermogen SA te produceren, terwijl dat voor WCS374r niet het geval was. Echter, een mutant van 7NSK2 die geen SA meer kan produceren, was nog steeds in staat ISR te induceren. De betrokkenheid van SA bij ISR kon verder worden onderzocht door gebruik te maken van transgene NahG planten, die niet in staat zijn SA te accumuleren en daardoor het vermogen missen om ISR tot expressie te laten komen. In deze NahG *Arabidopsis* planten induceerden WCS417r, CHA0r en 7NSK2 wel resistentie. Ook WCS374r, mits opgekweekt bij 33 °C of 36 °C, induceerde resistentie in NahG planten, maar deed dit niet in ethyleen-ongevoelige *ein2* of de in de expressie van PR-eiwitten en ISR gestoorde *npr1* mutanten van *Arabidopsis*. Deze resultaten tonen aan dat SA niet de primaire determinant is van de inductie van ISR door deze bacteriestammen in *Arabidopsis*.

Invloed van fenolische zuren op wortelkolonisatie door bacteriën

De invloed van door plantenwortels uitgescheiden fenolische zuren op kolonisatie door *Pseudomonas* bacteriën en inductie van ISR werd eveneens onderzocht. Mutanten van WCS358r die niet in staat zijn specifieke fenolische zuren als substraat te gebruiken, werden met de ouderstam vergeleken met betrekking tot hun vermogen wortels te koloniseren en resistentie te induceren in *Arabidopsis*. In een gnotobiotisch systeem scheiden wortels van *Arabidopsis* een complex mengsel van fenolische verbindingen uit. In dit mengsel werden kleine hoeveelheden *p*-coumaar-, *p*-hydroxybenzoë-, protocatechu- en vanillinezuur geïdentificeerd. Populatiedichtheden van bacteriën van de ouderstam en de mutanten in de voedingsoplossing van het gnotobiotische systeem waren vergelijkbaar. Dit geeft aan dat onder deze omstandigheden fenolische zuren geen beperkende factor zijn voor groei van de bacteriën. Echter, in een potgrondsysteem koloniseerden de mutanten FAI1, FAI15 en VBHB, die gestoord zijn in het gebruik van respectievelijk *p*-coumaar-, vanilline- en *p*-hydroxybenzoëzuur, de wortels van *Arabidopsis* slechter dan de ouderstam. Ondanks de verminderde kolonisatie was het vermogen van de mutanten om resistentie te induceren tegen Pst onaangetast.

Conclusies

De rol van bacteriële determinanten bij de onderdrukking van plantenziekten lijkt afhankelijk te zijn van de plantensoort. Het pseudobactine siderofoor van WCS358r onderdrukt bacteriële verwelking in *Eucalyptus* zowel door concurrentie om ijzer als door inductie van ISR. Voor geen van de *Pseudomonas* stammen lijkt door de bacteriën geproduceerd SA een rol te spelen bij de inductie van ISR, noch in het *E. urophylla-R. solanacearum*, noch in het *Arabidopsis*-Pst systeem. Determinanten van stam WCS374r, die betrokken zijn bij inductie van resistentie in *Eucalyptus*, vergen nader onderzoek. Productie van 2,4-diacetylphloroglucinol door CHA0r en een derivaat van WCS358r, WCS358::p_hl, remde de groei van *R. solanacearum in vitro* sterk en consistent. Echter, alleen stam WCS358::p_hl onderdrukte bacteriële verwelking *in vivo*. De vraag of de stammen het antibioticum daadwerkelijk produceren in het wortelmilieu van *Eucalyptus* dient nader onderzocht te worden.

De in dit onderzoek waargenomen onderdrukking van bacteriële verwelking door specifieke *Pseudomonas* bacteriën via zowel directe interacties tussen de bacterie en het pathogeen als door de bacterie in de plant geïnduceerde ISR, opent mogelijkheden voor effectieve beheersing van de ziekte.