

# De wortelrotpathogeen *Pythium myriotylum* op cocoyam: intraspecificke variabiliteit en biologische bestrijding

Maaïke Perneel

Op 8 december 2006 promoveerde Maaïke Perneel aan de Universiteit Gent op het proefschrift met de titel: 'The root rot pathogen *Pythium myriotylum* on cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott): intraspecific variability and biological control'. Promotor was prof. dr. Monica Höfte van het Laboratorium voor de Fytopathologie, Faculteit Bio-Ingenieurswetenschappen, Universiteit Gent. Het onderzoek werd gefinancierd door de Vlaamse Interuniversitaire Raad (VLIR) en het Instituut voor de Aanmoediging van Innovatie door Wetenschap en Technologie in Vlaanderen (IWT).

## Inleiding

Cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott), een knolgewas uit de *Araceae*-familie, voorziet miljoenen mensen in de tropen en subtropen in hun dagelijkse behoeften aan koolhydraten, proteïnen, vetten en essentiële vitamines. Cocoyam is het tweede belangrijkste voedingsgewas in Kameroen na maniok. Ondanks zijn potentieel om honger en armoede in ontwikkelingslanden te verminderen, is de cocoyam-productie verre van optimaal

door cocoyamwortelrot (Figuur 1). De bodempathogeen verantwoordelijk voor wortelrot werd morfologisch geïdentificeerd als *Pythium myriotylum*. Bestrijding van wortelrot bij cocoyam is moeilijk omdat fungiciden niet volledig effectief zijn en veredelen naar resistente variëteiten moeilijk is omwille van ploïdie-incompatibiliteit tussen resistente en gevoelige cocoyam-cultivars.

Biologische bestrijding met behulp van fluorescerende pseudomonaden zou een alter-

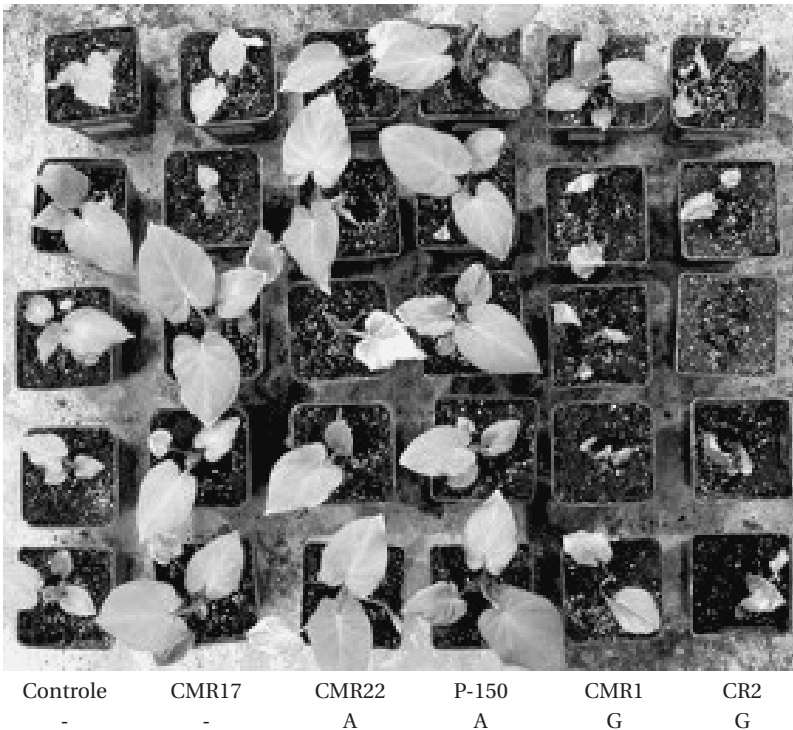
natieve strategie kunnen zijn. Onderzoek toonde reeds aan dat *Pseudomonas aeruginosa* PNA1 een goede antagonist is van *P. myriotylum*. De biologische activiteit van PNA1 werd toegewezen aan de productie van fenazine-antibiotica, maar PNA1 produceert ook nog rhamnolipide-biosurfactants waarvan de rol in de biologische bestrijding van *Pythium* wortelrot op cocoyam nog niet bestudeerd werd. In dit proefschrift werd *P. myriotylum* nader gekarakteriseerd, de rol van secundaire metaboliëten zoals fenazines en biosurfactants onderzocht in de biologische bestrijding van cocoyamwortelrot, en de mogelijkheid van inheemse fluorescerende pseudomonaden als biologische bestrijders nagegaan.

## Intraspecificke variabiliteit

Een vergelijkende studie werd uitgevoerd tussen *P. myriotylum*-isolaten afkomstig van cocoyam en *P. myriotylum*-isolaten van andere waardplanten. Hierbij werd gebruik gemaakt van de optimale groeitemperatuur, isozym patronen, AFLP-analyse, sequencerings van rDNA-ITS en virulentie voor cocoyam. *P. myriotylum*-isola-



Figuur 1. Gezond (links) en aangetast (rechts) cocoyamveld in Kameroen



Figuur 2. Pathogeniteit van verschillende *Pythium myriotylum*-isolaten voor cocoyam. Alleen *P. myriotylum*-isolaten die een guanine (G) en geen adenine (A) op positie 824 in de ITS2-regio hebben, zijn virulent voor cocoyam.

ten van cocoyam hadden een optimale groeitemperatuur van ongeveer 28°C, terwijl de typische *P. myriotylum*-isolaten een optimum groeitemperatuur van 37°C vertoonden. Esterase- en AFLP-analyses lieten toe de cocoyamisolaten ondubbelzinnig te onderscheiden van de overige *P. myriotylum*-isolaten. Uit sequentieanalyse bleek dat de ITS regio van cocoyamisolaten 99,1 tot 99,7% homogeen is met de ITS-regio van typische *P. myriotylum*-stammen. Aligering van de ITS-regio's toonden echter een opmerkelijke basepaarmutatie aan op positie 824 van adenine in de typische *P. myriotylum*-isolaten naar guanine in isolaten die pathogeen zijn voor cocoyam. Plantexperimenten toonden aan dat alleen isolaten met een guanine-basepaarmutatie in staat zijn cocoyamplanten te infecteren (Figuur 2).

### Biologische bestrijding van *Pythium myriotylum*

In een tweede fase van het onderzoek werd de rol van fenazines en rhamnolipiden, geproduceerd door *P. aeruginosa* PNA1, onderzocht in de biologische bestrijding van cocoyamwortelrot. Een rhamnolipide-deficiënte mutant PNA1-RhlB (rhamnolipiden<sup>-</sup>; fenazines<sup>+</sup>) en een fenazine-deficiënte mutant FM29 (rhamnolipiden<sup>+</sup>; fenazines<sup>-</sup>) werden ofwel samen of apart getest in plantexperimenten. Wanneer de mutanten alleen in de grond werden geïnoculeerd, werd er geen ziekteonderdrukkend effect waargenomen, hoewel beide mutanten nog één van de antifungale metabolieten produceerde (fenazines of rhamnolipiden). Wanneer echter de mutanten samen in de grond werden geïnoculeerd, werd een significant ziekteonder-

drukkend effect waargenomen dat vergelijkbaar was met het effect van PNA1. *In vitro* testen toonden aan dat een combinatie van fenazines en rhamnolipiden significant meer *P. myriotylum*-myceliumgroei remde dan wanneer de metabolieten alleen werden getest. Dit impliceert dat fenazines en rhamnolipiden geproduceerd door *P. aeruginosa* PNA1 synergistisch interageren in de biologische bestrijding van *P. myriotylum*. Fenazines bleken bovendien ook met synthetische surfactants synergistisch te interageren. Deze belangrijke observatie opent nieuwe perspectieven voor de formulering van biofungiciden.

### Isolatie en karakterisatie van inheemse antagonistische bacteriën

De implementatie van *P. aeruginosa* PNA1 als biologische bestrijder is controversieel omdat deze stam mogelijk een opportunistisch menselijk pathogeen kan zijn. Daarom werd in een laatste fase van het onderzoek op zoek gegaan naar alternatieve pseudomonaden die zowel biosurfactants als fenazines produceren en die PNA1 kunnen vervangen in de biologische bestrijding van cocoyamwortelrot. Veertig fluorescerende pseudomonaden werden geïsoleerd uit de rhizosfeer van gezonde witte en rode cocoyamplanten. *P. myriotylum*-antagonisten konden enkel uit de rhizosfeer van rode cocoyam geïsoleerd worden. We vermoeden dat rode cocoyam specifieke groepen van natuurlijk voorkomende antagonistische micro-organismen stimuleert door de fenolische componenten in zijn wortel-exsudaten. Profilerings op basis van proteïnepatronen toonde

PROMOTIES



# PROMOTIES

aan dat de antagonistische geïsoleerde pseudomonaden zeer verschillend zijn van de overige geïsoleerde pseudomonaden. BOX-PCR op alle antagonisten en sequenering van het 16S rDNA van representatieve stammen toonden aan dat de antagonistische isolaten onderling zeer homoloog zijn en dat ze bovendien verschillend zijn van andere reeds beschreven *Pseudomonas*-stammen. Deze resultaten suggereren dat isolaten van deze groep waarschijnlijk een nieuw *Pseudomonas*-soort vertegenwoordigen. Van de acht geïsoleerde antagonisten werden *Pseudomonas* CMR5c en CMR12a geselecteerd omwille van hun gecombineerde productie van fenazines en biosurfactants. Beide stammen bleken bovendien waterstofcyanide (HCN) en exoproteases te produceren. Daarnaast bleek CMR5c ook nog pyrrolnitrine

en pyoluteorine te produceren. Beide stammen bleken een uitstekende biologische activiteit *in vivo* te vertonen tegen de cocoyamwortelrotverwekker *P. myriotylum*.

### Conclusies en vooruitblik

Deze studie heeft moleculaire bewijzen geleverd dat *P. myriotylum*-isolaten van cocoyam genetisch verschillend zijn van *P. myriotylum*-isolaten van andere waardplanten. Omdat de isolaten van cocoyam een zekere graad van adaptatie aan de waardplant ondergaan hebben, stellen we voor om de isolaten van cocoyam *P. myriotylum* var. *aracearum* te noemen om ze te onderscheiden van de overige *P. myriotylum*-isolaten. Verder hebben we aangetoond dat fenazines en biosurfactants, geproduceerd door plant-geas-

socieerde pseudomonaden, in synergie werken in de biologische bestrijding van *Pythium*-geïnduceerde bodemziektes. Deze belangrijke bevinding maakt het mogelijk om meer efficiënt te gaan screenen op biologische bestrijders en meer effectief biofungiciden te gaan formuleren. Tenslotte hebben we aangetoond dat de rhizosfeer van rode cocoyam bewoond wordt door natuurlijke antagonisten van *P. myriotylum*. Isolatie en karakterisering van deze antagonistische isolaten leidde tot de selectie van *Pseudomonas* CMR5c en CMR12a. Beide stammen blijken een arsenaal aan antagonistische metabolieten te produceren en hebben potentieel om belangrijke biologische bestrijders te worden in de strijd tegen diverse bodemgebonden ziekten.

