Universiteit Leiden
The Netherlands

Biocontrol of tomato foot and root rot by Pseudomonas bacteria in stonewool

Validov, S.

Citation
Validov, S. (2007, December 6). *Biocontrol of tomato foot and root rot by Pseudomonas bacteria in stonewool*. Retrieved from https://hdl.handle.net/1887/12480

Version:	Corrected Publisher's Version
License:	Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden
Downloaded from:	https://hdl.handle.net/1887/12480

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Nederlandse samenvatting

Samenvatting

Inleiding en doelstelling

De grootste bedreiging voor de productie van planten is infectie met ziekteverwekkende schimmels. Veel schimmels kunnen worden bestreden met chemische pesticiden. Politiek en publieke opinie hebben zich tegen deze bestrijdingswijze gekeerd.

Recent is een aantal microbiologische producten ontwikkeld om infectie met schimmels te voorkomen of de infectie te bestrijden. Dit is een vorm van biologische controle. In ons laboratorium richten we ons op biocontrole-bacteriën die actief zijn tegen schimmels die het wortelstelsel aanvallen. Meer precies, we gebruiken als model de ziekte tomaten-voet-en-wortelrot (in het Engels tomato foot and root rot, TFRR), die wordt veroorzaakt door de bodemschimmel *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersoci* (*Forl)*. We proberen de mechanismen te ontrafelen die bacteriën gebruiken om *Forl* te bestrijden. Bovendien proberen we nieuwe biocontrole-bacterien te isoleren.

Mechanismen van biocontrole

Toen dit door STW gesteunde onderzoek begon waren vooral de volgende mechanismen bekend.

1. Antibiose. Hierbij produceert de bacterie een antibioticum dat actief is tegen de schimmel. Voorwaarde voor effectieve bestrijding is dat de bacterie het wortelstelsel van de plant goed koloniseert. In dat geval wordt het antibioticum overal op de wortel geproduceerd en is de bescherming tegen de schimmel succesvol.

2. Inductie van Systemische Resistentie (ISR). Sommige bacteriën produceren stoffen die de plant aanzetten tot een snellere reactie op infectie met schimmels.

3. Predatie en parasitisme. Hierbij maakt de biologische bestrijder enzymen die de celwand van de pathogene schimmel afbreken. Het best bekende voorbeeld is

de biocontrole-schimmel *Trichoderma*. Bij bacteriën is dit mechanisme voor bepaalde *Serratia* stammen voorgesteld.

Hoe worden biocontrole bacteriën geisoleerd?

Het vinden van biocontrole-microben is een arbeidsintensieve zaak. Het minst moeilijk is nog het vinden van stammen die werken via antibiose. Zulke bacteriën kunnen op een plaat met vast groeimedium worden getest op de productie van stoffen die de groei van de pathogene schimmel, die op dezelfde plaat wordt aangebracht, remmen. Sommige van de positieve bacteriestammen blijken ook te werken als ze op zaad of plant worden aangebracht. Op deze wijze is een aantal biocontrole-stammen geisoleerd, vooral *Pseudomonas* en *Bacillus* soorten. Een voorbeeld is de in ons laboratorium geisoleerde bacterie *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391, die actief is tegen TFRR. Een groot nadeel bij toepassing van antibioticum-producerende bacteriën is echter dat het bij de registratie als product moeilijk is om bacteriën, die antibiotica in het milieu uitscheiden, voor toepassing goedgekeurd te krijgen.

Men zou verwachten dat, via eenzelfde voor-screening als werd gebruikt bij bacteriën die werken via de productie van antibiotica, bacteriën te isoleren zijn die werken via predatie en parasitisme. Dit is echter nooit gerapporteerd in de vakliteratuur.

Het vinden van stammen die werken via ISR kan alleen gedaan worden via het testen van grote aantallen bacterien in een biocontrole test. Aangezien de kansen laag zijn en de test arbeids-intensief, is dit een vrijwel onmogelijke taak. In ons laboratorium is lang gewerkt met de stam *Pseudomonas fluorescens* WCS365, die het wortelstelsel van veel planten voortreffelijk koloniseert. De stam functioneerde dan ook als model-stam om het mechanisme van kolonisatie te bestuderen. Tot onze grote verbazing bleek echter dat de stam niet werkte via het tot dan toe hypothetische mechanisme "competitie voor voedingsstoffen en plekken op de wortel" (in het Engels "competition for nutrients and niches; CNN"), maar via ISR. Geluk komt ook in de wetenschap voor. De stam werkt zeer goed tegen TFRR.

Bestaat het mechanisme "Competitie voor Nutrienten en Niches" (CNN)?

Tijdens het bestuderen van wortelkolonisatie was in ons lab in de jaren negentig van de vorige eeuw een systeem ontwikkeld om het competitief koloniserend vermogen van bacteriën ten opzichte van elkaar te meten. In ons STW project LBI.5884 werd besloten daarmee de hypothese te testen dat het mechanisme "competitie voor voedingsstoffen en plekken op de wortel" bestaat. Voor dit mechanisme was nooit een overtuigend bewijs geleverd. Een mengsel van (honderd)duizenden wortelbacteriën werd door ons in een simpele test aan de competitie om de wortel onderworpen en de beste koloniseerders werden op biocontrole van TFRR getest. Het resultaat was zeer positief: een groot deel van de geteste bacteriën bleek actief te zijn tegen TFRR. De meeste van deze bacteriën produceren geen antibiotica wat voordelig is in geval van registratie als product. (Hoofdstukken 2 en 3).

In eerste instantie werd biocontrole van TFRR getest in grond, een klassiek substraat voor de productie van tomaat (hoofdstuk 2). Moderne, hoog-productieve tomatenproductie vindt echte plaats op steenwol-substraat. Zo worden in Nederland alle tomaten op steenwol gekweekt en in Spanje 40%. Daarom werd de door ons ontwikkelde techniek ook op steenwol toegepast, eveneens met succes (hoofdstuk 3). We zijn er dus als eerste in geslaagd biocontrole bacteriën op te hopen.

Als "proof of priciple "werd getest of onze veronderstelling, dat de isolaten werken via "competitie voor voedingsstoffen en plekken op de wortel", klopt. Dit leek het geval te zijn voor stam *P. fluorescens* PCL1751 als tomaat werd gekweekt in grond (hoofdstuk 2). Het werkingsmechanisme werd in groter detail bestudeerd voor de stam *P. putida* PCL1760 voor tomatenproductie op steenwol (hoofdstuk 4). Competitie voor nutrienten als mechanisme werd duidelijk bewezen: de biocontrole-stam consumeerde het enige beschikbare voedsel, tomaten wortel-exudaat (dit is een soort zweet dat de wortel uitscheidt), veel efficiënter dan *Forl*: de bacterie verhinderde zelfs de groei van *Forl* compleet. Een bewegingsloze mutant, die de wortel (de niche) niet kan koloniseren, vertoonde geen biocontrole in grond.

Daarmee is bewezen dat competitie voor de wortel-niche een essentieele rol speelt in de biocontrole van TFRR door stam PCL1760.

Tot onze verbazing konden we in steenwol niet bewijzen dat competitie voor een plaats op de wortel een rol speelde in de controle van TFRR. Daartoe werd dezelfde bewegingsloze mutant gebruikt. In steenwol bleek dat deze mutant significante bescherming gaf. Toen we controleerden of de bacterie de wortel koloniseerde, hetgeen niet werd verwacht voor een bewegingsloze mutant, bleek dat de mutant de wortel net zo effectief als de ouder had gekoloniseerd. Als mogelijke verklaring werd bedacht dat steenwol de biocontrole bacterie vasthoudt waardoor de in steenwol groeiende wortel continu in contact met de bacterie blijft. Uit onze testen bleek vervolgens dat toevoegen van onze bacterie aan steenwol, zoals voor biocontrole wordt gedaan, ertoe leidt dat de steenwol meer dan 95% van de bacteriën bindt. Het lijkt er dus op dat steenwol sterk bijdraagt aan wortelkolonisatie en dat in steenwol beweeglijkheid van de bacterie niet zo belangrijk is. Wortelkolonisatie zal waarschijnlijk ook in steenwol essentieel zijn voor biocontrole maar de bewegingsloze mutant is geen goed hulpmiddel om dat te testen.

Diversiteit van Fusarium stammen en monitoring van infectie met pathogenen

Fusarium komt erg algemeen voor, niet alleen als ziekteverwekker maar ook als ongevaarlijke of zelfs als voor de mens gunstige schimmel. In dit onderzoek werden 33 stammen bestudeerd afkomstig van diverse planten en al of niet als ziekteverwekker geisoleerd. Om infectie met een pathogene *Forl* snel te kunnen detecteren werd in eerste instantie getracht een DNA fragment te vinden dat uniek is voor alle tomaten-pathogenen en dat niet voorkomt in andere pathogenen en ook niet in niet-pathogenen. Verwacht werd dat we zo'n fragment konden vinden in de zgn. intergenic spacer region (ISR). Dit bleek echter niet het geval. Wel werd een *Fox* –specifiek fragment gevonden (hoofdstuk 5). Daarmee werd gekeken of misschien de hoeveelheid *Fox* DNA in de tomatenplant een maat voor infectie met tomaatpathogenen kon zijn. Tot onze verrassing werd gevonden dat alle 33

teststammen zowel tomaat als komkommer binnendringen. Tomatenpathogenen bleken echter te onderscheiden van de andere stammen omdat de laatsten al vroeg na infectie van de plant stoppen met hun groei in de plant. We concludeerden dat, zodra de hoeveelheid *Fox* DNA in de plant groter is dan 50 fg per ng totaal planten DNA (d.w.z. meer dan 0.005%), gesproken kan worden van infectie met een tomatenpathogeen. Zo kan dus infectie van tomaat met een tomatenpathogeen toch snel worden ontdekt (hoofdstuk 6).

Kan Pseudomonas TFRR ook onder praktijkomstandigheden bestrijden?

Hoewel we uitgebreid hebben laten zien dat ons isolaat *P. putida* PLC1760 in een laboratoriumkas prima TFRR kan bestrijden (significant succes in zeven van de acht uitgevoerde tests) , zijn praktijkmensen pas te overtuigen als dit ook onder praktijkomstandigheden, en uitgevoerd door derden, het geval is. Daartoe werd door het gecertificeerde, dus onafhankelijke, instituut PPO in Bleiswijk een proef uitgevoerd waarbij tomaten van het cultivar Carmello in steenwol werden besmet met sporen van de ziekteverwekker *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* ZUM2407. Om effectiviteit van biocontrole te testen werd een deel van de planten tevens beent met onze *P. putida* PCL1760 of van het commercieel verkrijgbare biofungicide Mycostop®Biofungicide, dat wordt aanbevolen voor toepassing tegen o.a. *Fusarium* in kassen. Eenendertig dagen na infectie bleek onze *Pseudomonas* de ziekte significant en overtuigend te hebben beperkt terwijl het commercieel verkrijgbare product niet bleek te werken. Uit deze resultaten kunnen we concluderen dat *P. putida* PL1760 een aantrekkelijke kandidaat is voor de industrieele toepassing tegen *Fusarium* in kassen waarin tomaat wordt gekweekt. Gezien het werkingsmechanisme van de stam, CNN, is het waarschijnlijk dat PCL 1760 ook tegen andere wortelziekten van tomaat kan worden ingezet. Bovendien, aangezien de exudaatsamenstelling van bv. komkommer en paprika sterk op die van tomaat lijkt, is het waarschijnlijk dat PCL 1760 ook wortelpathogenen van andere groentegewassen kan bestrijden.