



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Impact of plant hormones on growth and development of Actinobacteria

Meij, A. van der

Citation

Meij, A. van der. (2020, September 16). *Impact of plant hormones on growth and development of Actinobacteria*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/136530>

Version: 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/1887/136530>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/136530> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Meij, A. van der

Title: Impact of plant hormones on growth and development of Actinobacteria

Issue date: 2020-09-16

Nederlandse samenvatting

Ook al zie je ze niet met het blote oog, planten zijn vergeven van microben. Planten maken veel suikers en aminozuren die een aantrekkelijke voedselbron vormen voor allerlei schimmels en bacteriën. Dit is de reden dat veel microben de plant als hun thuis kiezen. De microben kun je onder- en bovengronds op de plant vinden en soms zelfs in de plant. In de laatste jaren is er veel onderzoek gedaan naar welke soorten microben er allemaal in en op de plant voorkomen en welke effecten ze hebben op plantengroei en plantgezondheid. Door deze zogeheten microbiom studies weten we dat actinomyceten regelmatig in en op de plantenwortels te vinden zijn. Actinomyceten zijn meercellige bacteriën die we als wetenschappers al lange tijd bestuderen. Deze bacteriën kunnen namelijk heel veel verschillende antibiotica en andere moleculen met medicinale werking maken. De effecten die actinomyceten op planten kunnen hebben variëren. Verschillende onderzoeken laten zien dat actinomyceten de groei van plantpathogenen¹ tegen gaan. Waarschijnlijk kunnen de actinomyceten dit omdat ze zo goed zijn in het maken van antibiotica en daarmee zichzelf maar ook de plant beschermen. Op deze manier creëren actinomyceten een goede leefomgeving voor henzelf. Daarnaast kunnen actinomyceten plantengroei stimuleren door bijvoorbeeld stikstof beschikbaar te maken voor de plant en plantenhormonen te produceren. Actinomyceten kunnen dus grote effecten hebben op de groei en gezondheid van planten.

Streptomyces: een plantenliefhebber

Als we de actinomyceten onder de loep nemen, zien we dat het genus *Streptomyces* vaak in en rondom planten gevonden wordt. *Streptomyces* bacteriën zijn ware fabrieken van antibiotica en andere bioactieve natuurstoffen die al tientallen jaren onderzocht worden. Maar als het gaat om hun relatie met planten, weten we relatief weinig. We snappen bijvoorbeeld

¹ plantpathogenen zijn organismen die ziekten veroorzaken bij planten.

niet hoe ze hun weg naar de plant vinden en hoe ze vervolgens de plant koloniseren. Wellicht gaat hier specifieke communicatie aan vooraf en hebben deze bacteriën speciale aanhechtingsmechanismen. We weten overigens ook niet hoe die streptomyceten vervolgens binnen in het plantweefsel terecht komen. We hebben gewoonweg nog nooit gezien hoe ze dat doen.

Een bijkomende maar belangrijke vraag is of plant-gerelateerde streptomyceten ook van die krachtige antibiotica kunnen maken, en de suggestie is gemaakt dat streptomyceten verrijkt worden zodra er infecties plaatsvinden. Ze zouden dus een mogelijke bron voor nieuwe antibiotica kunnen zijn. Nieuwe antibiotica kunnen we goed gebruiken nu we meer en meer geconfronteerd worden met antimicrobiële resistentie van bacteriën die ons ziek maken. In het kader van het BacktoRoots project² heb ik onderzocht hoe streptomyceten in en op de plant groeien en wat hun antimicrobiële potentie is. De belangrijkste bevindingen vat ik hieronder samen.

We zijn met een brede blik het onderzoek ingestapt. Allereerst hebben we ons gefocust op de ecologie van actinomyceten. We vroegen ons af hoe actinomyceten zich ontwikkeld hebben tot ware partners van planten en dieren. Vaak lijkt het erop dat de planten en dieren een voedselbron zijn voor de actinomyceten en dat de bacteriën allerlei enzymen en antibiotica produceren waar hun gastheren van profiteren. Maar constante productie van antibiotica zou erg kostbaar zijn: dit kost energie die ook ingezet kan worden voor onderhoudsprocessen, groei en ontwikkeling. Dit zou dan ook kunnen verklaren waarom actinomyceten vaak maar een zeer beperkt deel van hun arsenaal aan antibiotica maken wanneer we ze in het lab groeien, terwijl in hun DNA prachtige instructies voor andere, vaak nog onbekende antibiotica aanwezig zijn. Hierdoor kwam de gedachte bij ons op dat er mogelijk bepaalde signalen nodig zijn van de gastheer om de productie van deze nog onbekende antibiotica te activeren in de bacterie. Die signalen zouden dan logischerwijs

² BacktoRoots is een onderzoeksproject tussen verschillende Nederlandse kennisinstellingen en bedrijven, met als doel om planten groei en productiviteit te verbeteren door de juiste microben met de juiste planten samen te groeien.

stress signalen zijn, welke de gastheer aanmaakt als deze aangevallen wordt door ziekteverwekkende (micro)organismen. We zijn vervolgens gaan nadenken over welke signalen de antibioticaproductie dan zouden kunnen aanzetten in het lab. Zo hebben we speerpunten geformuleerd die de ontdekkingstocht naar nieuwe antibiotica hopelijk vooruithelpen.

Vanaf hier zijn we ons gaan focussen op plant-*Streptomyces* interacties. We hebben uit *Arabidopsis* planten endofytische streptomyceten geïsoleerd. Endofyten zijn bacteriën en schimmels die als symbiont in de plant leven. Vervolgens hebben we het kolonisatieproces van de plant door deze streptomyceet in beeld gebracht. Met verschillende microscopische technieken hebben we laten zien dat streptomyceten zich tussen en in de plantencellen bevinden (figuur 34). Dat deze *Streptomyces* bacteriën zelfs in plantencellen doordringen was vooral bijzonder, want dit was nog niet eerder aangetoond. We hebben ook de antibioticaproductie van deze *Streptomyces* endofyten onderzocht en nagedacht over hoe we de antibioticaproductie zouden kunnen stimuleren in het lab. Omdat deze streptomyceten uit planten komen, hebben we ze blootgesteld aan plantenhormonen en hebben we vervolgens gekeken hoe deze hormonen de antibioticaproductie beïnvloeden. Hier zagen we dat plantenhormonen een stimulerende werking hebben op de antibioticaproductie van een aantal – maar zeker niet alle - endofytische streptomyceten. We waren benieuwd of dit effect ook te zien was in andere streptomyceten, die bijvoorbeeld uit de grond zijn geïsoleerd of die al lange tijd in het lab worden gekweekt. Dit zou ons kunnen vertellen of de reactie op plantenhormonen specifiek is voor endofyten. Dit bleek niet het geval, want tijdens deze experimenten zagen we dat ook sommige niet plant-geassocieerde streptomyceten reageerden op jasmonaten³, een belangrijke groep plantenhormonen betrokken bij planten afweer. We hebben daarbij

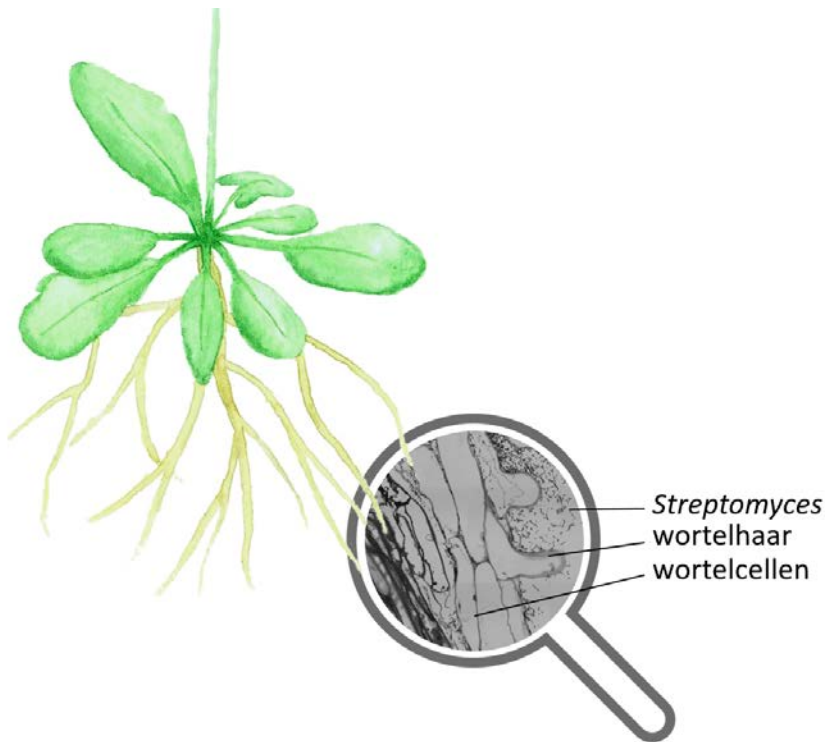
³ Jasmonaten vormen een groep plantenhormonen die een belangrijke regulerende functie hebben in onder andere het afweersysteem van de plant. Jasmonaten hebben dan ook als mogelijke toepassing om de tolerantie van gewassen voor plantenziekten te verhogen. In dit onderzoek hebben we voornamelijk gekeken naar het effect van jasmonaten op streptomyceten.

vooral gekeken naar twee jasmonaat varianten, jasmonzuur en methyljasmonaat.

Plantenhormonen brengen de antibioticaproductie op gang

Ook de modelstreptomyceet *Streptomyces coelicolor*, die al 65 jaar in het laboratorium onderzocht wordt, bleek te reageren op jasmonaten door de productie te verhogen van actinorhodine, een blauwkleurig antibioticum. Door die blauwe kleur kun je heel goed zien of er antibioticaproductie is en hoeveel. Dit maakt het antibioticum een handige marker. Methyljasmonaat zorgde voor een boost in actinorhodine productie en gedraagt zich in die zin als een trigger van antibioticaproductie. Jasmonzuur zorgde daarbij voor een versnelde ontwikkeling van *S. coelicolor*, waardoor er meer actinorhodine in dezelfde tijd werd geproduceerd. Dit betekent dus dat methyljasmonaat en jasmonzuur andere mechanismen erop na houden die voor verhoogde antibioticaproductie zorgen.

We hebben ook naar de reactie op jasmonaten gekeken van *Streptomyces roseifaciens*, een streptomyceet die is geïsoleerd uit de grond in het Chinese Qinling gebergte. Deze rode *Streptomyces* stam heeft laten zien een ware producent van verschillende waardevolle moleculen te zijn, waaronder antibiotica.



Figuur 34. ***Streptomyces* hecht zich aan de wortel van *Arabidopsis* planten.** Een schematische tekening van de *Arabidopsis* plant tezamen met een microscopie foto van de wortel illustreert dat *Streptomyces* bacteriën, de kleine zwarte puntjes en streepjes in de loep, zich aan de buiten kant van de planten wortel hechten. Credits: Eske A. Ravensbergen en Anne van der Meij

Jasmonzuur zorgt er bij deze streptomyceet voor dat deze nog meer antibiotica produceert. De productie van antibiotica met activiteit tegen bacteriën zoals *Escherichia coli* en *Bacillus subtilis* wordt geactiveerd door jasmonzuur. Echter, chemische analyse liet zien dat *S. roseifaciens* jasmonzuur ook kan conjuger⁴ met het aminozuur glutamine. Dit betekent dus dat een bacterie een plantenhormoon chemisch kan veranderen in - in dit geval - jasmonoyl-glutamine. In de tijd voorafgaand aan ons onderzoek was niet bekend dat streptomyceten dit konden. Hoewel de functie van deze

⁴ Chemische koppelingen maken

conjugatie niet bekend is, hebben we wel aanwijzingen over hoe het zou kunnen werken. De hypothese is dat jasmonzuur selectiedruk⁵ uitoefent op *S. roseifaciens*. Wanneer we de bacterie op een voedingsbodem groeien met jasmonzuur, bleek in sommige gevallen dat de bacteriële kolonies niet meer de typische rode kleur hadden maar dat in plaats daarvan een geel pigment werd geproduceerd. De hyfen van de gemuteerde stam die het gele pigment produceerde vertakten veel minder dan normaal en tevens waren ze dikker dan die van de oorspronkelijke stam. Dit effect verdween bij gebruik van het glutamine conjugaat. Dit suggereert dat jasmonzuur conjugaten minder toxisch zijn voor streptomyceten dan het plantenhormoon zelf.

Conjugatie van plantenhormonen in *Streptacidiphilus*

Omdat we benieuwd waren of meer bacteriën jasmonzuur konden conjugeren, hebben we een aantal *Streptomyces* en *Streptacidiphilus* bacteriën opgegroeid met jasmonzuur. *Streptacidiphilus* is een zuster genus van *Streptomyces*. Deze onderzoeksresultaten lieten zien dat er nog veel meer jasmonzuur conjugaten gemaakt werden door de bacteriën. Zo vond er naast de conjugatie van glutamine eveneens conjugatie van jasmonzuur met isoleucine, phenylalanine, valine en tyrosine plaats. Ook van deze varianten was nog niet bekend dat ze door bacteriën gemaakt konden worden. Daarnaast kwamen we tijdens deze experimenten tot de ontdekking dat *Streptacidiphilus* bacteriën gevoeliger zijn voor jasmonzuur dan *Streptomyces*, maar ook deze bacteriën zijn minder gevoelig voor geconjugeerde versies van jasmonzuur dan voor jasmonzuur zelf. Vervolgexperimenten waarbij we de gevoeligheid voor andere plantenhormonen onderzochten lieten zien dat *Streptacidiphilus* bacteriën in het algemeen gevoeliger zijn voor plantenhormonen dan streptomyceten en dat het plant-geassocieerde bacteriële genus (*Para*)*burkholderia* erg goed tegen plantenhormonen kan. Dit laat duidelijk zien dat plantenhormonen niet alleen een effect hebben op

⁵ De natuur selecteert op eigenschappen die betrekking hebben op het vermogen van levende organismen om zich aan te passen. Dit noemen we ook wel selectiedruk: de omgeving die selecteert.

planten, maar ook op bacteriën. Een interessante hypothese is dat plantenhormonen een belangrijke rol spelen bij de selectie van welke bacteriën kunnen groeien in en om de plant en welke niet.

Openstaande vragen

Naast dat we in de afgelopen vier jaar een aantal belangrijke vragen met betrekking tot plant-*Streptomyces* interacties hebben beantwoord, vormen bovenstaande resultaten vooral ook een solide basis voor verder onderzoek. We weten bijvoorbeeld uit ons onderzoek en uit dat van anderen dat keer op keer de bacterie soorten *Streptomyces clavifer* en *Streptomyces olivochromogenes* interacties met verschillende planten aan gaan. Dit zouden dus hele goede kandidaten zijn om de endofytische levenscyclus van *Streptomyces* verder te bestuderen. Mede dankzij ons onderzoek liggen de protocollen die dit proces gedetailleerd in beeld kunnen brengen klaar. We weten nu ook dat plantenhormonen een stimulerend effect kunnen hebben op de antibioticaproductie van streptomyceten, maar in hoeverre dit ecologisch gezien relevant is, is nog niet duidelijk. Hiervoor zouden we moeten kijken naar een systeem waarbij we er zeker van zijn dat plant en streptomyceet in symbiose leven. Op deze manier kunnen we onderzoeken wat er met de antibioticaproductie door de streptomyceet gebeurt als de plant wordt aangevallen door een pathogeen. Beschermt de streptomyceet dan daadwerkelijk de plant - en doet hij dit specifiek wanneer er een pathogeen in de buurt is - zijn belangrijke vragen die nog beantwoord moeten worden. Tot slot laten onze experimenten zien dat bacteriën een verschillende gevoeligheid hebben voor plantenhormonen. Daardoor stellen we ons nu voor dat plantenhormonen mede als poortwachters van de plant fungeren. Zij zouden wel eens een groot aandeel kunnen hebben in hoe goed een microbe in en op de plant kan groeien. Om deze hypothese verder te testen zou gebruik gemaakt kunnen worden van plant-mutanten die een veranderde hormoonhuishouding hebben. Vervolgens zouden we kunnen kijken of dit effect heeft op het planten microbiom. Een andere optie is om grond (mét bacteriën) bloot te stellen aan plantenhormonen en vervolgens te bepalen of en zo ja, welke microben zich hierin ophopen. Dit laatste zou zeer interessant zijn in het kader van de doelstellingen van het BacktoRoots concept. Op deze manier zou het namelijk mogelijk kunnen zijn om de groei van goede

bacteriën in en rond de plant te bevorderen en daarmee plantengroei en productiviteit te verbeteren.

Samenvattend onderstreept het werk in mijn proefschrift de belangrijke rol van de ecologie bij de productie van antibiotica. We hebben de ecologie dan ook omarmd in ons onderzoek naar plant-*Streptomyces* interacties. Hierdoor hebben we nieuwe inzichten verkregen welke een belangrijke basis kunnen vormen voor vervolgonderzoek. Ik hoop daarbij dat de uitkomsten bij zullen dragen aan duurzame gewasbescherming en daarnaast de ontdekking van nieuwe antibiotica zullen bevorderen.

