

# Het belang van microbiële diversiteit voor ziektevering in landbouwgronden

P. Garbeva

Op 21 juni 2005 promoveerde Paolina Garbeva aan de Universiteit Leiden op het proefschrift getiteld 'The significance of microbial diversity in Agricultural soil for disease suppressivenss'. Promotoren waren Prof. Dr. J. A. van Veen (Universiteit Leiden) en Prof. Dr. J. D. van Elsas (Rijksuniversiteit Groningen). Het onderzoek werd gefinancierd door NWO en is uitgevoerd op Plant Research International.

den duidelijke verschillen aangetoond in de gemeenschapsstructuur in landbouwsystemen onder verschillend beheer. Grondmonsters uit het permanente grasland en het in akkerland om-

## Inleiding

Het belangrijkste doel van dit onderzoek is meer inzicht te krijgen in de relatie tussen ondergrondse (microbiële) en bovengrondse (plant) diversiteit bij verschillende vormen van agrarisch landgebruik. Hierbij is specifiek gelet op het belang van ondergrondse diversiteit voor suppressiviteit tegen ziektes. Er is een vergelijking gemaakt tussen landbouwsystemen onder verschillend beheer: permanent (soortenrijk) grasland, grasland dat werd omgezet in akkerland, lange termijn akkerland (met gewasrotatie en met monocultuur), en akkerland dat omgezet is in grasland.

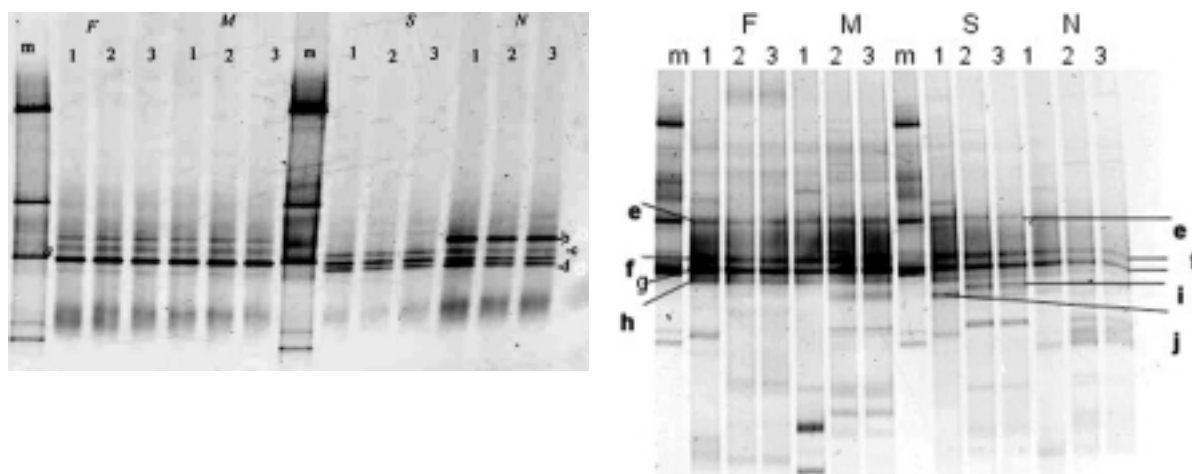
## Moleculaire fingerprinting technieken

Er is een PCR-DGGE systeem ontwikkeld voor specifieke detectie van de gemeenschap van *Bacillus* soorten en hieraan verwante organismen. PCR-DGGE staat voor Polymerase chain reaction - denaturating gradient gel electrophoresis en is een techniek die de samenstelling van een populatie weergeeft (zie Figuur 2). Hiermee wer-



Figuur 1. Veldproeven met verschillende rotaties.

PROMOTIE



Figuur 2. Samenstelling van de *Pseudomonas*-populatie bepaald met PCR-DGGE in akkerbouwgrond (links) en in grasland (rechts). De gronden zijn bemonsterd in februari (F), maart (M), september (S) en november (N).

gezette grasland vertoonden vergelijkbare profielen, terwijl die uit het lange-termijn akkerland en in grasland omgezet akkerland significante verschillen in de PCR-DGGE bandenpatronen vertoonden. Op basis van de Shannon-Weaver indices, berekend uit de PCR-DGGE profielen, werd stelselmatig een hogere diversiteit gevonden in het permanente grasland of grasland omgezet in akkerland, vergeleken met het lange termijn akkerland.

Ook voor de populaties van *Pseudomonas*-bacteriën is een specifiek PCR-gebaseerd detectiesysteem ontwikkeld. Dit toonde verschillen aan in de samenstelling van *Pseudomonas*-gemeenschappen in landbouwsystemen onder verschillend beheer. Zo werd in het permanente grasland een hogere diversiteit aan *Pseudomonas*-populaties aangetoond dan in akkerland. Ook met uitplanten werden verschillen gevonden. Hiertoe werden geïsoleerde pseudomonaden getest op antagonistische eigenschappen tegen de aardappelpathogene schimmel *Rhizoctonia solani* AG3. Een groep pseudomonaden zoals *Pseudomonas* sp. E102 en Sau7, geïsoleerd uit het permanente grasland, bleek sterk antagonistisch te zijn tegen *R. solani*. Deze stammen bleken genen te bezitten die betrokken zijn bij de synthese van

het antibioticum pyrrolnitrine (PRN).

### Detectie van genen in de bodem

Om de aanwezigheid van functies die relevant zijn voor ziekteonderdrukking te onderzoeken, is de kwantiteit en diversiteit van een pyrrolnitrine-biosynthetisch gen in verschillend beheerde landbouwgronden onderzocht. Er werd een detectiemethode toegepast die gebaseerd was op PCR en hybridisatie, om de aanwezigheid van een van de genen van het pyrrolnitrine biosynthetische operon (*prnD*) te kunnen vaststellen. Hieruit bleek dat deze genen het meest voorkwamen in grasland. Daarnaast werd op basis van het *prnD*-gen een *real time*-PCR systeem ontwikkeld, voor de kwantitatieve detectie van PRN-biosynthetische loci. Uit de kwantitatieve data, verkregen van de landbouwgronden, bleek dat *prnD*-genen veel meer voorkwamen in grasland en het in akkerland omgezette grasland. Hier werd ook de hoogste capaciteit tot onderdrukking van *R. solani* AG3 gevonden. Dit duidt op een correlatie tussen PRN-productie en de mate van onderdrukking van *R. solani* AG3. Om de diversiteit van de *prnD*-genen in de verschillende landbouw-

gronden te onderzoeken zijn deze uit de gronden geïsoleerd, geklooneerd en vervolgens geanalyseerd middels RFLP. De genen zijn op basis van de gevonden restrictiepatronen in 5 verschillende groepen ingedeeld. De hoogste diversiteit hiervan werd gevonden in het grasland, de laagste in het akkerland.

### Potproef

In een potexperiment werden vier verschillende gewassen (mais, haver, gerst en gras) gekweekt op grond uit verschillende beheerde landbouwgronden. Het doel was om het effect van plantensoort en voorafgaand landgebruik op de structuur van de microbiële gemeenschap in de rhizosfeer van deze planten te onderzoeken. Er werden duidelijke effecten gevonden van plantensoort én landgebruik op de totale bacteriële gemeenschap, en op de *Pseudomonas* en *Bacillus*-gemeenschappen. Zo werd een hogere diversiteit en dichtheid pseudomonaden gevonden in de rhizosfeer van haver en gerst, vergeleken met mais en gras. Voor *Bacillus*-soorten werd daarentegen hogere diversiteit aangetoond in de rhizosfeer van mais en gras. Zowel plantensoort als het voorafgaand landgebruik beïnvloedden het

PROMOTIE



Figuur 3. Biotests met *Rhizoctonia solani* AG 3 in aardappel om de ziekteverendheid van de grond te bepalen.

voorkomen en de samenstelling van antagonistische bacterie-isolaten tegen het aardappelpathogeen *R. solani* AG3. In het algemeen werden de hoogste percentages antagonisten gevonden in de rhizosfeer van mais en gras, in grond uit het permanente grasland.

### **Effect van gewashistotie en -rotatie**

Gedurende een vierjarig veldexperiment met permanent grasland en lange-termijn akkerland welke waren omgezet in verschillende rotaties zijn regelmatig bodemonsters geanalyseerd. Zowel met uitplaattechnieken als met PCR-DGGE zijn een aantal verschillen in microbiële gemeenschapsstructuur gevonden tussen de behandelingen. In behandelingen met hogere bovengrondse biodiversiteit (zoals in soortenrijk grasland) was de microbiële diversiteit hoger, hoewel dit niet in alle gevallen significant was. Deze bevinding be-

vestigt de hypothese, geformuleerd in dit proefschrift, dat ondergrondse (microbiële) diversiteit positief gecorreleerd is met de bovengrondse diversiteit. Eveneens werd een positieve correlatie gevonden tussen ondergrondse diversiteit en het ziekte-onderdrukkend vermogen van de grond (Figuur 3). Hierin werden duidelijke verschillen gevonden tussen de behandelingen. Permanent grasland en in akkerland omgezet grasland hadden significant hogere niveaus van ziekteonderdrukking dan lange-termijn akkerland. Opvallend was dat in akkerland omgezet grasland, één jaar nadat het als akkerland in gebruik was genomen en beplant was met mais, de hoogste percentages antagonistische bacteriën werden gevonden tegen *R. solani* AG3, en de sterkste antagonisten. Dit betekende dat het gekozen cultuursysteem een belangrijk effect heeft op bodemsuppressiviteit. Waarschijnlijk stimuleerde het omzetten van permanent grasland naar akkerland met mais specifieke microbiële consortia, die effectief zijn tegen *R. solani* AG3. Multivariate statistische analyse van de data

duidde op een positieve correlatie tussen het ziekteonderdrukkend vermogen en microbiële diversiteit. Hierbij bleek het belang van hoge diversiteit van de *Pseudomonas*- en *Bacillus*-populaties die eveneens zeer duidelijk correleerde met het niveau van suppressiviteit tegen *R. solani* AG3.

### **Conclusie**

De resultaten van dit onderzoek tonen aan dat factoren zoals plantensoort, landgebruik en bodembeheer invloed hebben op de microbiële diversiteit van de bodem en belangrijke implicaties hebben voor het ziekteonderdrukkend vermogen van de grond.

Het onderzoek heeft laten zien dat het niveau van bodemsuppressiviteit kan worden gemanipuleerd door de microbiële diversiteit van de bodem te beïnvloeden. Permanent grasland en grasland omgezet in een maisakker stimuleren een hogere microbiële diversiteit en hogere niveaus van ziekteonderdrukkend vermogen tegen *R. solani* AG3, vergeleken met lange termijn akkerland. Juist de twee eerste behandelingen bleken de hoogste dichtheid aan *prnD* genen te bezitten, wat erop duidt dat PRN-producerende organismen mogelijk bijdragen aan de natuurlijke suppressiviteit tegen *R. solani* AG3. Dit werk duidt erop dat de structuur van de microbiële gemeenschappen van de bodem een belangrijke rol speelt bij de onderdrukking van plantenpathogenen. De exacte mechanismen van de versterkte ziekteonderdrukking zijn niet opgehelderd. Begrip van landbouwecosystemen en de invloed van beheersmethoden op verschillende functionele groepen van micro-organismen is de sleutel naar het effectieve landbouwbeleid.