

## **Introductie van genetisch gemodificeerde *Pseudomonas putida* WCS358r in het veld:**

# **Moleculaire analyse van effecten op de microbiële gemeenschappen in de rhizosfeer van tarwe**

M. Viebahn

Op 26 april 2005 promoveerde Mareike Viebahn aan de Universiteit Utrecht op het proefschrift getiteld 'Field release of genetically modified *Pseudomonas putida* WCS358r – Molecular analysis of effects on microbial communities in the rhizosphere of wheat'. Promotor was Prof.dr.ir. L.C. van Loon en co-promotoren waren Dr. P.A.H.M. Bakker (leerstoelgroep Fytopathologie, Universiteit Utrecht) en Dr. E. Smit (Rijksinstituut voor de Volksgezondheid en het Milieu te Bilthoven). Het onderzoek werd gefinancierd door het Ministerie van Volkshuisvesting, Ruimtelijke Ordening en Milieu.

### **Inleiding**

Verschiedende wortelkoloniserende bacteriën van het geslacht *Pseudomonas* vertonen een remmend effect op de groei van schimmels die plantenziekten veroorzaken en zijn mogelijk te gebruiken als biologisch gewasbeschermingsmiddel. Door middel van genetische modificatie kan de ziekteonderdrukkende activiteit van deze bacteriën worden verhoogd, bijvoorbeeld door de expressie van effectieve eigenschappen te versterken of door genen in te brengen die tot expressie van nieuwe activiteiten leiden. Bij grootschalige introductie van zulke genetisch gemodificeerde micro-organismen (GGM's) in het milieu is het waarschijnlijk dat het natuurlijke bodemecosysteem wordt beïnvloed. In eerder door de leerstoelgroep Fytopathologie uitgevoerde veldexperimenten werden effecten van een eenmalige introductie van *Pseudomonas putida* stam

WCS358r en een genetisch gemodificeerd derivaat op de schimmelmicroflora in de rhizosfeer van tarwe bestudeerd. Dit GGM bevat een chromosomale insertie van het PCA biosynthese-gencluster (*phz*) van *Pseudomonas fluorescens* 2-79 en produceert constitutief phenazine-1-carbonzuur (PCA), een verbinding met een breed spectrum van antimicrobiële activiteit. Zowel stam WCS358r als het GGM veroorzaakten een tijdelijke, geringe verandering in de natuurlijke microflora van tarwewortels, waarbij effecten van het GGM verschilden van die van de niet gemodificeerde ouderstam.

### **Doel en aanpak onderzoek**

Aangezien in de praktijk gewasbeschermingsmiddelen herhaaldelijk toegepast worden in hetzelfde veld, was het doel van het huidige

onderzoek na te gaan of een jaarlijks herhaalde introductie van de GGM's de eerder waargenomen verandering in de bodemmicroflora zou versterken. Om vast te stellen in hoeverre de eerder aangetoonde effecten specifiek zijn voor PCA, werd in deze studie een tweede GGM geïntroduceerd dat constitutief de antimicrobiële verbinding 2,4-diacetylfloroglucinol (DAPG) produceert. *P. putida* WCS358r werd gemodificeerd met het *phl* gencluster van *P. fluorescens* Q2-87 door het inbrengen van een minitransposon in het chromosoom, leidend tot constitutieve productie van DAPG. Effecten van de PCA- en DAPG-producerende GGM's op de natuurlijke microflora van de plantenwortels werden vergeleken met effecten van de ouderstam WCS358r en ten opzichte van een niet met bacteriën behandelde controle, elk in zes veldjes van 1 x 1 m<sup>2</sup> (Figuur 1). Om mogelijke synergistische effecten van de PCA en DAPG producerende GGM's te bestuderen, werden de GGM's tevens in combinatie toegepast. Ieder jaar werden dezelfde behandelingen toegepast in dezelfde veldjes. Om effecten van de GGM's te vergelijken met effecten van een gangbare landbouwkundige toepassing zoals wisselteelt, werd in een zesde behandeling in 1999 en 2001 tarwe geteeld, en in 2000 en 2002 aardappel.

PROMOTIE

Het grootste deel van de bodemmicroflora kan niet worden gekweekt op voedingsbodems. Om eventuele veranderingen als gevolg van de introductie van de gemodificeerde bacteriën op zowel de kweekbare als de niet-kweekbare rhizosfeer microflora in kaart te brengen werd daarom gebruik gemaakt van technieken die onafhankelijk zijn van de kweekbaarheid van de micro-organismen. DNA werd direct uit rhizosfeergrond geïsoleerd en met specifieke primers werden schimmel (18S) en bacterieel (16S) ribosomaal (r)DNA met behulp van de polymerase ketting-reactie (PCR) geamplificeerd. De amplicons werden geanalyseerd door middel van 'amplified ribosomal DNA restriction analysis' (ARDRA) of 'denaturing gradient gel electrophoresis' (DGGE), resulterend in fingerprinten van de microflora. Terwijl bij DGGE (Figuur 2) ieder resulterend bandje in principe voor één soort staat, worden met ARDRA per soort meerdere bandjes gegenereerd.



Figuur 1. Het proefveld in de Uithof in Utrecht.

## Effecten op de rhizosfeer microflora

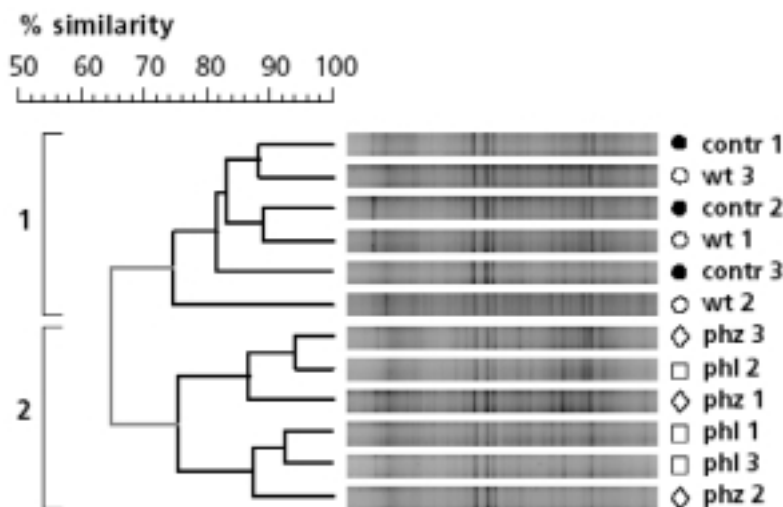
De GGM's werden in het veld geïntroduceerd als een coating op tarwezaden. Na kieming van de zaden groeien de bacteriën met de wortels mee en verspreiden zich over het wortelstelsel. De aantallen cellen van zowel wildtype WCS358r als de GGM's in de rhizosfeer namen ieder jaar in de loop van de tijd af en kwamen aan het eind van het seizoen onder de detectiegrens. De chromosomale insertie van het mini-transposon in de GGM's bleek stabiel. In ieder geval voor het PCA producerende GGM kon productie van de antimicrobiële verbinding in het veld worden aangetoond. Noch de wildtype bacteriën, noch de GGM's hadden een significante invloed op de aantallen van diverse groepen kweekbare schimmels en

bacteriën. Bepaling van de totale (kweekbare en niet-kweekbare) microflora met behulp van ARDRA toonde echter aan dat het DAPG-producerende GGM in 1999 een voorbijgaand effect had op zowel de bacterie- als de schimmelmicroflora. Dit effect bestond uit een verschuiving binnen de microbiële gemeenschap, maar de aard van deze verschuiving kon met de gebruikte techniek niet worden vastgesteld.

Tegen de verwachting in bleek in 2000 na herhaalde introductie geen enkele behandeling meer een aantoonbaar effect te hebben op de rhizosfeermicroflora. Evenmin werden verschillen gevonden tussen de rhizosfeermicroflora van tarwe en van aardappel. Dit laatste was in tegenspraak met studies waarin duidelijke gewasspecificiteit met betrekking tot de rhizosfeermicroflora is aangetoond. Een

verdere analyse van de totale bacteriële microflora van aardappel en van tarwe met DGGE in plaats van met ARDRA liet wel een significant verschil tussen beide gewassen zien. Daarom werden alle monsters ook met DGGE (Figuur 2) geanalyseerd. Hieruit bleek dat in het eerste jaar van introductie (1999) alle bacteriële behandelingen een voorbijgaand effect hadden op de samenstelling van de bacteriële gemeenschap, zonder verschil tussen het wildtype en de GGM's. In alle volgende jaren, na herhaalde introductie, beïnvloedde het DAPG-producerende GGM de bacteriële gemeenschap anders dan het wildtype. Daarentegen had alleen in het laatste jaar het PCA-producerende GGM een ander effect dan het wildtype. In vergelijking met een continueelt van tarwe had gewasrotatie met aardappel een blijvend effect op de samenstelling van de bacteriële ge-

PROMOTIE



Figuur 2. Dendrogram gebaseerd op DGGE van geamplificeerd 16S rDNA geëxtraheerd uit de rhizosfeer van controle planten (contro) en planten behandeld met de niet gemodificeerde stam *Pseudomonas putida* WCS358r (wt), met het phenazine-1-carbonzuur producerende GGM (phz) of met het 2,4-diacetylfloroglucinol producerende GGM (phl). Er zijn twee significant verschillende clusters, één met de controle en de wild-type bacterie behandeling en één met de behandelingen met elk van de GGM's.

meenschap. Tijdens dit meerjarige veldexperiment waren de effecten van de GGM's op de microflora in de rhizosfeer van tarwe nooit groter dan die van de gewasrotatie.

## Analyse van de schimmelgemeenschap

Om effecten van de gewasrotatie op de schimmelgemeenschap in de rhizosfeer te bepalen, kon slechts een ascomycet-specifiek 'primer' paar (ITS5-ITS4A) gebruikt worden. Daarmee werden 'internal transcribed spacer' (ITS) sequenties van rRNA geamplificeerd in totaal-DNA extracten uit rhizosfeergrond. Het geamplificeerde DNA werd geanalyseerd met behulp van DGGE. Individuele banden uit DGGE-gels werden gesequenced en vergeleken met bekende sequenties uit openbare databanken. DGGE-gels van ascomycetengemeenschappen uit veldjes met continu tarwe en de gewasrotatie werden met elkaar vergeleken en gerelateerd aan as-

comyceten die uit het veld geïsoleerd en geïdentificeerd waren. Het effect van de gewasrotatie was groter dan dat van de ruimtelijke heterogeniteit in het veld. Er werden significante verschillen gevonden tussen de ascomycetengemeenschappen in rhizosfeergrond van tarwe in monocultuur en van tarwe na aardappel, hetgeen op een langdurend effect van de teelt van aardappel wijst. De sequenties van de uit DGGE-gels gesneden banden hadden sterke homologie met die van ascomyceten die normaal voorkomen in landbouwgrond. Ascomyceten vormen de grootste groep echte schimmels en omvatten vele belangrijke plantenpathogenen. Verschillende van deze ascomyceten worden ook sterk geremd door antibiotica producerende bacteriën. Daarom werd ook van de behandelingen met het wildtype WCS358r, het PCA- en DAPG-producerende GGM de ascomycetengemeenschap geanalyseerd. In alle jaren hadden noch het wildtype, noch de GGM's effecten op de ascomyceten. In 1999 had echter de combinatie van beide GGM's wel een significant effect. Na herhaalde in-

ductie van de bacteriën in het veld was dit effect niet langer aantoonbaar, noch in 2000, noch in de volgende jaren.

Om individuele schimmelsoorten te identificeren werden kloonbanken gemaakt van monsters uit 1999 en 2000. Sequentieanalyse liet zien dat de meeste aanwezige soorten in lage aantallen voorkwamen in vrijwel alle behandelingen. Echter, in 1999 kwam *Microdochium* relatief vaak voor, terwijl deze soort in de volgende jaren niet meer aantoonbaar was. Anderzijds kwam *Fusarium* in 1999 weinig voor, maar nam deze schimmel toe in 2000. Zowel de DGGE-patronen als de sequentieanalyse lieten zien dat herhaalde introductie van *P. putida* WCS358r geen grote effecten had op de ascomycetengemeenschap in de rhizosfeer van tarwe, dit in tegenstelling tot het blijvende verschil tussen de rhizosfeer van tarwe en aardappel.

## Analyse van effecten op de bacteriegemeenschap

Het introduceren van *P. putida* WCS358r, al dan niet genetisch gemodificeerd, leidt tot verschuivingen binnen de totale bacteriemicroflora. Met behulp van DGGE is het echter niet mogelijk conclusies te trekken met betrekking tot de aard van deze verschuivingen. Gebruik makend van subtractieve hybridisatie en micro-array technologie werd onderzocht of bacteriesoorten kunnen worden geïdentificeerd die specifiek gevoelig zijn voor introductie van de GGM's. Amplicons van bacterieel 16S rDNA uit rhizosfeermonsters werden gelabeld en gehybridiseerd op Affymetrix GeneChips® die 16S rDNA-sequenties bevatten van ongeveer 9000 'operational taxonomic units' (OTUs) die specifieke bacteriesoorten representeren. De met behulp van de Gene-

Chip gedetecteerde bacteriesoorten in de controle- behandeling waren ook allen aanwezig in de behandelingen met de al dan niet gemodificeerde *P. putida* WCS358r. De bacteriële diversiteit leek juist te worden verhoogd door introductie van WCS358r en zelfs nog iets sterker door het DAPG-producerende GGM. Bacterie-specifieke 16S rDNA amplicons van rhizosfeermonsters uit 2002 die behandeld waren met het wildtype of het DAPG-producerende GGM werden ook geanalyseerd door middel van 'suppression subtractive hybridization' (SSH). Deze techniek maakt het mogelijk unieke sequenties te identificeren in één van twee DNA monsters. Met een testsysteem werd aangetoond dat SSH toegepast kan worden op rhizosfeermonsters, aangezien unieke DNA sequenties van geknipt faag X174-DNA gedetecteerd wer-

den na subtractie van een rhizosfeermonster waaraan faag-DNA was toegevoegd en een rhizosfeermonster zonder toevoeging. Wanneer SSH werd toegepast op rhizosfeermonsters die behandeld waren met het wildtype of het DAPG-producerende GGM waren echter geen duidelijke verschillen waarneembaar. Klaarblijkelijk is deze techniek nog niet voldoende geoptimaliseerd om verschuivingen in de microflora van deze monsters aan te tonen of zijn de verschuivingen te klein om te kunnen worden waargenomen.

## Conclusies

Het doel van het in dit proefschrift beschreven onderzoek was te onderzoeken of de introductie van

genetisch gemodificeerde *Pseudomonas* bacteriën veranderingen in de microflora van de rhizosfeer van tarwe tot gevolg heeft en eventuele veranderingen te identificeren. Daartoe werden verschillende technieken toegepast voor het in kaart brengen van zowel de kweekbare als de niet kweekbare microorganismen. Tijdens het vierjarige veldexperiment werden geen grote verschuivingen in de microbiële gemeenschappen waargenomen. In deze studie had herhaalde introductie van genetisch gemodificeerde, antimicrobiële verbindingen producerende *Pseudomonas* bacteriën dus slechts voorbijgaande effecten op de microflora in de bodem. Deze effecten waren klein vergeleken met verschuivingen als gevolg van natuurlijke variatie in bodemeigenschappen en het geteelde gewas.

PROMOTIE