

Slutrapport för SLF-projekt:

Utveckling av stamspecifika genetiska markörer för ekologiska studier av mikroorganismer med miljöbiotekniska användningsområden

1. Bakgrund

Mikroorganismer har stor potential att ersätta kemiska bekämpningsmedel i kampen mot växtsjukdomar (Montesinos 2003; Punja & Utkehede 2003), och för att förhindra angrepp av mögelsvampar vid lagring av frukt, grönsaker och spannmål (Wilson & Wisniewski 1989; Druvefors et al. 2002; Melin et al. 2007). Vid sådan biologisk bekämpning av svamptillväxt är ofta flera verkningsmekanismer inblandade. Konkurrens om näring och/eller utrymme, produktion av antagonistiska metaboliter eller enzymer, samt inducering av naturliga försvarsmekanismer i växten, anses spela avgörande roller (Whipps 2001).

Inom EU skall den aktiva substansen i ett nytt bekämpningsmedel – i vårt fall mikroorganismen – prövas och godkännas centralt på EU-nivå (reglerat främst i direktiven 91/414 och 2001/36). Processen har varit mycket långdragen (upp till 9 år). En viktig orsak är att kunskapsbrist inom några nyckelområden har försvårat riskbedömningarna. De långa och mycket kostsamma prövningsförfarandena är en orsak till att det uppstått brist på denna typ av miljövänliga produkter på den europeiska marknaden (Montesinos 2003). I miljöriskbedömningarna har bl.a. saknats användbar information för att bedöma hur de introducerade organismerna överlever och om de kan spridas till omgivande områden. För bedömningen av risken för negativa hälsoeffekter på människor har en stor svårighet varit att få fram realistiska mätningar och scenarier för i vilken utsträckning organismerna kan spridas via partiklar i luften. Sådan information krävs för att bedöma om användningen av mikroorganismen som biologiskt bekämpningsmedel kan medföra en ökad total luftexponering av människor för mikroorganismer, eller om det biologiska bekämpningsmedlet är försumbart jämfört med normal bakgrundsexponering för andra mikroorganismer. En anledning till svårigheterna är att det tills nyligen saknats praktiska mätmetoder för detektion och kvantifiering som är tillräckligt specifika för enskilda bakterie- eller svampstammar.

En möjlighet att följa populationer av introducerade organismer är att utnyttja DNA-baserade "fingerprinting"-metoder, som i första hand utvecklats för typning av nya okända stammar. I en av dessa metoder, RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) används korta, slumpmässigt valda, ospecifika PCR-primrar för detektion av stamspecifika avsnitt av DNA. Genom sekvensering av sådana unika DNA-avsnitt ges möjlighet att utveckla PCR-primrar som är specifika för just dessa regioner. Denna typ av stamspecifika markörer kallas SCAR-markörer (Sequence-Characterised Amplified Region). En stor styrka med SCAR-metoden är att den är tillämplig för såväl eukaryoter (inklusive svampar) som för bakterier. SCAR-markörer har utvecklats för vitt skilda organismtyper, inklusive sådana med potential för biologisk bekämpning (Hermosa et al. 2001; Isenegger et al. 2001; Dauch et al. 2003). Däremot har denna typ av markör hittills använts ganska lite i riktiga fältstudier. Förutom att SCAR-markörer ger möjlighet att följa utvecklingen hos de introducerade organismerna har de också stor potential att ge information om organismers naturliga

utbredning. I sitt ursprungliga utförande indikerar metoden enbart om en organism förekommer eller inte, varför det är naturligt i vårt projekt att göra metoden kvantitativ, genom användning av Realtids-PCR (Levin 2004).

2. Syfte

Syftet med detta projekt är att utveckla och använda stamspecifika, genetiska SCAR-markörer för mikroorganismer använda för biologisk bekämpning inom jordbruket. Markörerna utnyttjas för undersökningar av organismernas populationsutveckling efter utsättning, inklusive deras spridning via partiklar i luften. Den nya kunskapen ökar förutsättningarna för ett rationellt och effektivt registreringsförfarande för mikrobiologiska bekämpningsmedel, och bidrar därför till att svenska odlare får tillgång till fler sådana miljövänliga produkter.

3. Material och metoder

Organismer

I projektet har vi valt att fokusera på tre organismer verksamma för biologisk bekämpning av växtsjukdomar i jordbruket: (a) En gram-negativ bakterie, *Pseudomonas brassicacearum* MA250 ("DOM8"), med stark suppressiv effekt mot snömjöl på vete (orsakat av *Fusarium spp.* och *Microdochium nivale*), vid behandling av utsäde med bakterien. (b) Två svampstammar hörande till *Trichoderma atroviride* resp. *T. parapiluliferum*, vilka används tillsammans i biologiska bekämpningsmedel mot svampangrepp, saluförda av det svenska företaget Binab BioInnovation AB (<http://www.algonet.se/~binab/>).

Vid sidan av dessa stammar odlas flera både när- och obesläktade organismer som referensorganismer för testning av SCAR-markörernas specificitet, särskilt organismer som kan misstänkas förekomma i målmiljöerna.

Experimentellt arbete

Med hjälp av RAPD-PCR identifierades flera DNA-sekvenser i DOM8-bakterien som föreföll vara specifika för denna. Därefter konstruerades PCR-primrar för specifik detektion av dessa DNA-avsnitt i olika typer av prover. En av primrarna (OPA2-73) har också använts för framtagning av en Realtids-PCR-metod (ABI7000-system från Applied Biosystems), så att vi nu även kan kvantifiera bakteriens förekomst i miljöprover. Specificiteten hos markörerna verifierades ytterligare med Southern Blot.

Markörerna för DOM8 användes först i en undersökning av bakteriens överlevnad och kolonisering av växten (höstvete) i krukförsök i växthus. Bakterien applicerades genom betning av utsädet. Jord- och växtprover samlades in och populationsstorleken på växtens olika delar bestämdes genom analys av proverna med den utvecklade markörtekniken. I försöken användes ett par olika smittade utsäden, och försöksleden var obehandlat, kemiskt bekämpningsmedel, samt betning med olika mängder av vått fermentat respektive torkade celler av DOM8-bakterien.

För en fullständig belysning av hur utsatta populationer av DOM8 utvecklas över tiden krävs även riktiga fältförsök. Vi har därför samlat in prover från fältförsök med liknande uppställning med höstvetete som i växthusförsöken. Fältförsöken utfördes på Hushållningssällskapets försöksytor i Hedemora samt Tierp (två provtillfällen). Proverna analyseras med SCAR-markörerna vinter och vår 2008.

I projektets förlängning kommer prover av luftpartiklar att samlas in i anslutning till odling av DOM8-bakterien, samt vid applicering och följande hantering av det betade utsädet. Eventuellt kan det även bli aktuellt att gå in i kompletterande växthus- eller fältförsök.

Även för de två *Trichoderma*-stammarna har vi använt RAPD-PCR för identifiering av unika DNA-sekvenser. Två nya primerpar syntetiserades, vars specificitet för Binabs stammar konfirmerades genom jämförande tester med DNA från referensorganismer. Under våren 2008 utvecklar vi realtids-PCR-metodik, som kommer att möjliggöra kvantifiering även av dessa två svampar i prover från miljö. Samarbetet med Binab har gett oss utmärkta möjligheter att utse relevanta försök för undersökningar av svamparnas populationsdynamik under realistiska fältförhållanden. Den ena lokalen är golfgreenen på Örestads golfklubbs banor. Vi tar också prover från växthusodlingar av jordgubbar i Belgien, vilket möjliggjorts genom Binabs samarbete med det Belgiska företaget Biobest Biological Systems.

4. Resultat och diskussion

Projektfakta och personal

Projektet planerades från första början att drivas av en doktorand. Anna-Ida Johnsson Holmberg rekryterades vintern 2005 och anställdes från och med maj 2005, med Ingvar Sundh som huvudhandledare och Petter Melin som biträdande handledare. Projektet är således i dagsläget (mars 2008) inte avslutat och Johnsson Holmberg planerar att disputeras i november 2009. Vi har alltså nödgats finna annan finansiering för projektets två avslutande år. Verksamheten drivs associerad till det MISTRA-finansierade programmet DOM (Domesticering av mikroorganismer: <http://www.mistra.org/dom>) vid Inst. f. mikrobiologi, SLU, i vilket Sundh leder arbetet med säkerhetsfrågor. Melin gjorde en post-doc vid Nottinghams universitet, England, juli 2006 – juni 2007, men höll under denna period regelbunden kontakt med Johnsson och Sundh. Melin tillträdde 1 januari 2008 en forskarasistenttjänst vid vår institution, men fortsätter inom ramen för den samarbetet med Johnsson Holmberg och Sundh. Höstterminen 2005 gjorde Hamid Sharifi ett 20p examensarbete inom projektet. Sharifi identifierade markörsekvenser hos en aktinobakterie.

Kort sammanfattning av projektets framåtskridande

I stort sett så framskrider projektet efter planerna. Johnsson har hittills lagt mesta energin på DOM8-bakterien. Arbetet har varit krävande men framgångsrikt. Johnsson har utvecklat en realtids-PCR-metod för kvantitativ bestämning av bakteriens förekomst i växt- och jordprover. Med denna metod har vi genomfört en studie av bakteriens överlevnad och kolonisering av växten i krukförsök med höstvetete (se nedan för mer detaljer). Prover har också samlats in från de riktiga fältförsök där

DOM8-bakterien har använts. Dessa prover analyseras nu med markörtekniken.

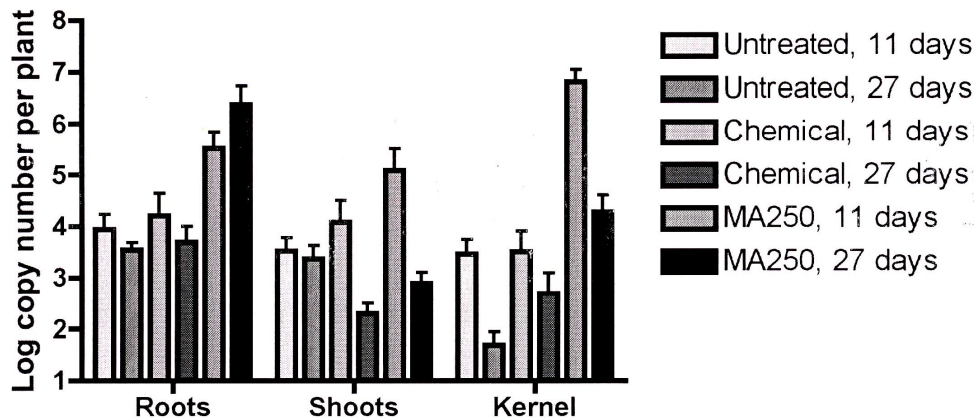
Under projektets gång har vi fått anledning att delvis omvärdera valet av organismer. Vi påbörjade under 2007 inom DOM-programmet ett samarbetsprojekt med Binab BioInnovation AB. Detta gav oss möjlighet att jobba med deras produkter för biologisk bekämpning, vilka är baserade på två olika arter filamentösa svampar av släktet *Trichoderma*. I samarbetsprojektet utvecklar Melin SCAR-markörer för *Trichoderma*-svamparna (se nedan för mer detaljer). Johnsson Holmberg tar nu en aktiv del i *Trichoderma*-studierna, medan de planerade försöken med jästsvampen *Pichia anomala* J121, som kan användas för ”biokonservering” av spannmål, har lagts åt sidan.

Johnsson Holmberg har också hunnit vara mycket aktiv på kurssidan och klarat av totalt 27 poäng i doktorandutbildningen (se nedan). Vidare har hon presenterat resultat från projektet vid flera internationella konferenser. Hon bidrog också till handledningen av examensarbetaren i projektet.

Experimentellt arbete: DOM8-bakterien

Två olika SCAR-markörer för DOM8-bakterien identifierades med RAPD-PCR, OPA2-73 och OPX12-535. Analysen med Southern Blot visade att bakterien innehåller en kopia av OPA2-73, vilken användes för Realtids-PCR. Detta gör att vi direkt kan översätta analysresultaten från Realtids-PCR till antal bakterieceller i proverna.

I växthusförsöken med *P. brassicacearum* MA250 gav analyserna med markören OPA2-73 flera viktiga insikter. Bland annat kunde bakterien detekteras på växtens alla delar, även de överjordiska. Vidare visade analyserna tydligt att den inympade bakteriepopulationen fortlevde på växten i åtminstone tre veckor efter sådd. Celltätheten av MA250 på plantor som behandlats med bakterien var genomgående högst på fröet och rötterna. Tätheten på rötterna varierade från ungefär 10^6 till 10^8 celler per gram rotvävnad, vilket var flera tiopotenser högre än på obehandlade plantor. Det fanns också en tydlig tendens att mellan dag 11 och 27 efter sådd, så minskade totala cellantalet på det gamla fröet, medan det ökade på rötterna. Ett manuskript som sammanfattar resultaten av detta försök är i stort sett klart (se Resultatförmedling och publicering nedan), och skickas in för publicering under april 2008.



Grafen visar totala cellantalet av DOM8 på olika växtdelar i prover från växthusförsöket med höstvet, insamlade 11 och 27 dagar efter sådd. Fröbehandlingarna var en obehandlad kontroll, konventionell kemisk behandling, samt betning med bakterien. Frö, blad och rötter analyserades separat. Resultaten visar att växtdelar från de bakteriebehandlade veteplantorna har högre kopicantal än övriga behandlingar, samt att MA250 återfinns på växtens alla delar. Förekomsten i obehandlad och kemisk kontroll representerar sannolikt naturlig bakgrund. Tidsjämförelsen visar att MA250 sannolikt tillväxer i anslutning till rötterna. Observera att y-axeln är logaritmisk.

Sammanfattningsvis gav alltså markörerna mycket användbar information om bakteriens populationsutveckling i krukförsöken. Det blir därför mycket intressant att senare under 2008 ta del av resultaten från undersökningarna i fältförsöken.

Experimentellt arbete: Trichoderma-svamparna

Vid starten av detta projekt ansågs de två stammarna i Binabs biologiska bekämpningsmedel höra till arterna *Trichoderma harzianum* och *Trichoderma polysporum*. Vi och andra forskargrupper har dock parallellt med hjälp av 18S rDNA-sekvensering visat att den förstnämnda varit felidentifierad och skall heta *T. atroviride*. Utifrån sekvenseringarna har vi kunnat visa att även *polysporum*-stammen egentligen är en annan art, nämligen *T. parapiluliferum*. Här är det dock inte frågan om någon felidentifiering utan att arten nyligen delats upp i flera olika arter. Det unika med detta projekt är att vi jobbar med en produkt som innehåller två olika antagonistiska svampar för biologisk bekämpning.

Arbetet med att framställa markörer för *Trichoderma*-stammarna initierades i augusti 2007. Vi har nu konstruerat SCAR-primrar för båda *Trichoderma*-isolaten. I praktiken är båda primerparen stamspecifika och i dagsläget utvecklas en metod för kvantifiering. Markörerna kommer att testas i nu pågående försök med applicering av svamparna på golfgreener samt i jordgubbsodlingar.

Sammanfattning av det experimentella arbetet

- Två specifika SCAR-markörer för DOM8 (*Pseudomonas brassicacearum*) har identifierats och sekvenserats.
- Specificiteten hos den ena markören har verifierats även med Southern Blot, vilket också har visat att markören förekommer i en kopia.
- En realtids-PCR-metod för kvantitativ bestämning av bakterien DOM8 i prover från

miljön har tagits fram.

- Med användning av markörtekniken har en undersökning av utvecklingen hos inympade populationer av DOM8 genomförts i krukförsök i växthus.
- Prover från fältförsök i Hedemora och Tierp (två provtillfällen) analyseras med markörerna under vinter/vår 2008.
- Utifrån sekvensering av ITS-regioner, RAPD-analyser samt tillväxtbetingelser och morfologi har vi kunnat korrigera *Trichoderma*-stammarnas taxonomi.
- Flera potentiella SCAR-markörer för *Trichoderma*-svamparna har identifierats med RAPD-metoden.
- Ett specifikt primerpar för vardera *Trichoderma*-stammen har konstruerats.

Kurser och övriga aktiviteter

Johnsson Holmberg har redan klarat av 27 poäng av de 30 som krävs i forskarutbildningen.

Hon har sedan juni 2006 varit doktorandrepresentant för SLU i NOVA University Network, som samlar nordiska skogs-, veterinär- och jordbruksuniversitet. Hon har också hjälpt till i undervisningen vid heminstitutionen. Johnsson Holmberg var även från november 2005 till juli 2007 doktorandrepresentant i styrgruppen för forskarskolan Focus on Soils vid SLU. Styrgruppen sammanträder tre till fyra gånger per år.

Resultatförmedling och publicering

Det är en styrka för projektet att vi förutom direkt förmedling till vetenskapssamhället via publicering i tidskrifter och presentationer på konferenser (se lista nedan), kan utnyttja den regelbundna resultatförmedlingen i MISTRA-programmet DOM. På detta sätt sprids framsteg och resultat i projektet även till myndigheter och näringen. De viktigaste kanalerna är: a) DOM:s årsvisa, skriftliga rapporter. Dessa skrivs fr.o.m. 2006 på engelska och sprids till en internationell målgrupp. b) Rapportering till programmets referensgrupp (representanter från myndigheter, industri, forskningsinstitut och organisationer) vid årliga möten. c) DOM:s hemsida riktad mot allmänheten, vetenskapssamhället och industrin (<http://www.mistra.org/dom>).

Manuskript

Johnsson Holmberg, A.-I., P. Melin, J.P. Levenfors, and I. Sundh. 2007. Development and evaluation of SCAR markers for a *Pseudomonas brassicacearum* strain used in biological control of snow mould. Manuskript skickas in till tidskrift i april 2008.

Presentationer vid konferenser

Johnsson, A.-I., P. Melin, and I. Sundh. 2005. Development of strain-specific genetic markers for ecological studies of microorganisms used in environmental applications. Poster-presentation vid: Focus on Soils Symposium – "Managing Soils for the Future", Uppsala 14-16 september 2005.

Johnsson, A.-I., P. Melin, and I. Sundh. 2006. Development of SCAR markers for detection and quantification of a *Pseudomonas brassicacearum* strain used in biocontrol of snow mould. Poster-presentation vid: MASE Conference, Microbial Activity for a Sound Environment, Uppsala, 28-30 juni 2006.

Johnsson, A.-I., P. Melin, and I. Sundh. 2006. Development of SCAR markers for detection and quantification of a *Pseudomonas brassicacearum* strain used in biocontrol of snow mould. Poster-

presentation vid: ISME-11 (International Society for Microbial Ecology), Wien, 20-25 augusti 2006 (ej samma poster som vid MASE-konferensen).
 Johnsson, A.-I., P. Melin, J.P. Levenfors, and I. Sundh. 2007. Strain-specific quantification in soil and plant parts of a *Pseudomonas brassicacearum* used in biocontrol of snow mould.
 Posterpresentation vid: BAGECO-9, Wernigerode, 23-27 juni 2007.

Examensarbete

Hamid R. Sharifi (2006) Development of strain-specific genetic markers for studies of natural populations of an Actinobacterium, *Rhodococcus wratislawiensis* (DSM 44126).

5. Kommentarer om projektets ekonomi

SLF beviljade endast ca två tredjedelar av sökta medel för tre år, med hänvisning till att bara två av de tre mikrobiologiska tillämpningar som ursprungligen avsågs att studeras i projektet faller under SLF:s ansvarsområden. Tack vare att doktoranden började först i maj 2005 och avlönades med utbildningsbidrag de två första åren, så klarade vi ändå precis budgeten t.o.m. december 2007 på enbart SLF-anslaget. Vi räknar med att Johnsson Holmberg disputerar i slutet av 2009. Medel för projektets andra hälft måste alltså tas från annan källa.

Johnsson Holmberg har sökt och erhållit två resebidrag: (1) 2214 SEK från Rådet för forskarutbildning vid SLU (FUR), för NOVA-kursen ”Bioremediation of Boreal Soils”; och (2) 9000 SEK ur ”Jubileumsdonationen” från Knut och Alice Wallenbergs stiftelse avseende konferensresa till ISME-11, Wien.

6. Citerad litteratur

- Dauch AL, Watson AK, Jabaji-Hare SH (2003) Detection of the biocontrol agent *Colletrotrichum coccodes* (183088) from the target weed velvetleaf and from soil by strain-specific PCR markers. *J Microbiol Methods* 55: 51-64
- Druvefors U, Jonsson N, Boysen ME, Schnürer J (2002) Efficacy of the biocontrol yeast *Pichia anomala* during long-term storage of moist feed grain under different oxygen and carbon dioxide regimens. *FEMS Yeast Res* 2: 389-394
- Hermosa MR, Grondona I, Díaz-Mínguez JM, Iturriaga EA, Monte E (2001) Development of a strain-specific SCAR marker for the detection of *Trichoderma atroviride* 11, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. *Curr Genet* 38: 343-350
- Isenegger DA, Taylor PWJ, Ford R, Franz P, McGregor GR, Hutchinson JF (2001) DNA fingerprinting and genetic relationships of potato cultivars (*Solanum tuberosum* L.) commercially grown in Australia. *Aust J Agric Res* 52: 911-918
- Levin RE (2004) The application of real-time PCR to food and agricultural systems. A review. *Food Biotechnol* 18: 97-133
- Melin P, Sundh I, Håkansson S, Schnürer J (2007) Biological preservation of plant derived animal feed with antifungal microorganisms: Safety and formulation aspects. *Biotechnol Lett* 29: 1147-1154
- Montesinos E (2003) Development, registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection. *Int Microbiol* 6: 245-252
- Punja ZK, Utkehede RS (2003) Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. *Trends Biotechnol* 21: 400-407
- Whipps JM (2001) Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J Exp Bot* 52: 487-511
- Wilson CL, Wisniewski ME (1989) Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: an emerging technology. *Ann Rev Phytopathol* 27: 425-441