

# VEELZIJDIGHEID VAN STREPTOMYCES EN RHODOCOCCLUS: NIEUWE AGRO-AGENTIA TEGEN TOXIGENE PLANT PATHOGENEN

BIOCHEMISCHE EN MOLECULAIRE ANALYSE

ACADEMIEJAAR 2021-2022

Groep 1.3.4. :

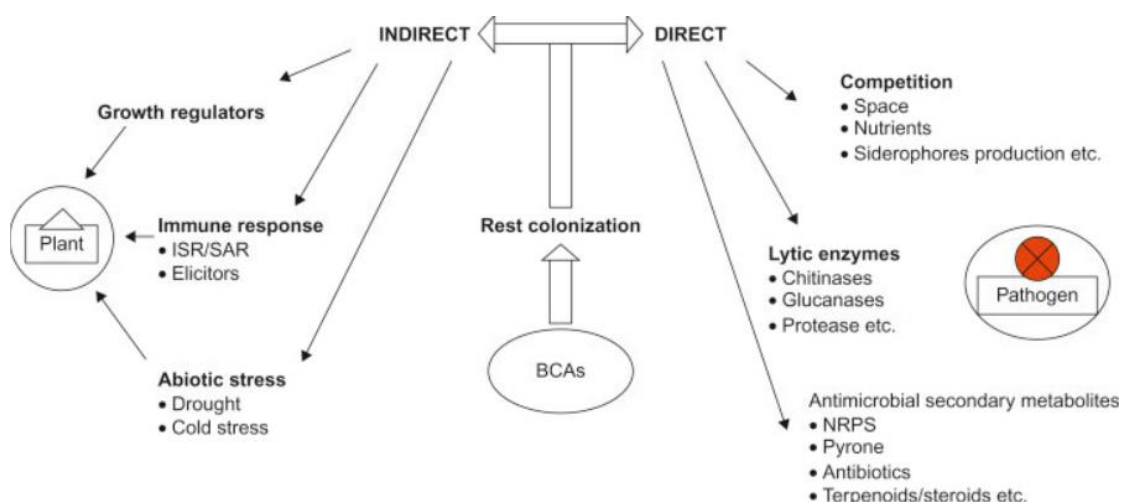
Jesse Goeman  
Dries Ausloos  
Lennert Scholiers

## 1. Introductie

Met een steeds groeiende wereldbevolking stijgt de vraag naar gewassen die een lagere gevoeligheid hebben tegenover plant pathogenen. Deze pathogenen veroorzaken aanzienlijke economische schade en verminderen de voedselzekerheid op huishoudelijk, nationaal en mondiaal niveau. Een verlies 28.1% van de gewasopbrengst bij granen wordt toegeschreven aan plantenziekten (Savary et al., 2019). *Fusarium head blight* (FHB) is een gevreesde fungale ziekte die voorkomt bij graangewassen, die een verlies tot 40% in opbrengst veroorzaakt bij granen (Tan et al., 2020). FHB wordt veroorzaakt door een *Fusarium*-species complex van onder meer *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. poae* en *F. graminearum*, waarbij *F. graminearum* de meest dominante species is. Naast de aanzienlijke economische schade zorgt FHB eveneens voor de productie van trichothecenen, mycotoxines die als schadelijk worden beschouwd tegen mens en dier.

Door de toenemende belangstelling naar de negatieve effecten van fungiciden wordt *Integrated pest management* (IPM) gepromoot als aanpak voor de preventie en/of onderdrukking van organismen die schadelijk zijn voor planten, zoals onder meer *Fusarium* species. IPM wordt omschreven als een manier van bestrijding die de nadruk legt op de groei van een gezond gewas met zo min mogelijk verstoring van agro-ecosystemen en stimuleert eveneens natuurlijke plaagbestrijdingsmechanismen als biocontrole (Directorate-General for Health and Food Safety, n.d.).

In dit onderzoek wordt de effectiviteit van *Streptomyces* sp. en *Rhodococcus* sp. tegen *Fusarium* als biocontrole onderzocht. Zowel *Streptomyces* en *Rhodococcus* behoren tot de actinobacteriën. Actinobacteriën hebben een directe en indirecte werking als biocontrole tegen plantenziekten (fig. 1). Onder directe werking tegen plant pathogenen worden mechanismen als de productie van antimicrobiële metabolieten, lytische enzymen (die de celwand afbreken van de pathogenen) en competitie voor plaats en nutriënten aanzien. Indirecte werking heeft voornamelijk betrekking tot het triggeren van het afweersysteem van de plant.



Figuur 1: Overzicht van het biocontrolemechanismen van actinobacteriën (Sharma & Salwan, 2018)

Aan de start van deze practica zijn er per groepje twee epjes met bacteriën voorzien. Aan de hand hiervan werden er volgende onderzoeksvragen opgesteld: Met welke bacteriën hebben we te maken en zijn deze bacteriën werkzaam tegen *F. graminearum* in tarwe?

## 2. Materiaal en methoden

### Practicum 1: DNA-extractie

Tijdens het eerste practicum werd het genomisch DNA (gDNA) uit de bacteriën, die zich bevinden in vloeibaar medium, geëxtraheerd via een DNA-extractie protocol voor actinobacteriën. De DNA-extractie werd uitgevoerd met twee isolaten (A en B) in drievoud.

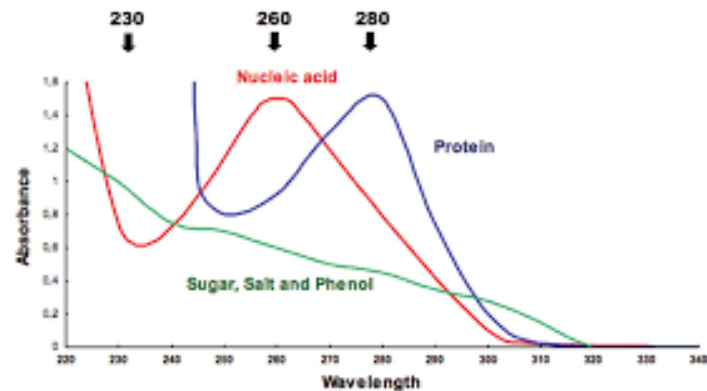
#### DNA-extractie:

1. Re-suspendeer beide pellets in 1200  $\mu$ L Na-EDTA, Na-EDTA: 0.15 M NaCl, 0.1 M EDTA, pH 8.0
2. Voeg lysozyme toe in een finale concentratie van 1 mg/ml  
De concentratie van de stockoplossing was 100 mg/ml en dus werd er 12  $\mu$ L van de stockoplossing toegevoegd aan de 2 epjes met de pellets en Na-EDTA.
3. Incubatie bij 37°C voor 45 minuten
4. Voeg 30  $\mu$ L 1% proteinase K en 30  $\mu$ L 25% SDS toe aan oplossing. Aanwezige proteinase K had een concentratie van 2%, dus toevoeging van 15  $\mu$ L aan beide oplossingen was nodig.
5. Incubatie bij 55°C voor 30 minuten
6. Centrifugatie van beide oplossingen bij 15000G voor 5 minuten.  
DNA bevindt zich nu in het supernatans.
7. Pipeteer uit het supernatans telkens 3x 200  $\mu$ L in een ander epje om zo verder te werken in drievoud: A1-A3 en B1-B3, waar de letters verwijzen naar de isolaten A en B, respectievelijk.
8. Centrifugatie van alle epjes bij 10000G voor 15 min.  
Er worden 3 lagen in de epjes verkregen. DNA bevindt zich nu in de bovenste laag
9. 200  $\mu$ L van de bovenste laag wordt gepipetteerd in nieuwe epjes (opnieuw gelabeld A1-A3 en B1-B3).
10. Precipitatie van het DNA d.m.v. toevoegen 60  $\mu$ L natriumacetaat 0.3 %vol.
11. Incubatie bij -20°C voor 10 minuten
12. Centrifugatie van alle epjes bij 18000G voor 10 min.
13. Weg pipetteren van het bekomen supernatans, gevolgd door wasstap met 70% EtOH
14. Centrifugatie van alle epjes bij 18000G voor 10 min.
15. Supernatans voorzichtig weg-pipetteren en de pellets laten drogen bij 55 °C
16. Re-suspenderen van de pellets in 20  $\mu$ L TE-buffer

Vervolgens werd een DNA-kwantificatie uitgevoerd met behulp van een QuantiFluor® dsDNA System.

#### DNA-kwantificatie:

1. Voeg 100  $\mu$ L working solution en 99  $\mu$ L TE-buffer samen toe in een 0.5mL PCR-tube.  
Herhaal dit zes keer voor de zes stalen die bekomen zijn na de DNA-extractie
2. Voeg 1 $\mu$ L staal toe aan de bekomen 0.5 mL PCR-tubes voor elk van de bekomen stalen (A1-A3 en B1-B3).
3. Homogeniseer door op en neer te pipetteren.
4. DNA-kwantificatie in QuantiFluor® dsDNA System bij 260 nm



*Figuur 2: detectie van DNA door fotometrische metingen*

#### Practicum 2: Primer Design & PCR

Bij het tweede practicum werd het opgezuiverde gDNA uit het eerste practicum geamplificeerd. Als voorbereiding op de amplificatie door middel van PCR werd op voorhand een primerpaar opgesteld. Er werd gekozen voor 27F als forward primer met sequentie 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG en voor 1492R als reverse primer met sequentie 5'-GGTACCTTGTTACGACTT. Dit primerpaar zal binden op een geconserveerde regio binnen het 16S RNA gen. Van de zes samples vanuit practicum 1 werd er gekozen voor A1, A2, B2, B3. Dit omdat deze de hoogste hoeveelheid gDNA hadden en de minste onzuiverheden (zie tabel 1).

### Polymerase chain reaction

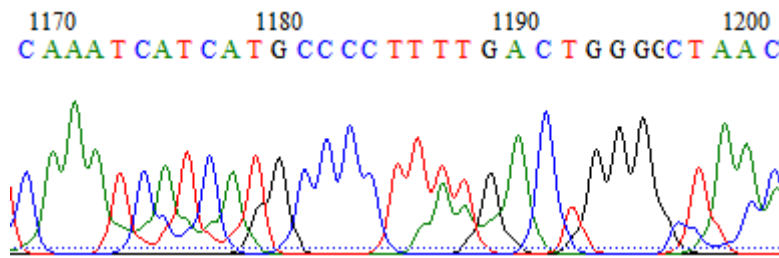
1. Plaats de vier stalen A1, A2, B2 en B3 op ijs.
2. Pipetteer van elk staal 1  $\mu$ l van het gDNA in een PCR-tube en label deze. Pipetteer het DNA zeker goed in de bodem van de tube zodat de 1  $\mu$ l niet tegen de wanden kleeft.
3. Maak de PCR-mix aan met een totaal volume van 20  $\mu$ l  
Voeg 4  $\mu$ l GoTaq reactiebuffer toe  
Voeg 2  $\mu$ l dNTPs toe  
Voeg 1  $\mu$ l F27 primer toe  
Voeg 1  $\mu$ l R1492 primer toe  
Voeg 0,1  $\mu$ l GoTaq toe  
Voeg 11,9  $\mu$ l moleculair water toe
4. Schud het reactiemengsel zachtjes
5. Uitvoeren PCR-protocol met behulp van een Thermal cycler  
Stap 1: 94°C gedurende 5 minuten  
Stap 2: 94°C gedurende 30 sec  
Stap 3: 50°C gedurende 30 sec  
Stap 4: 72°C gedurende 40 sec  
Stap 5: 72°C gedurende 10 minuten  
Stap 6: 4°C om het staal te bewaren

} 25 cycli

### DNA gel elektroforese van de amplicons

1. Maak een 1% agarose gel oplossing aan in 1 X TAE buffer
2. Los de agarose op door de oplossing te koken
3. Laat 25 minuten op kamertemperatuur staan om te voorkomen dat de plasticen bakjes smelten
4. Giet de gel uit en laat staan voor 30 minuten
5. Laad de samples  
2  $\mu$ l van molecular weight marker  
5  $\mu$ l van amplicons + 1  $\mu$ l van loading dye
6. Run de gel voor 30 minuten onder een constante spanning van 120V
7. Zet in een EtBr bad voor 25 minuten
8. Visualiseer door gebruik te maken van BioRad GelDoc system en de corresponderende software

De opgezuiverde amplicons werden opgestuurd naar Igc genomics in Duitsland die de sanger sequencing hierop uitvoerde. De data die hiermee verkregen werd, werd verwerkt door middel van het programma BioEdit. De pieken aan het begin en einde van de sequenties die niet meer mooi van elkaar te onderscheiden waren, werden verwijderd (fig. 3). Hierna werd het reverse complement van de sequentie afkomstig van de reverse primer R4192 gekopieerd bij de sequentie afkomstig van de forward primer F27. Er werd een ClustalW Multiple Alignment uitgevoerd en het resultaat hiervan werd geblast in ncbi (*National Center for Biotechnology Information*, n.d.).



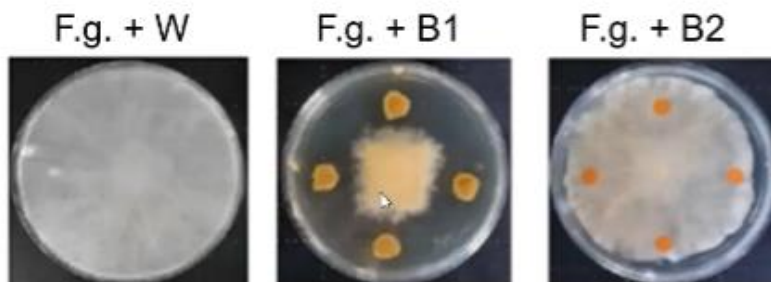
Figuur 3: niet onderscheidbare pieken in BioEdit software

### Practicum 3: Detached leaf assay

Bij het derde en laatste practicum van deel 1 gaan we bekijken of onze bacteriën effectief werkzaam zijn tegen *F. graminearum*.

#### Voorafgaand onderzoek

In-vitro testen waarin bacterie 1 en bacterie 2 (staal A en B respectievelijk) getest werden op een plaat.



Figuur 4: in vitro testen van beiden stalen op *F. graminearum* (bacteriën op de vierkantjes en schimmel in het midden)

Hieruit kunnen we besluiten dat bacterie 1 in vitro een goeie werking heeft tegen de schimmel terwijl bacterie 2 schijnbaar geen werking heeft. Bij practicum 3 gaan we deze werkingen testen in een detached leaf assay om te verifiëren of de in vitro bevonden resultaten representatief zijn voor de echte resultaten.

#### Sporensuspensie maken

##### Benodigdheden:

1. gegroeide *F. graminearum* plaat (GFP getagde kolonie opgegroeid op potato dextrose agar)
2. PBS + 0.1% tween (zodat de sporen niet geclusterd blijven)
3. Drigalski spatel om de sporen lost te maken van de plaat
4. Miracloth om het mycelium van de sporen te onderscheiden
5. Falcon om te filteren

### Protocol

1. Steriliseer Drigalski spatel in een vlam (Alles onder een flow)
2. PBS + tween op de plaat ( F. g) gieten tot de plaat volledig bedekt is
3. Geautoclaveerde miracloth in falcon houden als filtermateriaal en de inhoud van het plaatje in de falcon gieten (in de falcon resteert enkel de sporensuspensie)
4. Sporen tellen (want we willen  $10^6$ /ml toevoegen aan de plaat) met de Bürker telkamer

### Eigenlijke detached leaf assay

#### Vorbereiding

Bladstukjes klaarleggen

Sporensuspensie maken (zie hierboven)

Bacteriesuspensie maken

#### Benodigdheden

- Scalpel
- Tarweplanten (10 dagen oud)
- One well plate (gevuld met water agar en 40 mg/mL benzimidazole met template om blaadjes te leggen)
- Fusarium en bacteriën sporensuspensie

#### Practicum

Verwonden van de blaadjes en inoculeren volgens tabel 1. Het aangebrachte wondje op tarweblad 1 werd geïnoculeerd met *F. graminearum* om zo aan te tonen dat het virus werkt en vals negatieve resultaten te ondervangen. Aan blad 2 en 3 werden respectievelijk bacterie 1 en 2 toegevoegd als negatieve controle om vast te stellen dat er geen vals positieve resultaten zouden optreden. Op blad 4 en 5 werd *F. graminearum* samen met de bacteriën geïnoculeerd om de werking van de bacteriën te evalueren. Op blad 6 werd het wondje geïnoculeerd met psychrotrophic bacterium consortium (PBC); een veelzijdige en complexe gemeenschap van psychrotrofe bacteriën.

Behandeling	<i>F. graminearum</i> (µL)	Bacterie 1 (µL)	Bacterie 2 (µL)	PBS (µL)	leaf
<i>F. graminearum</i> (controle)	5			5	Leaf 1
Bacterie 1 (controle)		5		5	Leaf 2
Bacterie 2 (controle)			5	5	Leaf 3
<i>F. graminearum</i> + bacterie 1	5	5			Leaf 4
<i>F. graminearum</i> + bacterie 2	5		5		Leaf 5
PBC (controle)				10	Leaf 6

Tabel 1: Overzicht inoculatie en controles tarwebladeren

### Protocol

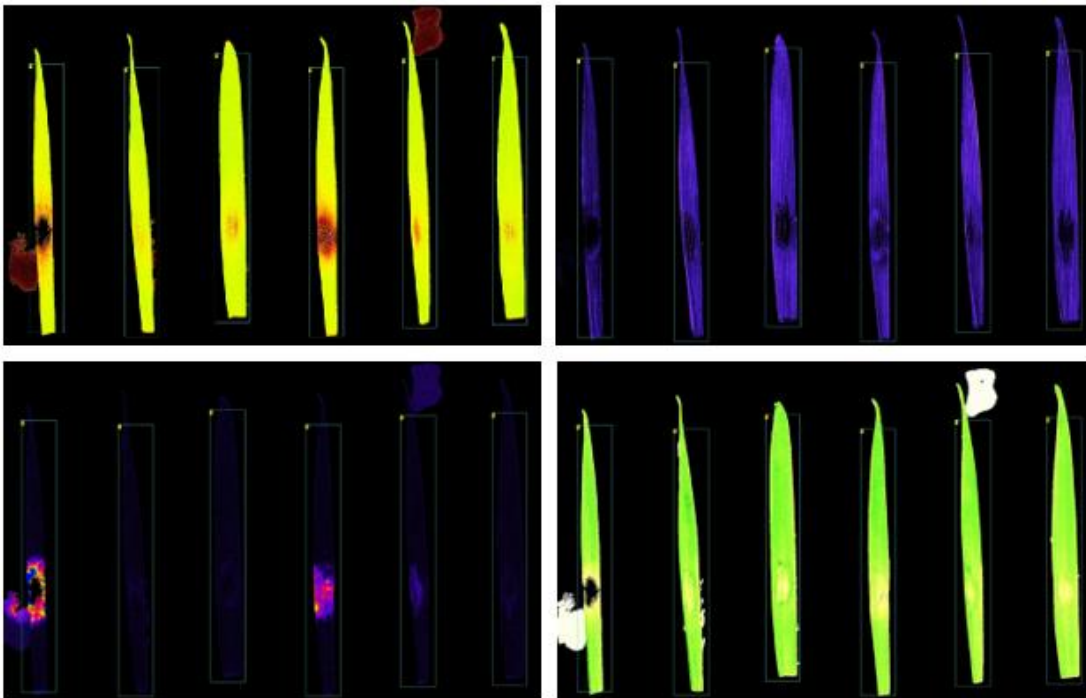
1. Bladstukjes van tarwe met scalpel verwonden
2. De wondjes inoculeren volgens bovenstaande tabel (ook het opstellen van de controles)
3. Opvolgen met foto's doorheen de tijd (dag 0, dag 1 en dag 2)

### Opvolging experiment

- Gebruik maken van multispectral imaging via de Pathoviewer, hiermee werden volgende parameters gemeten:
  - Fv/Fm waarde (maat voor de efficiëntie van fotosysteem 2)
  - ChlI dx index (chlorofyl index voor het kwantificeren van de groenheid van het blad)
  - mARI waarde (maat voor de foto-oxidatieve stress)
  - cGFP waarde (maat voor het gecorrigeerde GFP signaal)

### Verwerking data-analyse via CropReporter

De data verkregen tijdens de drie meetpunten werd verwerkt d.m.v. de software CropReporter. Via de functie Stretch werd voor zowel Fv/Fm, ChlI dx, ArI dx, cGfp en color de zichtbaarheid verbeterd op het scherm. De functie Mask werd gebruikt om een 'Mask' over de foto's heen te brengen om zo het aandeel back noise te verminderen en deze werd ingesteld op 600. Nadat dit in orde gebracht was, werd de functie ROI (region of interest) gebruikt om de tarwebladeren te selecteren met kaders. Dit werd gedaan voor negen foto's, één van elke plaat tijdens de drie meetmomenten. Een voorbeeld van de uitkomst van een van de meetmomenten is te zien in figuur 5. De data hieruit verkregen werd verwerkt in excel tot vier staafdiagrammen zichtbaar onder puntje 3: Resultaten.



*Figuur 5: linksboven; Fv/Fm, rechtsboven; ArI dx, linksonder; cGfp, rechtsonder; ChlI dx*

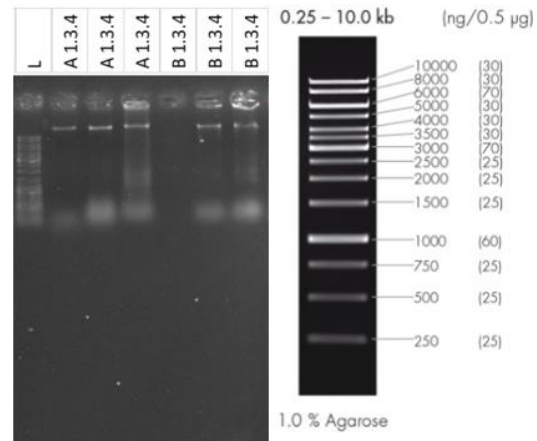


### 3. Resultaten

#### Practicum 1: DNA-extractie

Staal	ng/ $\mu$ L dsDNA
A1	3.02
A2	1.27
A3	2.35
B1	Foutief
B2	1.37
B3	3.86

Tabel 2: Resultaten DNA-kwantificatie



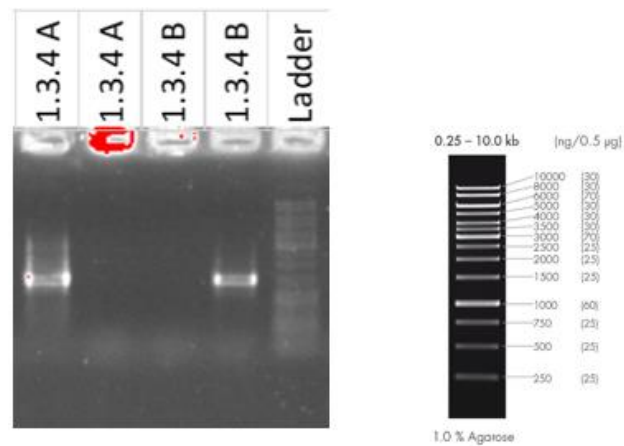
Figuur 6: links resultaat van de gel elektroforese van na extractie gDNA en rechts DNA-ladder peqGOLD 1kb.

De grootte van het gDNA van actinobacteriën, zoals *Streptomyces sp.* en *Rhodococcus sp.*, varieert tussen de 2 en 10 Mb (Gao & Gupta, 2012; Guevara et al., 2019). Aangezien de ladder een bereik heeft van 0.25- 10.0 kb wordt er verwacht dat het gDNA, indien aanwezig, waargenomen kan worden boven de ladder. Uit Figuur 1 kan afgeleid worden dat bij de stalen A1-A3 en B2-B3 een band wordt waargenomen boven de peqGOLD 1 kb ladder. De staal B1 werd niet opgeladen op de gel aangezien de DNA-extractie foutief verliep voor B1.

Verder is er op Figuur 1 ook een duidelijke verkleuring onderaan de gel waar te nemen bij elke staal behalve B1; deze verkleuring is bij B1 afwezig aangezien deze niet werd opgeladen op de gel. Aangezien deze banden onderaan waar te nemen zijn, wijst dit op kleine moleculen. Deze banden worden voornamelijk veroorzaakt door primer dimeren en zijn dus niet van belang voor verdere analyse. Verder is er bij A3 een zgn. *uitgesmeerde* band waarneembaar. Deze waarneming werd mogelijk veroorzaakt door een slechtere kwaliteit van het opgeladen staal: eventuele afwijkingen in de voorafgaande PCR procedure gaf mogelijk resultaat in meerdere aspecifieke bindingen, resulterend in een uitgesmeerde band. In dit geval was er echter geen sprake van een PCR procedure, voorafgaand op de gel elektroforese. Mogelijk waren er echter wel onzuiverheden aanwezig zoals RNA of willekeurige DNA fragmenten uit de omgeving. Andere mogelijke oorzaken zijn een gel van minder kwaliteit of een te geconcentreerd staal. Een gel van minder kwaliteit is in dit geval een minder waarschijnlijke oorzaak aangezien de overige stalen op deze gel dit fenomeen niet vertonen. Een te verdund staal lijkt in dit geval ook minder van belang aangezien elk staal op dezelfde wijze is verdund en uit tabel 1 af te leiden is dat de DNA concentraties gelijkend zijn.

Voor verdere sequencing van het gDNA werd er gebruik gemaakt van A1, A2, B2 en B3. Deze stalen werden gekozen aangezien de banden op de gel (Fig.1) aangaven dat er gDNA aanwezig kan zijn. Uit de DNA-kwantificatie (tabel 1) was eveneens duidelijk dat er een voldoende hoge DNA- concentratie aanwezig is. A2 werd verkozen in plaats van A3 aangezien op de gel (Fig.1) te zien is dat A3, zoals eerder vermeld, mogelijk meer onzuiverheden bevat tegenover A2.

## Practicum 2: Primer Design & PCR



*Figuur 7: links resultaat van de gel elektroforese na PCR van geselecteerde stalen en rechts DNA-ladder peqGOLD 1kb*

PCR van het 16S rRNA met als forward primer 27F en reverse primer 1492R resulteert in amplicons met een lengte van circa 1500bp. Met behulp van de peqGOLD 1kb DNA-ladder is het vervolgens mogelijk om af te leiden welke banden op de gel mogelijk afkomstig zijn van amplicons met een lengte van circa 1500bp. In dit geval is de DNA-ladder van lage kwaliteit. Aangezien de DNA-ladder een zwakke verkleuring vertoont is er mogelijk sprake van een lage concentratie. Anderzijds kan een andere samenstelling, of langere looptijd van de gel elektroforese ook leiden tot een betere scheiding van de DNA-ladder. Voor de verdere analyse zorgt de lagere kwaliteit echter niet voor problemen aangezien de verschillende trappen van de ladder net voldoende zichtbaar zijn. Bij staal A1 en B3 is duidelijk een band aanwezig is die overeenkomt met 1500 bp. Dit wijst erop dat de PCR succesvol is doorgegaan en via verdere in silico analyse van deze stalen is het vervolgens mogelijk om de stalen te identificeren. Verder is er op de gel van Figuur 7 opnieuw telkens onderaan een band aanwezig. Dit wijst opnieuw op de aanwezigheid van primer dimeren en andere, kleine aspecifieke bindingen en is dus irrelevant voor verdere analyse.

De in silico verwerking, besproken onder materiaal en methoden, gaf als resultaat dat isolaat A de bacterie *Priestia aryabhatai* is en isolaat B *Streptomyces rimosus*. *P.aryabhatai* behoort tot het fyllum firmicutes en *S.rimosus* het fyllum actinobacteriën. Het gDNA van *P.aryabhatai* heeft een lengte van circa 5 Mbp (Bhattacharyya et al., 2017); dit verklaart de hoge band op Figuur 6, ondanks dat deze bacterie niet tot de actinobacteriën behoort. Uit verscheidene onderzoeken is er al een antifungaal effect van *P.aryabhatai* aangetoond tegen *F. graminearum* (Nzytech, 2015). Aangezien *P.aryabhatai* niet behoort tot de actinobacteriën, maar mogelijk wel een antifungaal effect bezit, zal er in dit practicum toch de antifungale eigenschappen tegen *F. graminearum* verder worden onderzocht. Verscheidene onderzoeken hebben eveneens de antifungale werking aangetoond van *S.rimosus* tegen schimmels zoals *F. graminearum* (Tan et al., 2021). Er wordt in dit verder onderzoek dus verwacht dat beide stalen een antifungale werking zullen vertonen.

### Practicum 3: Detached leaf assay

De grafieken naar waar verwezen wordt in volgende paragrafen staan in de appendix en stellen het gemiddelde voor van de daarin vernoemde parameter voor de drie geobserveerde platen.

Bij grafiek 1 worden de Fv/Fm waardes vergeleken, dit is een maat voor de efficiëntie van fotosysteem 2 (elektronentransport). Een lagere Fv/Fm ratio toont aan dat de geïnspecteerde structuur onderhevig is aan stress. Er wordt verwacht dat het blad waar enkel *F. graminearum* onderhevig is aan de meeste stress. De bladeren waar isolaat A en B in combinatie met *F. graminearum* werden aangebracht zouden een lagere stressfactor moeten hebben terwijl de bladeren waar enkel isolaat A, isolaat B en de PBS-controle werden toegevoegd de kleinste stressfactor mogen hebben. In grafiek 1 is er echter geen beduidend verschil waar te nemen tussen de verschillende bladen. Als we echter enkel kijken naar de Fv/Fm waarden voor plaat twee, is er na 48 uur een duidelijk verschil zichtbaar tussen het blad met enkel *F. graminearum* en de overige bladeren: dit toont aan dat er een lagere efficiëntie van het fotosysteem wordt waargenomen in dit blad, zoals verwacht. Het blad met *F. graminearum* en bacterie 1 (*P.aryabhatai*) heeft na 48 uur een Fv/Fm waarde die gelijkend is op die van een blad met enkel *F. graminearum*, en lager als een staal met *F. graminearum* en bacterie 2 (*S.rimosus*). Dit kan erop duiden dat bacterie 2 een effectievere antifungale werking uitoefent, vergeleken met bacterie 1. Om hierover echter concrete besluiten te kunnen trekken dient er echter een verdere statistische verwerking uitgevoerd te worden.

Grafiek 2 weerspiegelt de ChlIdx index, dit is de chlorofyl index en kan in dit geval gebruikt worden om te kwantificeren hoe groen een blad is. Opnieuw wordt er verwacht dat de controles (zie tabel 1) het meest groen zijn, terwijl het blaadje met enkel *F. graminearum* inoculatie de laagste chlorofylwaarde heeft. Opnieuw is er nauwelijks een verschil te bemerken tussen de verschillende blaadjes. Als er echter opnieuw gekeken wordt naar de grafiek met ChlIdx index voor enkel plaat twee, is er een lagere waarde waarneembaar bij het blad met enkel *F. graminearum*, vergeleken met de overige bladeren. Dit is zoals verwacht en toont de antifungale werking van beide bacteriën aan.

De derde grafiek vergelijkt de Arildx waarden van de verschillende blaadjes. De Arildx waarde is een maat voor de foto-oxidatieve stress. De verwachte verdelingen zijn identiek als degene bij grafiek 2. Anthocyaninen zijn een indicatie voor de hoeveelheid stress een blad ondervindt. Opnieuw zouden de isolaten moeten zorgen voor een verminderde stress in vergelijking met het *F. graminearum* geïnoculeerde blad

Ten slotte de vierde en laatste grafiek, hierin worden de gemiddelde cGFP waarden van onze drie platen vergeleken. Deze waarde is een maat voor het gecorrigeerde GFP-signaal. De gebruikte *F. graminearum* kolonie heeft een GFP tag. Hoe hoger cGFP waarde, hoe meer (levende) *F. graminearum* er aanwezig is op het blaadje. Hier verwachten we de hoogste waarde bij het blaadje waar enkel *F. graminearum* is toegevoegd. De blaadjes waar de isolaten zijn toegevoegd moeten een lagere cGFP index hebben terwijl de controles nagenoeg een verwaarloosbare cGFP mogen hebben. De resultaten, zichtbaar in grafiek 4, van de gemiddelde cGFP waarden voor de drie platen lijken aan te tonen dat er een foutieve inoculatie heeft plaatsgevonden: het blad met enkel *F. graminearum* toont een verwaarloosbare cGFP waarde en het blad met enkel bacterie 2 (=negatieve controle) toont een significant grotere waarde t.o.v. de overige bladeren. Dit is niet zoals verwacht. Als we echter opnieuw enkel kijken naar de cGFP waarden van plaats 2 is het zichtbaar dat beide bacteriën een antifungale werking uitoefenen: het blad met enkel *F. graminearum* vertoont een hoge cGFP waarde na 48 uur terwijl beide bladeren met *F. graminearum* en bacterie een significant lagere waarde vertonen na 48 uur. Opnieuw lijkt het eveneens dat bacterie 2 een effectievere antifungale werking uitoefent op *F. graminearum*, vergeleken met bacterie 1: na 48 uur is er bij het blad met *F. graminearum* en bacterie 2 een significant lagere cGFP waarde zichtbaar in vergelijking met het blad met *F. graminearum* en bacterie 2.

Enkel focussend op de waarden voor plaat twee (zie appendix), aangezien de waarden voor het gemiddelde van de drie platen weinig informatief zijn, kan er, weliswaar met enige voorzichtigheid, wel worden geconcludeerd dat beide bacteriën een antifungale werking uitoefenen tegen met *F. graminearum*. Er dient wel opgemerkt te worden dat *P.aryabhattai* een schijnbaar lagere effectiviteit tegen *F. graminearum* uitoefent in vergelijking met *S.rimosus*. Uit het in vitro experiment was echter het tegenovergestelde resultaat zichtbaar: *P.aryabhattai* had een duidelijk antifungale werking terwijl *S.rimosus* geen antifungale werking oefende. Dit resultaat is onverwacht maar deze gebeurtenis is niet onbekend.

#### 4. Algemeen besluit

Na het doorlopen van practicum 1 en practicum 2, waarin het gDNA werd geëxtraheerd en finaal geanalyseerd, werd er geconcludeerd dat isolaat A hoogst waarschijnlijk de bacterie *Priestia aryabhattai* is en isolaat B de bacterie *Streptomyces rimosus*. Verscheidene onderzoeken uit de literatuurstudie tonen aan dat beide bacteriën een antifungale werking bezitten tegen *F.graminearum*. Practicum 3 doorlopen met beide isolaten was dus zeker van belang. Geen van beide bacteriën behoren weliswaar tot genus *Rhodococcus*; de effectiviteit van *Rhodococcus sp.* tegen *Fusarium* als biocontrole werd dus niet verder getest. *S.rimosus* behoort tot *Streptomyces sp.*, bijgevolg werd de antifungale werking van het genus *Rhodococcus* wel verder onderzocht m.b.v. een detached leaf assay. In vitro testen met beide stalen tegen *F. graminearum*, voorafgaand op de detached leaf assay, gaven weer dat isolaat 1 (*P.aryabhattai*) een duidelijke antifungale werking vertoonde. Dit was het niet het geval bij isolaat 2 (*S.rimosus*). Het merendeel van de resultaten, verkregen uit de detached leaf assay waren weinig informatief, maar indien er enkel gefocust werd op de resultaten voor plaat twee kon er wel worden geconcludeerd, met enige voorzichtigheid, dat beide bacteriën een antifungale werking uitoefenen tegen *F. graminearum*. Er dient wel opgemerkt te worden dat *P.aryabhattai* een schijnbaar lagere effectiviteit tegen *F. graminearum* uitoefent in vergelijking met *S.rimosus*.

## 5. Vragen

- 1) DNA-extractie: Bespreek (beknopt, bv. tabelvorm) per stap (cel lyse, scheiding DNA-eiwitten/lipiden, neerslaan DNA, wasstap en resuspendering (=opzuiveren)) de verschillen tussen het door jullie opgesteld protocol en het aangeleverde protocol. Waarom heb je finaal bepaalde keuzes gemaakt?

Stap	Zelf opgesteld protocol	Aangeleverde protocol	Bespreking
Cel lyse	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Na toevoeging lysozyme wordt suspensie op ijs gezet voor 45 min</li> <li>- Aparte incubatie na toevoeging proteinase K en SDS</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Na toevoeging lysozyme wordt suspensie geïncubeerd voor 45 min bij 37°C</li> <li>- SDS en proteinase K worden gelijktijdig toegevoegd aan de suspensie, waarna de suspensie eenmalig een incubatie doorloopt van 30 min</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Er werd finaal gekozen voor incubatie bij 37°C voor 45 min aangezien lysozyme op deze temperatuur een hogere activiteit vertoont.</li> <li>- Aangezien SDS beschouwd wordt als activator voor proteinase K (proteinase K is stabiel in de aanwezigheid van SDS) werd er gekozen om de twee componenten gelijktijdig toe te voegen. SDS heeft dus logischerwijs ook geen denaturerende invloed op proteinase K.</li> </ul>
Scheiding DNA-eiwitten/lipiden	Geen verschillen		
DNA neerslaan	<ul style="list-style-type: none"> <li>- DNA precipitatie door toevoeging van natriumacetaat (NaOAc), gevolgd door toevoeging van ethanol</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- DNA precipitatie door toevoeging van één van volgende componenten: ethanol, NaOAc, isopropanol</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aangezien NaOAc zorgt voor de neutralisatie van het negatief geladen DNA (en dus zo DNA veel minder hydrofiel maakt, waardoor het makkelijker kan neerslaan) en ethanol de interactie tussen de Na<sup>+</sup> ionen en PO<sub>3</sub><sup>-</sup> positief beïnvloed (waardoor de precipitatie efficiënter verloopt), werd er gekozen voor de toevoeging van</li> </ul>

	-Incubatie gebeurt voor 2 uur bij -20°C	-Geen gegeven	NaOAc en ethanol aan de oplossing. -Na weder inzien is er besloten om de incubatietijd in te korten tot 15 min aangezien een incubatietijd van 2 uur enkel voordelig is voor een hoger extractie efficiëntie te bereiken. Dit was niet nodig voor dit practicum
Opzuiveren	Geen verschillen		

- 2) DNA-extractie en PCR: Is de PCR-reactie gelukt? Indien niet, welke factoren kunnen voor een mislukking gezorgd hebben? Denk hier goed na over hoe je elke stap hebt uitgevoerd. Bv\ Was de ethanol volledig opgedroogd na de wasstap? Werden alle producten zeker toegevoegd voor de PCR-reactie? ...

De PCR-reactie is zowel bij A1 als bij B3 goed gelukt. Er worden duidelijke banden waargenomen rondom 1500 bp. A2 en B2 zijn niet gelukt en kan verschillende oorzaken hebben. Na de extractie was er een lagere hoeveelheid dsDNA i.v.g.m staal A1 en B3.

- 3) PCR-reactie: Hoe verschillen de door jullie gekozen primers van de aangeleverde, universele 27F en 1492R primers? Welk effect heeft amplicon lengte op het finale resultaat (Sanger sequencing)?

Onze gekozen primers waren identiek aan de universele primers dat gebruikt worden in het labo. Een langer amplicon is nadelig omdat de kwaliteit van een sequentie degradeert na 700-900 basen. De kinetische parameters van de amplificatiecurve veranderen als een functie van de amplicon lengte. Hoe langer het amplicon, hoe langer het duurt voor elke base van het amplicon getagt is.

- 4) Detached leaf assay: Op dag van het practicum werd, in parallel met jullie, door ons ook een detached leaf assay opgesteld (zelfde MO, zelfde sporensuspensie, zelfde tarweplanten). Komen de door jullie bekomen resultaten overeen met onderstaande info in de grafiek (DetachedLeaf\_Fg)? Indien dit niet het geval is, kan je dan verklaren waar dit aan ligt?

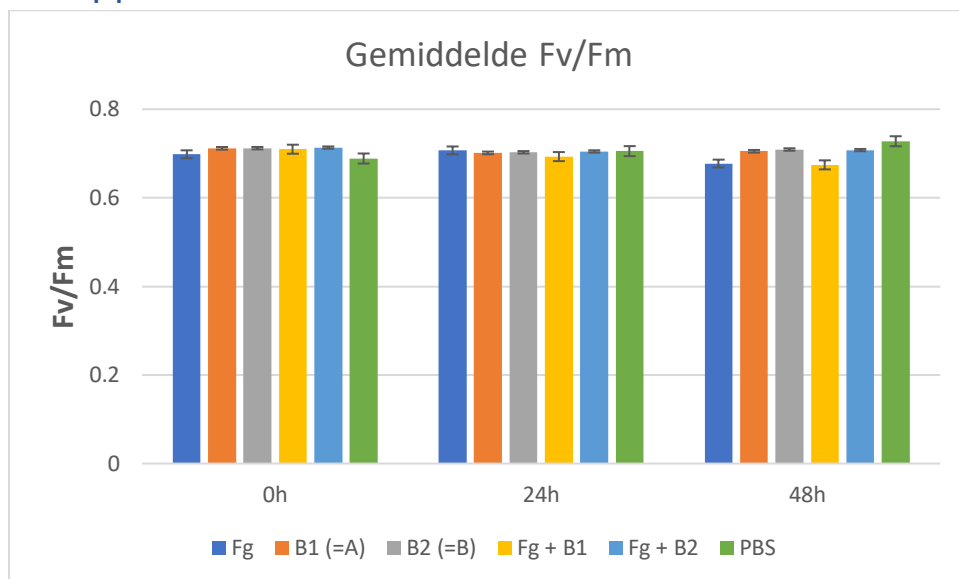
De cGFP figuur van de CropReporter lijkt in grove lijnen de matches met de verwachtingen. Hierop valt te zien dat er meer *F. graminearum* actief is op blad 1, en een gereduceerde hoeveelheid activiteit op de blaadjes waar de isolaten zijn toegevoegd. De andere figuren zijn niet duidelijk genoeg om nuttige besluiten te trekken. De reden hiervoor kan zijn dat de inoculatie druppels naast het blad gevallen zijn, ofdat de verwondingen niet correct aangebracht werden (te veel schade aan het blad/agar)

- 5) Detached leaf assay: Welk effect zal het toevoegen van een veel hogere concentratie *F. graminearum* sporen hebben op de detached leaf assay?

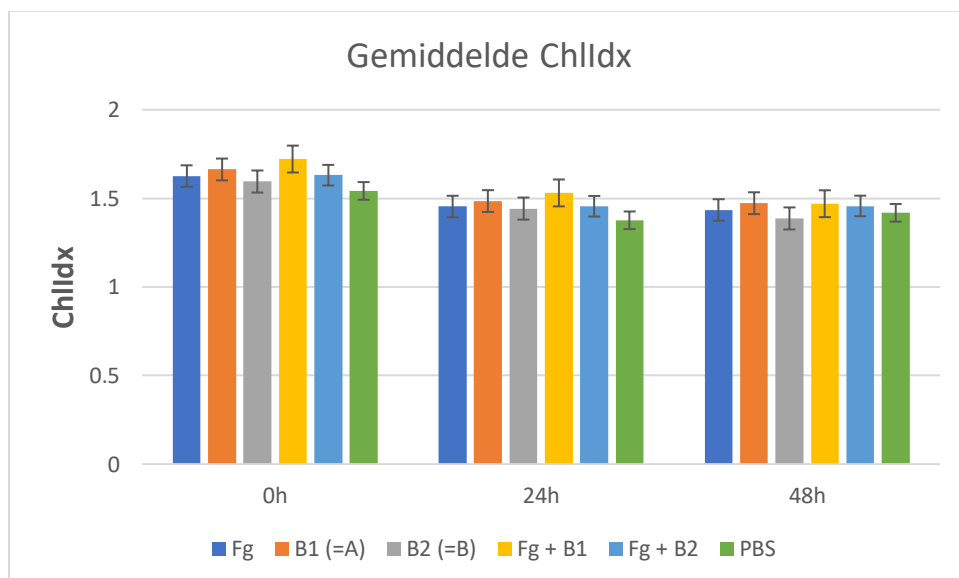
Wanneer er een veel hogere concentratie *F. graminearum* sporen worden toegevoegd aan de tarwebladeren zal dit logischerwijs leiden tot meer stress. De cGfp zal dus nog hogere waarden verkrijgen bij blad 1. Ook bij blad 4 en 5 waar de bacteriën mee zijn geïnoculeerd met *F. graminearum* worden hogere waarden verwacht. Dit omdat we verwachten dat de schimmel door zijn zeer hoge concentratie de werking van de actinobacteriën te niet zal doen. Er zal een grotere hoeveelheid chlorofyl afgedood worden waardoor de chlorofyl index zal zakken. Als laatste zullen de waarden ook verhogen, voor Arildx, en verlagen, voor Fv/Fm, door de extra geïnduceerde stress.



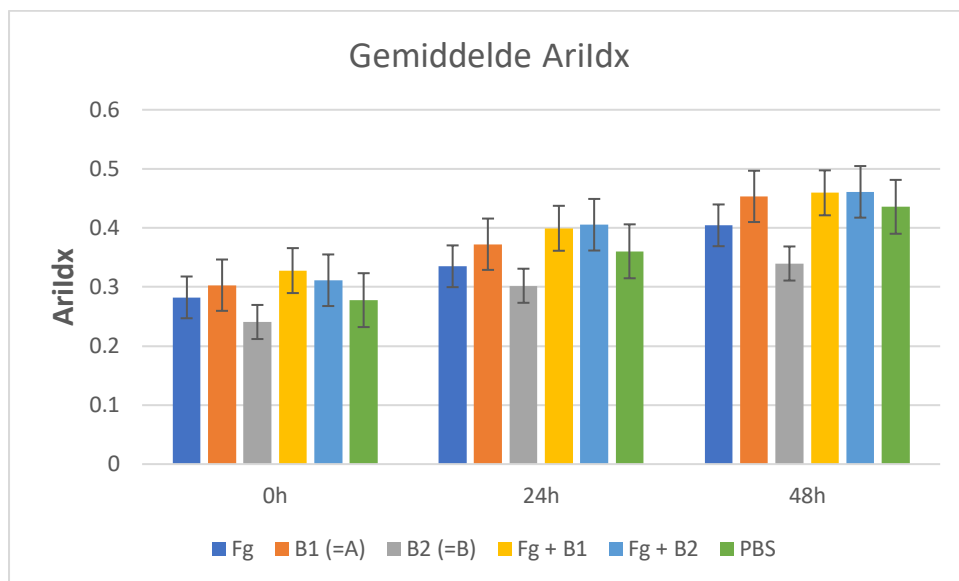
## 6. Appendix



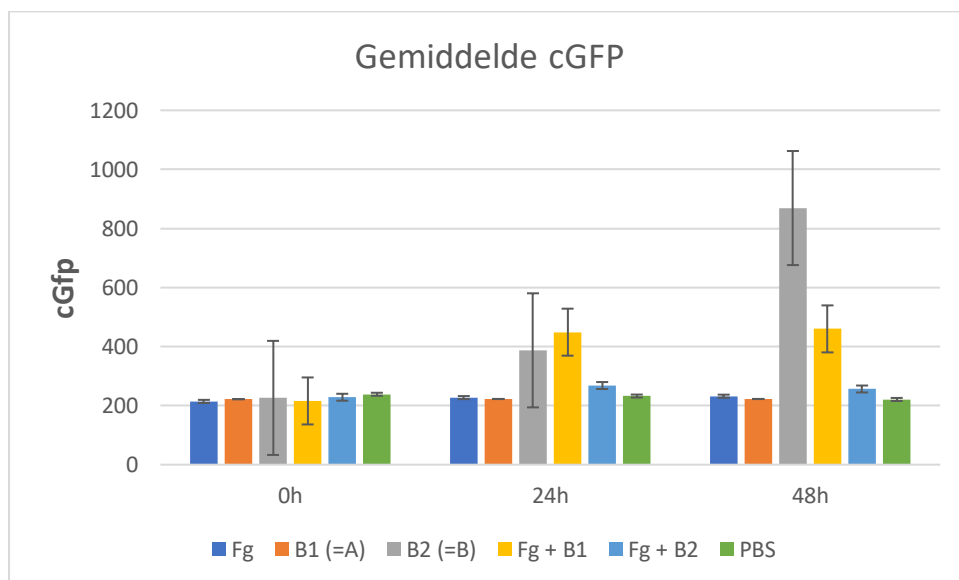
Grafiek 1: gemiddelde Fv/Fm waarden van de drie platen voor de verschillende behandelingen (legende)



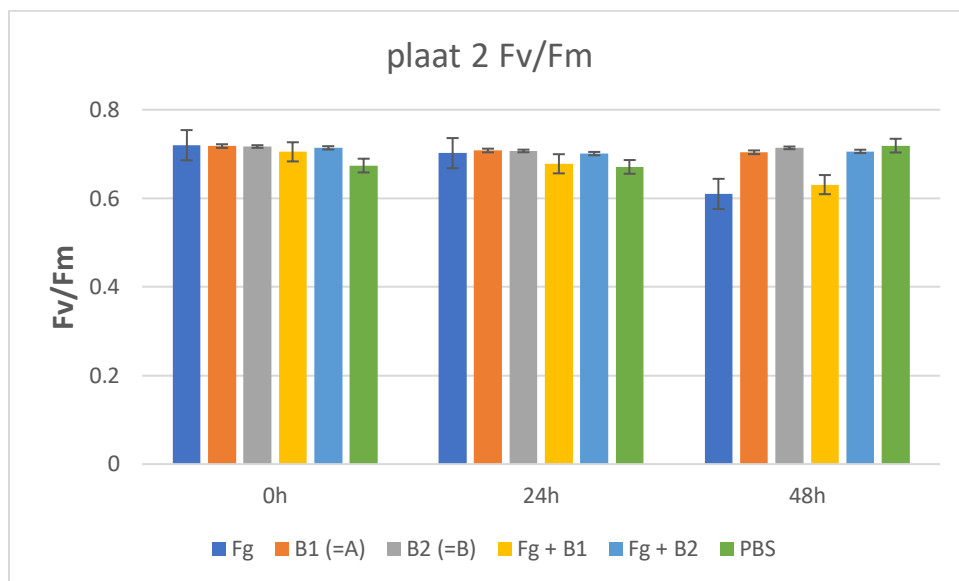
Grafiek 2: gemiddelde ChlIdx waarden van de drie platen voor de verschillende behandelingen (legende)



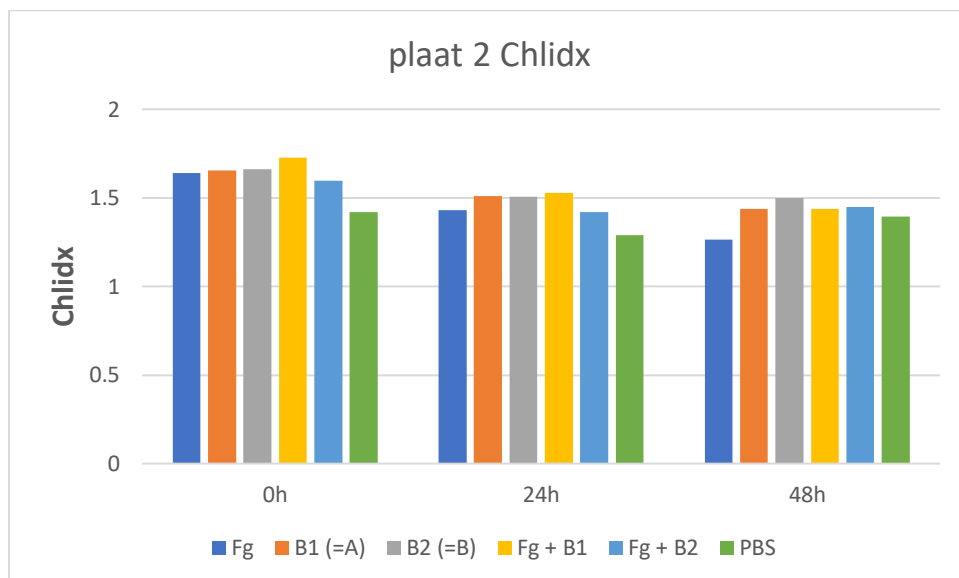
Grafiek 3: gemiddelde Arildx waarden van de drie platen voor de verschillende behandelingen (legende)



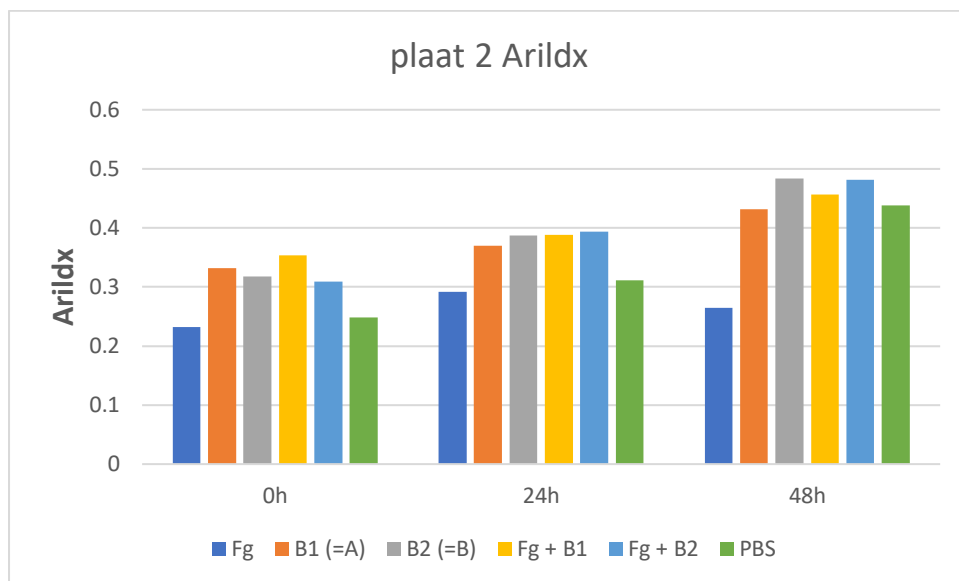
Grafiek 4: gemiddelde cGFP waarden van de drie platen voor de verschillende behandelingen (legende)



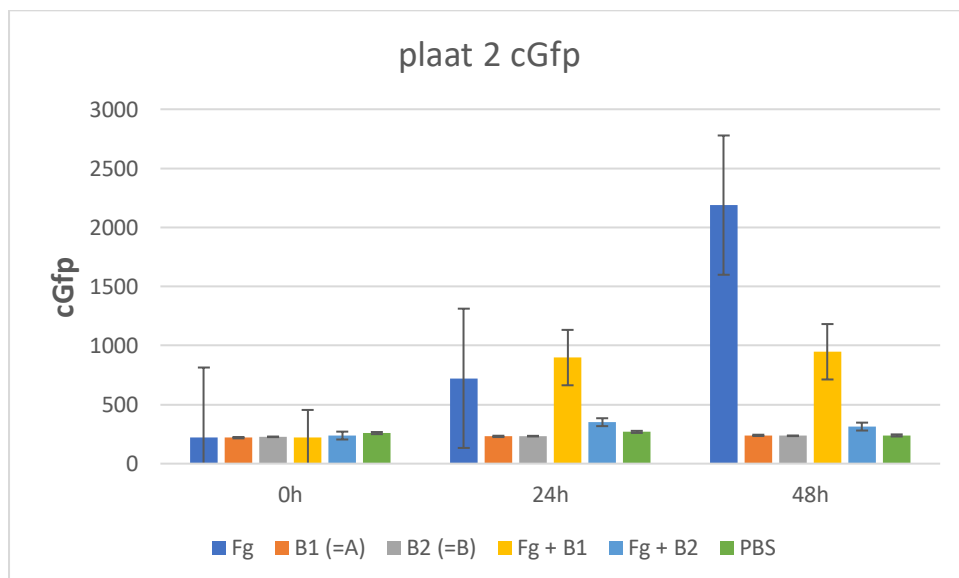
Grafiek 5: Fv/Fm waarden van plaat 2 voor de verschillende behandelingen (legende)



Grafiek 6: Chlidx waarden van plaat 2 voor de verschillende behandelingen (legende)



Grafiek 7: Arildx waarden van plaat 2 voor de verschillende behandelingen (legende)



Grafiek 8: cGfp waarden van plaat 2 voor de verschillende behandelingen (legende)

## 7. Referenties

- Bhattacharyya, C., Bakshi, U., Mallick, I., Mukherji, S., Bera, B., & Ghosh, A. (2017). Genome-guided insights into the plant growth promotion capabilities of the physiologically versatile *Bacillus aryabhattai* strain AB211. *Frontiers in Microbiology*, 8(MAR), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00411>
- Directorate-General for Health and Food Safety. (n.d.). *Integrated Pest Management (IPM)*. [https://ec.europa.eu/food/plants/pesticides/sustainable-use-pesticides/integrated-pest-management-ipm\\_en](https://ec.europa.eu/food/plants/pesticides/sustainable-use-pesticides/integrated-pest-management-ipm_en)
- Gao, B., & Gupta, R. S. (2012). Phylogenetic Framework and Molecular Signatures for the Main Clades of the Phylum Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(1), 66–112. <https://doi.org/10.1128/mmb.05011-11>
- Guevara, G., Castillo Lopez, M., Alonso, S., Perera, J., & Navarro-Llorens, J. M. (2019). New insights into the genome of *Rhodococcus ruber* strain Chol-4. *BMC Genomics*, 20(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5677-2>
- National Center for Biotechnology Information. (n.d.). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Nzytech. (2015). D-Glucose GOD-POD , colorimetric method. *Nzytech Genes & Enzymes*. [https://www.nzytech.com/files/brochures/AK0016\\_D-Glucose GOD-POD, UV method.pdf?b64c11](https://www.nzytech.com/files/brochures/AK0016_D-Glucose GOD-POD, UV method.pdf?b64c11)
- Savary, S., Willocquet, L., Pethybridge, S. J., Esker, P., McRoberts, N., & Nelson, A. (2019). The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature Ecology & Evolution*, 3(3), 430–439.
- Tan, J., Ameye, M., Landschoot, S., De Zutter, N., De Saeger, S., De Boevre, M., Abdallah, M. F., Van der Lee, T., Waalwijk, C., & Audenaert, K. (2020). At the scene of the crime: New insights into the role of weakly pathogenic members of the fusarium head blight disease complex. *Molecular Plant Pathology*, 21(12), 1559–1572.
- Tan, J., De Zutter, N., De Saeger, S., De Boevre, M., Tran, T. M., van der Lee, T., Waalwijk, C., Willems, A., Vandamme, P., Ameye, M., & Audenaert, K. (2021). Presence of the Weakly Pathogenic *Fusarium poae* in the Fusarium Head Blight Disease Complex Hampers Biocontrol and Chemical Control of the Virulent *Fusarium graminearum* Pathogen. *Frontiers in Plant Science*, 12(February), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.641890>