

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/20732> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Natalia V. Malfanova

Title: Endophytic bacteria with plant growth promoting and biocontrol abilities

Issue Date: 2013-04-10

Summary

In **Chapter 1** I give a brief introduction to the topic of my Ph.D. thesis and its main aims. Since global food insecurity is one of the major problems faced by humanity, there is a necessity to increase plant productivity. For this, biofungicides and biofertilizers present an ecologically friendly alternative to their chemical counterparts. Among these bioinoculants, endophytic bacteria with plant growth promotion and biocontrol abilities are the most promising candidates due to their ability to colonize the plant's interior and establish a stable, long-lasting relationship with a plant.

In **Chapter 2** I give a detailed overview of endophytic bacteria and their interactions with plants. According to the current knowledge, more than 200 different bacterial genera from 16 phyla can be found as endophytes, with Actinobacteria, Firmicutes and Proteobacteria being the best studied phylogenetic groups. They colonize virtually all plants and plant organs and can enter a plant through the root zone, phyllosphere and antosphere, or can be vertically transmitted from one generation to another. For successful rhizosphere colonization and subsequent endophytic establishment, bacteria have to possess a number of "competence" traits, such as expression of surface components (e.g. pili, LPS, EPS) as well as production of cell-wall degrading enzymes and the ability to utilize certain plant compounds. Inside a plant, endophytic bacteria can positively influence plant growth through providing plants with N and/or modulating the phytohormone level. Some endophytes protect plants from pathogens via ISR or, most likely, by using a combination of different biocontrol mechanisms. Analysis of the 13 sequenced endophytic genomes revealed the existence of additional traits which are possibly involved in endophytic colonization and in beneficial interactions with a plant.

In **Chapter 3** we describe different plant growth promoting microbes and their modes of beneficial action. For example, Arbuscular Mycorrhizal Fungi and *Trichoderma* have a general growth promoting effect on plants through a variety of mechanisms. Other microbes, e.g. *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia* etc. have a more specific effect by providing a plant with certain nutrients (e.g. N, P and Fe^{3+}). The well-recognized mechanisms mediated by these bacteria include biological nitrogen fixation, phosphate solubilization and siderophore production. The third class of beneficial

microbes includes microbial plant growth regulators which secrete hormones (e.g. auxins, cytokinins, gibberellins, etc.) or hormone-like substances (e.g. volatiles, *N*-Acyl Homoserine Lactones) which stimulate plant growth in extremely low concentrations.

In **Chapter 4** we describe different mechanisms of disease control by microbes. The majority of plant-associated bacteria produce various antifungal metabolites (e.g. c-LPs of *Bacillus* spp.) which can play a role in antibiosis and ISR. In addition to antifungal metabolites, ISR can also be triggered by bacterial molecules and organelles such as flagella, LPS, siderophores etc. Some beneficial bacteria are capable of signal interference with a pathogen by production of AHL-lactonases and AHL-acylases, which destroy AHLs which are required for the expression of pathogenicity factors. Moreover, biocontrol bacteria can interfere with activity, survival, multiplication, germination, sporulation and spreading of a pathogen. Other biocontrol mechanisms include CNN, predation and parasitisms and competition for Fe³⁺.

In **Chapter 5** I describe the isolation and partial characterization of the novel biocontrol and plant-growth promoting endophytic bacterium *Bacillus subtilis* HC8 from giant hogweed. This strain exhibits a high number of plant-beneficial traits including *in vitro* production of the phytohormone gibberellin, of cyclic lipopeptide antibiotics and fungal cell-wall degrading enzymes. When applied to seeds, *B. subtilis* HC8 is able to stimulate plant growth and suppress TFRR. Moreover, this strain has the ability to express its beneficial effect on different plant hosts which is an important prerequisite of an efficient bio-inoculant agent.

In **Chapter 6** I describe the identification of the lipopeptide antibiotics produced by *B. subtilis* HC8 and evaluation of their antifungal effect against *Forl in vitro*. We showed for the first time that an endophytic *B. subtilis* is able to produce all three major families of lipopeptides with a remarkably wide range of different homologues. Among them, fengycins are the most potent lipopeptides with regard to their fungicidal activity. We expect that the wide range of different homologues strongly contributes to the excellent disease control properties of the strain. Surprisingly, we did not find any synergism between different groups of lipopeptide antibiotics in contrast to some claims in the literature.

In **Chapter 7** I describe novel biocontrol endophytic *Pseudomonas* spp. isolated from cucumber plants. The selected biocontrol strains do not exhibit any of the potential plant-beneficial traits *in vitro*. Nevertheless, when applied to seeds, they were able to significantly suppress TFRR caused by *Forl* in a growth substrate-dependent way. Perhaps most interesting is the observation that utilization of L-arabinose by endophytic pseudomonads might be important for their endophytic lifestyle in the cucumber plants.

In **Chapter 8** I discuss the major findings of this thesis and included some unpublished results. For example, I showed that *B. subtilis* HC8 and *Rahnella aquatilis* HC2 from giant hogweed as well as *P. fluorescens* CR2 and *P. putida* CR3 from cucumber not only reduce stress of cereal plants caused by salinity and heavy metals, but have a stimulatory effect on plant growth as well. I also presented strong evidence of endophytic colonization of tomato plants when the biocontrol strain *P. fluorescens* CS1 was applied.

Samenvatting

In **Hoofdstuk 1** presenteer ik een korte inleiding over het onderwerp van mijn proefschrift evenals de belangrijkste doelstellingen. Omdat de behoefte aan voedsel in de wereld sterk zal toenemen is het nodig de productiviteit van gewassen te vergroten. Daarvoor zijn biologische antischimmel middelen en biologische meststoffen ecologisch vriendelijke alternatieven voor chemische producten. Onder deze biologische middelen zijn endofytische bacteriën met ziekteonderdrukkende en/of groeibevorderende eigenschappen de meest belovende kandidaten omdat ze zich binnenin de plant vestigen om daar een stabiele, langdurende relatie met de plant op te bouwen.

In **Hoofdstuk 2** presenteer ik (met enkele co-auteurs) een gedetailleerd overzicht over endofytische bacteriën en hun interacties met planten. Volgens onze huidige kennis worden meer dan 200 verschillende bacteriële genera van 16 phyla gevonden als endofyten met Actinobacteria, Firmicutes en Proteobacteria als de best bestudeerde fylogenetische groepen. Ze koloniseren bijna alle planten en plantenorganen en zijn in

staat de plant binnen te gaan via de wortelzone, de fylosfeer en de antosfeer, of ze kunnen verticaal worden doorgegeven van de ene generatie naar de andere. Voor succesvolle kolonisatie van de rhizosfeer en de daaropvolgende vestiging als endofyt, dienen bacteriën over een aantal competenties te beschikken, zoals expressie van oppervlaktecomponenten (bv. pili, lipopolysaccharide, exopolysaccharide etc.) alsmede de productie van schimmelcelwand-afbrekende enzymen en het vermogen bepaalde planten bestanddelen te gebruiken als voedsel. Binnenin de plant kunnen endofytische bacteriën een positieve invloed hebben op de groei van de plant door deze te voorzien van stikstof of door het nivo van hun hormonen te veranderen. Sommige endofyten beschermen de plant tegen ziekteverwekkers via ISR (induced systemic resistance) of (vaker) door een combinatie van verschillende mechanismen. Analyse van dertien genomen van endofyten liet het bestaan zien van nóg meer eigenschappen die mogelijk betrokken zijn bij endofytische kolonisatie en van hun gunstige interacties met de plant.

In **Hoofdstuk 3** beschrijven mijn co-auteurs en ik verschillende plantengroeibevorderende bacteriën alsmede de manier waarop ze hun gunstige werking uitvoeren. AMF (Arbuscular Mycorrhizal Fungi) en *Trichoderma* vertonen bijvoorbeeld een algemeen groeibevorderend effect op planten via een aantal verschillende mechanismen. Andere micro-organismen zoals bv. *Bacillus*, *Pseudomonas* en *Serratia* hebben een meer specifiek effect door de plant van bepaalde voedingsstoffen te voorzien (bv. N, P en Fe^{3+}). De bekende mechanismen die door deze bacteriën worden gebruikt zijn o.a. biologische stikstoffixatie, fosfaat oplossen en productie van sideroforen. De derde groep van gunstige micro-organismen zijn de microbiële plantengroeibevorderaars die hormonen (bv. auxines, cytokinines, gibberellines, etc) of hormoonachtige stoffen (bv. vluchtige organische stoffen en AHLs (*N*-acyl homoserine lactones) uitscheiden die de plantengroei in extreem lage concentraties stimuleren.

In **Hoofdstuk 4** beschrijven mijn co-auteurs en ik verschillende mechanismen van ziekte beheersing door micro-organismen. De meerderheid van de plant-geassocieerde bacteriën produceert verschillende anti-schimmel metabolieten (bv. c-LPn (cyclische lipopeptiden) van *Bacillus* spp.) die een rol kunnen spelen bij antibiose en/of ISR. ISR kan worden veroorzaakt door anti-schimmel metabolieten en door bacteriële organellen en moleculen zoals flagellen, LPS en sideroforen. Sommige gunstige

bacteriën veroorzaken “signal interference” door productie van AHL-lactonases en/of AHL-acylases die AHLs inactiveren. AHLs zijn noodzakelijk voor de productie van vele pathogeniteitsfactoren. Ziekteonderdrukkende bacteriën kunnen ook interfereren met activiteit, overleving, vermeerdering, kieming, sporulatie en verspreiding van een pathogeen. Andere biocontrole mechanismen zijn CNN (competition for nutrients and niches), predatie en parasitisme, en competitie voor Fe^{3+} .

In **Hoofdstuk 5** beschrijf ik de isolatie en gedeeltelijke karakterisatie van de unieke biocontrole en plantengroeistimulerende bacterie *Bacillus subtilis* HC8, geïsoleerd uit de plant *Heracleum sosnowskyi* Manden. Deze stam heeft een groot aantal voor de plant gunstige eigenschappen zoals de productie van het hormoon gibberelline, van c-LP antibiotica en van schimmelcelwand afbrekende enzymen. Na op zaad te zijn aangebracht is *B. subtilis* HC8 in staat plantengroei te bevorderen en de ziekte TFRR (tomato foot and root rot) te reduceren. Bovendien kan deze stam haar gunstige effect tot expressie brengen op diverse waardplanten, hetgeen een belangrijke eigenschap is voor een commercieel efficiënt product.

In **Hoofdstuk 6** beschrijf ik de identificatie van de c-LP antibiotica van *B. subtilis* HC8 en de evaluatie van hun antischimmel werking tegen *Forl in vitro*. We toonden aan dat *B. subtilis* HC8 het eerste voorbeeld is van een endofytische *Bacillus* die alle drie belangrijke families van c-LPs produceert en dat tevens doet met een opvallend breed scala aan verschillende analogen van elk van deze drie families. Onder deze c-LPn zijn de fengicines de meest potente antischimmel agentia. We verwachten dat het brede scala aan verschillende analogen sterk bijdraagt aan de voortreffelijke ziekteonderdrukkende eigenschappen van deze stam. Tot onze verbazing vonden we geen synergie tussen de verschillende groepen c-LP antibiotica, in tegenstelling tot sommige claims daarover in de literatuur .

In **Hoofdstuk 7** beschrijf ik nieuwe endofytische *Pseudomonas* soorten geïsoleerd uit komkommerplanten. *In vitro* experimenten met de geselecteerde *Pseudomonas* biocontrole stammen leverden geen aanwijzingen voor potentiële voor de plant gunstige eigenschappen. Desondanks zijn ze in staat om, na coaten op zaad, de door *Forl* veroorzaakte ziekte TFRR significant te onderdrukken, op een substraatafhankelijke wijze. De mogelijk meest interessante waarneming is dat het

vermogen van endofytische pseudomonaden om L-arabinose als koolstofbron te gebruiken belangrijk zou kunnen zijn voor de endofytische levenswijze in komkommer.

In **Hoofdstuk 8** bediscussieer ik de belangrijkste resultaten uit dit proefschrift en beschrijf ik sommige recentere resultaten. Ik laat bv. zien dat zowel *B. subtilis* HC8 en *Rahnella aquatilis* HC2 van *Heracleum sosnowskyi* Manden als *P. fluorescens* CR2 en *P. putida* CR3 van komkommerplanten niet alleen de door zout en zware metalen veroorzaakte stress bij granen verminderen, maar de groei van de plant ook nog stimuleren. Tenslotte beschrijf ik sterke aanwijzingen voor endofytische kolonisatie van tomaat door de biocontrolestam *P. fluorescens* CS1.