

Slutrapport, projekt nr 0133017

Biologisk bekämpning - genetisk analys av mekanismer

S. A. I. Wright och B. Gerhardson

Bakgrund

En bakteriestam som isolerats från kråkbär, *Pseudomonas chlororaphis* MA 342, gav under många år lovande resultat som biologiskt betningsmedel i fältförsök mot en rad fröburna svampsjukdomar i stråsäd (Johnsson et al., 1998). Den utgör den aktiva beståndsdelen hos de kommersiella, biologiska betningspreparaten Cedomon™, Cerall™ och Cedress™. Vi har utvecklat ett växthustest för biologisk bekämpning av kornets bladfläcksjuka, som i stort motsvarar förhållandena i fält, och detta har använts genomgående för att studera mekanismerna hos denna bakterie. Tidigare forskning pekade på att en svamphämmande metabolit, s. k. DDR (2,3-deepoxy-2,3-didehydro-rhizoxin), stod för en betydelsefull del av den sjukdomshämmande effekten vad gäller kornets bladfläcksjuka (Hökeberg, 1998). Vår forskargrupp hade också i tidigare undersökningar funnit att den fröbetade bakterien fortsatte att växa till på fröna, men att den inte koloniserade framväxande rötter eller koleoptil (Tombolini et al., 1999). Den hypotes som vuxit fram under åren är att bakteriestammen har en god koloniseringsförmåga av frön, i kombination med en lokal produktion av DDR som i sin tur hämmar de patogena svamparna (Johnsson et al, 1998). Lokal DDR produktion har även detekterats direkt på fröna. Men det finns även andra, utforskade mekanismer utöver DDR produktion som gör att bakterien lyckas hämma fröburna svampsjukdomar. Att kartlägga dessa och betydelsen av dessa har varit en av nyckelfrågorna för projektet.

Material och metoder

Sekvensering och kartläggning av DDR-generna

Vid 2002 års början hade en kosmidklon, pVB105 tagts fram ur ett genomiskt bibliotek av MA 342. Dess insert var delvis sekvenserat. Det saknades sekvenser på lite olika ställen. Det första som gjordes var att sekvensera klart dess insert, som uppgick till 32 kilobaser (kb). Vi hade sedan tidigare fem transposon-inducerade mutanter av MA 342 som inte bildade DDR, men som i övrigt var identiska med MA 342. Mutanterna hette: 1:10H, 2:2F, 1:5E, 3:2B och 8:6E. Positionerna för transposoninsättningarna kartlades via DNA-sekvensering.

Eftersom insertet i pVB105 hade sekvenserats färdigt, började jakten på nya kosmidkloner ur det genomiska biblioteket av MA 342 DNA som innehöll DNA som låg intill det som klonats i pVB105. Den första metoden vi använde var s. k. kolonihybridisering. Biblioteket (som består av en samling *E. coli* bakterier med var sitt unika, klonade DNA från MA 342) spreds ut på plattor och fick växa till. Parallellt med detta framställdes radioaktivt inmärkta versioner av två små DNA fragment (s.k. prober), som var identiska med vardera änden på det sekvensbestämda DNA:t i pVB105. Bibliotekets DNA, dvs. DNA:t i alla kolonier som växte på plattorna, överfördes till ett membran och fick sedan hybridisera mot en prob i taget. Om den sekvens som fanns i en prob också skulle finnas i en kosmidklon i biblioteket, skulle klonens DNA hybridisera till probens, och man kunde sedan leta sig tillbaka till den bakteriekoloni på plattorna som innehöll en ny kosmidklon av intresse. Vi letade framför allt efter kosmidkloner som innehöll mycket nytt DNA och inte överlappade existerande DNA särskilt mycket.

Vi bytte sedan strategi och bestämde oss för att använda PCR (polymerase chain reaction) för att hitta nya kloner i biblioteket som innehöll intilliggande DNA. Mikrotiterplattor innehållande 96 brunnar användes för uppodlingen av individuella medlemmar i biblioteket. Vi framställde åtta sådana plattor, innehållande sammanlagt $8 \times 96 = 768$ bakteriestammar ur

biblioteket. Dessa testades för amplifiering av ett fragment som ligger i vänstra änden av DDR-generna, med primerparet, PCR primerpar 1:

PCR1140-17 (CCACGCCACCGAACCCCAATAGC)

PCR591-613 (GCTGGCGGCATTGGCGAAGTCTG) (Fig. 1).

Ett nytt primerpar har också konstruerats i den vänstra ändan av insertet i pGM100, s.k. PCR primerpar 3, för att identifiera en ny kosmidklon som innehåller DNA till vänster om det i pGM100 (Fig. 1). Arbetet med att leta igenom biblioteket efter nya kloner till vänster om pGM100 är alltså också i gång. Vi letar också efter nya kloner som innehåller DNA till höger om det i pVB131 (Fig. 1) med primerparet: 34308-34324 (GCAGGTCGCGGGTCTTG) och 34091-34113 (GATATCCAGCAGTCGTTTTCTGTC), s.k. PCR primerpar 2. PCR-metoden har fungerat bra för att leta upp intilliggande kloner.

Nya mutanter av MA 342

Vi framställde nya mutanter av MA 342 med hjälp av en transposon, en liten bit flyttbart DNA som kan hoppa in på slumpvisa platser i bakteriernas arvs massa. Mutanterna sedan fick genomgå växthustestet i vilket kornfrön som är naturligt smittade med *D. teres*, bladfläcksjukessvampen, betas med bakterier, som skyddar fröna och framväxande koleoptiler från att angripas av svampen. Från varje testomgång valde vi ut de mutanter som gav allra sämst skydd, för fortsatta växthuster med fler upprepningar. Utav totalt 593 mutanter som genomgick den första biotest-screeningen hittade vi 40 som gav försämrat skydd mot bladfläcksjuka. Dessa 40 testades sedan på nytt i biotestet, mer rigoröst, med sex upprepningar av varje mutantbehandling, och då kvarstod åtta mutanter som konsekvent uppvisade försämrad bekämpningsförmåga. DNA:t som låg intill transposonerna i sex av dessa mutanter klonades och sekvenserades för att undersöka om de generna som muterats var kända. Med härledning av de träffar vi fick i databasen med gener vars funktioner var kända och de fenotypiska testresultaten, fastställde vi funktionerna hos de muterade generna. Parallellt med den genetiska studien lät vi också dessa åtta mutanter genomgå tester för produktion av svamphämmande metaboliter.

Dessa åtta mutanter fick genomgå biotestet med korn som var naturligt smittat med *Drechslera teres*, i växthus, (6 upprepningar vardera) ytterligare tre gånger för att säkerställa resultaten. S.k. fenotypiska tester utfördes också, dvs. mutanterna testades för fluorescerande sideroforproduktion, proteasproduktion och svärminningskapacitet. Efter att DNA-sekvenser hos sex mutanter erhållits skickades dessa på homologisökningar mot databasernas DNA.

Resultat

Sekvensering och kartläggning av DDR-generna

Mutanterna av MA342 som endast förändrats genom avsaknad av DDR-produktion, dvs. 1:10H, 2:2F, 1:5E, 3:2B och 8:6E undersöktes närmare. Transposoninsättningspositionerna i dessa mutanter kartlades i detalj, och de visade sig alla ha hamnat i det DNA som klonats i pVB105 (Fig. 1), i gener som kodar för enzymer i DDR-biosyntesen. Eftersom dessa mutanter varit betydligt sämre än MA 342 i biologisk bekämpning mot kornets bladfläcksjuka i upprepade växthusförsök var detta resultat ett bevis för att DDR har en viktig roll i bakteriens kamp mot bladfläcksjukessvampen på kornkärnans yta (Hökeberg, 1998). Positionerna för de fem mutationerna har markerats med fyllda pilspetsar på genkartan (Fig. 1).

Jakten på kosmidkloner som angränsade DNA:et i pVB105 genom kolonihybridisering resulterade i upptäckten av klon pVB131, som tyvärr endast hade 3-4 kb nytt DNA, till höger om det i pVB105. Klonen överlappade alltså DNA:t i pVB105 en hel del. pVB131 innehöll gener för biosyntesen av DDR, som utgjorde en fortsättning på de gener som identifierats i pVB105 (Fig. 1). När vi bytt strategi till PCR för att få fram ytterligare kosmidkloner, fick vi

efter att ha använt PCR primerpar 1 fram en ny kosmidklon, pGM100, som innehöll DNA till vänster om det i pVB105, och den sträckte sig långt ut till vänster. Denna klonades sedan om i många mindre delar för att underlätta sekvenseringsarbetet. Tre av dessa syns i Figur 1 – Eco 3-4, Apa 6 och Apa 3-1, samt en mindre klon som framställts ur Eco3-4, s.k. Pst 1. Ytterligare ett tiotal mindre kloner vars DNA ännu inte kunnat placeras in på genkartan har framställts ur pGM100. Vi är i färd med att sekvensera inserten hos dessa kloner. Vi hittade på så sätt ytterligare gener som står för biosyntesen av DDR (men som ännu inte kan placeras in på kartan, inte förrän mer DNA sekvens finns tillgänglig). Vi har bl.a. hittat ytterligare en gen för ett metyltransferas, som inte kan placeras in ännu.

DDR generna har på DNA-nivå inte mycket likhet med andra sekvenser i databaserna, men på aminosyrenivå har de mycket stor (40-50%) likhet med gener inblandade i biosyntesen av typ I (icke-aromatiska) polyketider, t. ex. makrocycliska laktoner från *Streptomyces*- och *Bacillus*-arter. Detta stämmer mycket väl med strukturen av DDR, som är en makrocyclisk lakton (Hökeberg, 1998). Polyketidsyntes av typ I utförs av stora enzymkomplex vari åtskilliga enzymatiska funktioner finns representerade (Katz och Donadio, 1993). Vi hade tidigare hittat funktionerna ketoacylsyntas (KS), dehydras (DH), acylbärarprotein (ACP) och ketoacylreduktas (KR) i DNA:et. Gener som står för produktionen av dessa komplex är ofta i storleksordningen 10 - 25 kb (Motamedi et al., 1997; Molnar et al., 1996; Scotti et al., 1993). Vi har dessutom hittat ytterligare funktioner som brukar knytas till polyketidsyntes; S-malonyltransferas, metyltransferas, cytokrom P450 monooxidase, acetyltransferas, tioesteras och icke-ribosomal peptidsyntes (NRPS). Dessa enzymer ligger i enskilda, normalstora gener, till skillnad från dem vi först upptäckte i pVB100 (KS, DH, ACP och KR; se ovan). De ligger allra längst ut till höger i pVB105 (Fig. 1), och enligt Dr. Alison Hill, polyketidkemist, är det dessa som antagligen kommer att utföra de sista stegen i DDR-biosyntesen, vilket betyder att den högra sidan av pVB105, eller där i närheten antagligen utgör "slutet" av alla de gener som kodar för biosyntesapparaten.

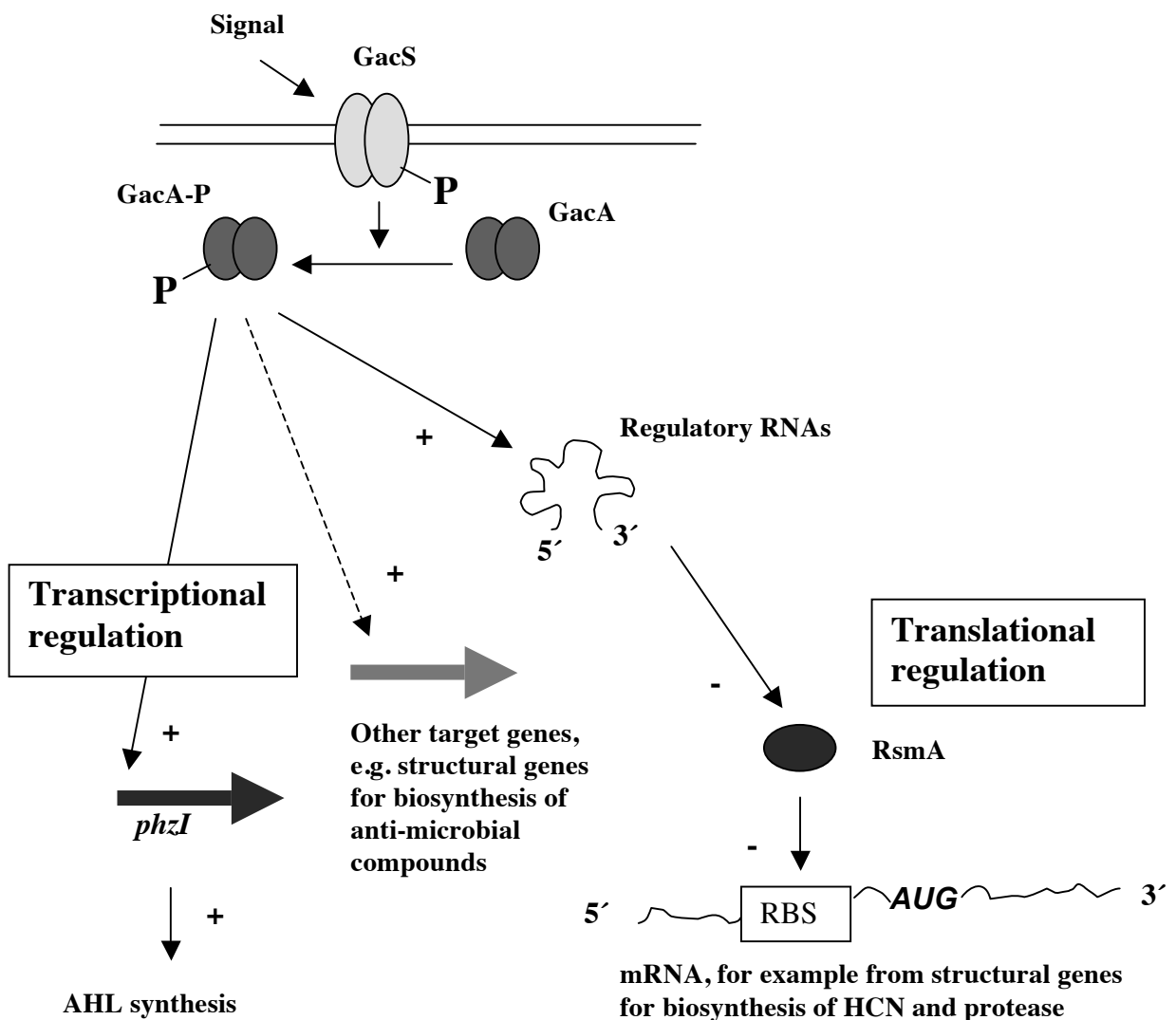
Interaktioner med forskargrupper i England rörande DDR.

För att på sikt formulera en möjlig biosyntesväg för DDR krävs också ett samarbete med kemister som har erfarenhet av arbete med inmärkning av substrat och spårning av intermediära substanser i biosynteskedjan, och helst även polyketidsyntes. Sedan jag år 2000 knöt kontakt med två av de ur internationellt perspektiv mest ansedda forskningsgrupperna inom polyketidområdet, ledda av Dr. Peter Leadlay resp. Dr. Jim Staunton, vid Inst. för biokemi respektive Inst. för kemi, Cambridge University, England, har jag fått två nya, mycket värdefulla polyketidkemistkontakter i England. Kemisterna är Dr. Alison Hill, vid University of Exeter och Dr. Rebecca Goss vid Univ. of East Anglia. Vi planerade ett gemensamt framtida forskningssamarbete.

Nya mutanter av MA 342

Mutanterna gav varierande grad av skydd, från att ge ett lika bra skydd som MA 342 till att inte alls ge något skydd. Utav de ursprungligen ca 600 mutanter som testats, upprepades testerna för 40 mutanter mer rigoröst, med sex upprepningar av varje mutantbehandling. Det var mycket otvetydiga resultat: åtta mutanter visade konsekvent en markant försämrad biologisk bekämpningsförmåga mot *D. teres*. Analysen av metabolitesterna visade en spridning hos mutanterna, även om metabolitprofilerna också till viss del sammanföll i grupper. Vi upptäckte att alla utom tre mutanter (Vb13, Vb14 och Vb18) bildar DDR.

Sekvenserna i de sex mutanter som sedan analyserades genetiskt visade att i princip alla hade mutationer i gener som styrde andra gener, sk. regleringsgener. Mutanterna Vb13 och Vb14 var muterade i en gen som heter *gacS* och som står för ett globalt regleringsprotein i bakterier. Det är sedan tidigare känt att GacS-proteinet reglerar biologisk bekämpning hos pseudomonader. GacS sitter i cellmembranet och tar in signaler från omivningen och styr sedan en mängd processer i bakteriecellerna (se figur nedan). Vad vi nu också fick veta, och som ej tidigare var känt, är att GacS reglerar DDR-produktion. GacS-mutanterna var de som gjorde sämst ifrån sig i biologisk bekämpning. Näst sämst var mutant Vb18, en intressant mutant, eftersom funktionen hos homologer till den muterade genen ännu ej karakteriserats. Vi hoppas att bli de första som beskriver funktionen hos regleringsproteinet som denna gen kodar för.



Diskussion

Målen för projektet – att fortsätta att karakterisera och kartlägga DDR-generna uppfylldes och arbetet fortlöpte under projektperioden. Sekvenseringen av kosmidklonen (pVB105) slutfördes. Därefter tog det många försök innan vi hittade intilliggande kloner med tillräckligt

nytt DNA. Så småningom hittade vi nya kloner och fick ny sekvens både till vänster och höger om det redan karakteriserade DNA:et. DDR är tillhör en grupp kemiska ämnen som kallas polyketider. Det är därför inte förvånande att DDR-generna kodar för polyketidsyntaser (dvs. enzymer som katalyserar bildandet av polyketider). Det anmärkningsvärda var att dessa polyketidsyntaser representerar en för bakterier helt ny typ av polyketidbiosyntes, och projektresultaten fick därför stor internationell vetenskaplig uppmärksamhet.

Analysen av sekvenserna skulle leda till formuleringen av en möjlig biosyntesväg för DDR. Trots att vi ännu inte avslutat sekvensprojektet fick vi med hjälp av en polyketidkemist från England, Dr. Alison Hill, fram en hypotetisk biosyntesväg (Fig. 2), baserat på släktskapen av DDR med andra, liknande molekyler och det som är känt om dessa biosyntesvägar.

Vi framsällde nya mutanter av MA 342 som hade förändringar i övriga egenskaper som var av betydelse för biologisk bekämpning. Det visade sig att mutanterna som ej var nedsatta i bekämpningsförmåga mestadels var muterade i gener som stod för produktionen av regleringsprotein, och att de därför förändrats i många egenskaper. Vi hittade åtta mutanter som hade viss eller mycket nedsatt biologisk bekämpningsförmåga. En del av dessa studerades i detalj på gennivå och fenotypiskt.

Det visade sig att minst tre av dessa nya mutanter har mutationer i gener som står för reglering av DDR-produktion (Vb13, Vb14 och Vb18). Vb13 och Vb14 har muterats i en gen som heter *gacS*. Trots att GacS (global activator sensor kinase) har beskrivits i många andra *Pseudomonas*-arter vet fortfarande ingen vilken signal det är som proteinet känner av i sin omgivning, ej heller exakt vilka gener som regleras. Informationen om signalerna som mottages av bakteriecellen kan användas för att få fram ett effektivare biologiskt bekämpningspreparat eller effektivare bekämpning med existerande biologiska betningsmedel genom olika tillsatser.

Litteratur

- Hökeberg, M. 1998. Seed bacterization for control of fungal seed-borne diseases in cereals. Diss., SLU, Uppsala, Acta Universitatis agriculturae Sueciae, Agraria 115. 44 s.
- Johnsson, L., Hökeberg, M. och Gerhardson, B. 1998. Performance of the *Pseudomonas chlororaphis* biocontrol agent MA 342 against seed-borne diseases in field experiments. European Journal of Plant Pathology 104: 701-711.
- Katz, L. och Donadio, S. 1993. Polyketide synthesis: Prospects for Hybrid Antibiotics. Annu. Rev. Microbiol. 47: 875-912.
- Molnar, I., Aparicio, J. F., Haydock, S. F., Khaw, L. E., Schwecke, T., König, A., Staunton, J. och Leadlay, P. F. 1996. Organisation of the biosynthetic gene cluster for rapamycin in *Streptomyces hygroscopicus*: analysis of genes flanking the polyketide synthase. Gene 169: 1-7.
- Motamedi, H., Cai, S.-J., Shafiee, A. och Elliston, K. O. 1997. Structural organization of a multifunctional polyketide synthase involved in the biosynthesis of the macrolide immunosuppressant FK506. Eur. J. Biochem. 244: 74-80.
- Scotti, C., Piatti, M., Cuzzoni, A., Perani, P., Tognoni, A., Grandi, G., Galizzi, A. och Albertini, A. M. 1993. A *Bacillus subtilis* large ORF coding for a polypeptide highly similar to polyketide synthases. Gene 130: 65-71.
- Tombolini, R., van der Gaag, D. J., Gerhardson, B. och Jansson, J. K. 1999. Colonization pattern of the biocontrol strain *Pseudomonas chlororaphis* MA 342 on barley seeds visualized by using green fluorescent protein. Applied and Environmental Microbiology 65 (8): 3674-3680.

Wright, S. A. I., Bondesson, P., Thorsson, L., Azarang, M. and Gerhardson, B. Analysis of biocontrol-deficient mutants in *Pseudomonas chlororaphis* reveals genes involved in regulation of biocontrol. Pages 241-244. In: Y. Elad and J. Köhl (eds.). Influence of A-Biotic and Biotic Factors on Biocontrol Agents, IOBC/wprs Bulletin Vol 22(10).

Publikationer

- Gerhardson, B. and Wright, S. 2002. Bokkapitel i: *Microorganisms in Plant Conservation and Biodiversity*: Ch. 4. Bacterial associations with plants: Beneficial, non N-fixing interactions, s.79-103. K. Sivasithamparam, K. W. Dixon and R. L. Barrett (eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. (DOI: 10.1007/0-306-48099-9_4)
- Vinnere, O. Fatehi, J., Wright, S. A. I. and Gerhardson, B. 2002. The causal agent of anthracnose of Rhododendron spp. in Sweden and in Latvia. *Mycological Research* **106** (1): 60-69. (<http://dx.doi.org/10.1017/S0953756201005366>)
- Wright, S. A. I. and Beer, S. V. 2002. Genes for biosynthesis of pantocin A and B by *Pantoea agglomerans* Eh318. *Acta Horticulturae* **590**: 237-241.
- Gerhardson, B. 2002. Biological Substitutes for Pesticides. *Trends in Biotechnology*. **20**: 338-343. (DOI:10.1016/S0167-7799(02)02021-8)
- Johansson, P. M. and Wright, S. A. I. 2003. Low-temperature isolation of disease-suppressive bacteria and characterization of a distinctive group of pseudomonads. *Applied and Environmental Microbiology*. **69** (11): 6464-6474. (DOI: 10.1128/AEM.69.11.6464-6474.2003)
- Wright, S. A. I., Bondesson, P., Thorsson, L. , Azarang, M. and Gerhardson, B. 2003. Analysis of biocontrol deficient mutants in *Pseudomonas chlororaphis* reveals genes involved in regulation of biocontrol. Pages 241-244. In: Y. Elad, J. Köhl and D. Shtienberg (eds). Influence of A-Biotic and Biotic Factors on Biocontrol Agents, IOBC/wprs Bulletin Vol. **22**(10). (www.iobc-wprs.org/pub/bulletins/bulletin_2002_25_10.pdf)
- Azarang, M., Collinge, D. B., Gerhardson, B, Johnsson, L. and Wright, S. 2004. An integrated approach to simultaneously control insect pests, powdery mildew and seed borne fungal diseases in barley by bacterial seed treatment. Pages: 57-62. In: Y. Elad and I. Pertot (eds). Management of plant diseases and arthropod pests by BCAs and their integration in agricultural systems, IOBC/wprs Bulletin Vol. **27** (8). (www.iobc-wprs.org/pub/bulletins/iobc-wprs_bulletin_2004_27_08.pdf)
- Schmitt, A., Amein, T., Tinivella, F., van der Wolf, J., Roberts, S., Groot, S., Gullino, M. L., Wright, S. and Koch, E. 2004. Control of seed-borne pathogens on vegetables by microbial and other alternative seed treatments. Pages: 120-123. In: Proceedings of the First World Conference on Organic Seeds, Rome, Italy, July 5-7, 2004 (ftp://ftp.fao.org/paia/organicag/organic-seed-conf_proceedings.pdf).

Posterpresentationer

- Analysis of biocontrol mutants in *Pseudomonas chlororaphis* reveals genes involved in regulation of biocontrol. S. A. I. Wright, Bondesson, P. Thorsson, L., Azarang, M. and B. Gerhardson. Biological Control of Fungal and Bacterial Plant Pathogens. Influence of A-biotic and Biotic Factors on Biocontrol Agents. 22-26 May, 2002. Kusadasi, Turkey.
- Sugar beet seed technology may contribute to optimise BCA efficacy. Tombolini, R., O. Arwidsson and B. Gerhardson. COST Action 830 WG2 Meeting 21-22, June 2002 Budapest, Ungern.
- Biocontrol mechanisms of *Pseudomonas chlororaphis* in the spermosphere of barley. S. A. I. Wright and B. Gerhardson. 8th International Congress of Plant Pathology, 3-7 February, 2003. Christchurch, New Zealand.

Slutrapport, projekt nr 0133017
Biologisk bekämpning - genetisk analys av mekanismer

EU Project: "Seed treatments for organic vegetable production". S. A. I. Wright, Schmitt, A. and E. Koch. XXXVII Annual Meeting of the Brazilian Phytopathological Society, 2-5 August, 2004. Gramado, Brazil.

Föreläsningar om projektet av Sandra Wright vid utländska universitet, företag och vid internationella konferenser

- The role of antimicrobial compounds from plant-associated bacteria in biocontrol and plant disease. Università de Molise, Campobasso, Italien (mars 2002)
- An integrated approach to control insect pests and fungal diseases in barley by bacterial seed treatment. Dept. of Syst. Botany, Göteborg University, Sverige (april 2002)
- Analysis of biocontrol factors in *Pseudomonas chlororaphis* Vb10. International workshop on biocontrol, Agadir, Marocko (april 2002)
- Antimicrobial compounds produced by two plant-associated bacteria - role in biocontrol and biosynthetic gene clusters. Dept. Chemistry, Exeter University, Exeter, Storbritannien (sept. 2002)
- Antimicrobial compounds by two plant-associated bacteria – role in biocontrol and biosynthetic gene clusters. Dept. Cell and Molecular Biology, Göteborgs Universitet (jan. 2003)
- Antimicrobial compounds produced by two plant-associated bacteria – role in biocontrol and biosynthetic gene clusters. Vid HortResearch, Auckland, Nya Zeeland (feb. 2003) och vid Genesis, Auckland, Nya Zeeland (feb. 2003)
- The role of *Pseudomonas* polyketides in plant disease and biocontrol. KVL, Frederiksberg, Danmark (okt. 2003) (Inbjuden talare)
- An integrated approach to simultaneously control insect pests, powdery mildew and seed borne fungal diseases in barley by bacterial seed treatment. International Workshop on Biocontrol, San Michele all' Adige, Italien (juni 2004)
- Molecular Analysis of Genes Involved in Biocontrol". Annual Congress of Plant Pathology, Gramado, Brasilien (aug. 2004) (Inbjuden talare)
- Biocontrol of barley net blotch with *Pseudomonas chlororaphis*. Practical aspects and modes of action. Sez. Patologia Vegetale, Università de Pisa, Pisa, Italien (nov. 2004)

Föreläsningar av Berndt Gerhardson vid utländska universitet, företag och vid internationella konferenser

- Biocontrol of fungal diseases in golf courses. Turfgrass and Environmental Research Workshop, Losby, Oslo, Norge, 12-13 april, 2002.
- Biocontrol of plant pathogens and weeds in Sweden. IFS-MISTRA-IAV HASSAN II Workshop on Plant Pathology, Biocontrol and Biopreservation, Agadir, Marocko, 22-27 april, 2002.
- Biocontrol of seed-borne and seedling diseases. 8th International Congress of Plant Pathology, Christchurch, Nya Zeeland, 3-7 februari, 2003 (inbjuden föreläsare).
- Commercialization of biopesticides – experiences from a European process. Föredrag vid "Workshop on Semiochemicals and Microbial antagonists; their role in integrated pest management in Latin America", CATIE, Costa Rica 22-26 mars 2004.

Handledning

- Bondesson, Paula. Analysis of biocontrol-defective mutants of *Pseudomonas chlororaphis* reveals genes involved in regulation of biocontrol 20-poängs

Slutrapport, projekt nr 0133017
Biologisk bekämpning - genetisk analys av mekanismer

examensarbete. LiTH-IFM-Ex 1080, Linköpings Universitet, maj 2002. Handledare: S. A. I. Wright.

- Thorsson, Lena. Characterisation of four regulatory mutants of *Pseudomonas chlororaphis* Vb10, a biocontrol agent. 20-poängs examensarbete. Mälardalens Högskola, augusti 2002. Handledare: S. A. I. Wright.
- Nilsson, Annica. Optimization of DDR production in a minimal medium. 10-poängs examensarbete. KTH 2002-2003. Handledare: S. A. I. Wright.
- Hanna Hurtig och Emma Jonsson, Identifiering, lokalisering samt kloning av gener som kodar för DDR, en svamphämmande polyketid från *Pseudomonas chlororaphis*. 10-poängs examensarbeten, Högskolan i Jönköping, 2003. Handledare: S. A. I. Wright.
- Kirsi Saranka, Karakterisering av ett regleringslocus i *Pseudomonas chlororaphis*. 10-poängs examensarbete, Uppsala Universitet, maj 2003. Handledare: S. A. I. Wright.
- Maria Johansson, doktorand, disputation 2003, vid SLU, Uppsala. Biocontrol of *Fusarium* in wheat – introducing bacteria to a complex system of interactions. Agraria 403. Biträdande handledare: S. A. I. Wright.

Extern information inklusive fortbildning

Gerhardson, B. Biocontrol of plant pathogens and weeds – Swedish experiences. Föredrag vid Sida-stödd internationell kurs för forskare från utvecklingsländer, BioAgri AB, Uppsala, 26 september, 2003.

Wright, S.A.I. Föreläsningar (å 50 min vardera) som beskriver det SLF-finansierade forskningsprojektet “Biologisk bekämpning – genetisk analys av mekanismer” för studenter vid *Göteborgs universitet*:

- Kurs i molekylär biologi, okt 2003
- Kurs i växtmolekylärbiologi, april 2004

Wright, S.A.I. och Azarang, M. Medverkan i Vetenskapsfestivalen i Göteborg, 12 maj 2004:

- "Fråga växtdoktorn", kl. 12-18: föreläsning+utställning+konsultation för/frågor från allmänheten
- "Vi angriper växterna", kl. 18-19: föreläsning +workshop för allmänheten
- "Växternas små beskyddare", kl. 19-20: föreläsning för allmänheten

Övrig resultatförmedling till näringen

Intervjuartikel: "Sandra vidareutvecklar biologisk bekämpning". Lantmannen 2004, nr 3, sid. 24-26.

Beskrivning av detta SLF-projekt förmedlades till Jessica Alm vid CUL (Centrum för uthålligt lantbruk, SLU), <http://www.cul.slu.se/database/sve>, men eftersom CUL lades ner 2010, finns projektbeskrivningen numera på Organic eprints online: <http://orgprints.org/> (tips: sök på “Wright” som namn).

Gerhardson, B. Biologisk forskning och bioteknikindustri. Föredrag i seminarier om innovationsteknik/management vid SLU och UU den 30:e maj 2002.

Gerhardson, B. Växtpatologi och bekämpning – framtidsscenarier. Föredrag vid Hushållningssällskapens HIR-konferens, Loka Brunn, 21-22 oktober, 2002.

Gerhardson, B. Research and commercialization of biopesticides. Föredrag vid Sida-kurs: “Seed testing and seed-borne disease control”, Uppsala, 2 juni, 2004.

Gerhardson, B. Alternativ till kemisk bekämpning på golfbanor. Föredrag vid möte med greenkeepers och styrelserepresentanter på Björnlunda golfklubb, 16 juni, 2004.

Slutrapport, projekt nr 0133017
Biologisk bekämpning - genetisk analys av mekanismer

- Gerhardson, B. Icke-kemisk bekämpning – vad kan vi göra på våra golfbanor? Föredrag i anslutning till högre kurs för greenkeepers på Barsebäck, 17 augusti, 2004.
- Gerhardson, B. Varför och hur vi domesticerar våra mikroorganismer. Föredrag vid årskursträff för agronomer, SLU, Uppsala, 7 september 2004.
- Gerhardson, B. Biologiskt växtskydd och kommersiell bioaktivitet. Föredrag vid seminariet ”Forskningen och Kapitalet” anordnat av Svenska Riskkapitalföreningen m fl. Näringslivets Hus, Stockholm, 15 september, 2004.
- Gerhardson, B. Biocontrol research and development in Sweden. Föredrag i anslutning till Sida-programmet: ”Sustainable Agriculture in an Environmental Perspective”. Uppsala, 1 oktober, 2004.
- Gerhardson, B. Utveckling av alternativa bekämpningsmedel för golfbanor. Föredrag vid möte med greenkeepers och styrelserepresentanter i Västsvenska Golfbundet, Strömstad, 5 oktober 2004.
- Gerhardson, B. Biologiska bekämpningsmedel; ett alternativ. Föreläsningar i anslutning till kursen Miljötoxikologi vid KTH, Stockholm, 2 november, 2004.
- Gerhardson, B. Alternativ till kemisk bekämpning i golfbanor. Föredrag vid möte med greenkeepers och styrelserepresentanter i Västra Götalands Golfbundet, Vara, 7 december, 2004.

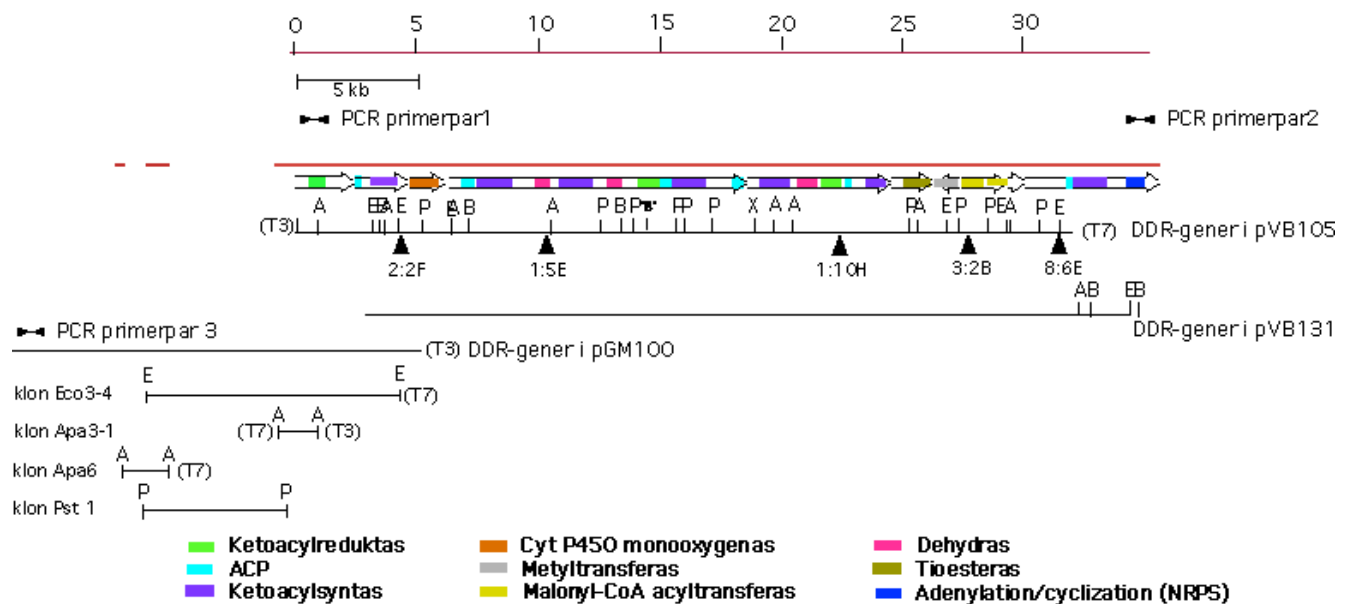


Fig. 1. Karta över det DNA som klonats i pVB105-, pVB131- och pGM100kosmidema, tre kloner ur det genomiska biblioteket. Vardera klonen innehåller 32 kb genomiskt DNA. Kosmidklonen pGM100 innehåller DNA som ligger till vänster om det i pVB105. DNA:t i tre subkloner ur pGM100; Eco3-4, Apa6 och Apa3-1 visas också. Pst 1 är en subklon ur Eco3-4. De färgade partierna visar de olika enzymatiska funktioner som detta DNA kodar för (se bildschemat ovan). Bokstäverna står för restriktionsställena: A, *ApaI*; B, *BamHI*; E, *EcoRI*; P, *PstI* och X, *XbaI*. De fyllda trianglarna står för positioner hos transposoner i fem mutanter som saknar förmågan att bilda DDR. Den röda fyllda linjen överst i bilden visar hur mycket DNA som hittills sekvensbestämts, ca 37 000 baser (dvs. 37 kb). PCR primerpar1, som visas överst till vänster i bilden används för att identifiera kosmidklonen pGM100, och det överst till höger i bilden (PCR primerpar 2) används nu för att hitta en ny kosmidklon i biblioteket innehållande DNA som ligger intill och överlappar det i pVB131 på höger sida. Det primerpar som ligger längst ut t. v. (PCR primerpar 3) används för att leta upp en ny kosmidklon som innehåller DNA till vänster om det som klonats i pGM100. Detta primerpar ligger egentligen längre ut till vänster än vad bilden anger, eftersom också pGM100 sträcker sig längre ut till vänster än sidan tillåter att ita.

Slutrapport, projekt nr 0133017
 Biologisk bekämpning - genetisk analys av mekanismer

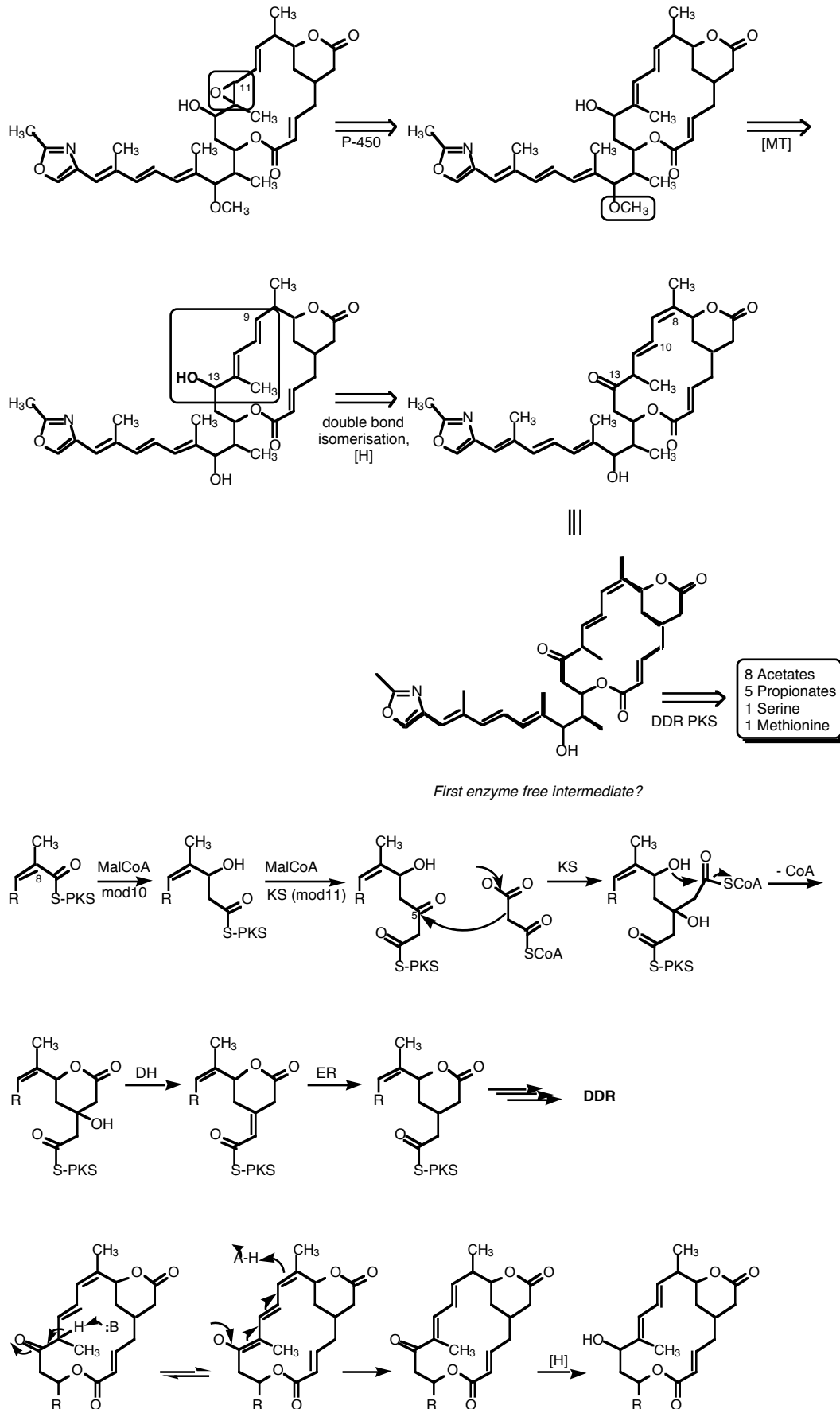


Fig. 2. Hypotetisk biosyntesväg för DDR (2,3-deepoxy-2,3-didehydro-rhizoxin).