



Faculteit Bio-ingenieurswetenschappen

Academiejaar 2015 – 2016

De biosynthese, regulatie en secretie van cyclische
lipopeptiden in fluorescerende *Pseudomonas* populaties

Charlotte De Bruyn

Promotor: Prof. dr. ir. Monica Höfte

Tutor: Feyisara Eyiwumi Olorunleke

Masterproef voorgedragen tot het behalen van de graad van
Master in de bio-ingenieurswetenschappen: cel- en genbiotechnologie



Faculteit Bio-ingenieurswetenschappen

Academiejaar 2015 – 2016

De biosynthese, regulatie en secretie van cyclische
lipopeptiden in fluorescerende *Pseudomonas* populaties

Charlotte De Bruyn

Promotor: Prof. dr. ir. Monica Höfte

Tutor: Feyisara Eyiwumi Olorunleke

Masterproef voorgedragen tot het behalen van de graad van
Master in de bio-ingenieurswetenschappen: cel- en genbiotechnologie

Auteursrecht

De auteur, de promotoren en de tutor geven de toelating deze masterproef voor consultatie beschikbaar te stellen en delen ervan te kopiëren voor persoonlijk gebruik. Elk ander gebruik valt onder de beperkingen van het auteursrecht, in het bijzonder met de verplichting uitdrukkelijk de bron te vermelden bij het aanhalen van resultaten uit deze masterproef.

Gent, juni 2016

De auteur,
Charlotte De Bruyn

De promotor
Prof. dr. ir. Monica Höfte

De tutor,
Feyisara Eyiwumi Olorunleke

Woord vooraf

Terugkijkend op dit jaar moet ik eerlijk zeggen blij te zijn deze woorden te schrijven. Daar het weliswaar een einde betekent maar tevens ook een nieuw begin. Het einde van een lange weg met ups en downs, van een fantastische opleiding en van samenwerkingen met geweldige mensen. Toch ook het begin van nieuwe ups en downs, van een spannende nieuwe wereld en van nog te ontdekken vriendschappen. Deze thesis sluit de deur van student zijn maar opent daarmee ook vele nieuwe deuren. Hiervoor wil ik verscheidene mensen bedanken.

Allereerst bedank ik mijn tutor, Feyi Olorunleke, die me door de wereld van de fytopathologie heeft geleid en me zo veel heeft geleerd. Ze heeft me in contact gebracht met uitdagingen en heeft me geholpen mezelf te ontdekken. Ook bedank ik mijn promotor, Prof. dr. ir. Monica Höfte, voor deze kans om me te ontwikkelen, voor de bijsturing en kritische blik.

Ik bedank Olumide Omoboye om altijd klaar te staan en me te helpen en begeleiden. Hij heeft me doen thuis voelen in 'het *Pseudomonas* team'. Ook bedank ik Evelien De Waele voor de hulp bij de vele PCR's, en Ilse Delaere en Nadia Lemaire voor de praktische assistentie.

Bedankt aan iedereen op de fytopathologie om steeds bereid te zijn te helpen en voor de babbels en leuke momenten.

Dankuwel Jan om er voor me te zijn. Om me raad te geven als ik erom vroeg en als ik er niet om vroeg. En bedankt aan al mijn vrienden om samen te lachen en plezier te maken, om toch een paar thesisvrije momentjes te creëren.

Ten slotte dank aan mijn ouders om me te steunen, niet alleen tijdens dit thesisjaar, maar doorheen alle studie jaren. Om me te helpen mijn eigen weg te vinden. Mama, bedankt om alles toch eens na te lezen ook al was het soms moeilijk te begrijpen.

Allen bedankt om nieuwe deuren te openen.

Charlotte De Bruyn

Gent, 3 juni 2016

Samenvatting

Orfamide is een cyclische lipopeptide met biosurfactants activiteit die geproduceerd wordt door verschillende *Pseudomonas* species. Deze orfamide producerende *Pseudomonas* species zijn onder andere belangrijk voor de lyse van oömyceet zoösporen, de biocontrole van *Rhizoctonia* en insecticide activiteit tegen bladluizen. In dit onderzoek wordt de biosynthese, regulatie en secretie van orfamide bestudeerd in een aantal orfamide producerende *Pseudomonas* isolaten. De orfamide biosynthesecluster bestaat uit drie biosynthesegenen *ofaA*, *ofaB* en *ofaC*; twee luxR-type regulatiegenen *luxUp* en *luxDown* en twee secretiegenen *macA*, *macB* en in sommige isolaten een derde secretiegen *nodT*. *P. protegens* Pf-5 en *Pseudomonas* sp. CMR12a en CMR5c maken orfamide aan en in de laatste twee stammen werd bewezen dat de twee luxR-type regulatorgenen instaan voor de regulatie van orfamide aangezien de LuxR-mutanten geen orfamide meer aanmaakten. Via qPCR-analyse is gebleken dat deze LuxR-genen in *Pseudomonas* sp. CMR5c de expressie van het secretiegen *macB* negatief reguleren. Het secretiesysteem van orfamide werd onderzocht in *Pseudomonas* sp. CMR12a en CMR5c die het MacA-MacB-secretiesysteem bevatten om orfamide van het intracellulaire milieu naar het periplasma te brengen. Om dit orfamide verder het extracellulaire milieu in te pompen zijn buitenste membraanproteïnen nodig zoals NodT en OprM in *Pseudomonas* sp. CMR12a en OprM en Cmec in *Pseudomonas* sp. CMR5c. Via swarmingtesten met mutanten in deze buitenste membraanproteïnen werd bewezen dat orfamide gebruik maakt van deze pompen om de cel te verlaten. Onderzoek met inhibitoren om de werking van deze pompen tegen te gaan toonde aan dat het secretiesysteem complexer is dan initieel gedacht. Het bewees dat er meerdere buitenste membraanproteïnen instaan voor de secretie van orfamide. Ook beïnvloeden de pompen elkaar en zorgt de combinatie van afwezige en geïnhibeerde pompen voor de hoeveelheid orfamide die de cel kan verlaten. Verder werd de bioactiviteit van orfamide tegen de oömyceet *Pythium myriotylum* nagegaan *in vitro* en *in planta* met *P. protegens* CHA0 en *Pseudomonas* sp. CMR5c. De orfamide in *Pseudomonas* sp. CMR5c lijkt *in vitro* een rol te spelen in de inhibitie van *P. myriotylum* terwijl in *P. protegens* CHA0 geen verschil waar te nemen was tussen het wild type en de orfamide mutant. Met een *in planta* experiment uitgevoerd op cocoyam met beide isolaten lijkt orfamide wel geen significante rol te spelen in het inhiberen van de groei van de oömyceet. Wel zou het kunnen bijdragen tot de beweegbaarheid van de bacterie in de grond en de kolonisatie van de plantwortels.

Abstract

Orfamide is a cyclic lipopeptide with biosurfactants activity, produced by a number of *Pseudomonas* species. Orfamides are important for lysis of oomycete zoospores, biocontrol of *Rhizoctonia* and insecticidal activity against green peach aphid. In this research the biosynthesis, regulation and secretion of orfamide is studied in some orfamide producing *Pseudomonas* isolates. The orfamide biosynthetic cluster consists of three biosynthetic genes *ofaA*, *ofaB* and *ofaC*; two regulator genes *luxUp* and *luxDown* and two secretion genes *macA*, *macB* and in some isolates a third secretion gene *nodT*. *P. protegens* Pf-5 and *Pseudomonas* sp. CMR12a and CMR5c are isolates that can produce orfamide. In this work we prove that the luxR-type regulator genes in *Pseudomonas* sp. CMR12a and CMR5c are responsible for the regulation of orfamide because the LuxR mutants do not make orfamide. With a qPCR analysis it is shown that the LuxR genes in *Pseudomonas* sp. CMR5c negatively regulate the secretion gene *macB*. The secretion system of orfamide was studied in *Pseudomonas* sp. CMR12a and CMR5c. They contain the MacA-MacB secretion system to bring orfamide from the intracellular space into the periplasm. To pump this orfamide further into the extracellular space, outer membrane proteins are necessary, like NodT and OprM in *Pseudomonas* sp. CMR12a and OprM and CmeC in *Pseudomonas* sp. CMR5c. Swarmingtests with mutants in this outer membrane proteins proved that orfamide makes use of this pumps to leave the cell. Research with inhibitors that block the activity of the pumps, showed that the secretion system is more complex than initially thought. This proves that there are more outer membrane proteins responsible for the secretion of orfamide. Furthermore, the pumps have influence on each other and a combination of absent pumps and pumps that are inhibited has influence on the amount of orfamide that can leave the cell. Also the bioactivity of orfamide against the oomycete *Pythium myriotylum* was tested with an *in vitro* and an *in planta* experiment with *P. protegens* CHA0 and *Pseudomonas* sp. CMR5c. The orfamide in *Pseudomonas* sp. CMR5c seems to play a role *in vitro* in the inhibition of *P. myriotylum* while in *P. protegens* CHA0 there is no difference between the wild type and the orfamide mutant. The orfamide of both isolates seems to play no significant role *in planta* on cocoyam in the inhibition of the growth of the oomycete. Maybe orfamide could contribute to the motility of the bacteria in the ground and the colonisation of the plant roots.

Lijst van afkortingen

Afkorting	Betekenis
A-domein	Adenylatie domein
ABC	ATP-binding cassette
AHL	N-acyl-homoserine lacton
AZ	Aminozuur
C-domein	Condensatie domein
C-domein	Cyclisatie domein
CCC	Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone
cDNA	Copy DNA
CFTR	Cystic fibrosis transmembranaire regulator
CFU	Colony Forming Unit
CLP	Cyclische lipopeptide
CWDE	Celwand-afbrekende-enzymen
DAPG	2,4-diacetylphloroglucinol
DNA	Desoxyribonucleïnezuur
E-domein	Epimerisatie domein
GLB	Glybenclamide
HCN	Waterstof cyanide
HPLC-MS	High-performance liquid chromatography-Massaspectrometry
Hpt	Histidine fosfotransfer
HTH	Helix-turn-helix
ISR	Induced systemic resistance
M-domein	N-methylatie domein
MM	MasterMix
NOV	Natriumorthovanadaat
NRPS	Niet-ribosomale peptide synthetase
OD	Optische densiteit
<i>ofaA</i>	orfamide A gen
<i>ofaB</i>	orfamide B gen
<i>ofaC</i>	orfamide C gen
ORF	Open reading frame
orf	Orfamide
PCP	Peptidyl carrier proteïne
PCR	Polymerasekettingreactie
PDI	Plant ziekte index
PLT	Pyoluteorin
PRN	Pyrrolnitrin
qPCR	Kwantitatieve Polymerasekettingreactie

Afkorting	Betekenis
R-domein	Reductase domein
RNA	Ribonucleïnezuur
RND	Resistance-nodulation-division
RSD	Relatieve Standaardafwijking
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerasekettingreactie
SUR	Sulfonylurea receptors
T-domein	Thiolatie domein
TE-domein	Thioesterase domein
TRI	Trizol
WT	Wild type
μ	Gemiddelde
σ	Standaardafwijking

Inhoudsopgave

Auteursrecht	i
Woord vooraf	ii
Samenvatting	iii
Abstract	iv
Lijst van afkortingen	v
Inhoudsopgave	vii
1. Inleiding	1
2. Literatuurstudie	2
2.1 Fluorescerende Pseudomonads	2
2.1.1 Inleiding	2
2.1.2 Classificatie	2
2.1.3 Biologische relevantie	2
2.2 Biosurfactants	4
2.2.1 Inleiding	4
2.2.2 Cyclische lipopeptiden	4
2.3 Regulatie van CLP's	10
2.3.1 Inleiding	10
2.3.2 LuxR-type transcriptieregulatorgenen	11
2.3.3 GacS/GacA twee componentensysteem	11
2.3.4 Quorum sensing	12
2.3.5 Heat schok proteïnen	12
2.3.6 Protease ClpP	13
2.3.7 Andere regulatorische genen	13
2.3.8 Milieueffecten	14
2.4 Secretie van CLP's	15
2.4.1 Inleiding	15
2.4.2 RND effluxpompen	15
2.4.3 Type I secretie systemen	16
2.3 Het CLP orfamide	17
2.3.1 Inleiding	17
2.3.2 <i>Pseudomonas protegens</i> stammen	17
2.3.3 Nauw verwante <i>Pseudomonas</i> isolaten	19
2.3.4 Regulatie van orfamide	20

2.3.5 Secretie van orfamide	20
2.3.6 Biologische relevantie van orfamide	22
2.4 Cocoyam	23
3. Doelstelling	24
4. Materiaal & Methoden	25
4.1 Fenotype bepaling	25
4.1.1 Druppelinzaktest	25
4.1.2 Swarming.....	25
4.1.3 HPLC-MS-analyse.....	26
4.1.4 Inhibitoren.....	26
4.1.5 Reverse Transcriptase Polymerasekettingreactie (RT-PCR)	27
4.1.6 Kwantitatieve Polymerasekettingreactie (qPCR).....	29
4.2 In vitro inhibitie experiment	30
4.3 Biocontrole experiment met cocoyam	31
4.3.1 Weefselkweek cocoyam.....	31
4.3.2 Inoculatie.....	32
5. Resultaten & Discussie.....	34
5.1 Biosynthese van orfamide.....	34
5.1.1 Resultaten	34
5.1.2 Discussie	36
5.1.3 Conclusie	37
5.2 Regulatie van orfamide	38
5.2.1 Resultaten	38
5.2.2 Discussie	41
5.2.3 Conclusie	45
5.3 Secretie van orfamide	45
5.3.1 Resultaten	45
5.3.2 Discussie	54
5.3.3 Conclusie	58
5.4 Bioactiviteit van orfamide.....	59
5.4.1 Resultaten	59
5.4.2 Discussie	62
5.4.3 Conclusie	65
6. Algemene conclusies	66
7. Ideeën voor verder onderzoek.....	67

8. Bronnen	68
9. Bijlage	76
9.1 Tabellen.....	76
9.2 Figuren	83

1. Inleiding

Fluorescerende *Pseudomonas* bacteriën komen voornamelijk in de aandacht in de medische wereld met het menselijk pathogeen *Pseudomonas aeruginosa* ook wel bekend als de ziekenhuisbacterie. Deze bacterie staat bekend om zijn resistentie tegen verscheidene antibiotica. Wanneer antibiotica toegediend worden en de bacterie binnendringen, kan de bacterie via een ingenieus pompsysteem de antibiotica terug naar buiten pompen. Op deze manier hebben de antibiotica geen effect op de bacterie en is het bijzonder moeilijk de bacterie uit te schakelen. In de geneeskunde ligt de prioriteit dan ook in het blokkeren van dit pompsysteem zodat de antibiotica de bacterie niet kunnen verlaten en de bacterie uiteindelijk sterft. Waarom echter bevat de *P. aeruginosa* dit pompsysteem in de eerste plaats? Het pompsysteem is er niet alleen om exogene moleculen naar buiten te pompen maar ook om eigen metabolieten buiten de cel te brengen. Deze metabolieten kunnen de bacterie helpen in zijn groei, onderhoud of levenswijze of kunnen een invloed uitoefenen op het extracellulair milieu waar de bacterie zich bevindt. Biosurfactants zijn metabolieten aangemaakt door tal van bacteriën waaronder fluorescerende *Pseudomonas* bacteriën. Sommige van deze biosurfactants kunnen de beweegbaarheid van de bacterie vergroten, plant-pathogene-activiteit vertonen of juist plant-pathogenen bestrijden. Daar *P. aeruginosa* een menselijke pathogeen is kan deze echter niet gebruikt worden voor biologische controle op planten. Om die reden is het interessant te onderzoeken of er andere *Pseudomonas* bacteriën bestaan die biosurfactants aanmaken en die het pompsysteem gebruiken om de biosurfactants naar buiten te brengen. Op deze manier is het onderzoek naar het pompsysteem niet alleen van belang voor de medische wereld maar ook voor de landbouw, daar biologische controle plantenziektes kan bestrijden en plantopbrengsten kan verhogen. In dit onderzoek worden cyclische lipopeptiden bestudeerd. Deze zijn een type biosurfactants die door tal van *Pseudomonas* bacteriën worden geproduceerd. Cyclische lipopeptiden zijn belangrijk voor verscheidene functies zoals de beweegbaarheid van de bacterie, de vasthechting en losmaking van de bacterie aan een oppervlak, de biobeschikbaarheid, antimicrobiële activiteit, plant-pathogeniteit, resistentie tegen pathogenen en zelfs biologische controle. Orfamide is een recent ontdekte cyclische lipopeptide, reeds bekend om zijn biocontrole activiteit. Verscheidene fluorescerende *Pseudomonas* bacteriën over de hele wereld kunnen orfamide aanmaken. Maar hoe wordt dit orfamide gevormd? Door welke genen wordt het gereguleerd? Op welke manier wordt het buiten de bacterie gebracht? Onderzoek naar orfamide is nodig om inzicht te verwerven in zijn biologische controle. Dit kan leiden naar een nieuw manier om plant-pathogenen te bestrijden en plantopbrengsten te verhogen.

2. Literatuurstudie

2.1 Fluorescerende *Pseudomonas*

2.1.1 Inleiding

De *Pseudomonas* zijn een complexe groep bacteriën die behoren tot de gammaproteobacteriën. Het aantal *Pseudomonas* bacteriën staat momenteel op 144 species (Gomila et al., 2015). Het zijn aerobe Gram-negatieve bacteriën en bevatten derhalve een binnenste en buitenste cytoplasmamembraan (Trögl et al., 2012). Door de samenstelling van het buitenste membraan, namelijk fosfolipiden, eiwitten en lipopolysachariden, zijn deze bacteriën bijzonder weinig permeabel voor kleine hydrofiele moleculen. Hierdoor zijn de *Pseudomonas* bacteriën goed bestand tegen het binnendringen van antimicrobiële agentia (Nikaido, 1989). Het genus *Pseudomonas* bevat twee grote groepen namelijk de *P. aeruginosa* en de *P. fluorescens* of ook wel de fluorescerende *Pseudomonas* bacteriën. De fluorescerende *Pseudomonas* bacteriën worden zo genoemd omdat ze fluorescerende geelgroene pigmenten kunnen aanmaken op cultuurmedia (Hua and Höfte, 2015). De *P. fluorescens* worden opgedeeld in vijf groepen namelijk *P. putida*, *P. syringae*, *P. lutea*, *P. asplenii* en *P. fluorescens*. Hierbij is de *P. fluorescens* groep het meest verschillend van de andere groepen en een zeer diverse groep die opgedeeld wordt in negen subgroepen, namelijk: *P. fluorescens*, *P. gessardi*, *P. fragi*, *P. mandelii*, *P. jessenii*, *P. koreensis*, *P. corrugata*, *P. chlororaphis* en *P. protegens*, weergegeven in Figuur 1 (Garrido-Sanz et al., 2016). Per subgroep komen dan verscheidene species voor.

2.1.2 Classificatie

De classificatie van de *Pseudomonas* species gebeurt door verschillende genen te sequencen. Zo wordt het 16S rRNA gen gebruikt als een universele marker waardoor verschillende bacteriën vergeleken kunnen worden. Verschillen tussen de subgroepen worden echter niet makkelijk teruggevonden door het 16S rRNA gen omdat het gen geconserveerd is onder bacteriën van dezelfde soort. Hierdoor worden andere 'housekeeping' genen aangeroepen zoals het *gyrB* gen, het *rpoB* gen en het *rpoD* gen. Deze genen worden gebruikt voor de fylogenetische karakterisatie van de *Pseudomonas* bacteriën. Hiervoor kan onder andere multi-locus sequence analysis (MLSA) gebruikt worden en kan er een fylogenetische boom gemaakt worden. Indien meer dan 97% gelijkheid optreedt tussen de 'housekeeping' genen van de bacteriën behoren ze tot dezelfde soort (Gomila et al., 2015; Mulet et al., 2010).

2.1.3 Biologische relevantie

Doordat de fluorescerende *Pseudomonas* bacteriën zo divers zijn komen ze voor in verscheidene milieus zoals water, bodem, planten en sedimenten (Hua and Höfte, 2015). Ze kunnen bijvoorbeeld voor biodegradatie gebruikt worden door toxische en chemische componenten af te breken. Ze zijn echter voornamelijk interessant omdat ze in hoge aantallen aanwezig zijn aan de oppervlakten van wortels en bladeren van planten. Door het aanmaken van bepaalde stoffen kunnen ze dan een invloed uitoefenen op de werking van de plant. Deze bacteriën worden aldus vaak bestudeerd om plantengroei en -gezondheid te verbeteren (Botelho & Mendonça-Hagler, 2006). Zo kunnen ze invloed uitoefenen op de werking van bepaalde plant-pathogenen in de bodem door bijvoorbeeld in competitie te treden met

2.2 Biosurfactants

2.2.1 Inleiding

Een bacterie maakt metabolieten aan die instaan voor zijn overleving, groei, ontwikkeling en reproductie. Ook kunnen secundaire metabolieten worden aangemaakt die hier niet rechtstreeks bij betrokken zijn maar wel biologisch werkzaam zijn en voordelen bieden zoals: antibiotica, toxinen, herbiciden en surfactants. Deze secundaire metabolieten worden vaak aangemaakt op het einde van de exponentiële fase en stationaire fase aangezien deze niet onmiddellijk nodig zijn (Soetaert, 2014). De productie kan eveneens op gang komen onder bepaalde omstandigheden (Ludwig-Müller, 2015). Ook de fluorescerende *Pseudomonas* bacteriën maken secundaire metabolieten aan, voornamelijk antibiotica en biosurfactants (Neidig et al., 2011). Surfactants zijn amfipatische organische moleculen wat betekent dat ze zowel hydrofiele als hydrofobe delen bevatten. Hierdoor bevinden de moleculen zich vaak aan de interfase tussen vloeibare fasen met verschillende polariteit en waterstofbindingen (Rodrigues et al., 2006). Ze kunnen oppervlakte eigenschappen zoals oppervlakte-energie en -spanning veranderen. Indien deze surfactants geproduceerd worden door een organisme wordt gesproken van biosurfactants (Sung-Chyr, 1996). De productie ervan komt vaak voor bij plantgeassocieerde bacteriën zodat ze de gezondheid van de plant op positieve of negatieve wijze kunnen beïnvloeden (D'aes et al., 2010). Biosurfactants worden beschouwd als secundaire metabolieten toch kunnen ze in sommige gevallen een rol spelen in de overleving van het micro-organisme door bijvoorbeeld nutriëntentransport te vergemakkelijken (Rodrigues et al., 2006). Ze kunnen invloed uitoefenen op de beweeglijkheid van het micro-organisme, op de biofilmformatie en de kolonisatie. Ook kunnen ze de biobeschikbaarheid van exogene componenten zoals nutriënten veranderen zodat deze en endogene metabolieten beter opgenomen kunnen worden, wat resulteert in een verhoogde biologische activiteit. Quorum sensing activiteit kan eveneens beïnvloed worden door deze biosurfactants. (D'aes et al., 2010; Rodrigues et al., 2006). Doordat ze door micro-organismen aangemaakt worden zijn ze in tegenstelling tot synthetische surfactants beter biodegradeerbaar, minder toxisch, resistenter tegen extreme temperaturen, pH en zoutgehalte en meer divers (Mnif & Ghribi, 2015; Rodrigues et al., 2006; Sung-Chyr, 1996). Het is echter niet zeker of de waargenomen effecten van de biosurfactants *in vitro* dezelfde zijn als in hun natuurlijke omgeving aangezien de aangemaakte hoeveelheden verschillen en er rekening moet worden gehouden met milieucondities (D'aes et al., 2010). Er zijn verschillende soorten biosurfactants beschreven zoals glycolipiden, fosfolipiden, polysacharide proteïne complexen, vetzuren, neutrale lipiden en lipopeptiden (Rodrigues et al., 2006).

2.2.2 Cyclische lipopeptiden

2.2.2.1 Inleiding

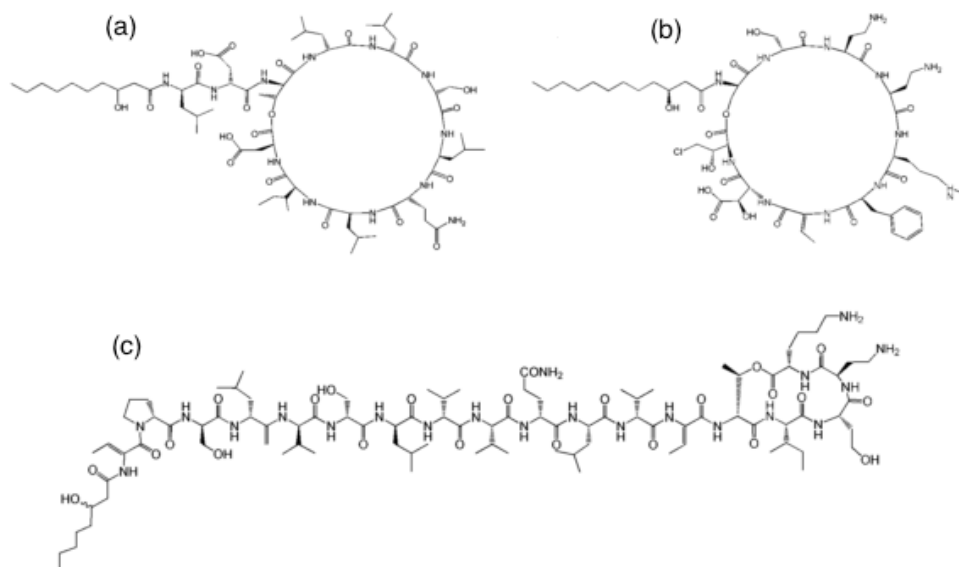
Cyclische lipopeptiden (CLP's) zijn een type biosurfactants met een laag moleculair gewicht die voorkomen in verscheidene vormen en die geproduceerd worden door vele bacteriën, waaronder ook de fluorescerende *Pseudomonas* bacteriën (Raaijmakers, de Bruijn, & de Kock, 2006; Ron & Rosenberg, 2001). CLP's worden met zekerheid geproduceerd door volgende plantgeassocieerde *Pseudomonas*: *P. syringae*, *P. tolaasii*, *P. fuscovaginae*, *P. corrugata*, *P. fluorescens*, *P. protegens* en *P. putida* (Nielsen et al., 2002; Raaijmakers et al., 2006). CLP's bestaan uit een vetzuurstaart gekoppeld aan een ringvormige oligopeptiden zodat een lactonring wordt gevormd tussen twee aminozuren uit de peptideketen (de

Bruijn et al., 2007; Finking & Marahiel, 2004; Raaijmakers et al., 2006). Structurele verschillen komen veelvuldig voor door variaties in het aantal, type, positie en configuratie van de aminozuren in de peptide maar ook door verschillen in de lengte en compositie van de vetzuurstaart (de Bruijn et al., 2007; Raaijmakers et al., 2006). Omdat CLP's worden aangemaakt door een verscheidenheid aan bacteriën en omdat ze verschillen in chemische structuur wordt verwacht dat ze mogelijk meerdere en verschillende biologische functies bevatten. Vele fluorescerende *Pseudomonas* bacteriën kunnen in de bodem CLP's produceren, wat doet vermoeden dat CLP's een ecologisch functie hebben in de bodem waarbij bodemtype (pH en textuur) een rol kan spelen. Zo kunnen er tal van voordelen optreden voor de fluorescerende *Pseudomonas* bacteriën door CLP's te produceren in de rhizosfeer, namelijk, de beweegbaarheid van de bacterie vergroten, zorgen voor adhesie van de bacterie aan de wortels, nutriënten beter beschikbaar maken, zorgen voor een competitievoordeel en aan antagonisme doen (Nielsen et al., 2002). Bij plant-pathogene *Pseudomonas* bacteriën zijn CLP's belangrijke virulentiefactoren en kunnen ze poriën induceren met celdood tot gevolg. Bij antagonistische *Pseudomonas* bacteriën kunnen CLP's een rol spelen in antimicrobiële en cytotoxische activiteit, beweegbaarheid en biofilmformatie. Ook antagonistische interacties met andere organismen komen frequent voor zoals planten, schimmels, oömyceten, mycoplasma's, bacteriën en virussen (de Bruijn et al., 2007; Nielsen et al., 2002; Raaijmakers et al., 2006). Op basis van hun structuur worden CLP's van de *Pseudomonas* species opgedeeld in negen grote groepen: viscosin, syringomycin, orfamide, amphisin, putisolvin, entolysin, xantholysin, tolaasin en syringopeptin (Gross & Loper, 2009; Li et al., 2013; Mnif & Ghribi, 2015; Roongsawang et al., 2011). Tabel 1 geeft de classificatie van de negen groepen weer terwijl Figuur 2 de structuren weergeeft van amphisin, syringomycin en tolaasin.

Tabel 1. Gekende CLP's geproduceerd door *Pseudomonas* species opgedeeld in negen klassen met aantal aminozuren (AZ) waaruit ze bestaan (Gross & Loper, 2009; Li et al., 2013; Mnif & Ghribi, 2015; Roongsawang et al., 2011).

Groep	Aantal AZ	CLP
Viscosin	9	Viscosin
		Viscosinamide
		WLIP
		Massetolide A/B/C
		Massetolide D
		Massetolide E
		Massetolide F
		Massetolide G/H
		Pseudophomin A/B
		Pseudodesmin A
Syringomycin	9	Pseudodesmin B
		Syringomycin SRA
		Syringomycin SRE
		Syringostatin A
		Syringostatin B
		Pseudomycin A/C
Orfamide	10	Cormycin A
		Orfamide A/C
Amphisin	11	Orfamide B/D/E
		Amphisin
		Tensin
		Pholipeptin
		Lokisin
		Arthrofactin A/D/C
		Arthrofactin B

Groep	Aantal AZ	CLP
Putisolvin	12	Putisolvin I
		Putisolvin II
Entolysin	14	Entolysin A
Xantholysin	14	Xantholysin A/C
		Xantholysin B
Tolaasin	22	MA026
		Tolaasin I
		Tolaasin II
		Tolaasin A
		Tolaasin B
		Tolaasin F
		Sessilin A
		Fuscopeptin A/B
Syringopeptin	23	Corpeptin A/B
		Chicopeptin A/B
		Sclerosin
		SP22
		SP25A
		Phe-SP25A

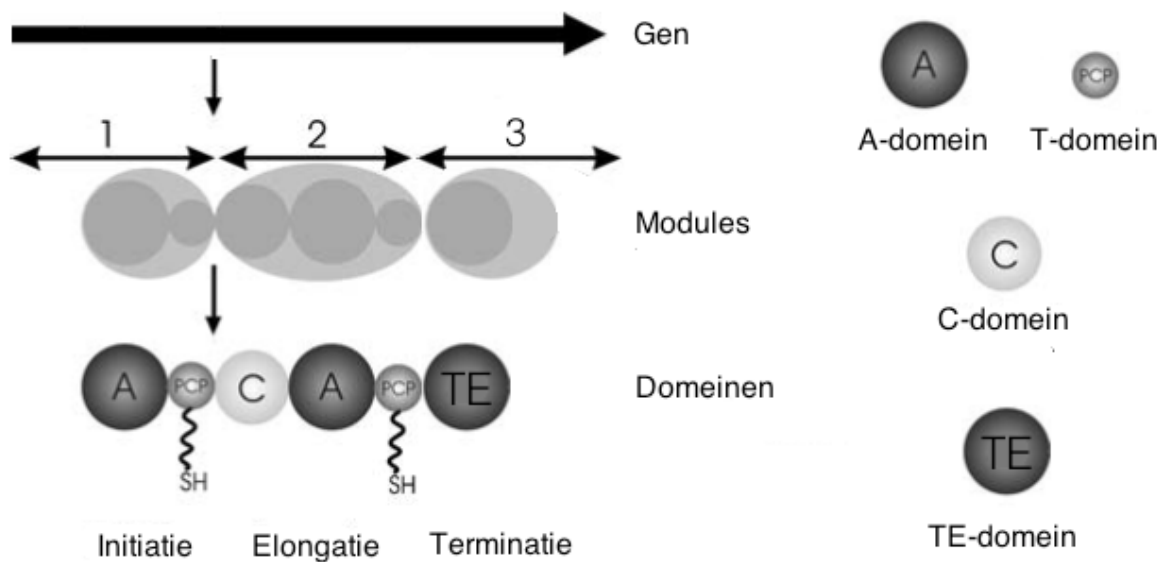


Figuur 2. Structuur van CLP (a) amphisin, (b) syringomycin en (c) tolaasin (Hamley, 2015).

2.2.2.2 Biosynthese

CLP's worden gevormd via niet-ribosomale peptide synthetases (NRPS's). Deze zijn multifunctionele enzymen om peptiden aan elkaar te binden en bevatten een grote activiteit. Tal van onnatuurlijke aminozuren en andere moleculen zoals carboxyzuren en vetzuren kunnen geïncorporeerd worden door NRPS's waardoor een grote structurele variabiliteit in peptiden ontstaat (de Bruijn et al., 2007; Finking & Marahiel, 2004; Raaijmakers et al., 2006). NRPS gevormde peptiden verschillen eveneens van ribosomaal gevormde peptiden doordat deze laatste verschillende nakijkmechanismes bevatten. Deze zijn van belang voor een goede werking van het primaire metabolisme waar het bij NRPS's belangrijk is een variëteit aan peptiden te kunnen maken (Finking & Marahiel, 2004). NRPS's worden gecodeerd door een zeer groot gen cluster en bevatten een modulaire structuur waarbij elke module instaat voor de stapsgewijze incorporatie en modificatie van één bepaald aminozuur in de oligopeptide (D'ae et al., 2010; Raaijmakers et al., 2006). Modules kunnen verder opgedeeld worden in initiatie, elongatie en terminatie modules. De NRPS-elongatie module bevat drie geconserveerde domeinen: het A-domein, T-domein en C-domein. Het adenylatie domein (A-domein) is verantwoordelijk voor het selecteren van aminozuren en activeert deze tot amino-acyl-adenylaat waar ATP wordt verbruikt. Het thiolatie domein (T-domein) of ook wel peptidyl carrier proteïne (PCP), zorgt voor de thioesterificatie van het geactiveerd aminozuur en staat in voor het transport. Het condensatie domein (C-domein) zorgt ten slotte voor de peptidebinding tussen het aminozuur dat gebonden zit op het PCP van dezelfde module en het peptidyl gebonden op de vorige module waardoor een peptideketen wordt opgebouwd. Het gevormde peptide beweegt van de ene module naar de andere en het aantal en de sequentie van de aminozuren in de peptide is gelinkt aan het aantal en de volgorde van de modules (Berti et al., 2007; de Bruijn et al., 2007; Finking and Marahiel, 2004; Gross and Loper, 2009; Marahiel et al., 1997; Raaijmakers et al., 2006). De NRPS-initiatie module zorgt voor de aanbreng van het eerste aminozuur voor de synthese van de peptide. Deze module bevat geen C-domein (de Bruijn et al., 2007). De NRPS-terminatiemodule bestaat enkel uit het thioesterase domein (TE-domein). Wanneer de lineair peptide aangemaakt is, wordt nog een laatste aminozuur toegevoegd door dit TE-domein, waarna het lineaire peptide aan het einde wordt

'losgeknipt' waardoor een lineair product vrijkomt. Door een intramoleculaire reactie kan eveneens een cyclische of vertakte peptide gevormd worden (de Bruijn et al., 2007; Gross & Loper, 2009; Marahiel et al., 1997; Raaijmakers et al., 2006). In Figuur 3 wordt een schematische weergave gegeven van de NRPS. Verder zijn er nog verschillende domeinen die nodig kunnen zijn tijdens NRPS-peptide vorming: het E-domein, M-domein, Cy-domein en R-domein. Het epimerisatie domein (E-domein) is verantwoordelijk voor de conversie van de L naar D-vorm van een aminozuur. Het is in sommige gevallen ook mogelijk dat een externe racemase verantwoordelijk is voor de L naar D conversie, zoals bij de vorming van arthrofactin (Raaijmakers et al., 2006). Het N-methylatie domein (M-domein) zorgt voor modificatie van het NRPS waardoor de biologische activiteit vergroot wordt en de peptidebinding wordt gestabiliseerd (Marahiel et al., 1997). Het cyclisatie domein (Cy-domein) staat in voor de vorming van een oxazoolring of een thiazoolring terwijl het reductase domein (R-domein) deze ringsystemen verder kan reduceren tot oxazolidine en thiazolidine ringsystemen (Gross & Loper, 2009).



Figuur 3. Modules worden afgeschreven uit een gen. Deze modules worden onderverdeeld in initiatie, elongatie en terminatie modules die bestaan uit katalytische domeinen voor substraatactivatie (A-domein), transport (T-domein), vorming van peptidebinding (C-domein) en loslaten van de peptideketen (TE-domein). Initiatie modules bevatten geen C-domein en terminatie modules bevatten enkel het TE-domein (Finking & Marahiel, 2004).

Voornamelijk het A-domein is verantwoordelijke voor de grote variabiliteit in CLP's. Twee dezelfde aminozuren kunnen namelijk geselecteerd worden door een verschillend A-domein. Het A-domein bevat eveneens de 'wobble-like' positie waardoor een flexibeler gebruik in aminozuren plaatsvindt. Op deze manier kunnen er dus 'incorrecte' aminozuren ingebouwd worden waardoor de iso-vormen van sommige CLP's verklaart kunnen worden. Niet enkel het A-domein maar ook C-, E- en TE-domeinen kunnen een rol spelen in de herkenning van aminozuren (Raaijmakers et al., 2006). Sommige bacteriën kunnen ook meerdere NRPS gen clusters bevatten, wat eveneens het ontstaan van verschillende CLP's verklaart (D'aes et al., 2010).

2.2.2.3 Biologisch nut

CLP's geproduceerd door fluorescerende *Pseudomonas* bacteriën hebben tal van biologische functies. In deze sectie zal voornamelijk de CLP-activiteit van plantgeassocieerde *Pseudomonas* bacteriën

bekeken worden, namelijk de oppervlakte eigenschappen, antimicrobiële activiteit, plant-pathogeniteit, geïnduceerde resistentie en biologische controle.

Oppervlakte eigenschappen

Beweegbaarheid

Zoals reeds eerder besproken maken fluorescerende *Pseudomonas* bacteriën voornamelijk biosurfactants aan als secundaire metabolieten. CLP's zijn een type biosurfactants en kunnen er dus voor zorgen dat de oppervlaktespanning verlaagd wordt of ze kunnen de viscositeit van het oppervlak veranderen. Zo kan viscosin de oppervlaktespanning verlagen tot 27mN/m (Ron & Rosenberg, 2001). Sommige plant-pathogenen en antagonistische fluorescerende *Pseudomonas* bacteriën zijn dus voor hun beweegbaarheid in de fylo- en rhizosfeer afhankelijk van hun CLP-productie, namelijk door de oppervlaktespanning te verlagen kunnen ze zich makkelijker bewegen naar de wortels of bladeren van de plant toe. Dit is bewezen voor *P. fluorescens* waar de productie van viscosin en amphisin zorgt voor een groter beweegbaarheid van de bacterie (D'aes et al., 2010; Raaijmakers et al., 2006). Waarschijnlijk speelt niet alleen de invloed van de oppervlaktespanning een rol bij de beweegbaarheid maar ook de fysische en chemische structuur van de biosurfactants (Raaijmakers et al., 2006). Hierdoor kan verklaard worden waarom sommige CLP's een hogere beweegbaarheid hebben dan anderen. Het is namelijk bewezen dat CLP's uit de amphisin groep een hogere beweegbaarheid van de *P. fluorescens* induceerde dan CLP's uit de viscosin groep (Nielsen et al., 2002).

Vasthechting en losmaking

De vasthechting van een bacterie aan het oppervlak van een plantwortel hangt af van zowel de hydrofobe reacties als de hydrofiële reacties van de geproduceerde CLP-molecule. De meeste natuurlijke oppervlakken hebben een negatieve lading, uitzonderlijk een positieve lading, wat van belang is bij de vasthechting van ionische CLP's waar ook de ioncondities en de pH een effect hebben (Neu, 1996). Na deze vasthechting kan dan biofilmformatie plaatsvinden. De rol van de CLP's in biofilmformatie hangt af van de fysische en chemische eigenschappen die ze bevatten (D'aes et al., 2010). CLP's als viscosin en massetolide geproduceerd door *P. fluorescens* en arthrofactin en putisolvin I en II geproduceerd door *P. putida* en *Pseudomonas species* MIS38, kunnen biofilmformatie induceren of veranderen. Dit is voornamelijk van belang in de rhizosfeer zodat ze de fluorescerende *Pseudomonas* bacteriën helpen de plantenwortels efficiënter te koloniseren (D'aes et al., 2010; Raaijmakers et al., 2006). CLP's als surfactin, geproduceerd door *Salmonella species* en *B. subtilis*, kunnen dan weer biofilmformatie inhiberen, wat belangrijk is in het onderzoek om biofilmen te vernietigen (Raaijmakers et al., 2006). Het binden van CLP's aan het celoppervlak van de bacterie kan de hydrofobe eigenschappen van zijn celoppervlak veranderen waardoor de bacterie zich uiteindelijk los kan maken van de biofilm. De moleculaire structuur van de CLP-moleculen is dus belangrijk voor vasthechting of losmaking van bacteriën aan oppervlakken (Neu, 1996).

Biobeschikbaarheid

CLP's kunnen andere uitgescheiden metabolieten zoals fenazines in oplossing brengen waardoor de bioactiviteit verhoogd wordt. Op deze manier hebben de CLP's en de fenazines een synergistisch effect; in sommige gevallen is het effect echter additief. Een onderzoek toont aan dat CLP's geproduceerd door *Pseudomonas species* CMR12a verantwoordelijk kunnen zijn voor de onderdrukking van *Verticillium microsclerotia* (D'aes et al., 2010). Dit werd aangetoond doordat de CLP-mutanten de aanwezigheid van

de microsclerotia veel minder kon onderdrukken. De CLP's kunnen een dunne biofilm vormen aan het oppervlak van de microsclerotia en er functioneren als transportmoleculen voor fenazines. Aangezien fenazines redox eigenschappen bevatten, hebben deze ook een functie als extracellulaire elektron shuttle waar CLP's eveneens helpen om deze rol te vervullen (D'aes et al., 2010). Plant-pathogene *Pseudomonas* bacteriën gebruiken ook CLP's om celwand-afbrekende-enzymen (CWDE) naar het oppervlak van de plant te brengen. Ze helpen mee in de biobeschikbaarheid van CWDE (Raaijmakers et al., 2006). Door de CWDE's ter beschikking te stellen wordt de celwand afgebroken en kunnen toxische surfactants het celmembraan binnengaan om de celmembraanfuncties te verstoren. Zonder de CWDE's zou dit effect minder nadrukkelijk voorkomen (Fogliano et al., 2002).

Antimicrobiële activiteit

Zowel CLP's als biologische membranen bestaan uit amfipatische moleculen waardoor ze bijzonder goed kunnen interageren met elkaar. CLP's kunnen reageren als breed spectrum agentia met cytolyse activiteit waardoor biologische membranen afgebroken worden en bacteriën, virussen, schimmels, mycoplasma's en oomyceten mede afsterven (D'aes et al., 2010; Raaijmakers et al., 2006). Sommige CLP's zijn toxisch voor bepaalde organismen terwijl ze minder activiteit vertonen tegen anderen. Deze verschillen kunnen te wijten zijn aan de structurele verschillen van zowel CLP als membraan. Ook stereochemische veranderingen en verschillen tussen één aminozuur kunnen verantwoordelijk zijn voor de verschillende activiteiten. Zo was de antimicrobiële activiteit van de gezuiverde CLP's van amphisin, lokisin en tensin hoger dan voor viscosinamide (Nielsen et al., 2002). De CLP's geproduceerd door de fluorescerende *Pseudomonas* bacteriën hebben vaak een toxisch effect tegen schimmels (D'aes et al., 2010). Viscosinamide, geproduceerd door *P. fluorescens* DR54, zou iontunnels kunnen creëren in het membraan van de oömyceet *Pythium ultimum* en de schimmel *Rhizoctonia solani*, waardoor hun groei verhinderd wordt (Nielsen et al., 1998). Ook tensin, geproduceerd door *P. fluorescens* 96.578, kan schimmelgroei van *R. solani* inhiberen (Nielsen et al., 2000). Echter, in het geval van *P. tolaasii* zorgt tolaasin ervoor dat de celmembraan van eetbare paddenstoelen verstoord wordt waardoor de ziekte 'brown blotch' floreert, wat leidt tot economische verliezen (D'aes et al., 2010). De CLP's massetolide en viscosin geproduceerd door *P. fluorescens* SS101 en SBW25 kunnen een rol spelen in de verdediging tegen predatie van protozoa *Naegleria americana* (Mazzola et al., 2009).

Plant-pathogeniteit

Een verscheidenheid van plant-pathogene *Pseudomonas* bacteriën produceren CLP's, namelijk *P. syringae* pv. *syringae*, *P. syringae* pv. *atropaciens* en *P. fuscovaginae*. Deze CLP's zijn fytotoxines wat betekent dat ze de plantgroei inhiberen of zelfs giftig zijn voor de plant. Fytotoxines zijn niet gastheer specifiek en kunnen necrose induceren in het plasmamembraan van plantencellen (D'aes et al., 2010). Deze fytotoxines worden opgedeeld in twee groepen aan de hand van hun structuur, namelijk de tolaasin en de syringomycin groep (Raaijmakers et al., 2006). In plantweefsel wordt necrose door beide groepen geïnduceerd door poriën te vormen. Door deze openingen in het plasmamembraan ontstaan er transmembranaire fluxen van H^+ , Ca^{2+} en K^+ waardoor de pH-gradiënt daalt over het plasmamembraan en de vloeistof binnen in de cel meer basisch wordt. Hierdoor valt de cel uiteen in meerdere cellulaire componenten waardoor de binnendringende bacterie verder kan vermeerderen en CLP-productie kan stijgen, wat uiteindelijk leidt tot de dood van de cel. Slechts enkele nanomol toxine is voldoende om deze poriën te maken waardoor dit proces erg efficiënt is (D'aes et al., 2010; Raaijmakers et al., 2006). CLP-fytotoxines kunnen eveneens een hemolytische activiteit bevatten wat

betekent dat ze rode bloedcellen kunnen afbreken. Hemolyse door tolaasin kan geïnhibeerd worden door divalente metaalionen toe te voegen zoals Zn^{2+} , Ca^{2+} en Mg^{2+} . Deze binden immers aan negatief geladen groepen aan de extracellulaire kant van het plasmamembraan dicht bij de plaats waar porievorming plaats vindt. De oppervlakte eigenschappen van CLP's spelen een indirecte rol in virulentie door plantweefsel te koloniseren en door CWDE's toegang te verlenen aan het oppervlak (de Bruijn et al., 2007; Lindow & Brandl, 2003; Raaijmakers et al., 2006). Plant-pathogene *Pseudomonas* bacteriën produceren tegelijk twee CLP's, één uit de tolaasin en één uit de syringomycin groep, terwijl andere *Pseudomonas* bacteriën doorgaans één CLP aanmaken. Hierdoor wordt vermoed dat de aanmaak van de twee CLP's nodig is voor plant-pathogene interacties te verwezenlijken. Het kan ook zijn dat de concentratie van het geproduceerde fytotoxine de pathogeniteit bepaalt. Uiteindelijk zijn de milieucondities en de natuurlijke omgeving eveneens factoren die de CLP-productie beïnvloeden (Raaijmakers et al., 2006). Structurele verschillen tussen CLP's leiden tot verschillende biologische activiteiten en dus verschillende activiteiten van de fytotoxines (D'aes et al., 2010).

Geïnduceerde resistentie

Sommige CLP's kunnen verdedigingssignalen induceren (ISR) in de plant tegen een breed spectrum van pathogenen. Zo kan massetolide A, geproduceerd door *P. fluorescens* SS101 resistentie induceren tegen de ziekte 'tomaat bruinrot', dat wordt veroorzaakt door *Phytophthora infestans* (Tran et al., 2007). Het is niet duidelijk hoe massetolide A resistentie induceert. Het is mogelijk dat een effect op het plasmamembraan van de plant zorgt voor een verdedigingsrespons in de plant. (D'aes et al., 2010).

Biologische controle

Biologische controle van plantenziektes betekent het beheersen van de ziekte of het aantal/effect van pathogenen doen dalen door middel van biologische mechanismen of organismen (Campbell, 1989). Meer specifiek kunnen levende micro-organismen in het milieu gebracht worden om het pathogeen te beheersen. *Pseudomonas* species kunnen gebruikt worden voor biocontrole om verschillende redenen. Zo kunnen ze vele exudaat componenten gebruiken als nutriëntenbron, zijn ze vaak overvloedig aanwezig in natuurlijke gronden, voornamelijk de rhizosfeer, en groeien ze snel (Chin-A-Woeng et al., 2003). Biocontrole met *Pseudomonas* species staat commercieel gezien nog niet zo ver als biocontrole met *Bacillus* species. Dit komt voornamelijk doordat *Bacillus* species makkelijker zijn om mee te werken aangezien ze sporen kunnen vormen. Desondanks hebben vele CLP's geproduceerd door *Pseudomonas* bacteriën een grote antibiotica activiteit *in vitro* waardoor ze vaak belangrijke effecten kunnen uitoefenen op plant-pathogenen zoals reeds eerder besproken. Toch moet steeds rekening gehouden worden met het feit dat *in situ* resultaten afhankelijk zijn van meerdere factoren zoals grond karakteristieken, aanwezigheid van andere micro-organismen, enzovoort en dus kunnen verschillen van *in vitro* resultaten (D'aes et al., 2010). Voorgaande onderzoeken kunnen helpen om de fluorescerende *Pseudomonas* bacteriën voor biologische controle te gebruiken.

2.3 Regulatie van CLP's

2.3.1 Inleiding

Er is weinig gekend over de genetische regulatie van CLP-productie omdat verscheidene factoren verschillende effecten kunnen verwezenlijken. Verschillende systemen zouden een rol kunnen spelen onder anderen transcriptie regulator genen, een twee componentensysteem en celdensiteit maar ook

verscheidene andere factoren zouden de biosynthese van CLP's kunnen beïnvloeden. Deze worden allen hieronder besproken waarbij Tabel 2 een samenvatting weergeeft van de reeds in de literatuur besproken regulatie systemen.

2.3.2 LuxR-type transcriptieregulatorgenen

De LuxR-familie bestaat uit transcriptionele regulatoren die een DNA-bindend helix-turn-helix (HTH) motief bevatten in de C-terminale regio. Deze LuxR-type regulatoren kunnen op basis van hun activatie mechanisme opgedeeld worden in twee grote groepen. De eerste groep bestaat uit regulatoren die tot een twee componentensysteem behoren en worden geactiveerd door fosforylatie (zie 2.3.3 GacS/GacA twee componentensysteem). De tweede groep zijn regulatoren die kunnen worden geactiveerd door binding van een autoinducer zoals AHL (zie 2.3.4 Quorum sensing). Verscheidene LuxR-type regulatoren bevatten het C-terminale HTH-motief en behoren toch niet tot één van de twee groepen. De dag van vandaag zijn verschillende LuxR-type regulatoren bekend (de Bruijn & Raaijmakers, 2009a). Een eerste is PpuR die een AHL-bindend domein bevat en dus tot de tweede groep LuxR-type regulatoren behoort. PpuR speelt een rol in de productie van putisolvin door *P. putida* PCL1445 (Dubern et al., 2006). Andere LuxR-type regulatoren zijn Sala, SyrF en SyrG in *P. syringae* pv. *syringae* die geen AHL-bindend domein bevatten noch een respons regulator domein en dus tot geen van beide groepen LuxR-type regulatoren behoort. Sala, SyrF en SyrG beïnvloeden de biosynthese van syringomycin en syringopeptin (Kitten et al., 1998; Lu et al., 2002a; Wang et al., 2006). Ook putisolvin wordt minder geproduceerd door *P. putida* bij een mutatie in SyrF (Dubern et al., 2008). De regulatie van viscosin biosynthese in *P. fluorescens* SBW25 kan eveneens gebeuren door twee LuxR-type regulatoren, namelijk ViscAR en ViscBCR die ook niet behoren tot één van de twee groepen (de Bruijn & Raaijmakers, 2009a). In *Pseudomonas* species MIS38 wordt de biosynthese van arthrofactin gereguleerd door ORF1 (Roongsawang et al., 2003). Verder zijn er eveneens verscheidene mechanismes die LuxR-type regulatoren kunnen beïnvloeden. Deze zullen hieronder besproken worden.

2.3.3 GacS/GacA twee componentensysteem

Een twee componentensysteem wordt vaak in bacteriën teruggevonden aangezien het de bacterie helpt om zich aan te passen aan veranderende condities of om bepaalde milieus te koloniseren. Een twee componentensysteem bestaat uit een sensor kinase en een cogaat respons regulator. De sensor kinase GacS werd als eerste beschreven in *P. syringae* pv. *syringae* B728a als essentiële factor voor laesie manifestatie op de bladeren van de boon. De respons regulator GacA werd als eerste beschreven in de *P. protegens* CHA0, waar het dienst doet als activator van antibiotica en cyanideproductie. Het bewijs dat GacS en GacA samen deel uit maken van een twee componentensysteem werd als eerste aangetoond in *P. syringae* pv. *syringae* en later voor verscheidene andere bacteriën. GacS behoort tot de klasse van onorthodoxe histidine sensor kinases die een fosforyl zenderdomein bevat, een ontvangersdomein en een histidine fosfotransfer (Hpt) uitgangdomein. Wanneer een milieusignaal het GacS bereikt treedt autofosforylatie op waarbij een fosforylgroep van het zenderdomein wordt overgebracht naar het primaire ontvangersdomein en vervolgens naar het Htp domein. Het Htp domein reageert hierna als een secundair zenderdomein door de fosforylgroep over te brengen naar de respons regulator GacA. Het GacA wordt gefosforyleerd en kan vervolgens binden met DNA en er een regulatorisch effect uitoefenen. De dag van vandaag worden er reeds 20 GacS en GacA homologen beschreven in enterische bacteriën, fluorescerende *Pseudomonas* bacteriën, *Vibrio* en *Azetobacter*. In

plant-pathogene bacteriën is het GacS/GacA twee componentensysteem vaak nodig voor virulentie. In plant-antagonistische bacteriën wordt het systeem dan weer gebruikt voor de expressie van biocontrole factoren zodat de plant beschermd is tegen pathogene schimmels. Zo kan het GacS/GacA systeem in een groep van plantgeassocieerde wortel-koloniserende *Pseudomonas* bacteriën expressie van genen activeren die nodig zijn voor de synthese van secundaire metabolieten met antimicrobiële activiteit. Ook kan deze groep bacteriën de expressie van genen die instaan voor secreterende enzymen, positief reguleren (Heeb & Haas, 2001). In de *P. syringae* pv. *syringae* reguleert GacS de biosynthese van syringomycin (Hrabak & Willis, 1992). Het GacS reageert met GacA waardoor ook GacA in *P. syringae* pv. *syringae* invloed heeft op de regulatie van de biosynthese van syringomycin (Rich et al., 1994). De amphisin biosynthese in *Pseudomonas* species DSS73 wordt eveneens gereguleerd door GacS (Koch et al., 2002). De tolaasin biosynthese in *P. tolaasii* wordt gereguleerd door PheN die fungeert als GacS in een twee componentensysteem (Grewal et al., 1995). Mutaties in GacS/GacA zorgden voor een verlies in CLP-productie wat resulteerde in een gedaalde virulentie en een verlies van biocontrole activiteit (de Bruijn & Raaijmakers, 2009b; Song et al., 2014). GacS en GacA kunnen ook andere regulatorische genen beïnvloeden. Zo wordt het SalA, een LuxR-type regulator in *P. syringae* pv. *syringae* stammen B301D en B728a positief beïnvloed door GacA en GacS. DnaK (zie 2.3.5 Heat shock proteïnen) wordt eveneens positief gereguleerd door het GacS/GacA systeem in *P. putida* (Raaijmakers et al., 2006).

2.3.4 Quorum sensing

Celdensiteit kan eveneens een rol spelen in de globale regulatie van CLP-biosynthese. Signaalmoleculen kunnen aangemaakt worden zoals N-acyl homoserine lactonen (AHL's) en wanneer deze AHL-concentratie een bepaalde grens overschrijdt kunnen andere genen gereguleerd worden zowel positief als negatief. Dit mechanisme waar celdensiteit een rol speelt in de expressie van genen wordt quorum sensing genoemd. *P. fluorescens* 5064 maakt AHL's aan om de biosynthese van viscosin te reguleren (Cui et al., 2005; Song et al., 2015). Het PpuR-RsaL-PpuR quorum sensing systeem in *P. putida* PCL1445 controleert de biosynthese van putisolvin I en II (zie ook 2.3.2 LuxR-type transcriptie regulator genen) (Dubern et al., 2006). De CLP-biosynthese van andere *Pseudomonas* species wordt echter niet beïnvloed door AHL's. Zo wordt de biosynthese van massetolide A door *P. fluorescens* SS101 niet beïnvloed door AHL-gebaseerd quorum sensing. Dit toont aan dat de regulatie van CLP-biosynthese kan verschillen tussen species en tussen stammen van dezelfde species (de Bruijn & Raaijmakers, 2009b; Song et al., 2014).

2.3.5 Heat schok proteïnen

DnaK is een heat shock proteïne die behoort tot de Hsp70 heat shock proteïne familie. Deze Hsp70 is een moleculaire chaperone die helpt bij de correcte opvouwing van proteïnen in cellen. Hsp70 chaperonen hebben meerdere rollen waarvan één is dat ze door warmte geïnduceerde beschadiging in proteïnen kunnen voorkomen of herstellen (de Bruijn & Raaijmakers, 2009a; Schröder et al., 1993). In *P. putida* PCL1445 wordt DnaK waarschijnlijk gereguleerd door σ^{32} . DnaJ en GrpE zijn co-chaperonen van DnaK en kunnen samen een chaperonencomplex vormen (Dubern et al., 2005). DnaK kan nu de regulatie van de biosynthese van verscheidene CLP's beïnvloeden. Zo zal DnaK in *P. putida* PCL1445 de biosynthese van putisolvin I en II reguleren (Dubern et al., 2005). De deletie van DnaK of GrpE in *P. syringae* pv. *glycinea* resulteert in het verlies van de levensvatbaarheid terwijl een mutatie in dezelfde genen bij 28°C geen invloed heeft op groei van *P. putida* PCL1445. Het verlies van DnaK zou

gecompenseerd kunnen worden door andere heat shock proteïnen of DnaK is gewoonweg niet belangrijk. Bij hogere temperaturen zoals bij 35°C heeft de mutatie in DnaK en GrpE wel invloed op de groei van *P. putida* PCL1445. Het is niet geweten of DnaK in *P. putida* PCL1445 direct of indirect wordt gereguleerd door GacS/GacA, echter, de heat shock respons blijkt geen deel uit te maken van de GacS/GacA regulatie (Dubern et al., 2005). DnaK kan eveneens massetolide biosynthese reguleren in *P. fluorescens* SS101 en het wordt gesuggereerd dat het niet onder de controle staat van het GacS/GacA twee componentensysteem (Song et al., 2014).

2.3.6 Protease ClpP

ClpP is een ATP-afhankelijke serine protease welke zeer geconserveerd is en verscheidene functies bevat waarvan intracellulaire proteolyse. De ATPases waarmee ClpP geassocieerd is kunnen ofwel het proteïne substraat herkennen ofwel kunnen ze met het substraat interageren via adaptorproteïnen. De substraten worden dan uit hun opgevouwen structuur gehaald en worden vervolgens naar de proteolytische kamer van het ClpP protease gebracht dat leidt tot proteïne degradatie en het vrijkomen van proteïne fragmenten (de Bruijn & Raaijmakers, 2009b; Song et al., 2015). De ClpP protease is eveneens een regulator in de biosynthese van CLP's. Massetolide biosynthese in *P. fluorescens* SS101 wordt namelijk gereguleerd door ClpP. Deze ClpP regulatie kan gebeuren op verschillende manieren (Song et al., 2015). ClpP kan invloed hebben op het transcriptionele regulator gen LuxR(mA) waardoor massetolide biosynthese gereguleerd wordt. Een ander scenario is dat ClpP de citroenzuurcyclus en het aminozuur metabolisme beïnvloedt wat de aanmaak van proline beïnvloedt en dat heeft op zijn beurt invloed op LuxR(mA). De ClpP regulatie van massetolide biosynthese in *P. fluorescens* SS101 is onafhankelijk van de regulatie door het GacS/GacA twee componentensysteem (de Bruijn & Raaijmakers, 2009b; Song et al., 2014; Song et al., 2015).

2.3.7 Andere regulatorische genen

2.3.7.1 GidA

Het *gidA* gen is betrokken bij de globale regulatie van syringomycin en syringopeptin biosynthese in *P. syringae*. Er wordt eveneens gesuggereerd dat GidA een rol speelt in de regulatie van luxR-type regulator *salA* in *P. syringae*. Het *gidA* gen is belangrijk bij de timing en coördinatie van chromosoom initiatie en is nodig voor efficiënte chromosoom verdubbeling (Kinscherf & Willis, 2002).

2.3.7.2 SyrA

SyrA is voornamelijk betrokken bij de biosynthese van arginine toch heeft het ook een regulatorische functie in de biosynthese van syringomycin in de *P. syringae* pv. *syringae* (Lu et al., 2003).

2.3.7.3 SyrP

Het *syrP* gen cluster in *P. syringae* pv. *syringae* is betrokken bij de fosfotransfer bij de regulatie van syringomycin productie waardoor het gelijkenis vertoont met de histidine kinases van de twee componentensystemen. SyrP bevat echter niet de domeinen die instaan voor autofosforylatie activiteit en wordt daarom beschouwd als een intermediair tussen de sensor proteïne en de respons regulator van een twee componentensysteem genaamd fosforelay systeem (Zhang et al., 1997).

2.3.8 Milieueffecten

Voorgaande beschreven genen en proteïnen worden vaak geactiveerd of gedeactiveerd door bepaalde omgevingssignalen. Nutritionele factoren kunnen namelijk een invloed hebben op de regulatie van de biosynthese van CLP's. Ijzerconcentraties vanaf 2µM hebben een positief regulatorisch effect op de productie van syringomycin in *P. syringae* pv. *syringae* terwijl anorganische fosfaatconcentraties vanaf 1mM de productie kunnen onderdrukken (Bender et al., 1999; Gross, 1985). Ook kan het soort koolstof substraat invloed hebben op de regulatie, zoals aangetoond in *P. fluorescens* DR54 voor de biosynthese van viscosinamide. Hier hebben limitatie van koolstof, stikstof en fosfor eveneens een invloed op de regulatie (Nielsen et al., 1999). De invloed van abiotische condities zoals pH, temperatuur en zuurstof werden eveneens bestudeerd (Raaijmakers et al., 2006). Niet alleen nutritionele factoren of abiotische condities spelen een rol maar ook plant signaal moleculen kunnen een invloed uitoefenen. Primaire signalen die de productie van syringomycin in *P. syringae* pv. *syringae* beïnvloeden zijn bijvoorbeeld fenolische glycosides. Deze zijn aanwezig in de bladeren, stam en bloemen van verscheidene planten die *P. syringae* pv. *syringae* bevatten. Arbutin is zo'n fenolische β-glucoside die de biosynthese van syringomycin kan reguleren (Bender et al., 1999).

Tabel 2. Proteïnen betrokken bij de regulatie van CLP's geproduceerd door *Pseudomonas* species.

CLP	Species/ Stam	Proteïne	Referentie
Viscosin	<i>P. fluorescens</i> SBW25	ViscAR en ViscBCR (LuxR-type)	(de Bruijn & Raaijmakers, 2009a)
	<i>P. fluorescens</i> 5064	AHL (Quorum sensing)	(Cui et al., 2005)
Massetolide	<i>P. fluorescens</i> SS101	DnaK (Heat shock proteïne)	(Song et al., 2014)
	<i>P. fluorescens</i> SS101	ClpP	(Song et al., 2014)
Amphisin	<i>Pseudomonas</i> sp. DSS73	GacS	(Koch et al., 2002)
Arthrofactin	<i>Pseudomonas</i> sp. MIS38	ORF1 (LuxR-type)	(Roongsawang et al., 2003)
Tolaasin	<i>P. tolaasii</i>	PheN (GacS)	(Grewal et al., 1995)
Syringopeptin	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> B728a	GidA	(Kinscherf & Willis, 2002)
	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> B301D	SalA, SyrG, SyrF (LuxR-type)	(Lu et al., 2002a)
Syringomycin	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> B728a	LemA (GacS)	(Hrabak & Willis, 1992)
	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> B728a	GacA	(Rich et al., 1994)
	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> B728a	GidA	(Kinscherf & Willis, 2002)
	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> B728a	SalA (LuxR-type)	(Kitten et al., 1998)
Syringomycin	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> B301D	SalA, SyrG, SyrF (LuxR-type)	(Lu et al., 2002a)
	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> B301D	SyrA (arginine biosynthese)	(Lu et al., 2003)
	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> B301D	SyrP	(Zhang et al., 1997)
	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> B301D	SyrF (LuxR-type)	(Dubern et al., 2008)
Putisolvin	<i>P. putida</i>	SyrF (LuxR-type)	(Dubern et al., 2008)
	<i>P. putida</i> PCL1445	GacA	(Dubern et al., 2005)
	<i>P. putida</i> PCL1445	GacS	(Dubern et al., 2005)
	<i>P. putida</i> PCL1445	DnaK, DnaJ, GrpE (Heat shock proteïne)	(Dubern et al., 2005)
	<i>P. putida</i> PCL1445	PpuR (LuxR-type / Quorum sensing)	(Dubern et al., 2006)

2.4 Secretie van CLP's

2.4.1 Inleiding

Er bestaan verscheidene secretiesystemen voor Gram-negatieve bacteriën die kunnen opgedeeld worden in twee grote groepen; de enkelvoudige-membraan-overspannende transporters die enkel het buitenste membraan overspannen en de dubbele-membraan-overspannende transporters die zowel het buitenste als het binnenste membraan overspannen. De dubbele-membraan-overspannende transporters kunnen opgedeeld worden in tripartite secretie, type II, type III, type IV en type VI secretie systemen. Hierbij kan de tripartite secretie opgedeeld worden in RND effluxpompen en type I secretiesystemen. Beide systemen vormen een tripartiet dubbele-membraan-overspannend kanaal met een binnenste membraan component, een periplasma adaptorproteïne en een buitenste membraanproteïnekanaal (Costa et al., 2015). Deze twee systemen worden hieronder uitgebreid besproken aangezien deze systemen van belang zijn voor de secretie van CLP's.

2.4.2 RND effluxpompen

2.4.2.1 Inleiding

'Resistance-nodulation-division' (RND) pompen zijn een familie van multidrug effluxpompen. Ze pompen kleine exogene moleculen die vaak antibacteriële componenten zijn uit de cel waardoor ze dikwijls een rol spelen in antibiotica resistentiemechanismen. De binnenste membraancomponent maakt gebruik van een protongradiënt als energiebron. Het transport van de substraten wordt hierbij gekoppeld aan het transport van de protonen. Het substraat kan zowel in het periplasma als aan de binnenkant van het binnenste membraan binden aan de binnenste membraancomponent. Vervolgens wordt het substraat naar een holte in de periplasma proteïne gebracht waarbij het protonentransport voor de nodige energie zorgt. Doordat het substraat bindt wordt het complex, dat bestaat uit het binnenste membraancomponent en de periplasma proteïne, verbonden met de buitenste membraancomponent. Door deze binding wordt de buitenste membraancomponent geopend en kan het substraat de cel verlaten (Costa et al., 2015; Daury et al., 2016; Marquez, 2005).

2.4.2.2 MexAB-OprM

Twaalf RND-type effluxpompen worden teruggevonden in *P. aeruginosa* waaronder de reeds goed bestudeerde MexAB-OprM (Kourtesi et al., 2013). De *mexAB-oprM* genen in *P. aeruginosa* vormen een operon dat codeert voor MexA, MexB en OprM. Hierbij is MexA de binnenste membraanproteïne, MexB de periplasma fusieproteïne en OprM het buitenste membraankanaalproteïne die moleculen direct buiten de cel kan pompen. Het MexAB-OprM systeem speelt een rol in het naar buiten pompen van tal van antibiotica en chemotherapeutische stoffen zoals fluoroquinolones, β -lactams, tetracyclines, chloramphenicol en norfloxacin. Op deze manier draagt het MexAB-OprM systeem bij aan de resistentie van *P. aeruginosa* (Evans & Poole, 1999; Li et al., 1995).

2.4.3 Type I secretie systemen

2.4.3.1 Inleiding

Type I secretiesystemen zorgen voor de secretie van grote aantallen gevarieerde proteïnesubstraten. Het systeem is verwant aan de RND-familie van multidrug effluxpomp. De type I secretiesystemen die een rol spelen in antibiotica resistentie zijn echter vaak drug specifieke pompen. De binnenste membraancomponent behoort tot de 'ATP-binding cassette' (ABC)-transporterfamilie. Deze gebruiken de hydrolyse van ATP om energie op te weken om het substraat te transporteren. Het substraat in het cytoplasma bindt aan de binnenste membraancomponent en wordt overgezet naar de holte in de periplasma fusieproteïne door ATP te gebruiken als energiebron. Door de binding van het substraat wordt het complex van binnenste membraancomponent en periplasma fusieproteïne gebonden aan de buitenste membraancomponent die vervolgens opent en het substraat het extracellulair milieu instuurt. Bij type I secretiesystemen is de periplasma fusieproteïne verbonden aan de ABC-transporter of wordt deze gerekruteerd wanneer het substraat bindt aan de binnenste membraanproteïne (Costa et al., 2015; Marquez, 2005).

2.4.3.2 MacA-MacB

MacB is een ABC-type effluxpomp dat gebonden is aan MacA. Hierbij is MacA de periplasma fusieproteïne en MacB de binnenste membraanproteïne (Kobayashi et al., 2001). De genen die instaan voor de aanmaak van deze proteïnen, *macA* en *macB*, zijn redelijk geconserveerd en komen voor in tal van *Pseudomonas* species. Zo bevatten de sessiline biosynthesecluster in *Pseudomonas* sp. CMR12a en de orfamide biosynthesecluster in *Pseudomonas protegens* Pf-5 de *macA* en *macB* genen (Olorunleke et al., 2007). Het *macA* en *macB* gen van *Pseudomonas putida* PCL1445 bevatten respectievelijk 85% en 88% gelijkheid met *Pseudomonas entomophila* L48 (Dubern et al., 2008). In *Pseudomonas* species MIS38 is een periplasma proteïne gen teruggevonden dat 87% gelijkheid vertoont met *macA* van *P. protegens* Pf-5 (Lim et al., 2009). *Pseudomonas fluorescens* SS101 bevat twee open reading frames (ORF) die 84% en 85% gelijkheid vertonen met respectievelijk *macA* en *macB* van *P. protegens* Pf-5. Al deze *macA* en *macB* genen worden vaak teruggevonden naast de CLP-biosyntheseclusters van verschillende *Pseudomonas* species. Deze positie is redelijk geconserveerd en suggereert een belangrijke rol in CLP-biosynthese (de Bruijn et al., 2008). Het werd reeds aangetoond dat de secretie van het CLP putisolvin in *P. putida* PCL1445 afhankelijk is van *macA* en *macB* (Dubern et al., 2008). Ook in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* is de secretie van fytotoxische CLP's, namelijk syringomycin en syringopeptin, afhankelijk van een PseE en PseF proteïne die gelijkheid vertonen met MacA en MacB respectievelijk (Cho & Kang, 2012).

2.4.3.3 NodT

In een aantal CLP-producerende stammen wordt het luxR-type regulatorgen van de CLP-biosynthesecluster voorafgegaan door een *nodT* gen dat zorgt voor de aanmaak van een effluxtransporter. Deze NodT is een buitenste membraanproteïne. Of deze NodT effluxtransporter al dan niet een rol speelt in de secretie van de CLP is nog niet aangetoond (D'aes et al., 2014). De regio naast de massetolide gencluster in *P. fluorescens* SS101 heeft eveneens een ORF dat 75% gelijkheid vertoont met *nodT* van *P. fluorescens* Pf0-1 (de Bruijn et al., 2008).

2.3 Het CLP orfamide

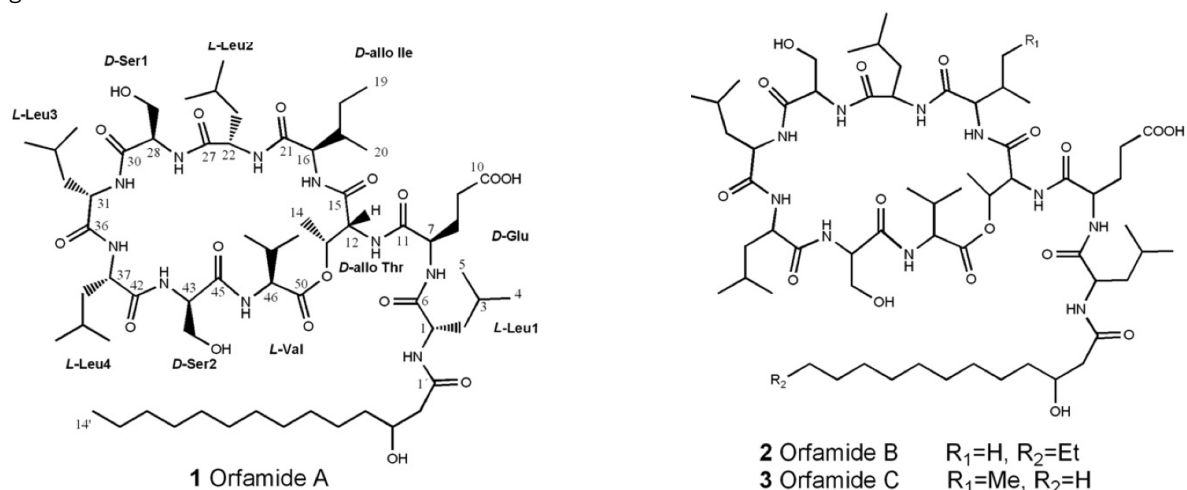
2.3.1 Inleiding

Orfamides zijn opgebouwd uit tien aminozuren die een cyclische peptide vormen. Ze worden gekarakteriseerd door een 3-hydroxy laurinezuur of een myristinezuur die verbonden is aan de N-terminus van de cyclische peptide. Door hun verschillende aminozuursequentie en cyclisatieschema zijn ze verschillend van de andere CLP's (Gross et al., 2007). Ze worden voornamelijk geproduceerd door *Pseudomonas protegens* bacteriën en door enkele nauw verwante isolaten.

2.3.2 *Pseudomonas protegens* stammen

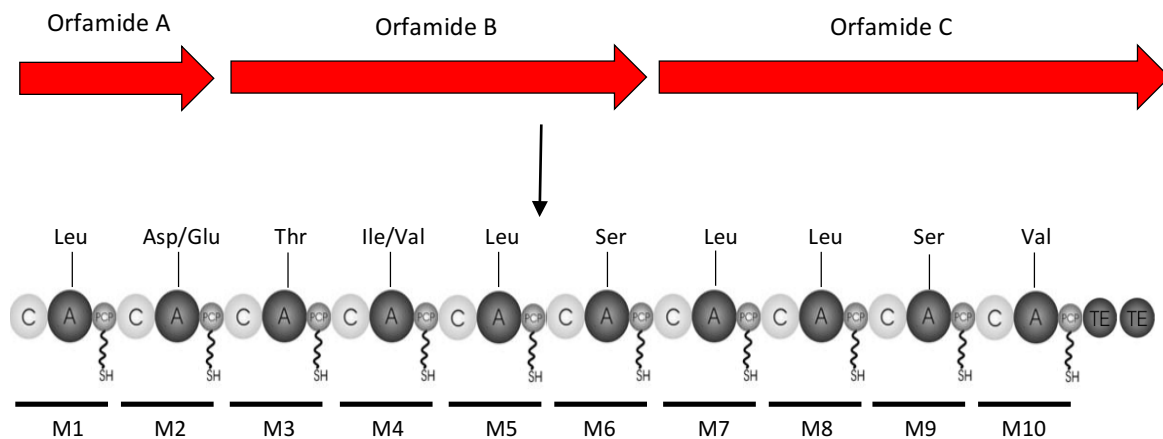
2.3.2.1 *Pseudomonas protegens* Pf-5

Pseudomonas protegens Pf-5 werd voor het eerst geïsoleerd van de wortels van de katoenplant (*Gossypium*) in Texas, US (Howell & Stipanovic, 1979). In deze soort werd de orfamide gencluster ontdekt waar het drie grote ORF's bevat namelijk orfamide A (*ofaA*), orfamide B (*ofaB*) en orfamide C (*ofaC*). Deze genen staan in voor de productie van de CLP's orfamide A, orfamide B en orfamide C met m/z waarden respectievelijk gelijk aan 1295, 1281 en 1267. De structuren worden weergegeven in Figuur 4.

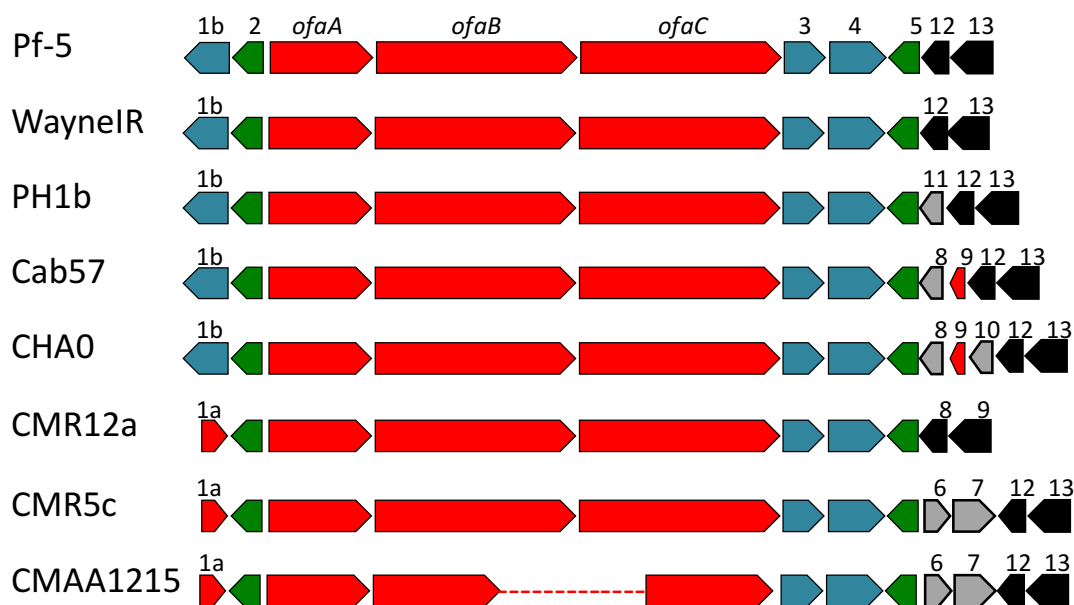


Figuur 4. Structuur van CLP's orfamide A, B en C (Gross et al., 2007).

De genen *ofaA*, *ofaB* en *ofaC* bestaan gezamenlijk uit tien modules die elk een C-domein, A-domein en T-domein bevatten die de elongatiemodule vormt. De typische initiatiemodule die geen C-domein bevat wordt niet teruggevonden in *ofaA*. Er worden geen E-domeinen teruggevonden in *ofaA*, *ofaB* en *ofaC* maar zes van de tien C-domeinen bevatten geconserveerde C/E-sequenties in de N-terminale regio. Aan de C-terminus van *ofaC* zijn ook twee TE-domeinen aanwezig. De drie componenten orfamide A, orfamide B en orfamide C worden door dezelfde gencluster aangemaakt. Dit werd aangetoond doordat een mutatie in *ofaA* zorgde voor de eliminatie van de productie van alle drie de orfamides. Gerelaxeerde substraatspecificiteit is de reden voor het ontstaan van de verschillende orfamides (Gross et al., 2007). De gencluster en de module organisatie in *P. protegens* Pf-5 zijn terug te vinden in Figuur 5. De orfamide gencluster met flankerende genen van *P. protegens* Pf-5 en andere stammen worden weergegeven in Figuur 6.



Figuur 5. Orfamide gencluster bestaand uit 3 ORF's namelijk *ofaA*, *ofaB* en *ofaC* en de NRPS-module organisatie in *P. protegens* Pf-5. De pijlen representeren de ORF's die de NRPS's vormen. Asp, asparaginezuur; Glu, glutaminezuur; Ile, isoleucine; Leu, leucine; Ser, serine; Thr, threonine; Val, valine; C, condensatie domein, A; adenylatie domein; PCP, thiolatie domein; Te, thioesterase domein; M, module (Gross et al., 2007).



Figuur 6. Orfamide biosynthesecuster met flankerende regio's van orfamide producerende *Pseudomonas* isolaten. Rood: biosynthesegenen; Groen: regulatorgenen; Blauw: transportergenen; Grijs/zwart: andere genen. (1a) GCN5-gerelateerde N-acteyltransferase; (1b) RND effluxsysteem, buitenste membraanproteïne; (2) LuxR transcriptieregulator, *luxUp*; (*ofaA*, *ofaB*, *ofaC*) Nonribosomale peptidesynthase; (3) Macrolide effluxproteïne, *macA*; (4) Macrolide effluxproteïne, *macB*; (5) LuxR transcriptieregulator, *luxDown*; (6) Flagellair basaal lichaampoteïne, *flgD*; (7) Flagellaire haakproteïne, *flgE*; (8) Putatieve gnat familie acetyltransferase; (9) Familie 2 glycosyl transferase; (10,11) Hypothetische proteïne; (12) Glyoxalase familieproteïne; (13) Heme transporter CemD, radicale SAM domein bevattende proteïne (Ma et al., 2016).

2.3.2.2 *Pseudomonas protegens* CHA0

Pseudomonas protegens CHA0 werd voor het eerst geïsoleerd van de wortels van de tabaksplant (*Nicotiana tabacum*) in Zwitserland (Stutz et al., 1986). Recent werd aangetoond dat ook deze soort orfamide kan aanmaken, voornamelijk orfamide A (Ma et al., 2016).

2.3.2.3 *Pseudomonas protegens* F6

Pseudomonas protegens F6 werd voor het eerst geïsoleerd uit een olie vervuilde grond in Korea. Het 16S rRNA vertoont 100% gelijkheid met de *P. protegens* CHA0 en de productie van orfamide A werd aangetoond (Jang et al., 2013).

2.3.2.4 *Pseudomonas protegens* Cab57

Pseudomonas protegens Cab57 werd voor het eerst geïsoleerd uit de rhizosfeer van het herderstasje (*Capsella bursa-pastoris*) dat groeide in een veld in Hokkaido, Japan. De nucleotiden van deze soort vertonen 98,47% gelijkheid met die van *P. protegens* CHA0 en 98,22% met *P. protegens* Pf-5 waarbij het 16S rRNA 100% gelijkheid toont met beide isolaten. De gencluster voor orfamide A van de *P. protegens* Pf-5 is eveneens geconserveerd in deze soort (Takeuchi et al., 2014).

2.3.2.5 Andere *Pseudomonas protegens* stammen

Recent werd aangetoond via BLAST dat er mogelijk nog meer orfamide producerende *Pseudomonas* isolaten bestaan namelijk *P. fluorescens* Wayne1R geïsoleerd uit de rhizosfeer van maïs en sojaboon in Ohio, US en *Pseudomonas* species PH1b geïsoleerd uit phytotelma van carnivore planten in Maleisië. (Anon, 2014; McSpadden Gardener et al., 2005; Vasconcellos et al., 2013). De orfamide clusters van alle hierboven besproken *Pseudomonas* stammen worden weergegeven in Figuur 6 (Ma et al., 2016).

2.3.3 Nauw verwante *Pseudomonas* isolaten

2.3.3.1 *Pseudomonas* species CMR12a

Pseudomonas species CMR12a behoort tot de fluorescerende *Pseudomonas* bacteriën en bevindt zich tussen de *P. protegens* en *P. chlororaphis* subgroepen (D'aes et al., 2014). Het werd voor het eerst geïsoleerd uit de rhizosfeer van de cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*) in Cameroon en ook deze soort maakt orfamide aan. De orfamide gencluster vertoont hoge gelijkheid met de gencluster van *P. protegens* Pf-5. De *ofaA*, *ofaB* en *ofaC* genen van *Pseudomonas* sp. CMR12a vertonen namelijk respectievelijk 79%, 82% en 82% gelijkheid met *ofaA*, *ofaB* en *ofaC* van *P. protegens* Pf-5. Een ander verschil is de structuur van de orfamide moleculen die worden aangemaakt. Zo maakt *Pseudomonas* sp. CMR12a de CLP's orfamide B, orfamide D en orfamide E aan met m/z waarden 1254, 1280, 1282 respectievelijk waarbij orfamide B het meest geproduceerd wordt. Het aangemaakte CLP orfamide B is identiek aan orfamide B van *P. protegens* Pf-5 maar orfamide D en orfamide E verschillen van orfamide A en orfamide C doordat hun isoleucine-residu vervangen is door een valine-residu en ze verschillen van orfamide B door een verschil in vetzuurketen (D'aes et al., 2014). *Pseudomonas* sp. CMR12a maakt naast orfamide nog een ander CLP aan, namelijk sessiline.

2.3.3.1 *Pseudomonas* species CMR5c

Ook *Pseudomonas* species CMR5c behoort tot de fluorescerende *Pseudomonas* bacteriën en bevindt zich tussen de *P. protegens* en *P. chlororaphis* subgroepen (D'aes et al., 2014; Perneel et al., 2007). Het

werd geïsoleerd uit de rhizosfeer van de cocoyam in Cameroon en maakt eveneens orfamide aan. De genen *ofaA*, *ofaB* en *ofaC* van *Pseudomonas* sp. CMR5c vertonen respectievelijk 82%, 84% en 84% gelijkheid met *ofaA*, *ofaB* en *ofaC* van *P. protegens* Pf-5 (Perneel et al., 2007). *Pseudomonas* sp. CMR5c maakt vijf verschillende soorten orfamide aan namelijk orfamide B, D, E, F en G waarbij orfamide F en G m/z waarden bezitten van respectievelijk 1307,7 en 1309,6. Orfamide G verschilt van orfamide B in zijn vetzuurketenlengte terwijl orfamide G en F verschillen omdat orfamide F een dubbele binding bevat. De orfamide gencluster van *Pseudomonas* sp. CMR5c komt overeen met die van *Pseudomonas* sp. CMR12a, weergegeven in Figuur 6 (Ma et al., 2016).

2.3.3.1 *Pseudomonas* species CMAA1215

Via BLAST werd recent nog een orfamide producerende *Pseudomonas* soort ontdekt namelijk de *Pseudomonas* species CMAA1215 die werd geïsoleerd uit de bodem van Mangroves in Brazilië (Anon, 2014; McSpadden Gardener et al., 2005; Vasconcellos et al., 2013)

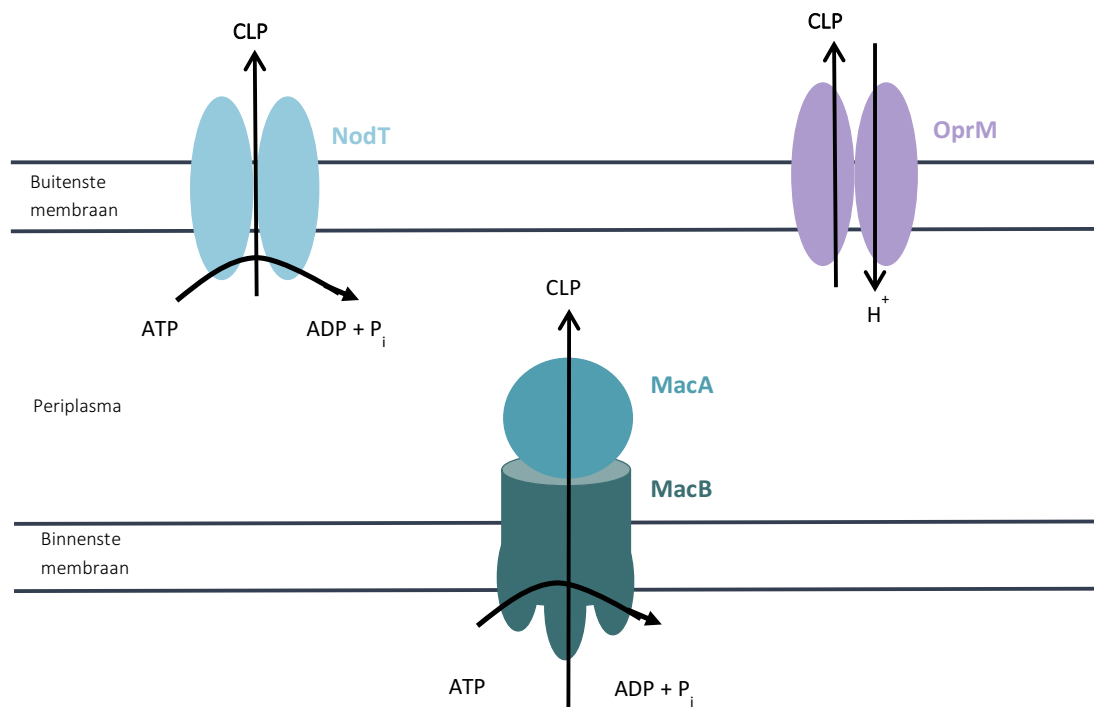
2.3.4 Regulatie van orfamide

De orfamide cluster bevat twee luxR-type transcriptieregulatorgenen, namelijk *luxUp* en *luxDown*. Stroomopwaarts van de orfamide cluster bevindt zich *luxUp* en stroomafwaarts bevindt zich *luxDown*, weergegeven in Figuur 6. Deze genen zijn waarschijnlijk betrokken bij de regulatie van orfamide in bovengenoemde *Pseudomonas* isolaten. De luxR-type transcriptieregulatorgenen in andere *Pseudomonas* isolaten zijn namelijk betrokken bij de regulatie van CLP-productie (de Bruijn & Raaijmakers, 2009a). In *Pseudomonas* sp. CMR12a en CMR5c regelen deze twee regulatorgenen ook de biosynthese van orfamide aangezien een mutatie in ofwel *luxUp* ofwel *luxDown* ervoor zorgt dat er geen orfamide wordt aangemaakt (Ma et al., 2016).

2.3.5 Secretie van orfamide

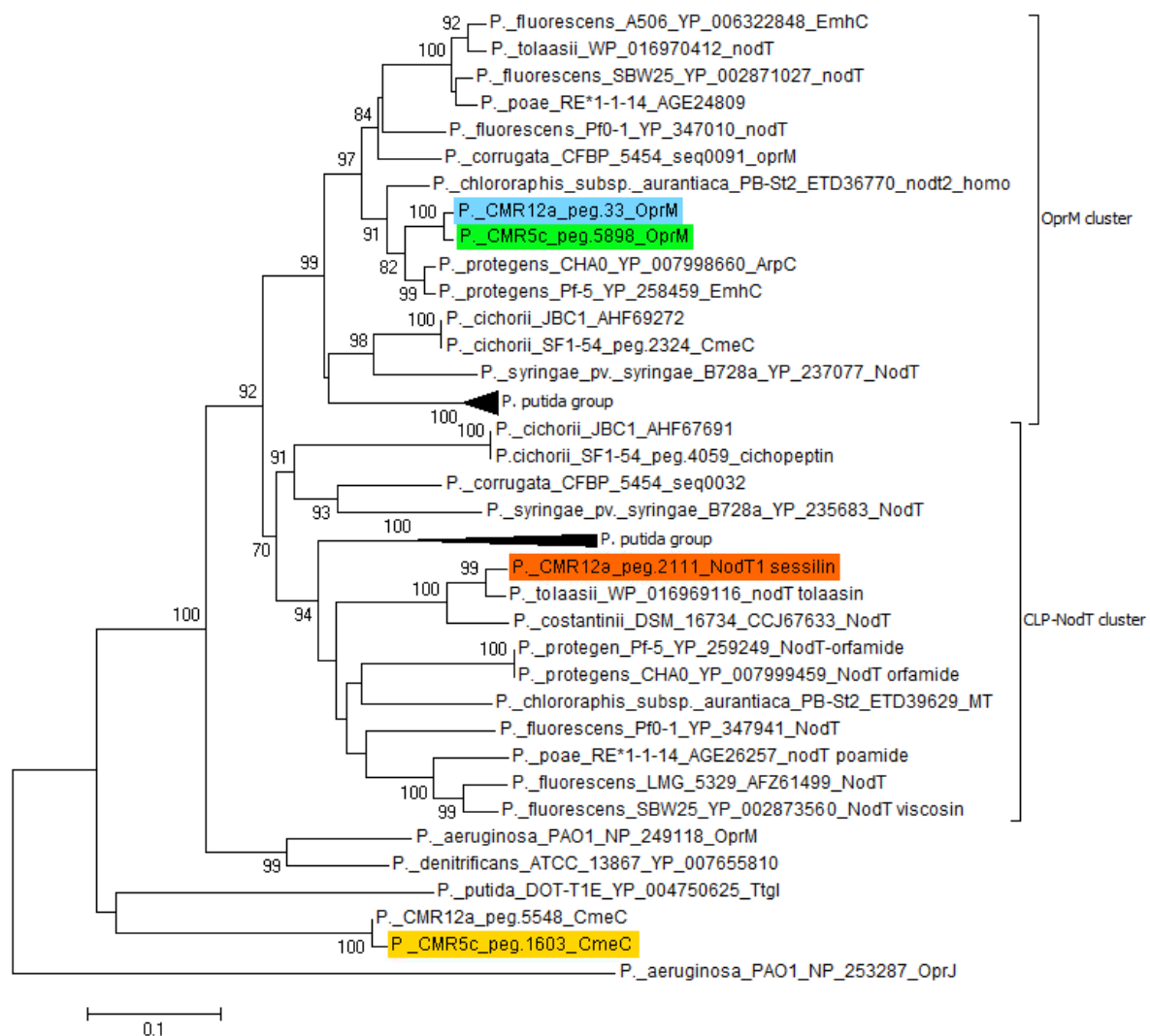
Net achter de orfamide cluster bevinden zich genen die instaan voor de secretie, namelijk *macA* en *macB*, weergegeven in Figuur 6. *MacA* schrijft het membraan fusieproteïne af dat zich nestelt in het periplasma van het plasmamembraan. *MacB* schrijft het integraal membraanproteïne af dat zich in het binnenste plasmamembraan bevindt en ATP gebruikt als energiebron. De orfamide producerende *Pseudomonas protegens* stammen bevatten nog een *nodT* gen dat zich bevindt voor het *luxUp* regulatorgen. Dit *nodT* gen zorgt voor de aanmaak van een buitenste membraanproteïne. *Pseudomonas* sp. CMR12a, CMR5c en CMAA1215 bevatten dit *nodT* gen niet in de orfamide biosynthesecluster, duidelijk weergegeven in Figuur 6 (Ma et al., 2016; Olorunleke et al., 2007). *Pseudomonas* sp. CMR12a bevat het *nodT* gen echter wel in de CLP sessiline biosynthesecluster die 71% gelijkheid vertoont met *P. protegens* Pf-5. De sessiline biosynthesecluster bevat eveneens de *macA* en *macB* genen (D'aes et al., 2014). Het MacA-MacB-NodT mechanisme gebruikt ATP voor zijn werking en zorgt voor de secretie van sessiline (data nog niet gepubliceerd). Ook een ander mechanisme is verantwoordelijk voor de secretie van sessiline, namelijk het MexA-MexB-OprM systeem dat gebruik maakt van een protonengradiënt voor zijn werking (data nog niet gepubliceerd). Sessiline kan dus door twee systemen buiten de cel worden gebracht. Hierbij lijkt de buitenste membraanproteïne OprM eerder actief te zijn in de log groeifase van de cel terwijl NodT meer gebruikt wordt in een later stadium (data nog niet gepubliceerd). De orfamide die wordt aangemaakt in *Pseudomonas* sp. CMR12a gebruikt eveneens het MacA-MacB-NodT mechanisme om de extracellulaire ruimte te bereiken (data nog niet gepubliceerd). Orfamide

gebruikt dus de NodT buitenste membraanproteïne die wordt aangemaakt door het *nodT* gen uit een andere CLP-biosyntheseclassie, namelijk die van sessiline. Ook gebruikt orfamide het OprM buitenste membraanproteïne om de cel te verlaten (data nog niet gepubliceerd). Het OprM dat normaal gebruikt wordt bij het MexA-MexB systeem en het NodT dat afgeschreven wordt door *nodT* aanwezig in de sessiline biosyntheseclassie, worden beiden gebruikt als buitenste membraanproteïnen die elk afzonderlijk samenwerken met het MacA-MacB systeem. Deze secretiesystemen worden weergegeven in Figuur 7.



Figuur 7. Secretiepumpsysteem MacA-MacB-NodT en MacA-MacB-OprM in *Pseudomonas* sp. CMR12a. MacB en NodT maken gebruik van ATP voor hun werking. OprM behoort tot de RND-familie die gebruik maakt van protonen om de cyclische lipopeptiden in het periplasma verder de extracellulaire ruimte in te pompen.

Ook *Pseudomonas* sp. CMR5c bevat een *oprM* gen dat 100% gelijkheid vertoont met het *oprM* gen van *Pseudomonas* sp. CMR12a dat waarschijnlijk instaat voor het naar buiten brengen van orfamide. *Pseudomonas* sp. CMR5c en CMR12a bevatten eveneens een gen, namelijk *cmeC*, dat homologie vertoont met de genen die buitenste membraanproteïnen afschrijven. *Cmec* schrijft waarschijnlijk ook een buitenste membraanproteïne af waarvan het werkingsmechanisme nog niet gekend is (data nog niet gepubliceerd). Figuur 8 geeft de fylogenetische boom weer van een aantal *Pseudomonas* isolaten op basis van hun buitenste membraanproteïnen.



Figuur 8. Fylogenetische boom van aantal *Pseudomonas* isolaten gealigneerd met de buitenste membraanproteïne sequenties. De wortel van de boom is buitenste membraanproteïne sequentie van OprJ van *P. aeruginosa_PAO1_NP_253287*. De gekleurde *Pseudomonas* isolaten worden onderzocht in deze thesis daar reeds mutanten werden aangemaakt.

2.3.6 Biologische relevantie van orfamide

De activiteit van orfamide maakt het geschikt voor allerlei toepassingen. *P. protegens* Pf-5 maakt het meest orfamide A aan dat zorgt voor het immobiel maken van zoösporen, wat wordt geobserveerd door de snelle lyse van de oömyceet *Phytophthora ramorum*. In dezelfde studie wordt echter aangetoond dat de groei van het mycelium van een schimmel of oömyceet niet wordt tegengegaan. Het heeft wel een effect op de amphotericin B-resistente stam van *Candida albicans* (Gross et al., 2007). De productie van orfamide B in *Pseudomonas* sp. CMR12a zorgt voor de groeionderdrukking van het mycelium van de schimmel *Rhizoctonia solani* op boon en kool (D'aes et al., 2011; Olorunleke et al., 2014). Ook oefent het biocontrole activiteit uit op cocoyamwortels waar het *Pythium myriotylum* onderdrukt (Ma et al., 2016; Perneel et al., 2007). Orfamide speelt tevens een rol in swarming dat waarschijnlijk een effect heeft op de capaciteit van de bacterie om zich te verspreiden in de rhizosfeer. Aangezien *Pseudomonas* sp. CMR5c gerelateerd is aan *Pseudomonas* sp. CMR12a, wordt verwacht dat de orfamide productie in

Pseudomonas sp. CMR5c dezelfde rol zal hebben (Perneel et al., 2007). *P. protegens* F6 maakt orfamide A aan dat insecticide activiteit vertoont tegen de groene perzikluiz (Myzus persicae). Orfamide A is dodelijk voor de perzikluizen in bepaalde dosissen en zou gebruikt kunnen worden om luizen onder controle te houden in de organische agricultuur (Jang et al., 2013).

2.4 Cocoyam

De cocoyam, in het Latijns *Xanthosoma sagittifolium*, behoort tot de *Araceae* familie en vindt zijn oorsprong in tropisch Amerika. In de jaren negentig werd het ingevoerd in West-Afrika dat nu één van de grootste producenten is. De knol van de cocoyam is eetbaar en voedt ongeveer 200 miljoen mensen in de tropen en subtropen. De plant is dus een belangrijke voedselbron en hoge opbrengsten zijn gewenst. Twee variëteiten worden voornamelijk gecultiveerd namelijk de witte cocoyam en de rode cocoyam. De witte cocoyam is het populairst onder de populatie maar is echter gevoelig aan ziektes, specifiek aan de oömyceet *Pythium myriotylum* wat 'root rot disease' of wortelrot veroorzaakt. De rode cocoyam is hier minder gevoelig voor. Door wortelrot kan de opbrengst tot wel 90% verminderen. De oömyceet is zowel effectief op de jongere als oudere planten. Symptomen van de ziekte zijn het geel worden van bladeren, dwerggroei en ernstige verkleining van het wortelsysteem. Chemische pesticiden kunnen deze oömyceet bestrijden maar deze hebben een negatief effect op het milieu en de gezondheid van de mens. Om die reden is het onderzoek naar biocontrole heel belangrijk (De Maeyer et al., 2011; Tambong et al., 1999; Tambong & Höfte, 2001). Zo'n 40 *Pseudomonas* species werden geïsoleerd uit de rhizosfeer van de witte en rode cocoyam (Perneel et al., 2006). Hieruit is *Pseudomonas aeruginosa* een gekende en effectieve biocontrole agent die *P. myriotylum* reeds effectief kon controleren. *P. aeruginosa* is echter een opportunistisch menselijk pathogeen waardoor gezocht werd naar alternatieve *Pseudomonas* isolaten. Uit de geïsoleerde *Pseudomonas* species werd gezocht naar *in vitro* antagonisme tegen *P. myriotylum*. Antagonistische stammen konden enkel worden teruggevonden in de rhizosfeer van de rode cocoyam (Höfte & Altier, 2010). De antagonistische stammen *Pseudomonas* sp. CMR12a en CMR5c bleken wortelrot 60% en 53% terug te dringen waar *P. aeruginosa* wortelrot kon terugdringen tot 48% (Gardener, 2007; Perneel et al., 2007). De rode cocoyam lijkt dus een strategie ontworpen te hebben om specifieke antagonistische micro-organismen te stimuleren om *P. myriotylum* te onderdrukken. Deze hypothese wordt gesteund met het feit dat de rode cocoyam in steriele grond even gevoelig is als de witte cocoyam (Höfte & Altier, 2010; Perneel et al., 2007). De onderdrukking van *P. myriotylum* is onder anderen afhankelijk van de productie van CLP's. Om die reden is het interessant CLP-productie door *Pseudomonas* isolaten en hun invloeden op de cocoyam te onderzoeken.

3. Doelstelling

Vele fluorescerende *Pseudomonas* bacteriën, behorende tot de *P. putida* en *P. fluorescens* groep (zie Figuur 1), staan bekend om hun biocontrole activiteit (Höfte & Altier, 2010b). Deze biocontrole activiteit is mogelijk door de aanmaak van metabolieten die een invloed kunnen uitoefenen op de bacterie zelf en/of het extracellulair milieu. Onderzoek naar een klasse van deze metabolieten, namelijk de cyclische lipopeptiden, is toegenomen daar deze vaak biocontrole activiteit vertonen. Orfamide is zo'n cyclische lipopeptide waarvan het mechanisme nog niet helemaal is uitgepluisd. Recent onderzoek toonde aan dat tal van *Pseudomonas protegens* stammen en enkele nauw verwante isolaten orfamide kunnen aanmaken. Dit orfamide blijkt een rol te spelen in de beweegbaarheid van de bacterie en kan de oppervlaktespanning verlagen. Ook werd reeds aangetoond dat orfamide een biocontrole activiteit bezit tegen enkele schimmels en oömyceten (D'aes et al., 2014; Gross et al., 2007; Jang et al., 2013; Ma et al., 2016). Hoewel de biosynthese en bioactiviteit reeds werden onderzocht is de regulatie nog niet grondig bestudeerd. Het is reeds bekend dat twee luxR-type regulatorgenen een rol spelen in de regulatie van orfamide (de Bruijn & Raaijmakers, 2009a; Ma et al., 2016). Interessant om te onderzoeken is of deze genen in alle stammen dezelfde invloed uitoefenen. Hiervoor kan het fenotype van mutanten in *luxUp* en *luxDown* vergeleken worden met het fenotype van het wild type. Er is voornamelijk zeer weinig gekend over de secretie van orfamide. Dat de *macA* en *macB* transportergenen waarschijnlijk een rol spelen in het naar buiten brengen van orfamide is reeds gekend (Ma et al., 2016; Olorunleke et al., 2007). De mate waarin ze een rol kunnen spelen is echter nog niet bestudeerd. Onderzoek naar deze secretiemechanismen vertelt misschien iets meer over hun specifieke rol in de secretie van orfamide. In het bijzonder kan het nut van de buitenste membraanproteïnen worden bestudeerd. Hiervoor kan het fenotype van de mutanten in deze buitenste membraanproteïnen vergeleken worden met het fenotype van het wild type. Verder onderzoek naar de bioactiviteit van orfamide is ook aangeraden. Het verlies in opbrengsten van de cocoyam in Afrika is nog niet verholpen (Höfte and Altier, 2010b). Daarom is belangrijk dat de plant-pathogeen *Pythium myriotylum* wordt bestreden. Het nut van orfamide in de rhizosfeer van de cocoyam zou weleens een oplossing kunnen bieden voor de bestrijding van *P. myriotylum*.

De doelstelling van deze thesis is het onderzoeken van de biosynthese, regulatie, secretie en bioactiviteit van orfamide in verschillende fluorescerende *Pseudomonas* populaties. Hiervoor zal de regulatie voornamelijk in *Pseudomonas* sp. CMR5c bestudeerd worden daar er reeds een *luxUp* en *luxDown* mutant was aangemaakt. De secretie zal eveneens voornamelijk in *Pseudomonas* sp. CMR5c worden bestudeerd daar er mutaties waren gemaakt in twee buitenste membraanproteïnen. Ook het secretiesysteem van *Pseudomonas* sp. CMR12a zal verder worden onderzocht. De bioactiviteit van orfamide tegen de plant-pathogene oömyceet *P. myriotylum* wordt bestudeerd in *Pseudomonas* sp. CMR5c en *P. protegens* CHA0 omdat er in beide stammen reeds orfamide mutanten werden gemaakt. Op deze manier kon de invloed van orfamide worden bestudeerd. Hierbij bevat *Pseudomonas* sp. CMR5c het transporter *nodT* gen niet in de orfamide biosynthesecluster waar *P. protegens* CHA0 dit *nodT* gen wel bevat (Ma et al., 2016).

4. Materiaal & Methoden

De verschillende *Pseudomonas* isolaten en primers die gebruikt werden tijdens de experimenten worden weergegeven in Tabel B1. De samenstelling van de aangemaakte media worden weergegeven in Tabel B2 en B3.

4.1 Fenotype bepaling

4.1.1 Druppelinzaktest

Met een druppelinzaktest kan snel nagegaan worden of een bacterie orfamide uitscheidt. De biosurfactants eigenschap van orfamide zorgt ervoor dat de oppervlaktespanning van een druppel bacteriecultuur verlaagt en dat de druppel in elkaar zakt. *Pseudomonas* sp. CMR5c en mutanten werden opgegroeid op LB-medium op 28°C. Kolonies werden opgepikt, overgebracht in 5mL LB-vloeistof en overnacht geïncubeerd in de shaker op 28°C. Een druppel van 50µL van de vloeibare bacteriecultuur werd op parafilm gebracht. Als blanco staal werd een 50µL druppel water gebruikt. De druppels werden gekleurd met broomthymolblauw waardoor de druppel blauw kleurde en het resultaat beter zichtbaar werd.

4.1.2 Swarming

Swarming is eveneens een test om te bepalen of orfamide uitgescheiden werd aangezien het de beweegbaarheid van de bacterie stimuleert. *Pseudomonas* sp. CMR12a, CMR5c, *P. protegens* Pf-5 en mutanten werden opgegroeid op KB-medium op 28°C. Kolonies werden opgepikt, overgebracht in 5mL KB-vloeistof en overnacht geïncubeerd in de shaker op 28°C. De OD₆₂₀ werd bepaald met KB-vloeistof als blanco staal. Het nodige volume werd berekend zodat 10⁷ CFU aanwezig waren in 1,5mL KB-vloeistof. Hiervoor werden Formule 1 tot en met 3 gebruikt. De OD werd via een reeds bepaalde regressiecoëfficiënt omgezet in CFU/mL.

Formule 1:

$$1 \text{ OD}_{620} = 8,2293 \cdot 10^8 \frac{\text{CFU}}{\text{mL}}$$

Om alle bacteriën op een beginconcentratie te zetten van 10⁷ CFU per mL KB-vloeistof moet het volume waarin dit aantal bacteriën aanwezig is worden bepaald.

Formule 2:

$$\frac{\frac{10^7 \text{ CFU}}{\text{mL KB}_{\text{vloeistof}}}}{\frac{\text{CFU}}{\text{mL}}} = \frac{\text{mL}}{\text{mL KB}_{\text{vloeistof}}}$$

Het volume in mL dat zou worden aangevuld met KB-vloeistof tot een volume van 1mL wordt bereikt, zou dan een concentratie hebben van 10⁷ CFU/mL KB-vloeistof. Er werd echter 1,5mL KB-vloeistof gebruikt in plaats van 1mL. Om dit te corrigeren werd volgende formule gebruikt.

Formule 3:

$$\frac{\text{mL}}{\text{mL KB}_{\text{vloeistof}}} \cdot 1000 \frac{\mu\text{L}}{\text{mL}} \cdot 1,5 \text{ mL KB}_{\text{vloeistof}} = \mu\text{L}$$

Wanneer dit volume in μL toegevoegd wordt aan 1,5mL KB-vloeistof bevatte de oplossing een concentratie van 10^7 CFU/mL. Deze 1,5mL KB-vloeistof met berekende hoeveelheid bacteriecultuur werd in een welletje van een zes well plaat gebracht en vervolgens geïncubeerd op 28°C gedurende 24 uur. Van de bacteriecultuur werd 1mL overgebracht naar een 1,5mL eppendorftube dat gecentrifugeerd werd gedurende 2 minuten aan 13,400g. De cellen werden tweemaal gewassen met 1mL normale saline oplossing door te resuspenderen en te centrifugeren gedurende 2 minuten op 13,400g. De cellen werden opgelost in 1mL normale saline oplossing en de OD_{620} werd bepaald. Een $5\mu\text{L}$ druppel van de oplossing werd in het midden van een 0,6% agar LB-plaat gebracht. De platen werden gedurende 17 uur ondergebracht in de incubator op 28°C .

4.1.3 HPLC-MS-analyse

Pseudomonas sp. CMR12a, CMR5c en mutanten werden opgegroeid op LB-medium op 28°C . Kolonies werden opgepikt, overgebracht in 5mL LB-vloeistof en overnacht geïncubeerd in de shaker op 28°C . De OD_{620} werd gemeten met LB-vloeistof als blanco staal. Het volume nodig zodat 10^7 bacteriën aanwezig waren in 2,5mL LB-vloeistof werd berekend met Formules 1 tot en met 3 waarbij Formule 3 in die mate aangepast werd dat vermenigvuldigd werd met 2,5mL in plaats van 1,5mL. Drie welletjes van een zes well plaat werden opgevuld met 2,5mL LB-vloeistof en de berekende hoeveelheid bacteriecultuur voor elke soort. Deze werden op 28°C geïncubeerd zonder te shaken gedurende zowel 17 uur, 24 uur als 41 uur zodat drie tijdstippen ter beschikking waren. De OD_{620} werd gemeten, de vloeibare bacterieculturen uit de welletjes werden elk in 1,5mL eppendorftubes gebracht en werden gecentrifugeerd gedurende 2 minuten aan 13400rpm. Het supernatans werd in een nieuwe eppendorftube gebracht en vervolgens gefilterd met behulp van een 10mL spuit en een $0,22\mu\text{m}$ filter. Het gefilterde supernatans werd ingepakt voor HPLC-analyse.

4.1.4 Inhibitoren

4.1.4.1 Concentratie

Om bepaalde effluxpompsystemen te inhiberen kunnen inhibitoren worden gebruikt. Een eerste inhibitor is carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCC) die de protonafhankelijke secretiepompen deactiveert. Een tweede inhibitor is natriumorthovanadaat (NOV) die reageert als een ATPase inhibitor. Een derde en laatste inhibitor is glybenclamide (GLB) die eveneens verscheidene ATP-transporters kan inhiberen. De concentraties van CCC, NOV en GLB die gebruikt werden zijn respectievelijk $25\mu\text{M}$, 1mM en $10\mu\text{M}$. Tabel B3 geeft weer hoe deze inhibitoren klaargemaakt werden.

4.1.4.2 Swarming

Pseudomonas sp. CMR12a, CMR5c en mutanten werden opgegroeid op LB-medium op 28°C . Kolonies werden opgepikt, overgebracht in 5mL KB-vloeistof en overnacht geïncubeerd in de shaker op 28°C . De OD_{620} werd bepaald met LB-vloeistof als blanco staal. Het volume nodig zodat 10^7 bacteriën aanwezig waren in 1,5mL LB-vloeistof werd berekend met Formules 1 tot en met 3. Er werd telkens $50\mu\text{L}$ inhibitor toegevoegd aan de 1,5mL LB-vloeistof met bacteriecultuur. Dit werd geïncubeerd op 28°C gedurende 24 uur. Van de bacteriecultuur werd 1mL overgebracht naar een 1,5mL eppendorftube dat gecentrifugeerd werd gedurende 2 minuten aan 13,400g. De cellen werden tweemaal gewassen met 1mL normale saline oplossing en opgelost in 1mL normale saline oplossing waarna de OD_{620} werd bepaald. Een $5\mu\text{L}$ druppel van de oplossing werd in het midden van een 0,6% agar LB-plaat gebracht.

De platen werden 17 uur geïncubeerd op 28°C waarna de resultaten werden bekeken. Er werd ook een swarmingtest uitgevoerd waar 1µL DMSO werd toegevoegd in plaats van inhibitor. Dit om na te kijken of er een effect van DMSO waarneembaar was. Het effect in % tussen de behandeling zonder inhibitor en een behandeling met inhibitor wordt berekend met Formule 4.

Formule 4:

$$\% \text{ Effect} = \frac{\text{Behandeling met inhibitor} - \text{Behandeling zonder inhibitor}}{\text{Behandeling zonder inhibitor}}$$

Om na te gaan of dit effect significant is werd op de diameterwaarden statistiek toegepast met het programma SPSS. Er werd gebruik gemaakt van de Mann-Whitney Test om elke behandeling met één andere behandeling te vergelijken met als nulhypothese dat de twee behandelingen gelijk zijn. Een significantieniveau van 5% werd gebruikt zodat indien de p-waarde groter was dan 0,05 de nulhypothese behouden werd en indien de p-waarde kleiner was dan 0,05 de nulhypothese verworpen werd.

4.1.5 Reverse Transcriptase Polymerasekettingreactie (RT-PCR)

4.1.5.1 Cellen opgroeien

Pseudomonas sp. CMR5c, *P. protegens* Pf-5 en mutanten werden opgegroeid op LB-medium op 28°C. Kolonies werden opgepikt, overgebracht in 5mL LB-vloeistof en overnacht geïncubeerd in de shaker op 28°C. De OD₆₂₀ werd gemeten met LB-vloeistof als blanco staal. Het volume nodig zodat 10⁷ bacteriën aanwezig waren in 2,5mL LB-vloeistof werd berekend met Formules 1 tot en met 3 waarbij formule 3 in die mate aangepast werd dat vermenigvuldigd werd met 2,5mL in plaats van 1,5mL. Drie welletjes van een zes well plaat werden opgevuld per soort en werden op 28°C geïncubeerd zonder te shaken gedurende zowel 17 uur als 24 uur zodat twee tijdstippen ter beschikking waren. De OD₆₂₀ werd gemeten, de vloeibare bacterieculturen uit de welletjes werden elk in 2mL eppendorftubes gebracht en werden gecentrifugeerd gedurende 10 minuten aan 10000rpm op 20°C. Het supernatans werd afgegoten en de celpellets werden bevroren in vloeibaar stikstof en bewaard in -80°C.

4.1.5.2 RNA-extractie

Wanneer de cellen uit de -80°C werden gehaald werden ze onmiddellijk in vloeibare stikstof bewaard. In elke eppendorftube werd een beat geplaatst waarna de cellen tot poeder werden vermalen in de homogenisator gedurende 30 seconden op 24Hz. Er werd 1mL Trizol (TRI Reagent) toegevoegd aan 100mg poeder en dit werd onmiddellijk gevortext gedurende 1 minuut. De stalen werden geïncubeerd gedurende 5 minuten op 28°C. Hierna werd 0,2mL chloroform toegevoegd en werd er goed geschud met de hand gedurende 15 seconden. De eppendorftubes werden geïncubeerd gedurende 3 minuten op kamertemperatuur. Vervolgens werden de stalen gecentrifugeerd gedurende 15 minuten op 12000g op 4°C. Hierdoor ontstond bovenaan een waterige fase die werd overgebracht naar een nieuwe eppendorftube. Het was hierbij belangrijk dat de interfase zeker niet werd aangeraakt. De waterige fase werd geprecipiteerd door 0,5mL isopropanol toe te voegen, goed te mengen en 10 minuten op kamertemperatuur te laten incuberen. Vervolgens werd gecentrifugeerd gedurende 10 minuten op 12000g op 4°C. Het supernatans werd verwijderd en de pellet werd gewassen met 1mL 75% ethanol. Dit werd gevortext gedurende 2 tot 3 seconden tot de pellet loskwam. Er werd gecentrifugeerd gedurende 5 minuten op 7000rpm op 4°C waarna het supernatans verwijderd werd. Vervolgens werd nog eens gecentrifugeerd gedurende 1 minuut op 7000rpm op 4°C om al het residuele supernatans te

verwijderen met een pipet. De stalen met RNA werden aan de lucht gedroogd gedurende ongeveer 10 minuten tot de pellet onzichtbaar was. Het RNA werd nu opgelost in 40µL RNase vrij water en de stalen werden bewaard in -80°C.

4.1.5.3 DNase behandeling, concentratie bepaling

Het was zeer belangrijk om alles in ijs te bewaren terwijl er gewerkt werd. Aan de bevroren stalen werd 40µL 10x TURBO DNase Buffer toegevoegd en 2µL DNase. Dit werd geïncubeerd gedurende 30 minuten op 37°C. Hierna werd 8µL inactivatie Reagent toegevoegd waarna goed geschud werd en 2 minuten geïncubeerd werd op kamertemperatuur. Na mengen werd gecentrifugeerd gedurende 1,5 minuten op 10000g. Het supernatans werd overgebracht naar een verse eppendorftube en met de spectrofotometer werd de concentratie van de stalen bepaald. Het volume werd aangepast zodat een massa van 3000ng RNA bekomen werd. Dit volume RNA werd vervolgens aangevuld met RNA vrij water tot 10µL zodat een concentratie van 300ng RNA/µL werd bekomen.

4.1.5.4 Maken van copy DNA (cDNA)

Om van het RNA cDNA te maken werd een PCR uitgevoerd met MasterMix (MM) uit Tabel 3. Van de MM werd 10µL bij 10µL van het RNA-staal gevoegd in PCR eppendorftubes. Op deze manier is er 3000ng RNA in 20µL om cDNA aan te maken. Het PCR-programma uit Tabel 4 werd gebruikt.

Tabel 3. MM voor PCR voor maken van cDNA uit RNA, berekend voor één staal.

Materialen	Volume per staal
10x RT Buffer	2µL
25xdNTP Mix(100mM)	0,8µL
10xRT Random Primers	2µL
Reverse Transcriptase(multiscribe)	1µL
Rnase inhibitor	1µL
Water (nuclease free)	3,2µL

Tabel 4. PCR-programma voor het maken van cDNA uit RNA.

PCR Programma	Tijd
25°C	10 min
37°C	40 min
85°C	5 min

4.1.5.5 Aanmaken primers

Voor de PCR-analyse moesten primers voor elk te onderzoeken gen worden aangemaakt. Via de website van “NCBI” kon de nucleotide sequentie van elk gen genoteerd worden (“NCBI,”z.d.). De website van “Primer3” gebruikte deze nucleotide sequentie om een aantal forward en reverse primers voor te stellen (“Primer3,”z.d.). Hierbij werd rekening gehouden met dat voor PCR-analyse het af te schrijven transcript ongeveer 500bp lang moet zijn. De forward en reverse primers werden gekozen waarbij rekening gehouden werd met dat de ideale primer ongeveer 20bp lang is, 50% GC-nucleotiden bevat en dat de smelttemperaturen van de primers dicht bij elkaar liggen. Via de website van “Multiple Primer Analyzer” werd nagegaan of de gekozen primers specifiek waren en geen dimeren vormden met elkaar (“Multiple Primer Analyser,”z.d.). Om de expressie van een gen na te gaan, werd voor elk te bestuderen gen een forward primer aangemaakt voor het begin stukje van het gen en een reverse primer voor het eind stukje van het gen. Om de co-expressie tussen twee genen na te gaan werd een forward primer

aangemaakt voor het eind stukje van het eerste gen en een reverse primer voor het begin stukje van het volgende gen.

4.1.5.6 PCR

Indien transcriptie plaatsvond in de *Pseudomonas* species werd het RNA aangemaakt. Door dit RNA om te zetten naar cDNA en primers te gebruiken voor de te onderzoeken genen kon bepaald worden of de *Pseudomonas* species de genen afschreven. De te onderzoeken genen waren *luxUp*, *ofaA*, *ofaB*, *ofaC*, *macA*, *macB*, *luxDown* en *nodT* voor sommige *Pseudomonas* isolaten. Een MasterMix (MM) werd aangemaakt voor deze genen en voor alle co-expressies voor zowel *Pseudomonas* sp. CMR5c als *P. protegens* Pf-5, weergegeven in Tabel 5. Van de MM werd 49µL bij 1µL van het cDNA-staal gebracht in de PCR-eppendorftubes zodat een volume van 50µL bekomen werd. Het PCR-programma dat werd gebruikt wordt weergegeven in Tabel 6. Vervolgens werd 20µL van het PCR-product op 1,5% agarosegel geladen voor gelelektroforese.

Tabel 5. MasterMix voor PCR met 1µL staal

Materialen	Volume
Go Taq Reaction Buffer	10µL
10µM Primer F	2µL
10µM Primer R	2µL
10mM dNTP mix	0.5µL
Go Taq DNA Polymerase	0,2µL
Water (RNase vrij)	32,3µL

Tabel 6. PCR-programma voor het amplificeren van de sequenties behorende tot de biosynthese, regulatie en secretie van de orfamide cluster.

PCR Programma	Tijd
94°C	2 min
30 cycli van: 94°C	30 sec
59°C	60 sec
72°C	30 sec
72°C	10 min

4.1.6 Kwantitatieve Polymerasekettingreactie (qPCR)

Om te bepalen hoeveel keer het transcript werd afgeschreven werd qPCR gebruikt. Via RNA-extractie werd RNA geëxtraheerd uit de te onderzoeken bacterie *Pseudomonas* sp. CMR5c en mutanten na zowel 17 uur opgroeien als 24 uur opgroeien (zie 4.1.5 RT-PCR). Van dit RNA werd cDNA gemaakt met MasterMix samenstelling gegeven in Tabel 3 en het gebruikte programma in Tabel 4. De concentratie van het cDNA werd bepaald en werd zodanig verdund met RNase vrij water dat een concentratie van 10ng/µL werd bereikt. De te onderzoeken genen waren *rpoD*, *macA*, *macB* en *luxDown* waarvoor primers werden aangemaakt op dezelfde manier als voor RT-PCR-analyse (zie 4.1.5.5 Aanmaken primers). Voor qPCR-analyse moest het af te schrijven transcript wel tussen de 150bp en 200bp lang zijn in plaats van 500bp zoals bij PCR-analyse. Een MasterMix werd aangemaakt voor elk gen, weergegeven in Tabel 7. Aan elke MasterMix van één genstaal wordt 2,5µL cDNA toegevoegd. Op deze manier bevatte elk genstaal 25ng cDNA.

Tabel 7. MasterMix voor qPCR voor één genstaal.

Materialen nodig per staal	Volume per genstaal
Sybergreen	12,5µL
3µM Primer F	2,5µL
3µM Primer R	2,5µL
Water (RNAse vrij)	5µL

Drie bacteriestalen werden onderzocht voor *Pseudomonas* sp. CMR5c gedurende 17 uur en 24 uur namelijk het wild type, de *luxUp* mutant en de *luxDown* mutant. Tabel 8 geeft weer hoe de qPCR werd opgesteld.

Tabel 8. QPCR-opstelling voor *Pseudomonas* sp. CMR5c gedurende zowel 17 uur als 24 uur. *rpoD*; housekeeping gen; mA, *macA*; mB, *macB*; ID, *luxDown*. WT, wild type; LU, *luxUp* mutant; LD, *luxDown* mutant; ntc, negatieve controle.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	rpoD WT	rpoD LU	rpoD LD	rpoD ntc	mA WT	mA LU	mA LD	mA ntc	mB WT	mB LU	mB LD	mB ntc
B	ID WT	ID LU	ID LD	ID ntc								

4.2 *In vitro* inhibitie experiment

Om na te gaan of de *Pseudomonas* species de groei van *Pythium myriotylum* kan inhiberen werd een inhibitietest uitgevoerd. Op een PDA-plaat werd *P. myriotylum* opgegroeid in de 28°C incubator gedurende drie dagen. *Pseudomonas* sp. CMR5c, *P. protegens* CHA0 en orfamide mutanten werden opgegroeid op KB-medium op 28°C gedurende twee dagen. Kolonies werden opgepikt, overgebracht in 5mL KB-vloeistof en overnacht geïncubeerd in de shaker op 28°C. Van de bacteriecultuur werd 4mL gecentrifugeerd gedurende 10 minuten aan 10000g. Het supernatans werd gefilterd met een 0,22µm filter naar een nieuwe eppendorftube. De overige 1mL van de bacteriecultuur werd overgebracht naar een nieuwe eppendorftube. Wanneer de oömyceet voldoende opgegroeid was, werd met een boor nummer 3 kleine cirkeltje uitgesneden. Met behulp van boor nummer 4 werd er in het midden van nieuwe PDA platen een cirkel uitgeboord. Rond de cirkel, op 1cm afstand, werden vier agarcirkeltjes met *P. myriotylum* geplaatst. Van het gefilterd supernatans werd 100µL in het cirkelgaatje gebracht, telkens drie replicaten. Van de bacteriecultuur werd 100µL in het cirkelgaatje gebracht, eveneens drie replicaten. De platen werden geïncubeerd op 28°C gedurende twee dagen waarna de diameter van de inhibitiezone opgemeten werd. Op deze diameterwaarden van elke behandeling weergegeven in Tabel 9 werd vervolgens statistiek toegepast met het programma SPSS. Er werd gebruik gemaakt van de Kruskal-Wallis Test met nulhypothese dat alle behandelingen gelijk zijn en de Mann-Whitney Test om elke behandeling met één andere behandeling te vergelijken met als nulhypothese dat de twee behandelingen gelijk zijn. Een significantieniveau van 5% werd gebruikt zodat indien de p-waarde groter was dan 0,05 de nulhypothese behouden werd en indien de p-waarde kleiner was dan 0,05 de nulhypothese verworpen werd.

Tabel 9. Behandelingen van *in vitro* inhibitie experiment op *P. myriotylum*. 'Δorf' zijn de orfamide mutanten, 'cellen' wijst erop dat de bacteriecultuur met cellen is gebruikt, zonder deze aanwijzing betekent dat het supernatans werd gebruikt. Bij de controle werd enkel *P. myriotylum* gebruikt zonder bacteriecultuur.

Nummer	Behandeling
1	Controle
2	<i>Pseudomonas protegens</i> CHA0
3	<i>Pseudomonas protegens</i> CHA0 - Δorf
4	<i>Pseudomonas protegens</i> CHA0 - cellen
5	<i>Pseudomonas protegens</i> CHA0 - Δorf - cellen
6	<i>Pseudomonas species</i> CMR5c
7	<i>Pseudomonas species</i> CMR5c - Δorf
8	<i>Pseudomonas species</i> CMR5c - cellen
9	<i>Pseudomonas species</i> CMR5c - Δorf - cellen

4.3 Biocontrole experiment met cocoyam

4.3.1 Weefselweek cocoyam

4.3.1.1 Proliferatie

In potjes werd 10mL geautoclaveerd MS+ medium gebracht en gewacht tot voldoende afgekoeld. Bij proliferatie van reeds opgegroeide cocoyamplantjes was het belangrijk steriel te werken: steriele scalpels, steriele pincetten, steriel oppervlak en handschoenen. Wortels en bladeren van de kleine steriele cocoyamplantjes werden afgesneden zodat enkel een klein deeltje van ongeveer een halve centimeter rond overbleef. Dit deel bevatte de apex en het wit materiaal dat deel is van de knol. Al het afgestorven materiaal (bruin) werd verwijderd. Het was hierbij belangrijk de apex niet te beschadigen. Zes apex stukjes werden in een potje met MS+ medium geplaatst waarbij het jongste deel van het afgesneden stukje in het medium werd geplaatst. De potjes werden geïncubeerd op 26°C gedurende 16 uur licht/8 uur donker gedurende twee maanden. Na zes weken en voor twee maanden kon deze stap herhaald worden om plantjes verder te vermenigvuldigen.

4.3.1.2 Acclimatisatie

Ook hier werd steriel gewerkt (zie proliferatie). De knollen van de plantjes werden verwijderd zodat ze geen tot weinig voedselvoorraad bevatten. De wortels van de plantjes werden gewassen met kraantjeswater waarbij de wortels en de plant zo weinig mogelijk beschadigd werden. Door de agar te verwijderen werd de kans op contaminatie verkleind. De plantjes werden tweemaal gewassen zodat de agar zeker verwijderd was en de wortels proper waren. Vervolgens werd een grote bak gesteriliseerd met ethanol waarna aarde die tweemaal werd geautoclaveerd met 700mL water in de bak werd gebracht. De plantjes werden in de aarde geplant en de bak werd bedekt met transparant plastic aangezien de plantjes veel licht nodig hebben en een heel hoge relatieve vochtigheid. Na drie dagen konden er een paar gaatjes in het plastic worden gemaakt, na 5 dagen werden deze gaatjes groter gemaakt en na 7 dagen werd het plastic verwijderd. Het was belangrijk dat de relatieve vochtigheid gradueel daalde.

4.3.2 Inoculatie

4.3.2.1 *Pseudomonas* species

Pseudomonas sp. CMR5c, *P. protegens* CHA0 en orfamide mutanten werden opgegroeid op KB-medium op 28°C en gedurende één à twee dagen geïncubeerd. Nadat de cellen voldoende gegroeid waren werd er aan de platen 25mL normale saline oplossing toegevoegd. Met de driehoeksspatel werden alle bacteriën opgelost in de normale saline oplossing. Deze oplossing werd overgegoten in een kleine erlenmeyer van 100mL. De platen werden nagespoeld met 25mL normale saline oplossing en eveneens overgegoten in de erlenmeyer waarna aangevuld werd met normale saline oplossing tot 100mL. De OD₆₂₀ werd bepaald en het volume werd bepaald waar 3.10⁶ bacteriën aanwezig zijn per gram grond. Formule 1 werd gebruikt om de OD om te zetten naar CFU/mL. Vervolgens werd Formule 5 gebruikt om het volume te bepalen dat nodig is zodat alle experimenten een beginconcentratie hebben van 3.10⁶CFU bacteriën per gram grond.

Formule 5:

$$\frac{\frac{3.10^6 CFU}{g \text{ grond}}}{\frac{CFU}{mL}} = \frac{mL}{g \text{ grond}}$$

Dit geeft het volume in mL dat zou worden gebruikt in 1g grond zodat de beginconcentratie bacteriën zou bestaan uit 3.10⁶CFU/g grond. Er werd echter 385g grond gebruikt aangezien elke pot 77g grond bevatte en er vijf herhalingen waren. Om dit te corrigeren werd Formule 6 gebruikt.

Formule 6:

$$\frac{mL}{g \text{ grond}} \cdot 77g \cdot 5 = mL$$

Wanneer dit volume in mL toegevoegd wordt aan 385g grond wordt een concentratie van 3.10⁶ CFU/g bereikt. Dit volume werd overgebracht in een falcontube.

4.3.2.2 *P. myriotylum*

P. myriotylum werd opgegroeid op PDA-medium op 28°C gedurende ongeveer vijf dagen. Wanneer voldoende opgegroeid werden er ringetjes uit gesneden met boor nummer 3. Per te onderzoeken *Pseudomonas* soort werden er 6 ringetjes uitgesneden. Er werden 30 ringetjes in een falcontube gebracht waar 25 mL geautoclaveerd bidest water aan toegevoegd werd. Met een homogenisator werd dit gehomogeniseerd gedurende 15 à 20 seconden. Geautoclaveerd bidest water werd toegevoegd tot een volume van 50mL werd bereikt.

4.3.2.3 Experiment

Drie delen potgrond type I werd gemengd met één deel zand. Aan het berekende volume *Pseudomonas* inoculum werd 50mL bidest water toegevoegd en dit werd vervolgens 2 minuten lang goed gemengd met de 385g grond. De grond werd gedurende twee dagen bewaard in steriele zakjes aan 28°C. Twee dagen later werd de gehomogeniseerde *P. myriotylum* aan de grond toegevoegd. Hiervoor werd 2 minuten lang goed gemengd. De gemengde grond met *Pseudomonas* en *P. myriotylum* werd verdeeld over vijf potten zodat elke pot 77g grond bevatte. De cocoyamwortels werden in nieuw berekend *Pseudomonas* inoculum gedipt om over de vijf potten verspreid te worden. Er werd ook telkens een positieve controle en negatieve controle uitgevoerd. De positieve controle was grond zonder

Pseudomonas en met twee delen water. De negatieve controle was grond zonder *Pseudomonas* maar met *P. myriotylum*.

4.3.2.4 Ziekte evaluatie en kwantificatie bacteriën

Na ongeveer zeven dagen werd al dan niet een gele verkleuring waargenomen op de bladeren. De bladeren werden gescoord op verkleuring. Een '0' werd toegekend aan de bladeren die geen verkleuring toonde; een '1' wanneer minder dan 50% van het blad geel kleurde; een '2' wanneer meer dan 50% van het blad geel kleurde; een '3' wanneer heel het blad geel kleurde en een '4' wanneer het blad dood was. Formule 7 geeft de de plantziekte index (PDI) weer die werd bepaald met behulp van deze scores.

Formule 7:

$$PDI = \frac{\sum \text{Aantal bladeren} * \text{Corresponderende score blad}}{\text{Totaal aantal bladeren} * \text{Maximale score}}$$

Op deze PDI-waarden van elke behandeling weergegeven in Tabel 10 werd vervolgens statistiek toegepast met het programma SPSS. Er werd gebruik gemaakt van de Kruskal-Wallis Test met nulhypothese dat alle behandelingen gelijk zijn en de Mann-Whitney Test om elke behandeling met één andere behandeling te vergelijken met als nulhypothese dat de twee behandelingen gelijk zijn. Een significantieniveau van 5% werd gebruikt zodat indien de p-waarde groter was dan 0,05 de nulhypothese behouden werd en indien de p-waarde kleiner was dan 0,05 de nulhypothese verworpen werd.

Tabel 10. Behandelingen van *in vitro* inhibitie experiment op *P. myriotylum*. 'Δorf' zijn de orfamide mutanten.

Nummer	Behandeling
1	Positieve controle
2	Negatieve controle
3	<i>Pseudomonas protegens</i> CHAO
4	<i>Pseudomonas protegens</i> CHAO - Δorf
5	<i>Pseudomonas species</i> CMR5c
6	<i>Pseudomonas species</i> CMR5c - Δorf

Nadat de bladeren gescoord waren werden de overgebleven wortels gewassen met water om de aarde te verwijderen. De wortels werden gedroogd en onmiddellijk gewogen. Vervolgens werden ze elk apart in vijzels gebracht die geautoclaveerd werden. Er werd zand toegevoegd, 5mL normale saline oplossing en de wortels werden gedurende twee minuten lang gecrushed. Een verdunningsreeks werd aangemaakt met normale saline oplossing tot 10^{-4} . Van elke verdunning werd 10μL tweemaal uitgeplaat op KB-medium en geïncubeerd op 28°C gedurende 30uur. Vervolgens werden de CFU's geteld.

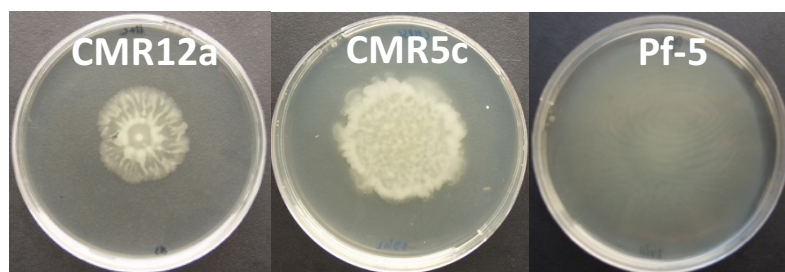
5. Resultaten & Discussie

5.1 Biosynthese van orfamide

5.1.1 Resultaten

Swarmingtest

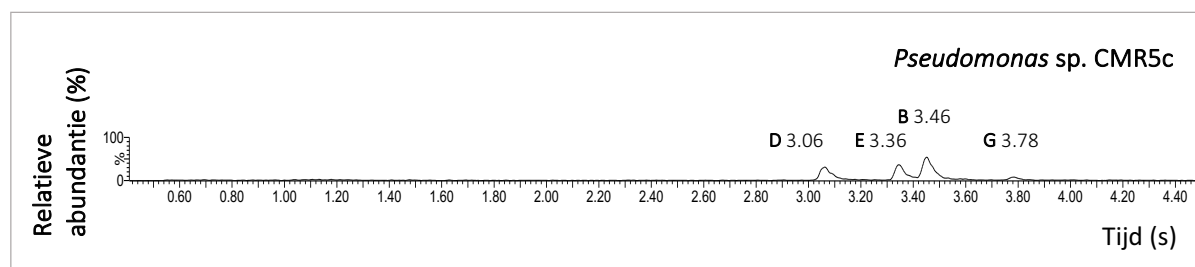
De biosynthese van orfamide in *Pseudomonas* species CMR12a, CMR5c en *Pseudomonas protegens* Pf-5 werd allereerst nagegaan met een swarmingtest. Figuur 9 geeft de swarmingtest resultaten weer van de drie isolaten die duidelijk een swarmingpatroon geven.



Figuur 9. Swarmingtest met *Pseudomonas* sp. CMR12a, CMR5c en *P. protegens* Pf-5 na 24 uur opgroeien op LB-medium met 0,6% agar.

HPLC-MS-analyse

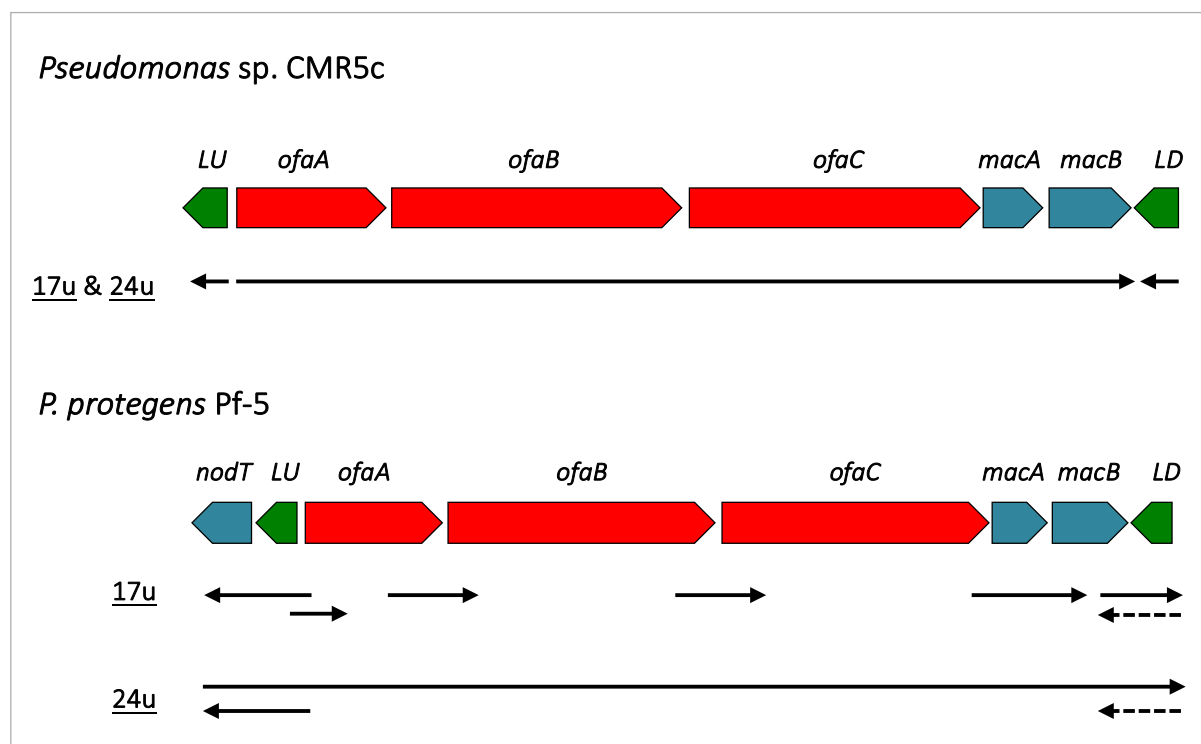
High-performance liquid chromatography (HPLC) - Massaspectrometry (MS)-analyse van *Pseudomonas* sp. CMR5c werd uitgevoerd om specifiek te bepalen welke moleculen werden aangemaakt. Doordat het supernatans werd bestudeerd en niet de cellen kon worden bepaald welke aangemaakte moleculen buiten de cel werden gebracht. Aangezien de m/z waarden van orfamide reeds bekend waren kon makkelijk de aanmaak van orfamide teruggevonden worden. Figuur 10 geeft het chromatogram weer voor *Pseudomonas* sp. CMR5c na 24 uur opgroeien. Drie grotere pieken en één kleinere piek werden zichtbaar bij het wild type, namelijk de pieken voor orfamide D, E, B en G. Orfamide B werd hierbij het meeste aangemaakt.



Figuur 10. HPLC-MS-analyse van *Pseudomonas* sp. CMR5c. De stalen van de bacteriën werden bereid uit het supernatans van 24 uur gegroeide LB-vloeistof culturen.

RT-PCR-analyse

Een Reverse Transcriptase Polymerasekettingreactie (RT-PCR) werd uitgevoerd om te bepalen welke orfamide cluster genen werden afgeschreven door *Pseudomonas* sp. CMR5c en *P. protegens* Pf-5. RNA werd geëxtraheerd uit cellen die 17 uur en 24 uur waren gegroeid in LB-vloeistof op 28°C. De concentratie van het RNA wordt weergegeven in Tabel B4. Deze tabel toont hoge concentratiewaarden en goede zuiverheden van het geëxtraheerde RNA. Uit dit RNA werd vervolgens cDNA gemaakt waaruit kon worden onderzocht welke genen van de orfamide cluster expressie vertoonden. In Figuur 11 wordt de transcriptionele analyse van de orfamide biosynthesecluster van *Pseudomonas* sp. CMR5c en *P. protegens* Pf-5 na 17 uur en 24 uur weergegeven. Hierbij werd ook de co-expressie tussen de genen nagekeken. Na 17 uur en 24 uur werden er bij *Pseudomonas* sp. CMR5c dezelfde transcripten gevormd namelijk een kort transcript van *luxUp* en een lang transcript dat *ofaABC-macAB-luxDown* omspannt. Bij *P. protegens* Pf-5 na 17 uur opgroeien werden drie transcripten aangemaakt namelijk eentje dat *luxUp* omspannt, één voor *macA* en één voor *luxDown*. Transcripten met deeltjes van *luxUp-ofaA*, *ofaA-ofaB*, *ofaB-ofaC*, *ofaC-macA*, *macA-macB* en *macB-luxDown* werden eveneens waargenomen zonder dat de genen effectief werden afgeschreven. Na 24 uur werd één groot transcript gevormd dat alle genen omspande, *nodT-luxUp-ofaABC-macAB-luxDown*. Er moet opgemerkt worden dat bij *P. protegens* Pf-5 na zowel 17 uur als 24 uur opgroeien er twee transcripten getekend zijn die *macB* en *luxDown* omspannen. Dit omdat de richting van afschrijving van deze co-expressie niet gekend is en dus beide kanten zou kunnen uitgaan.



Figuur 11. Transcriptionele analyse van de orfamide biosynthesecluster van *Pseudomonas* sp. CMR5c en *P. protegens* Pf-5 na 17 uur en 24 uur opgroeien in LB-vloeistof op 28°C.

5.1.2 Discussie

Orfamide wordt geproduceerd door tal van plant geassocieerde *Pseudomonas* species (Ma et al., 2016) zoals onder anderen *Pseudomonas protegens* Pf-5 geïsoleerd van de katoenplant (Howell and Stipanovic, 1979), *Pseudomonas protegens* CHA0 geïsoleerd van de wortels van de tabaksplant (Stutz et al., 1986) en *Pseudomonas* species CMR12a en CMR5c beiden geïsoleerd uit de rhizosfeer van de cocoyam (Perneel et al., 2007). De orfamide biosynthese staat onder controle van drie NRPS genen namelijk *ofaA*, *ofaB* en *ofaC* (D'aes et al., 2014). Deze genen kunnen verschillende soorten orfamide aanmaken namelijk orfamide A tot en met G door gerelaxeerde substraatspecificiteit (Gross et al., 2007; Ma et al., 2016).

Swarmingtest

De aanmaak van orfamide in *Pseudomonas* sp. CMR12a, CMR5c en *P. protegens* Pf-5 werd aangetoond met een swarmingtest waarbij swarmingbeweegbaarheid voorkwam (Figuur 9). De swarmingbeweegbaarheid toonde aan dat orfamide aangemaakt werd aangezien orfamide de oppervlaktespanning kan verlagen zodat bacteriën kunnen bewegen doorheen het medium. Dat *Pseudomonas* sp. CMR12a zo weinig beweegt doorheen het medium is te verklaren doordat ook sessiline aangemaakt wordt. Sessiline in *Pseudomonas* sp. CMR12a is belangrijk voor biofilmformatie waar orfamide voornamelijk van belang is voor de swarmingbeweegbaarheid. Deze sessiline blokkeert echter het vrijkomen van orfamide, waardoor de swarmingbeweegbaarheid onderdrukt wordt (D'aes et al., 2014). *Pseudomonas* sp. CMR5c maakt enkel orfamide aan en geen sessiline, waardoor orfamide vrij spel heeft en de swarmingbeweegbaarheid groter is dan bij *Pseudomonas* sp. CMR12a. Nu blijkt *P. protegens* Pf-5 het meest doorheen het medium te kunnen bewegen. Allereerst maakt deze soort geen sessiline aan, zodat het vrijkomen van de orfamide niet onderdrukt wordt. Een reden voor de grotere beweegbaarheid zou kunnen zijn dat de promotors voor de biosynthesegenen in *P. protegens* Pf-5 actiever zijn dan die van *Pseudomonas* sp. CMR12a en CMR5c (Li and Zhang, 2014). Hierdoor kan de genexpressie hoger zijn waardoor meer orfamide wordt aangemaakt, wat resulteert in een hogere beweegbaarheid.

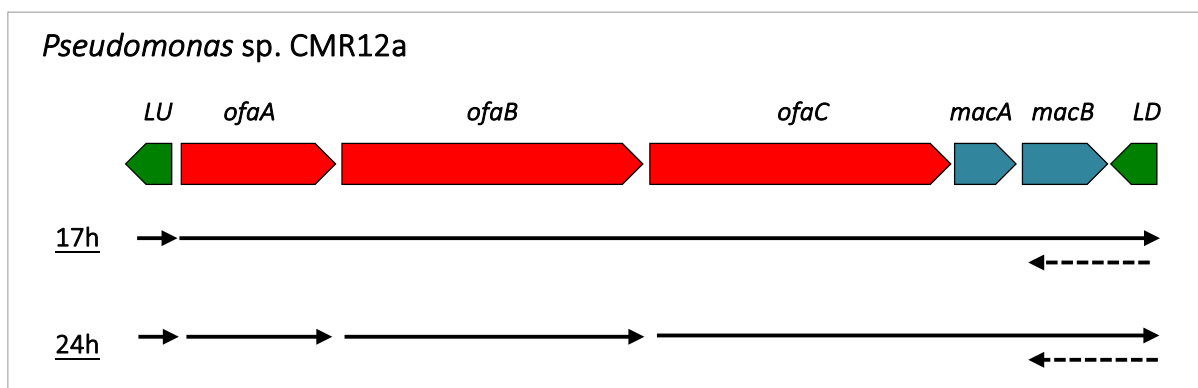
HPLC-MS-analyse

Met HPLC-MS op *Pseudomonas* sp. CMR5c kon onderzocht worden welke specifieke orfamide moleculen werden aangemaakt. Vier duidelijke pieken verschenen namelijk die van orfamide B, D, E en G met m/z waarden respectievelijk gelijk aan 1254, 1280, 1282 en 1309. Normaal wordt echter nog een vijfde orfamide moleculen aangemaakt door *Pseudomonas* sp. CMR5c namelijk orfamide F met m/z waarde 1307 (Ma et al., 2016). Deze piek in de HPLC-MS-analyse was echter te klein om opgemerkt te worden.

RT-PCR-analyse

Met RT-PCR-analyse kan dan bepaald worden welke genen exact werden afgeschreven, zowel na 17 uur als na 24 uur opgroeien van de bacteriën. In een vorig onderzoek met RT-PCR-analyse werd het wild type van *Pseudomonas* sp. CMR12a onderzocht, weergegeven in Figuur 12. Na 17 uur ontstaan er twee transcripten, namelijk een kort transcript voor het *luxUp* gen en een lang transcript dat *ofaABC*, *macAB* en *luxDown* omspant. Na 24 uur ontstaan er echter vier transcripten namelijk drie korte voor het *luxUp*,

ofaA en *ofaB* gen en een langer transcript dat het *ofaC*, *macAB* en *luxDown* gen omspannt (data nog niet gepubliceerd). Het is meteen duidelijk dat de expressie van de orfamide biosynthesegenen tijdsafhankelijk is daar verschillende transcripten werden gevormd na 17 uur en 24 uur. Een opmerking moet gemaakt worden over het transcript dat *macB* en *luxDown* omspannt na 17 uur en 24 uur opgroeien van de bacterie. Deze twee genen worden in de tegenovergestelde richting afgeschreven waardoor verwacht wordt dat geen co-expressie tussen *macB* en *luxDown* voorkomt. Doordat toch co-expressie wordt waargenomen is onzeker in welke richting het transcript wordt afgeschreven. Het kan zijn dat een promotor rechts van het *macB* gen de afschrijving start en het DNA verder afschrijft in tegenovergestelde richting van *luxDown*. Of een promotor links van het *luxDown* gen start de afschrijving en het DNA van *macB* wordt in de tegenovergestelde richting afgeschreven. Deze stukjes RNA die in de andere richting worden afgeschreven worden antisense RNA's (asRNA's) genoemd. Deze asRNA's kunnen optreden als sleutel regulators van genexpressie. Ze kunnen de expressie van een operon onderdrukken terwijl ze als mRNA functioneren voor een ander operon. Hierdoor staan ze bekend als verfijnde regulator switchen in bacteriën (Sesto et al., 2012). Verder onderzoek is vereist om te bepalen wat de functie is van deze asRNA's in *Pseudomonas* sp. CMR12a.



Figuur 12. (Vorig onderzoek) Transcriptionele analyse van de orfamide biosynthesecuster van *Pseudomonas* sp. CMR12a na 17 uur en 24 uur opgroeien (data nog niet gepubliceerd).

In *Pseudomonas* sp. CMR5c lijkt de expressie niet tijdsafhankelijk te zijn daar de transcripten voor beide tijdstippen dezelfde bleven (Figuur 11). Hetzelfde lange transcript werd aangemaakt als bij *Pseudomonas* sp. CMR12a na 17 uur opgroeien. De expressie in *P. protegens* Pf-5 blijkt terug tijdsafhankelijk te zijn maar blijkt juist na 24 uur het lange transcript te vormen in plaats van na 17 uur zoals in *Pseudomonas* sp. CMR12a. De tijdsafhankelijkheid van het lange transcript kan alweer te wijten zijn aan de activiteit van de promotor voor dit transcript dat meer (*P. protegens* Pf-5) of minder (*Pseudomonas* sp. CMR12a) actief wordt na verloop van tijd (Li and Zhang, 2014). Ook in *P. protegens* Pf-5 worden asRNA's teruggevonden net als in *Pseudomonas* sp. CMR12a. Verder onderzoek is eveneens vereist om de functie van deze asRNA's te bepalen.

5.1.3 Conclusie

Orfamide wordt aangemaakt door *Pseudomonas* sp. CMR12a, CMR5c en *P. protegens* Pf-5. De afschrijving van de biosynthesegenen is echter tijdsafhankelijk voor *Pseudomonas* sp. CMR12a en *P. protegens* Pf-5. Waarschijnlijk is dit te wijten aan de promotoractiviteit die verandert in functie van de tijd. De promotors voor de biosynthesegenen van orfamide in *Pseudomonas* sp. CMR5c lijken niet

afhankelijk van de tijd. *Pseudomonas* sp. CMR12a en *P. protegens* Pf-5 maken ook nog asRNA's aan die een rol zouden kunnen spelen in de regulatie van bepaalde genen. Deze asRNA's zijn niet aanwezig in *Pseudomonas* sp. CMR5c. Het is duidelijk dat de expressie van de biosynthesegenen verschilt in de drie *Pseudomonas* isolaten. Dit doet vermoeden dat orfamide productie in de orfamide producerende *Pseudomonas* species elk op een andere manier wordt gereguleerd en beïnvloed.

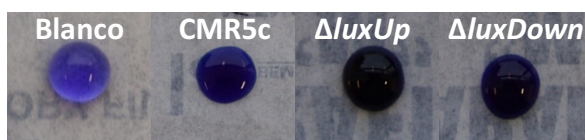
5.2 Regulatie van orfamide

5.2.1 Resultaten

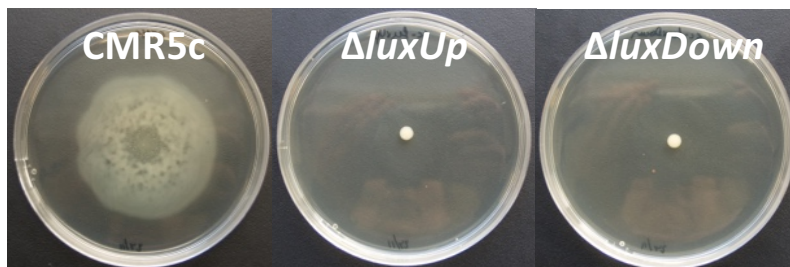
De regulatie van orfamide werd enkel onderzocht in *Pseudomonas* species CMR5c aangezien de regulatie in *Pseudomonas* sp. CMR12a reeds goed werd bestudeerd. Er werden verschillende testen uitgevoerd, namelijk de druppelinzaktest, de swarmingtest, HPLC-analyse, RT-PCR-analyse en qPCR-analyse. De regulatie in *Pseudomonas protegens* Pf-5 kon niet worden onderzocht daar geen *luxUp* en *luxDown* mutanten waren aangemaakt.

Druppelinzaktest & Swarmingtest

Om de invloed van de *luxUp* en *luxDown* regulatorgenen van *Pseudomonas* sp. CMR5c zelf aan te tonen werd een snelle druppelinzaktest uitgevoerd. De resultaten hiervan worden weergegeven in Figuur 13 en tonen aan dat de druppel bacteriecultuur van *luxUp* en *luxDown* mutanten niet inzakten. Vervolgens werd een swarmingtest uitgevoerd waarvan de resultaten worden weergegeven in Figuur 14. Deze bevestigden de resultaten van de druppelinzaktest. Het wild type bewoog doorheen het medium doordat deze orfamide aanmaakte terwijl de *luxUp* en *luxDown* mutanten geen swarmingbeweegbaarheid vertoonden.



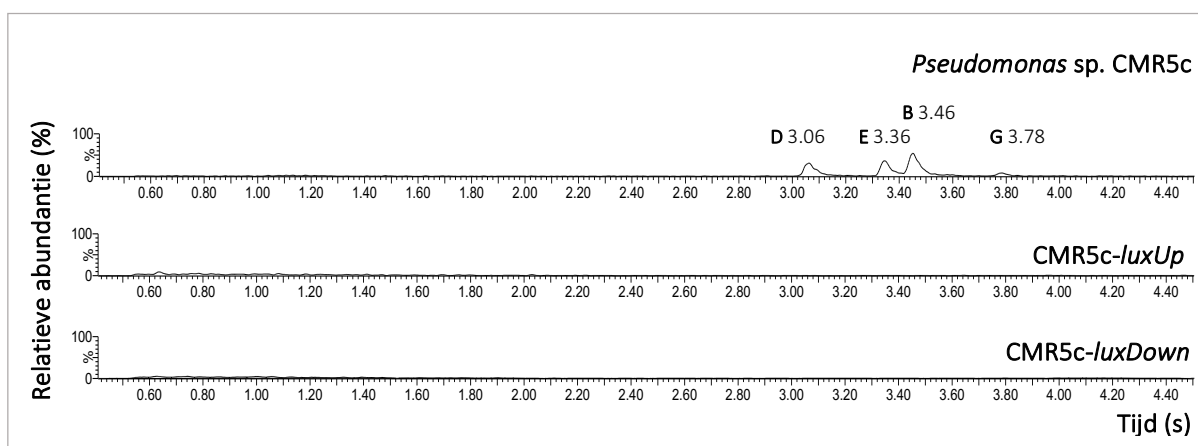
Figuur 13. Druppelinzaktest van *Pseudomonas* sp. CMR5c en de mutanten voor *luxUp* en *luxDown*. Voor het blanco staal werd water gebruikt.



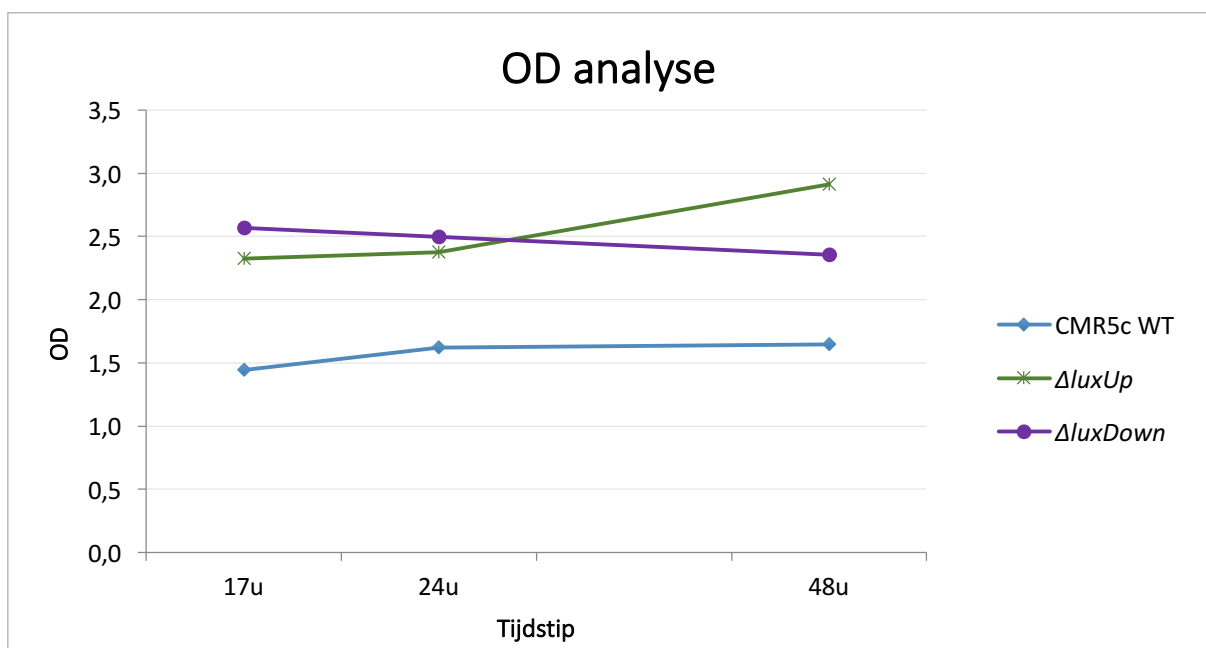
Figuur 14. Swarmingtest voor *Pseudomonas* sp. CMR5c en *luxUp* en *luxDown* mutanten na 17 uur opgroeien van bacteriën op LB-medium met 0,6% agar aan 28°C.

HPLC-MS-analyse

HPLC-MS-analyse werd uitgevoerd om specifiek te bepalen welke moleculen werden aangemaakt. Figuur 15 geeft het chromatogram weer voor *Pseudomonas* sp. CMR5c en *luxUp* en *luxDown* mutanten na 24 uur opgroeien. De figuur geeft duidelijk weer dat de *luxUp* en *luxDown* mutanten geen orfamide aanmaken want er werden geen pieken waargenomen. Figuur 16 geeft de optische densiteit (OD) weer na 17 uur, 24 uur en 48 uur opgroeien in LB-vloeistof. Tabel B5 geeft de getabelleerde waarden weer. De cellen werden bij de start zodanig verdund dat ze allemaal dezelfde celconcentratie bevatte namelijk 10^7 cellen/mL. Na 17 uur waren de *luxUp* en *luxDown* mutanten sneller aangegroeid dan de anderen. Deze trend werd ook teruggevonden na 24 uur. Na 48 uur echter was de *luxUp* mutant aangegroeid terwijl de hoeveelheid *luxDown* mutant daalde. Het wild type vertoonde eveneens een stijging doch lag de celconcentratie lager dan bij de *luxUp* en *luxDown* mutanten.



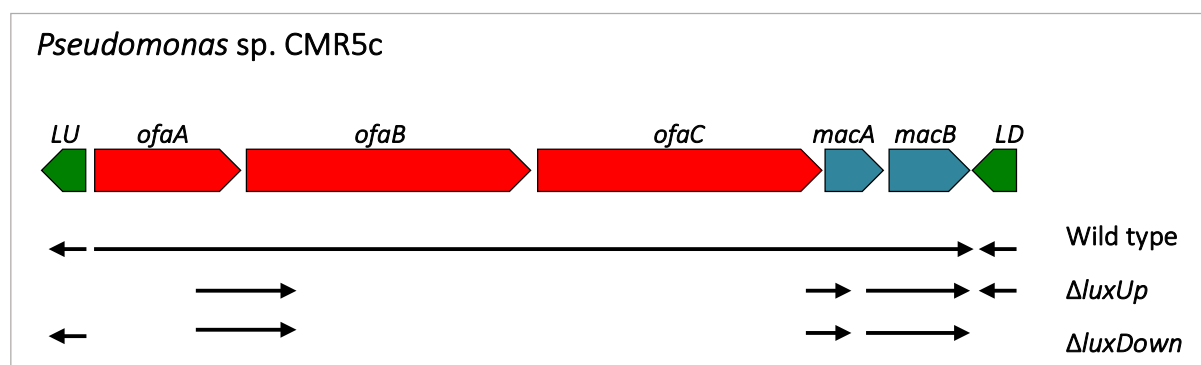
Figuur 15. HPLC-MS-analyse van *Pseudomonas* sp. CMR5c en mutanten. De stalen van de bacteriën werden bereid uit het supernatans van 24 uur gegroeide LB-vloeistof culturen.



Figuur 16. Optische densiteit van *Pseudomonas* sp. CMR5c en *luxUp* en *luxDown* mutanten. Culturen werden 17 uur, 24 uur en 48 uur opgegroeid in vloeibare LB en de OD werd bepaald.

RT-PCR-analyse

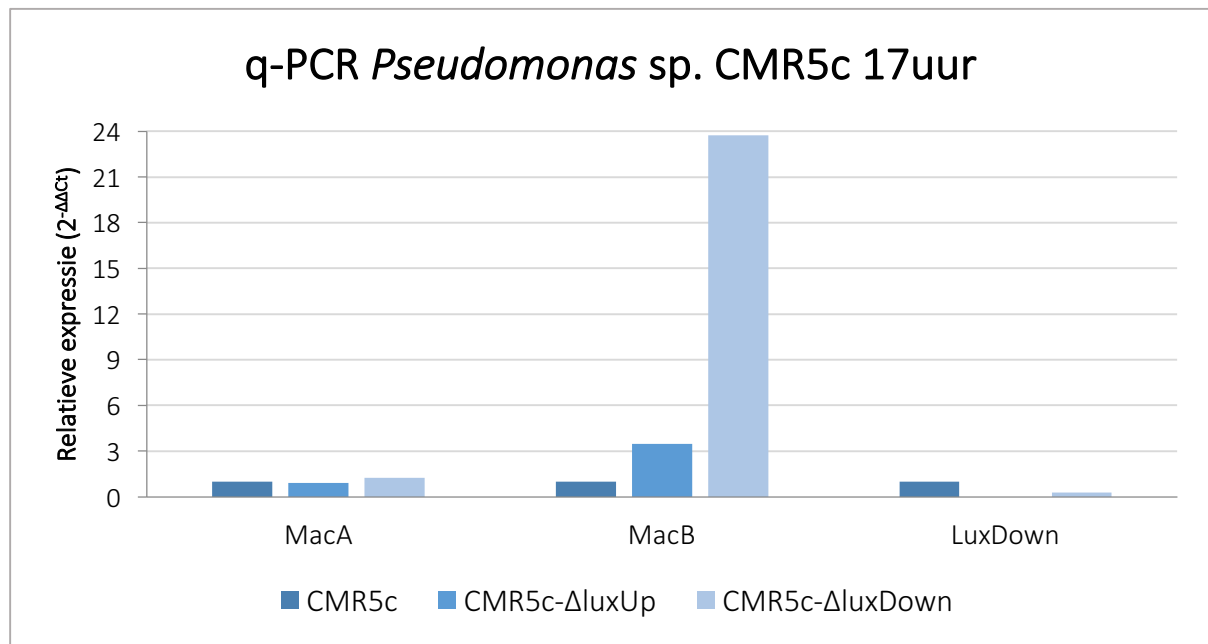
RT-PCR-analyse werd uitgevoerd op de *luxUp* en *luxDown* mutanten om te bepalen welke orfamide clustergenen werden afgeschreven. Tabel B4 geeft de RNA-concentraties weer die een goede zuiverheid blijken te vertonen. De RT-PCR-resultaten worden weergegeven in Figuur 17. De *luxUp* mutant maakte vier transcripten aan. Er werd een kort transcript teruggevonden dat deeltjes van *ofaA* en *ofaB* omspande zonder dat de effectieve genen werden afgeschreven. Hetzelfde was terug te vinden voor *ofaC* en *macA*. Een transcript van *macB* werd teruggevonden waar een deeltje *macA* vasthing en een transcript van *luxDown* werd gedetecteerd. De *luxDown* mutant maakte dezelfde transcripten aan maar in de plaats van het *luxDown* transcript werd het *luxUp* transcript teruggevonden. Na 24 uur werden nog steeds dezelfde transcripten gevormd als na 17 uur voor zowel het wild type als de *luxUp* en *luxDown* mutanten.



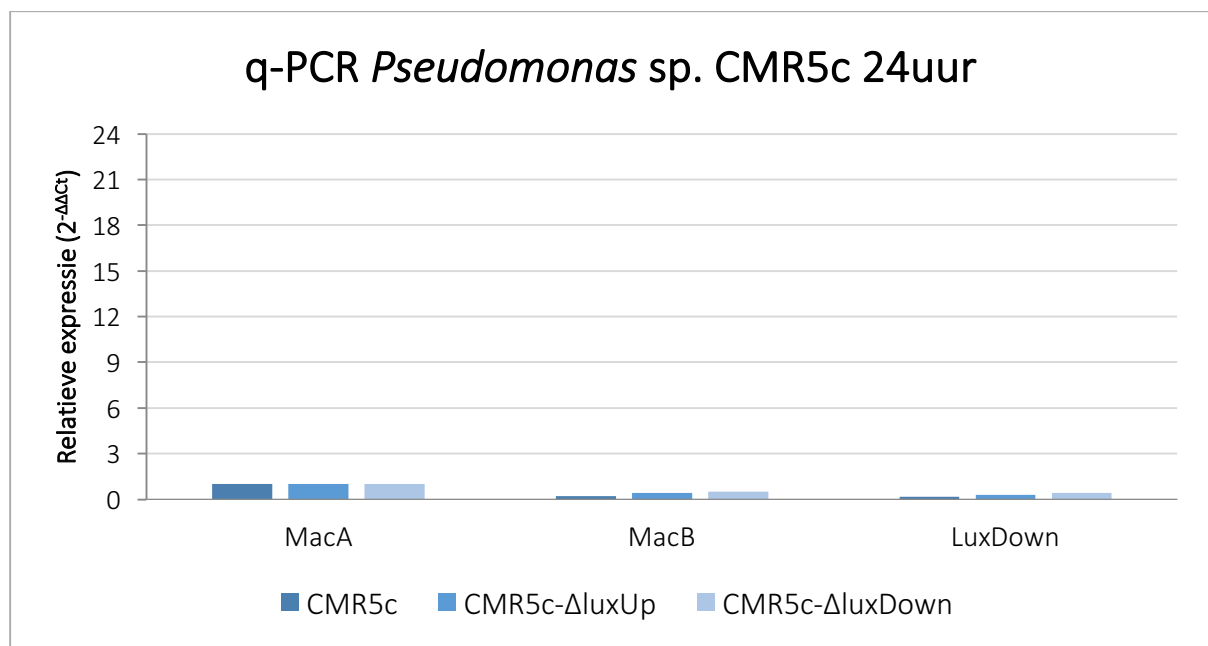
Figuur 17. Transcriptionele analyse van de orfamide biosynthesecuster van *Pseudomonas* sp. CMR5c en *luxUp* en *luxDown* mutanten na 17 uur en 24 uur opgroeien in LB-vloeistof op 28°C. De expressie was hetzelfde na 17 uur en 24 uur en worden in de figuur als één weergegeven.

qPCR-analyse

Een qPCR werd eveneens uitgevoerd op *Pseudomonas* sp. CMR5c om het aantal keer dat de transcripten werden afgeschreven te bepalen. De concentratie van het cDNA wordt weergegeven in Tabel B6. Voor alle genen waren de primers in orde aangezien de dissociatiecurves goed waren. Deze worden weergegeven in Figuur B1. Figuren 18 en 19 geven de qPCR-waarde respectievelijk voor 17 uur en 24 uur respectievelijk. Hiervoor werden de Ct-waarden van het housekeeping gen *rpoD* afgetrokken van de Ct-waarde van het staal. Vervolgens werd gekalibreerd ten opzichte van het wild type zodat de qPCR-waarde van het wild type telkens naar één werd herleid. De getabelleerde waarden worden weergegeven in Tabel B7. Het valt op dat na 17 uur de *luxUp* en voornamelijk de *luxDown* mutanten een verhoogde expressie vertoonden van *macB*. De stijging van expressie verdween dan weer na 24 uur waar de expressie van zowel *macA*, *macB* als *luxDown* in de *luxUp* en *luxDown* mutanten daalde.



Figuur 18. $2^{-\Delta\Delta C_t}$ waarden van qPCR-analyse van *Pseudomonas* sp. CMR5c na 17 uur opgroeien gekalibreerd ten opzichte van wild type.



Figuur 19. $2^{-\Delta\Delta C_t}$ waarden van qPCR-analyse van *Pseudomonas* sp. CMR5c na 24 uur opgroeien gekalibreerd ten opzichte van wild type.

5.2.2 Discussie

In plant-pathogene *Pseudomonas* species zijn enkele regulatiemechanismen bekend die CLP-biosynthese reguleren. Het GacS/GacA twee componentensysteem is zo'n eerste regulatie mechanisme aangezien een mutatie in één van de twee genen resulteert in het verlies van CLP-productie (de Bruijn et al., 2007; de Bruijn et al., 2008; Dubern et al., 2005; Kitten et al., 1998; Lu et al., 2002b). Quorum

sensing is een tweede mechanisme dat de biosynthese van een aantal CLP's kan reguleren (Cui et al., 2005; Dubern et al., 2006). Een derde mechanisme zijn de luxR-type transcriptieregulatorgenen. Een mutatie in deze genen zorgt eveneens voor het verlies van CLP-productie (Berti et al., 2007; de Bruijn and Raaijmakers, 2009a; Dubern et al., 2005; Dubern et al., 2008; Ma et al., 2016; Vallet-Gely et al., 2010; Wang et al., 2006). De luxR-type regulatorgenen behoren ofwel tot het GacS/GacA twee componentensysteem ofwel worden ze geactiveerd via quorum sensing. In sommige gevallen behoren ze tot geen van beide groepen (de Bruijn and Raaijmakers, 2009a). Ook bestaan er andere mechanismen die de luxR-type regulatorgenen kunnen beïnvloeden. Zo kan namelijk de ClpP protease de luxR-type regulatorgenen in *P. fluorescens* SS01 voor massetolide productie beïnvloeden (Song et al., 2015). Ook het GidA gen speelt waarschijnlijk een rol in de regulatie van luxR-type regulatorgen *salA* in *P. syringae* (Kinscherf and Willis, 2002).

De orfamide biosynthesecuster, van alle orfamide producerende *Pseudomonas* species, bevat eveneens twee luxR-type regulatoren, namelijk het *luxUp* gen dat zich voor de orfamide biosynthesegenen bevindt en het *luxDown* gen dat zich achter de orfamide biosynthesegenen bevindt (D'aes et al., 2014; Ma et al., 2016). De regulatorische rol van *luxUp* en *luxDown* in *Pseudomonas* sp. CMR12a werd reeds aangetoond (data nog niet gepubliceerd). Mutanten in *luxUp* of *luxDown* verliezen namelijk de aanmaak van orfamide.

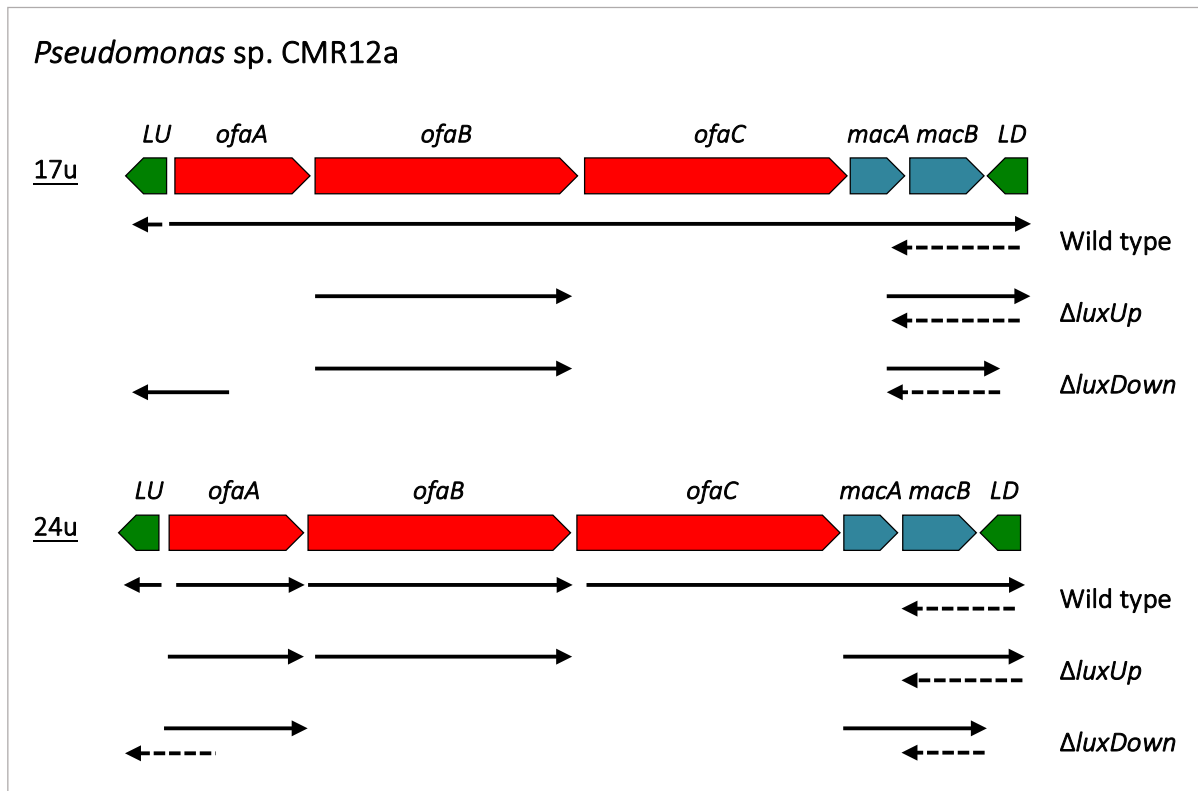
Druppelinzaktest, Swarmingtest & HPLC-MS-analyse

Om de rol van de twee LuxR regulatoren in *Pseudomonas* sp. CMR5c te bekijken werden verschillende testen uitgevoerd. Een druppelinzaktest (Figuur 13), swarmingtest (Figuur 14) en HPLC-MS-analyse (Figuur 15) toonden aan dat orfamide niet meer geproduceerd wordt door de *luxUp* en *luxDown* mutant. *LuxUp* en *luxDown* in *Pseudomonas* sp. CMR5c blijken dus orfamide te reguleren net zoals in *Pseudomonas* sp. CMR12a. Uit de optische densiteit analyse (Figuur 16) wordt vastgesteld dat de *luxUp* en *luxDown* mutanten sneller groeien dan het wild type. Dit komt waarschijnlijk doordat de *luxUp* en *luxDown* mutanten hun energie niet moeten steken in het aanmaken van orfamide waardoor ze hun energie kunnen gebruiken om te groeien en te reproduceren. Deze metabolische belasting is wel aanwezig bij het wild type en zorgt dan voor een tragere groei in vergelijking met de mutanten (Van Den Broek et al., 2005; De Leij et al., 1998).

RT-PCR-analyse

Via een RT-PCR-analyse kon bepaald worden welke genen werden afgeschreven door de *luxUp* en *luxDown* mutanten. In een vorig onderzoek met RT-PCR-analyse werd het wild type en de *luxUp* en *luxDown* mutanten van *Pseudomonas* sp. CMR12a onderzocht. Deze resultaten worden weergegeven in Figuur 20. Het blijkt dat de *luxUp* mutant na 17 uur twee transcripten vormt, één dat *macB-luxDown* omspannt met een stukje van *macA* en één dat *ofaB* omspannt. Na 24 uur worden dezelfde transcripten gedetecteerd met een extra transcript voor het *ofaA* gen. *Pseudomonas* sp. CMR12a met een mutatie in *luxDown* geeft na 17 uur een transcript van *ofaB* en een transcript dat *macAB-luxDown* omspannt. Ook komt de co-expressie van *luxUp-ofaA* genen voor. Na 24 uur is er een transcript dat *macAB* volledig omspannt en een stukje van *luxDown* maar ook een langer transcript dat *luxUp-ofaAB* omspannt. De RT-PCR-analyse toonde aan dat een mutatie in ofwel *luxUp* ofwel *luxDown* zorgt voor het verlies van het lange enkelvoudige transcript. Toch blijken de *luxUp* en *luxDown* genen de expressie van de *macAB*

genen niet te verstoren wat aantoont dat de regulatiegenen enkel een invloed uitoefenen op de biosynthesegenen en niet op het secretiesysteem. Bij *Pseudomonas* sp. CMR5c verliezen de *luxUp* en *luxDown* mutanten na 17 uur en 24 uur groeien eveneens het lange transcript dat *ofaABC-macAB* omspant (Figuur 17). Dit blijkt dus de reden te zijn voor het verlies van orfamide productie wat met de druppelinzaktest, swarmingtest en HPLC-MS-analyse wordt aangetoond. Doordat de expressie van de *macAB* genen niet verstoord wordt in één van beide mutanten lijkt *luxUp* en *luxDown* geen positieve regulatorische invloed uitoefenen op het secretiesysteem net zoals bij *Pseudomonas* sp. CMR12a.



Figuur 20. (Vorig onderzoek) Transcriptionele analyse van de orfamide biosynthesecluster van *Pseudomonas* sp. CMR12a en *luxUp* en *luxDown* mutanten na 17 uur en 24 uur opgroeien (data nog niet gepubliceerd).

Reeds eerder werd de aanwezigheid van antisense RNA's (asRNA's) besproken. Deze komen ook voor bij *Pseudomonas* sp. CMR12a voornamelijk bij de *macB* en *luxDown* genen (Figuur 20). Het aanwezig zijn van co-expressie tussen deze genen bewijst het bestaan van asRNA's. Er werden nog andere transcripten gevonden in de *luxUp* en *luxDown* mutanten, namelijk transcripten die *ofaB* omspannen na 17 uur en *ofaA* en *ofaB* na 24 uur. De *luxDown* mutant bevatte ook een transcript dat *luxUp-ofaA* omspande na zowel 17 uur als 24 uur. De resultaten van de HPLC-MS-analyse gaven nochtans aan dat er geen orfamide werd gevormd en toch werden korte transcripten van de orfamide genen aangemaakt. Dit suggereert eveneens dat er asRNA's werden afgeschreven. Deze asRNA's reguleren de transcriptie van het complementaire mRNA door transcriptie interferentie of transcriptie attenuatie (Sesto et al., 2012). Waarschijnlijk wordt transcriptie attenuatie gebruikt waarbij de transcriptie vroegtijdig gestopt wordt. De korte transcripten zijn dan ook allicht verantwoordelijk voor de zwakke bandjes zichtbaar in de RT-PCR-analyse aangezien normaal sterke bandjes worden waargenomen indien een gen tot expressie komt. In het wild type van *Pseudomonas* sp. CMR12a werden deze korte transcripten niet

waargenomen. Doch wordt vermoed dat ze wel aanwezig waren maar gemaskeerd werden door de reeds aanwezige transcripten. RT-PCR-analyse van *Pseudomonas* sp. CMR5c toonde aan dat er waarschijnlijk ook asRNA's voorkomen tijdens de transcriptie van de orfamide biosynthesecluster van de *luxUp* en *luxDown* mutanten (Figuur 17). Immers, er werden *ofaA-ofaB* transcripten en *ofaC-macA* transcripten gevormd. Ook hier zorgde transcriptie attenuatie waarschijnlijk voor de korte transcripten en dus de zwakkere banden zichtbaar in de RT-PCR-analyse.

qPCR-analyse

De kwantificatie van de expressie van de *macA*, *macB* en *luxDown* genen in *Pseudomonas* sp. CMR5c en *luxUp* en *luxDown* mutanten kan bekeken worden met de qPCR-analyse (Figuren 18 en 19). Na 17 uur blijken de mutanten een hogere expressie van *macB* te reguleren voornamelijk bij de *luxDown* mutant. *LuxUp* en *luxDown* blijken de expressie van *macB* dan wel niet positief te reguleren maar wel negatief. Aangezien de *macB* expressie stijgt wanneer het *luxUp* of *luxDown* gen niet aanwezig is onderdrukt de *LuxUp* of *LuxDown* bij aanwezigheid deze verhoogde expressie. De *luxR*-type regulatorgenen treden dus op als transcriptionele repressors van *macB*. *luxR*-type regulatorgenen die als transcriptionele repressors dienen in plaats van transcriptionele activators worden slechts teruggevonden in enkele beschreven systemen. Zo functioneert een *luxR*-type regulatorgen in recombinante *Escherichia coli* als N-Acyl homoserine lactone (AHL)-afhankelijk repressor van de *lacZ* promotor (Egland and Greenberg, 2000). AHL's zijn signaalmoleculen die voorkomen in tal van Gram-negatieve bacteriën die quorum sensing kunnen induceren (Fuqua and Greenberg, 1998). De repressor in *E. coli* blijkt dus onder de controle te staan van quorum sensing. In *Brucella abortus* 2308 is de *LuxR*-type regulator *BabR* een repressor van het *virB* gen dat codeert voor het type IV secretiesysteem (Caswell et al., 2012). Het *LuxR* homoloog *EsaR* in *Pantoea stewartii* subspecies *stewartii* is eveneens een repressor van de productie van extracellulaire polysacharide stewartan (von Bodman et al., 1998). Zoals eerder vermeld staat de regulatie van de secretiegenen in *Pseudomonas* sp. CMR5c waarschijnlijk niet onder controle van de *luxR*-type regulatorgenen. *MacA* en *macB* worden vermoedelijk door andere genen gereguleerd. Toch is het mogelijk dat de expressie van het *macB* gen in het wild type wordt onderdrukt doordat de *luxR*-type regulatorgenen repressor proteïnen aanmaken die binden op de promotor van *macB*. Deze repressor proteïnen binden dan waarschijnlijk niet aan de promotor van *macA* aangezien geen verschil in expressie wordt waargenomen in de *luxUp* of *luxDown* mutant ten opzichte van het wild type. De *Pseudomonas* sp. CMR5c *luxUp* en *luxDown* mutant zouden dan minder tot geen repressor proteïnen meer aanmaken, zodat het mechanisme dat de secretiegenen reguleren volledige controle krijgt. Na 24 uur wordt *macB* terug minder tot expressie gebracht in de *luxUp* en *luxDown* mutanten. Dit kan te wijten zijn aan de promotor die minder actief wordt zodat er minder regulatie optreedt (Li and Zhang, 2014). Een andere reden kan zijn dat andere repressor proteïnen worden aangemaakt die de afschrijving van *macB* inhibeert. Het valt op voor beide tijdstippen in *Pseudomonas* sp. CMR5c dat *luxDown* nog steeds tot expressie wordt gebracht in de *luxDown* mutant. Ook wordt *luxUp* afgeschreven in de *luxUp* mutant na 24 uur opgroeien. Dit zou niet mogelijk mogen zijn aangezien de *luxDown* en *luxUp* genen respectievelijk niet aanwezig waren. Waarschijnlijk werd een ander stukje DNA geamplificeerd door contaminatie van de MasterMix of door specifieke primers. Deze transcripten zijn slechts in kleine mate aanwezig en kunnen bijgevolg worden verwaarloosd.

5.2.3 Conclusie

De luxR-type regulatoren *luxUp* en *luxDown* staan in voor de regulatie van orfamide in *Pseudomonas* sp. CMR5c. Mutanten in één van deze genen maken namelijk geen orfamide meer aan. Doordat deze mutanten hun energie niet moeten gebruiken voor de aanmaak van orfamide, kunnen ze hun energie gebruiken om te groeien en reproduceren. Orfamide biosynthesegenen worden niet langer afgeschreven maar de secretiegenen lijken nog steeds tot expressie te komen in de afwezigheid van de regulatiegenen. Een qPCR-analyse toonde echter aan dat de regulatiegenen toch een invloed uitoefenen op het secretiegen *macB*. Dit gen wordt waarschijnlijk negatief gereguleerd door LuxUp en/of LuxDown doordat deze als transcriptionale repressors optreden. In *Pseudomonas* sp. CMR12a maken zowel het wild type als *luxUp* en *luxDown* mutanten asRNA's aan. Het wordt verwacht dat er meer asRNA's aangemaakt worden in het wild type dan aangegeven. Deze zijn waarschijnlijk gemaskeerd door de reeds aanwezige transcripten waardoor ze niet geobserveerd kunnen worden met RT-PCR-analyse. Ook *Pseudomonas* sp. CMR5c blijken asRNA's aan te maken die in het wild type waarschijnlijk eveneens gemaskeerd worden door de reeds aangemaakte transcripten.

5.3 Secretie van orfamide

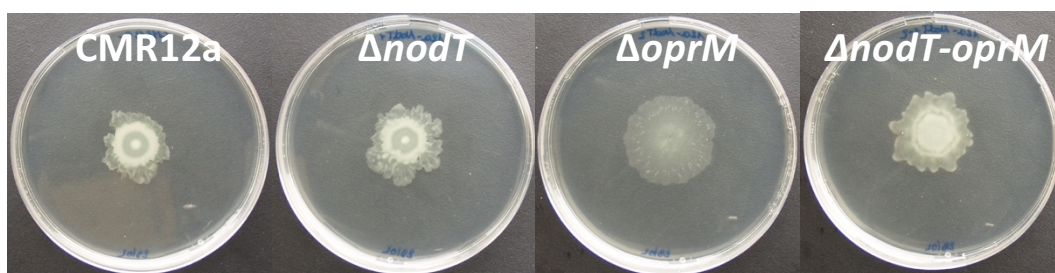
5.3.1 Resultaten

De secretie van orfamide werd onderzocht in *Pseudomonas* species CMR12a, CMR5c en *Pseudomonas protegens* Pf-5. In *Pseudomonas* sp. CMR12a werd het wild type en de *nodT* en *oprM* mutanten onderzocht en in *Pseudomonas* sp. CMR5c werd het wild type en de *oprM* en *cmeC* mutanten onderzocht, daar deze mutanten reeds waren aangemaakt. In *P. protegens* Pf-5 werd enkel het wild type bestudeerd daar geen mutanten waren aangemaakt. Verschillende testen werden uitgevoerd, namelijk de druppelinzaktest, swarming, HPLC-analyse en het effect van inhibitoren werd bestudeerd.

5.3.1.1 *Pseudomonas* species CMR12a

Swarmingtest

Om de invloed van de buitenste membraanproteïnen NodT en OprM van *Pseudomonas* sp. CMR12a te bestuderen werd een snelle swarmingtest uitgevoerd. De resultaten hiervan worden weergegeven in Figuur 21. Het verwijderen van het *oprM* gen zorgde ervoor dat de beweegbaarheid van de bacterie toenam.



Figuur 21. Swarmingtest voor *Pseudomonas* sp. CMR12a en *nodT*, *oprM* en *nodT-oprM* mutanten na 24 uur opgroeien van bacteriën op LB-medium met 0,6% agar aan 28°C.

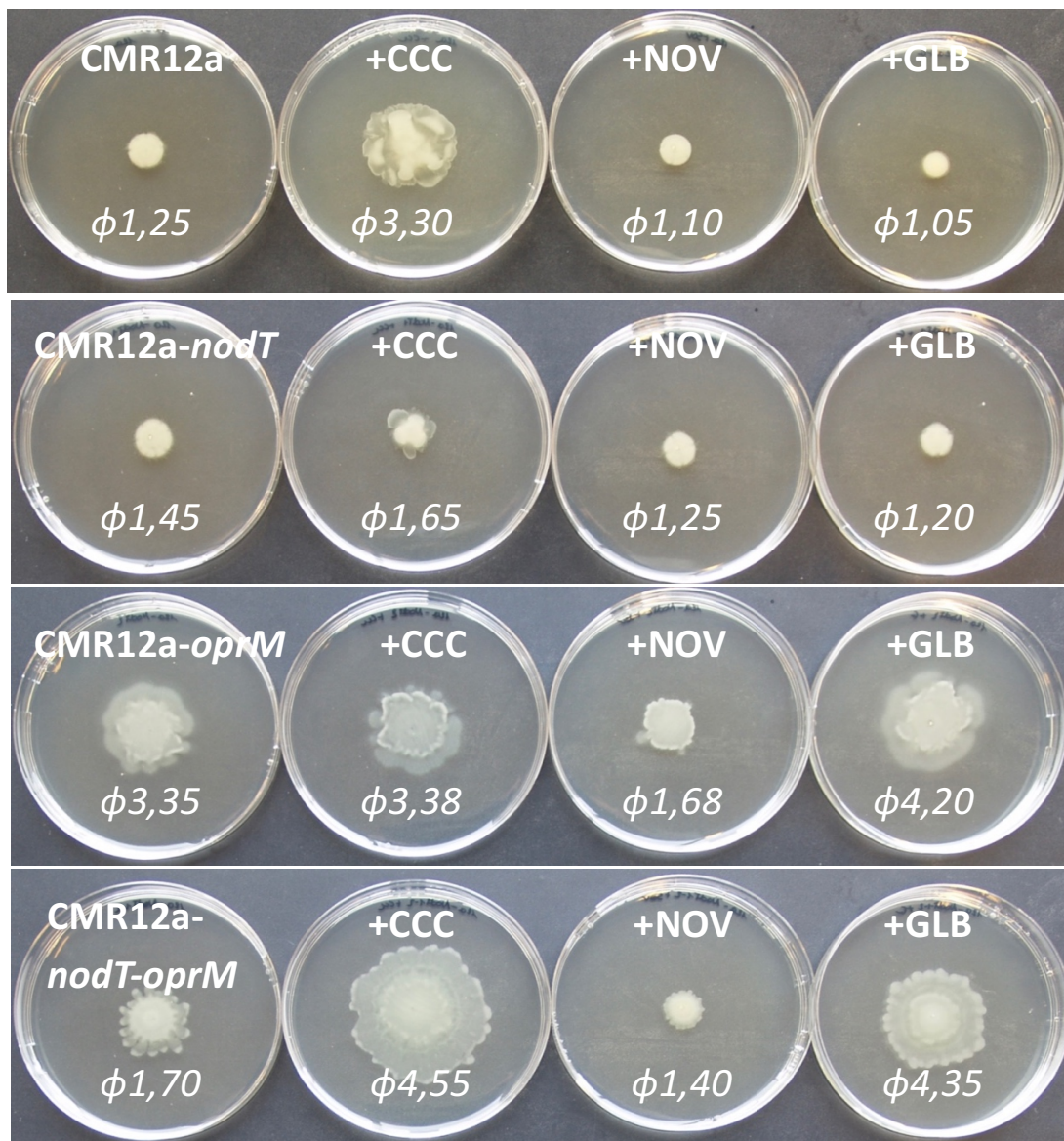
Swarmingtest met inhibitoren

Om het secretiesysteem verder te bestuderen werd gebruik gemaakt van inhibitoren die secretiepompen konden inhiberen. Tabel 11 geeft nog eens een kort overzicht weer van de gebruikte inhibitoren en hun activiteit.

Tabel 11. Inhibitoren gebruikt tijdens swarmingtest die bepaalde soorten pompen inhiberen. ‘*’, NOV en GLB inhiberen elk andere ATP-pompen.

Inhibitor	Inhibitie
Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCC)	H ⁺ -pomp
Natriumorthovanadaat (NOV)	ATP-pomp*
Glybenclamide (GLB)	ATP-pomp*

Met swarmingtesten kon bekeken worden in welke mate de inhibitoren effect hadden op het naar buiten brengen van orfamide. De inhibitoren werden toegevoegd voor het opgroeien in vloeibare LB-culturen. De cellen groeiden 24 uur op en werden gebruikt voor de swarmingtest. Na 17 uur werden de resultaten bekeken. De foto's van de swarmingplaten worden weergegeven in Figuur 22. De diameterwaarden van de swarmingzones werden opgemeten en de gemiddelde waarden worden weergegeven in Tabel 12. Allereerst werden swarmingtesten uitgevoerd waar 1µL DMSO werd toegevoegd in plaats van inhibitor om na te gaan of DMSO een toxisch effect had op de cellen. Er werd echter geen verschil waargenomen tussen de swarmingresultaten met en zonder DMSO (data niet weergegeven). De resultaten maken duidelijk dat *Pseudomonas* sp. CMR12a niet veel doorheen het medium beweegt. *OprM* mutant en *nodT-oprM* dubbelmutant vertoonden wel een grotere beweegbaarheid. Wanneer CCC werd toegevoegd werden de H⁺-pompen geïnhibeerd wat aanleiding gaf tot een hogere beweegbaarheid in het wild type en de *nodT-oprM* mutant aangezien een significant positief effect werd waargenomen. De NOV-inhibitor zorgde voor een lagere beweegbaarheid in het wild type en de *oprM* mutant daar een significant negatief effect werd waargenomen. De toevoeging van de GLB-inhibitor bij het wild type en de *nodT* mutant had een significant negatief effect terwijl het bij de *oprM* en *nodT-oprM* mutanten zorgde voor een significant positief effect en dus een grotere beweegbaarheid. Tabel B8 geeft weer wat de invloed van de mutanten is bij elke behandeling. In het experiment zonder inhibitor en de drie behandelingen met inhibitor zorgen zowel de *nodT* mutant als de *oprM* mutant als de *nodT-oprM* dubbelmutant voor een significante stijging van de swarmingbeweegbaarheid. Enkel bij de behandeling met CCC verliest de *nodT* mutant swarmingbeweegbaarheid ten opzichte van het wild type.



Figuur 22. Swarmingtest resultaten van *Pseudomonas* sp. CMR12a en mutanten en met drie verschillende inhibitoren: Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazon (CCC), natriumorthovanadaat (NOV) en glybenclamide (GLB). Inhibitoren werden toegevoegd aan een concentratie van 25μM, 1mM en 10μM respectievelijk waarna de vloeibare bacteriecultuur opgroeide voor 24 uur. 'φ', gemiddelde diameterwaarde.

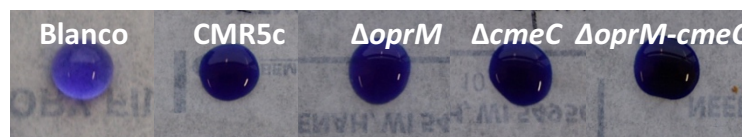
Tabel 12. Swarmingtest resultaten van *Pseudomonas* sp. CMR12a en mutanten met drie verschillende inhibitoren: Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazine (CCC), natriumorthovanadaat (NOV) en glybenclamide (GLB). μ , gemiddelde; σ , standaardafwijking; %RSD, relatieve standaardafwijking; p-waarde van de Mann-Whitney Test met significantieniveau 5% met als nulhypothese dat de behandeling met inhibitor (CCC, NOV of GLB) gelijk is aan de behandeling zonder inhibitor; %Effect, stijgend (+) of dalend (-) effect van de inhibitor ten opzichte van de bacterie zonder inhibitor. De vetgedrukte waarden in %Effect-kolom zijn significant op het 5% significantieniveau.

Behandeling	μ (cm)	σ (cm)	% RSD	p-waarde	% Effect
CMR12a	1,25	0,05	4%		
CMR12a + CCC	3,30	0,30	9%	0,029	164%
CMR12a + NOV	1,10	0,00	0%	0,029	-12%
CMR12a + GLB	1,05	0,05	5%	0,029	-16%
CMR12a-nodT	1,45	0,05	3%		
CMR12a-nodT + CCC	1,65	0,11	7%	0,057	14%
CMR12a-nodT + NOV	1,25	0,09	7%	0,057	-14%
CMR12a-nodT + GLB	1,20	0,00	0%	0,029	-17%
CMR12a-oprM	3,35	0,46	14%		
CMR12a-oprM + CCC	3,38	0,23	7%	1,00	1%
CMR12a-oprM + NOV	1,68	0,28	17%	0,029	-50%
CMR12a-oprM + GLB	4,20	0,17	4%	0,029	25%
CMR12a-nodT-oprM	1,70	0,90	53%		
CMR12a-nodT-oprM + CCC	4,55	0,85	19%	0,029	168%
CMR12a-nodT-oprM + NOV	1,40	0,00	0%	1,00	-18%
CMR12a-nodT-oprM + GLB	4,35	0,36	8%	0,029	156%

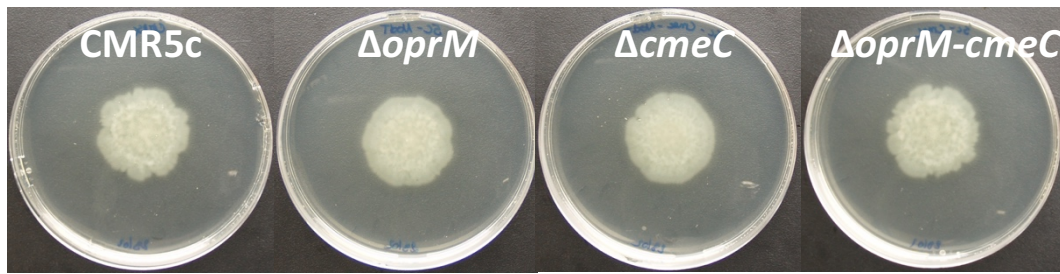
5.3.1.2 *Pseudomonas* species CMR5c

Druppelinzaktest & Swarmingtest

De druppelinzaktest werd eveneens uitgevoerd bij de *oprM* en *cmeC* mutanten van *Pseudomonas* sp. CMR5c. Het resultaat wordt weergegeven in Figuur 23 en toont aan dat de druppels bacteriecultuur van het wild type, *oprM* mutant, *cmeC* mutant en *oprM-cmeC* dubbelmutant hun oppervlaktespanning verloren en in elkaar zakten. De swarmingtest, weergegeven in Figuur 24, bevestigt de resultaten van de druppelinzaktest. Het wild type en de mutanten bewogen doorheen het medium doordat ze orfamide aanmaakten.



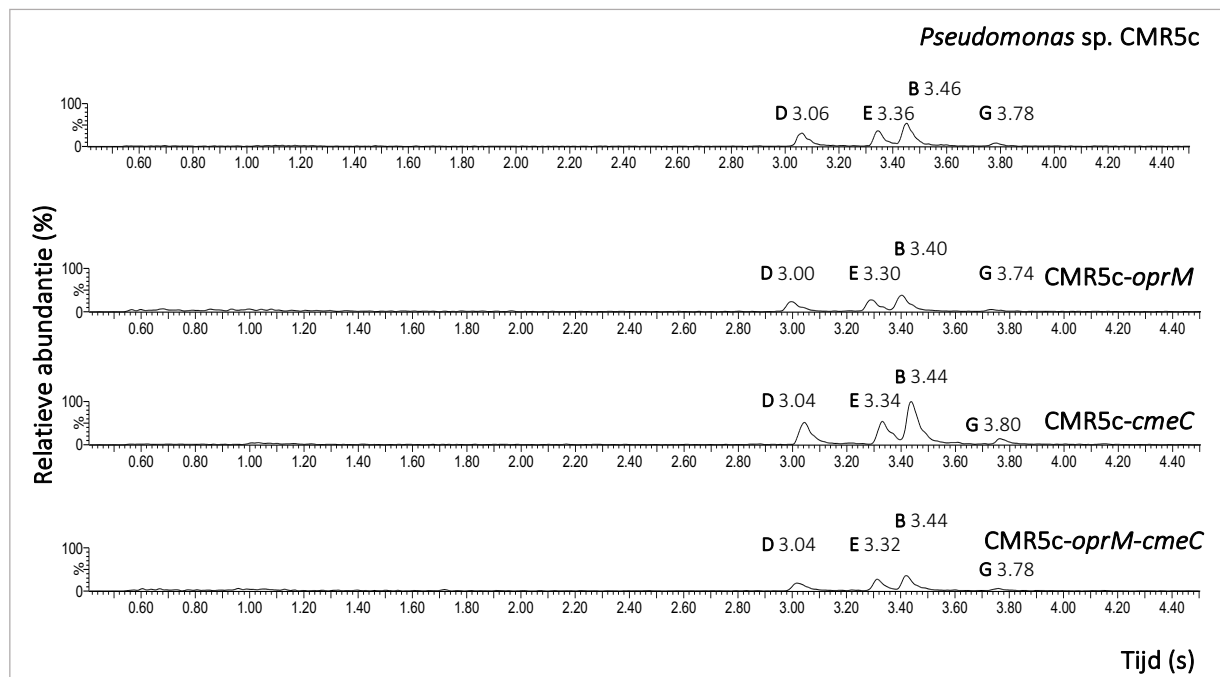
Figuur 23. Druppelinzaktest van *Pseudomonas* sp. CMR5c en de mutanten voor *nodT*, *oprM* en *nodT-oprM*. Voor het blanco staal werd water gebruikt.



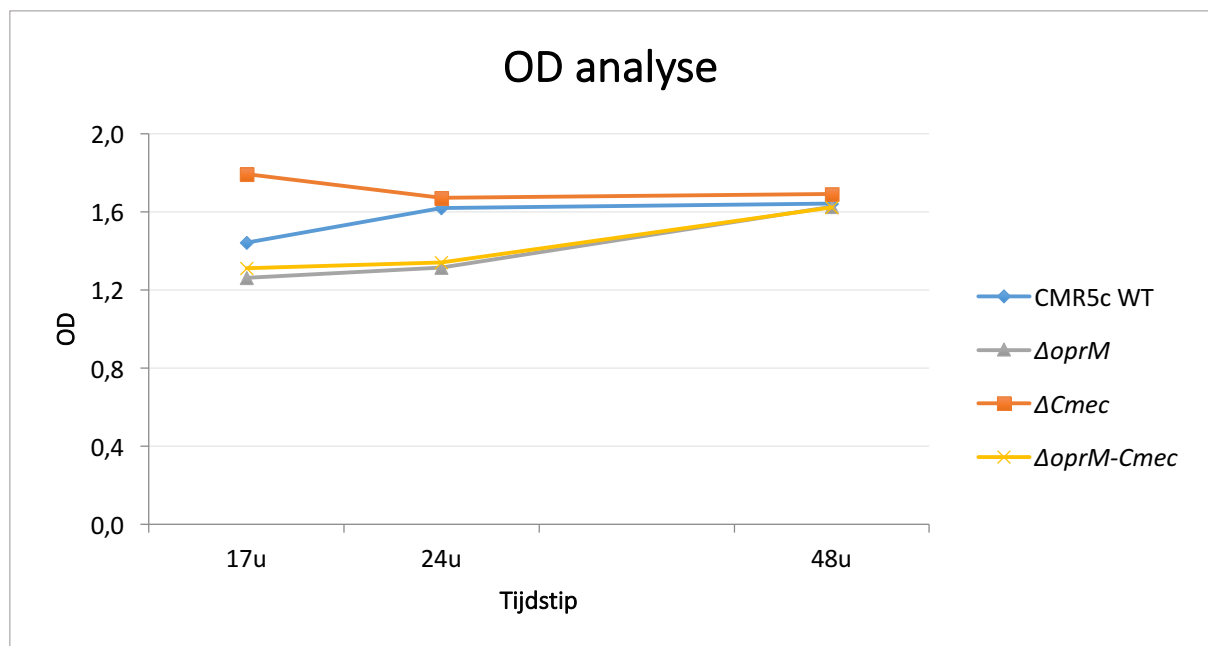
Figuur 24. Swarmingtest voor *Pseudomonas* sp. CMR5c en *nodT*, *oprM*, *nodT-oprM*, *luxUp* en *luxDown* mutanten na 17 uur opgroeien van bacteriën op LB platen aan 28°C.

HPLC-MS-analyse

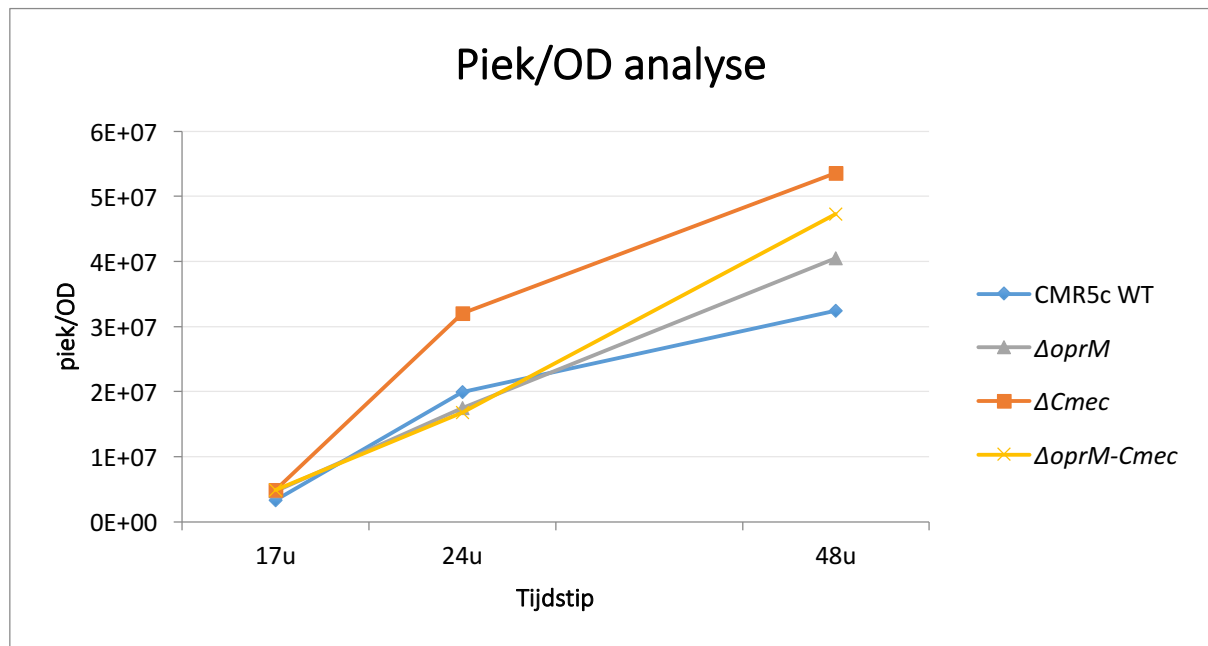
HPLC-MS-analyse werd uitgevoerd om te bepalen welke moleculen werden aangemaakt en of de mutaties een invloed hadden in de aanmaak ervan. Figuur 25 geeft het chromatogram weer voor *Pseudomonas* sp. CMR5c en mutanten na 24 uur opgroeien. Drie grotere pieken en één kleinere piek werden zichtbaar bij alle mutanten namelijk de pieken voor orfamide D, E, B en G. Orfamide B werd steeds het meeste aangemaakt. De figuur geeft duidelijk weer dat de *cmeC* mutant meer orfamide aanmaakte. Figuur 26 geeft de optische densiteit (OD) weer na 17 uur, 24 uur en 48 uur opgroeien in LB-vloeistof en Tabel B5 geeft de getabelleerde waarde weer. Na 48 uur waren het wild type, *oprM*, *cmeC* en *oprM-cmeC* mutanten evenveel aangegroeid. In Figuur 27 wordt aangetoond hoeveel orfamide wordt aangemaakt onafhankelijk van het aantal cellen aanwezig door de piekoppervlakte te delen door de OD. Tabel B9 geeft de getabelleerde waarden weer. Hiervoor werd de piekoppervlakte bij de chromatogram uit de HPLC-MS-analyse gedeeld door de optische densiteit. Na 17 uur werd er door alle bacteriën, zowel wild type als mutanten, ongeveer evenveel orfamide aangemaakt. Een stijgende trend was waar te nemen in de aanmaak van orfamide met de tijd. Na 24 uur maakte de *cmeC* mutant meer orfamide aan dan de anderen. Na 48 uur was er een duidelijke trend zichtbaar waar de *cmeC* mutant het meeste orfamide aanmaakte vervolgens de *oprM-cmeC* dubbelmutant en dan de *oprM* mutant.



Figuur 25. HPLC-MS-analyse van *Pseudomonas* sp. CMR5c en mutanten. De stalen van de bacteriën werden bereid uit het supernatans van 24 uur gegroeide LB-vloeistof culturen.



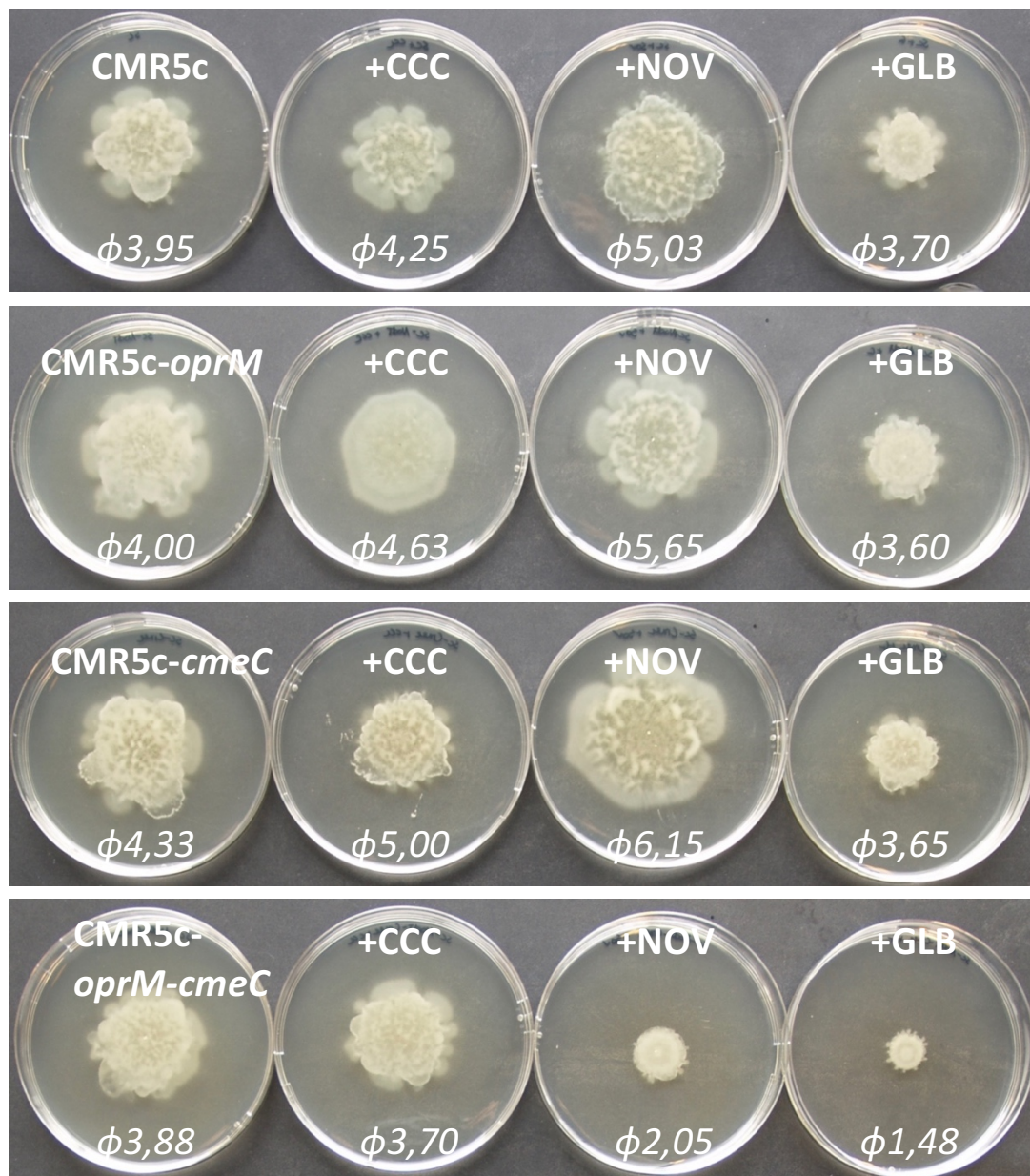
Figuur 26. Optische densiteit van *Pseudomonas* sp. CMR5C en mutanten. Culturen werden 17 uur, 24 uur en 48 uur opgegroeid in vloeibare LB en de OD werd bepaald.



Figuur 27. HPLC-MS-analyse van *Pseudomonas* sp. CMR5c en mutanten. De piekoppervlakten werden opgeteld en gedeeld door de optische densiteit van de bacteriën.

Swarmingtest met inhibitoren

Ook in *Pseudomonas* sp. CMR5c werden de inhibitoren gebruikt om het secretiesysteem verder te bestuderen. Figuur 28 geeft de foto's van de swarmingplaten weer en Tabel 13 geeft de getabelleerde resultaten. De resultaten tonen aan dat bij *Pseudomonas* sp. CMR5c de inhibitor CCC enkel zorgde voor een significante grotere beweegbaarheid in de *oprM-cmeC* mutant. De inhibitor NOV zorgde voor een significante grotere beweegbaarheid behalve bij de *oprM-cmeC* dubbelmutant waar het een significante kleinere beweegbaarheid vertoonde. Inhibitor GLB zorgde enkel voor een significant dalend effect in de *oprM-cmeC* mutant daar er een effect van -163% werd waargenomen. Tabel B8 geeft weer wat de invloed van de mutanten is bij elke behandeling. Het experiment zonder inhibitor geeft geen significante invloed van de mutanten. Bij de behandeling met CCC zorgde de *oprM-cmeC* dubbelmutant voor een stijging van de swarmingbeweegbaarheid ten opzichte van het wild type. De behandeling met NOV toonde een significant effect bij zowel de *oprM* mutant (12%) als de *cmeC* mutant (22%) als de *oprM-cmeC* dubbelmutant (-59%). Behandeling met GLB zorgde bij de *oprM-cmeC* dubbelmutant voor een daling in swarmingbeweegbaarheid (-60%).



Figuur 28. Swarmingtest resultaten van *Pseudomonas* sp. CMR5c en mutanten en met drie verschillende inhibitoren: Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCC), natriumorthovanadaat (NOV) en glybenclamide (GLB). Inhibitoren werden toegevoegd aan een concentratie van 25μM, 1mM en 10μM respectievelijk waarna de vloeibare bacteriecultuur opgroeide voor 24 uur.

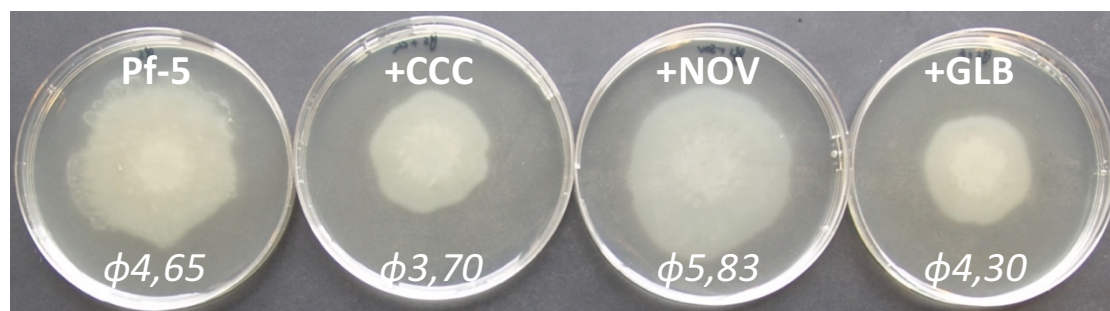
Tabel 13. Swarmingtest resultaten van *Pseudomonas* sp. CMR5c en mutanten met drie verschillende inhibitoren: Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCC), natriumorthovanadaat (NOV) en glybenclamide (GLB). μ , gemiddelde; σ , standaardafwijking; %RSD, relatieve standaardafwijking; p-waarde van de Mann-Whitney Test met significantieniveau 5% met als nulhypothese dat de behandeling met inhibitor (CCC, NOV of GLB) gelijk is aan de behandeling zonder inhibitor; %Effect, stijgend (+) of dalend (-) effect van de inhibitor ten opzichte van de bacterie zonder inhibitor. De vetgedrukte waarden in %Effect-kolom zijn significant op het 5% significantieniveau.

Behandeling	μ (cm)	σ (cm)	% RSD	p-waarde	% Effect
CMR5c	3,95	0,61	15%		
CMR5c + CCC	4,25	0,36	9%	0,486	8%
CMR5c + NOV	5,03	0,18	4%	0,029	27%
CMR5c + GLB	3,70	0,52	14%	0,486	-6%
CMR5c-<i>oprM</i>	4,00	1,16	29%		
CMR5c- <i>oprM</i> + CCC	4,63	0,18	4%	0,114	16%
CMR5c- <i>oprM</i> + NOV	5,65	0,11	2%	0,029	41%
CMR5c- <i>oprM</i> + GLB	3,60	0,10	3%	0,343	-10%
CMR5c-<i>cmeC</i>	4,33	0,58	13%		
CMR5c- <i>cmeC</i> + CCC	5,00	0,24	5%	1,00	16%
CMR5c- <i>cmeC</i> + NOV	6,15	0,35	6%	0,029	42%
CMR5c- <i>cmeC</i> + GLB	3,65	0,35	10%	1,00	-16%
CMR5c-<i>oprM-cmeC</i>	3,88	0,59	15%		
CMR5c- <i>oprM-cmeC</i> + CCC	5,23	0,48	9%	0,029	35%
CMR5c- <i>oprM-cmeC</i> + NOV	2,05	0,15	7%	0,029	-47%
CMR5c- <i>oprM-cmeC</i> + GLB	1,48	0,28	19%	0,029	-62%

5.3.1.3 *Pseudomonas protegens* Pf-5

Swarmingtest met inhibitoren

Figuur 29 geeft de foto's van de swarmingplaten weer met inhibitoren voor *P. protegens* Pf-5 en Tabel 14 geeft de getabelleerde waarden weer. Hierbij werd enkel met het wild type gewerkt daar er geen mutanten in *P. protegens* Pf-5 voorhanden waren. Uit de resultaten blijkt dat *P. protegens* Pf-5 een grote beweegbaarheid had in vergelijking met *Pseudomonas* sp. CMR12a en CMR5c. De CCC- en GLB-inhibitoren zorgden voor een lagere beweegbaarheid maar deze dalingen zijn niet significant. Het gebruik van de NOV-inhibitor bracht een grotere beweegbaarheid met zich mee die wel significant was.



Figuur 29. Swarming resultaten van *P. protegens* Pf-5 met drie verschillende inhibitoren: Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCC), natriumorthovanadaat (NOV) en glybenclamide (GLB). Inhibitoren werden toegevoegd aan een concentratie van 25 μ M, 1mM en 10 μ M respectievelijk waarna de vloeibare bacteriecultuur opgroeide voor 24 uur.

Tabel 14. Swarmingtest resultaten van *P. protegens* Pf-5 met drie verschillende inhibitoren: Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCC), natriumorthovanadaat (NOV) en glybenclamide (GLB). μ , gemiddelde; σ , standaardafwijking; %RSD, relatieve standaardafwijking; p-waarde van de Mann-Whitney Test met significantieniveau 5% met als nulhypothese dat de behandeling met inhibitor (CCC, NOV of GLB) gelijk is aan de behandeling zonder inhibitor; %Effect, stijgend (+) of dalend (-) effect van de inhibitor ten opzichte van de bacterie zonder inhibitor. De vetgedrukte waarden in %Effect-kolom zijn significant op het 5% significantieniveau.

Behandeling	μ (cm)	σ (cm)	% RSD	p-waarde	% Effect
Pf-5	4,65	0,85	18%		
Pf-5 + CCC	3,70	0,10	3%	0,114	-20%
Pf-5 + NOV	5,83	0,18	3%	0,029	25%
Pf-5 + GLB	4,30	0,10	2%	1,000	-8%

5.3.2 Discussie

Pseudomonas species kunnen verschillende secretiesystemen bevatten. Zo bevat *P. aeruginosa* RND-type-effluxpompen waaronder het MexAB-OprM systeem (Kourtesi et al., 2013). Dit wel beschreven systeem is verantwoordelijk voor het naar buiten pompen van antibiotica zodat *P. aeruginosa* hiertegen een hoge resistentie bevat (Li et al., 1995). Type I secretiesystemen komen ook veel voor in *Pseudomonas* species. Deze bestaan net als de RND-effluxpompen uit een binnenste membraancomponent, een periplasma adaptorproteïne en een buitenste membraankanaal (Costa et al., 2015). Het MacAB secretiesysteem is een voorbeeld van een type I secretiesysteem en komt voor in tal van *Pseudomonas* species (de Bruijn et al., 2008; Cho and Kang, 2012; Dubern et al., 2008; Lim et al., 2009; Olorunleke et al., 2007). Hierbij is MacB een ABC-type effluxpomp dat zich in het binnenste membraan bevindt en MacA is de periplasma proteïne die gebonden is aan MacB (Kobayashi et al., 2001). Wanneer een buitenste membraanproteïne bindt aan het MacAB-systeem vormt deze een functioneel type I secretiesysteem (Costa et al., 2015).

In de orfamide biosynthesecluster bij de orfamide producerende *Pseudomonas* species bevinden deze secretiegenen zich net achter de orfamide cluster en juist voor de LuxR-Down regulator (Ma et al., 2016). De meeste orfamide producerende *Pseudomonas* species bevatten ook een *nodT* gen dat zich voor de orfamide biosynthesecluster bevindt. Dit gen schrijft een buitenste membraanproteïne af. *Pseudomonas* sp. CMR12a, CMR5c en CMAA1215 bevatten dit *nodT* gen echter niet in de orfamide biosynthesecluster (Ma et al., 2016; Olorunleke et al., 2007). *Pseudomonas* sp. CMR12a bevat wel een homoloog van *nodT* in het genoom namelijk in de sessiline biosynthesecluster (D'aes et al., 2014). Een tweede buitenste membraanproteïne OprM wordt normaal samen met het MexAB secretiesysteem gebruikt (Li et al., 1995). Zowel het NodT proteïne als het OprM proteïne kunnen samenwerken met MacAB om een functioneel secretiesysteem te vormen, zodat orfamide uit de cel kan worden gepompt (data nog niet gepubliceerd). *Pseudomonas* sp. CMR12a en CMR5c bevatten een *cmeC* gen dat homologie vertoont met de buitenste membraanproteïnen. Het zou verantwoordelijk kunnen zijn voor de aanmaak van een andere buitenste membraanproteïne CmeC dat eveneens helpt met het naar buiten pompen van orfamide (data nog niet gepubliceerd).

5.3.2.1 *Pseudomonas* species CMR12a

HPLC-MS-analyse

In een voorgaande HPLC-MS-analyse met *Pseudomonas* sp. CMR12a werd duidelijk dat een mutatie in *oprM* ervoor zorgt dat een grotere hoeveelheid orfamide buiten de cel wordt gebracht. Een dubbele mutatie in zowel *nodT* als *oprM* zorgt voor een nog grotere hoeveelheid orfamide dat buiten de cel wordt gebracht. Deze resultaten zijn zichtbaar na 41 uur opgroeien van de bacteriën (data nog niet gepubliceerd). De swarmingtest voor *Pseudomonas* sp. CMR12a (Figuur 21) bevestigt deze resultaten. De *oprM* mutant zorgt voor een grotere hoeveelheid orfamide die naar buiten wordt gebracht in vergelijking met het wild type. Ook de dubbele mutant *nodT-oprM* brengt meer orfamide buiten de cel dan het wild type. Ten eerste moet gemeld worden dat in de dubbele mutant geen sessiline meer wordt geproduceerd (data nog niet gepubliceerd). Sessiline gebruikt het MexAB-OprM systeem en het MacAB-NodT systeem om de cel te verlaten. Bij uitschakelen van *nodT* en *oprM* wordt geen sessiline meer naar buiten gebracht. Hierdoor is het zichtbare swarmingpatroon in de *nodT-oprM* mutant helemaal te wijten aan de aanmaak van orfamide. Ten tweede toont dit aan dat er andere buitenste membraanproteïnen zijn die orfamide buiten de cel kunnen brengen aangezien in de dubbele mutant zowel *nodT* als *oprM* zijn uitgeschakeld en er toch een grote hoeveelheid orfamide buiten de cel wordt gebracht. Ten derde moet opgemerkt worden dat er meer orfamide buiten de cel wordt gebracht wanneer één of beide buitenste membraanproteïnen afwezig zijn en voornamelijk bij de afwezigheid van OprM. Een verklaring hiervoor zou kunnen zijn dat een andere pomp wordt geactiveerd die actiever is dan NodT of OprM (Daugelavicius et al., 2010).

Swarmingtest met inhibitoren

Om de pompsystemen dieper te bestuderen werd een swarmingtest uitgevoerd waarbij gebruik gemaakt werd van inhibitoren namelijk carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCC), natriumorthovanadaat (NOV) en glybenclamide (GLB) (Tabel 12). CCC kan in *P. aeruginosa* de protonen van de RND-pompen ontkoppelen waardoor het membraanproteïne geen energie meer heeft om te werken (Pagès et al., 2005). Bijgevolg staat CCC bekend voor het inhiberen van H^+ -pompen. De ABC-transporterfamilie die ATP gebruikt om energie op te wekken kan opgedeeld worden in verschillende klassen waaronder de sulfonylurea receptoren (SUR), cystic fibrosis transmembranaire regulator (CFTR) en de P-glycoproteïnen (Golstein et al., 1999). Het is bekend dat NOV kan binden op P-glycoproteïnen zodat het transport van moleculen wordt tegengegaan (Horio et al., 1988; Urbatsch et al., 1995). GLB kan reageren met SUR en CFTR zodat de werking van de pompen eveneens geïnhibeed worden. Ook kan GLB sommige P-glycoproteïnen inhiberen (Golstein et al., 1999). NOV en GLB kunnen met andere woorden elk andere ATP-pompen inhiberen. De swarmingresultaten met inhibitoren kunnen weergeven welke pompen het meest van belang zijn in het naar buiten pompen van orfamide. Het wild type *Pseudomonas* sp. CMR12a maakt buiten orfamide ook sessiline aan wat de kleine swarmingbeweegbaarheid verklaart. Sessiline blokkeert immers de activiteit van orfamide (D'aes et al., 2014). Deze sessiline gebruikt zowel het MexAB-OprM systeem als het MacAB-NodT systeem om de cel te verlaten (data nog niet gepubliceerd). Toevoeging van CCC aan het wild type *Pseudomonas* sp. CMR12a bracht een enorme stijging van swarmingbeweegbaarheid met zich mee. Hieruit blijkt dat de H^+ -pomp OprM het meest verantwoordelijk is voor het naar buiten brengen van sessiline. Wanneer sessiline grotendeels wordt geblokkeerd heeft orfamide immers meer vrij spel en activeert het

swarmingbeweegbaarheid. Wanneer NOV of GLB wordt toegevoegd en ATP-pompen worden geblokkeerd treedt een significante daling op van de beweegbaarheid wat doet vermoeden dat orfamide minder uit de cel geraakt. De *Pseudomonas* sp. CMR12a *nodT* mutant vertoont een hogere swarmingbeweegbaarheid ten opzichte van het wild type. Dit heeft eveneens te maken met het blokkeren van sessiline waardoor orfamide zijn activiteit kan uitvoeren. Enkel het toevoegen van GLB aan de *nodT* mutant vertoont een significante daling wat erop lijkt dat orfamide bepaalde ATP-pompen gebruikt om de cel te verlaten. De mutatie van *oprM* zorgt voor een hoge beweegbaarheid wat de voorgaande hypothese bevestigt dat sessiline voornamelijk de H^+ -pomp OprM gebruikt om de cel te verlaten. Indien OprM geblokkeerd is, door toevoegen van CCC, of niet aanwezig is, in de *oprM* mutant, wordt namelijk meer orfamide buiten de cel gebracht. Toevoegen van NOV en GLB aan de *oprM* mutant geven verschillende resultaten. NOV zorgt voor een significante daling (-50%) terwijl GLB zorgt voor een significante stijging (25%) wat doet vermoeden dat NodT een ATP-pomp is die door GLB wordt geïnhibeed maar niet door NOV. Orfamide gebruikt dus waarschijnlijk sommige ATP-pompen om de cel te verlaten en andere niet. De *nodT-oprM* mutant maakt geen sessiline meer aan waardoor enkel naar de secretie van orfamide kan worden gekeken. De verhoogde swarmingbeweegbaarheid met het wild type is dan te verklaren doordat geen sessiline wordt gevormd en orfamide vrij spel heeft. Het blokkeren van alle H^+ -pompen of bepaalde ATP-pompen zorgt echter voor een significante stijging (168% door CCC en 156% door GLB respectievelijk) in swarmingbeweegbaarheid. Het kan zijn dat het blokkeren van bepaalde pompen zorgt voor de activatie van anderen pompen (Daugelavicius et al., 2010). Ook kan het gebruik van de inhibitor ervoor zorgen dat een pomp niet wordt gedeactiveerd (Brooun et al., 1999; Sun et al., 2014). Het kan namelijk zijn dat er repressorproteïnen bestaan die een pomp deactiveren. Door gebruik te maken van toxische componenten zoals CCC kunnen deze binden aan de repressorproteïnen waardoor de pomp niet wordt gedeactiveerd. De swarmingresultaten kunnen ook op een andere manier bekeken worden namelijk door de behandelingen samen te zetten en de invloed van de mutanten op het wild type te bekijken in elke behandeling (Tabel B8). Een significante stijging van swarmingbeweegbaarheid in de mutanten wordt waargenomen in elke behandeling ten opzichte van het wild type behalve bij de CCC behandeling waar de *nodT* mutant een daling vertoont ten opzichte van het wild type. Door op deze manier naar de resultaten te kijken wordt opnieuw vastgesteld dat het afwezig zijn van één of beide buitenste membraanproteïnen zorgt voor meer secretie van orfamide. Wanneer H^+ -pompen worden geïnhibeed heeft het afwezig zijn van de NodT buitenste membraanproteïne nochtans een dalend effect in swarmingbeweegbaarheid. Dit kan zijn doordat NodT een grote functie vervult in het naar buiten pompen van orfamide. Een andere vaststelling is dat het inhiberen van sommige pompen een invloed heeft op de mate waarin de mutanten orfamide secreteren. Namelijk wanneer de H^+ -pompen worden geïnhibeed zal de *oprM* mutant niet veel meer orfamide naar buiten brengen dan het wild type. Wanneer bepaalde ATP-pompen worden geblokkeerd zal de *oprM* mutant echter veel meer orfamide buiten de cel brengen dan het wild type. Combinatie van geblokkeerde en afwezige pompen geven andere effecten waardoor het secretiesysteem complexer is dan eerst verwacht. Verder onderzoek is nodig om dit secretiesysteem in zijn geheel te ontrafelen. Een bijkomende opmerking moet gemaakt worden over de variatie in de swarmingtesten waardoor een verschil niet als significant kan worden beschouwd. Deze variatie kan te wijten zijn aan de samenstelling van het medium en/of aeratie tijdens het opgroeien van de bacteriën. De pompactiviteit bij *P. aeruginosa* is namelijk afhankelijk van deze twee factoren (Daugelavicius et al., 2010). Het zou daarom in *Pseudomonas* sp. CMR12a eveneens mogelijk geweest zijn dat het medium en/of aeratie een rol spelen in de pompactiviteit. De condities van de experimenten waren dan wel

dezelfde toch zouden kleine verschillen een groot effect kunnen hebben op de pompactiviteit. Ook worden de bacteriën na centrifugatie opgelost in normale saline oplossing om een isotone omgeving te behouden. Deze normale saline oplossing zou echter zoutstress teweeg kunnen brengen waardoor eveneens variatie in swarmingbeweegbaarheid kan optreden (Lo Nostro et al., 2005).

5.3.2.2 *Pseudomonas* species CMR5c

Druppelinzaktest & Swarmingtest

Om het secretiesysteem in *Pseudomonas* sp. CMR5c nader te bezien werden tal van testen uitgevoerd met het wild type en *oprM*, *cmeC* en *oprM-cmeC* mutanten. Het werkingsmechanisme van *cmeC* is hierbij nog niet bekend. Een eerste test is de druppelinzaktest (Figuur 23) die aantoont dat de bacterieculturen van alle mutanten inzakken en dus orfamide blijven produceren. Deze resultaten worden bevestigd met de swarmingtest (Figuur 24) waarbij alle mutanten een swarmingbeweegbaarheid vertonen. Orfamide wordt dus nog steeds geproduceerd door bacteriën met mutaties in de buitenste membraanproteïnen. Een verschil tussen de mutanten is echter niet op te merken. Een swarmingtest geeft de bacteriën echter maar 17 uur om op te groeien wat onvoldoende kan zijn om een verschil waar te nemen in swarmingbeweegbaarheid tussen de mutanten.

HPLC-MS-analyse

Om de orfamide secretie op verschillende tijdstippen te bekijken werd een HPLC-MS-analyse uitgevoerd voor 17 uur, 24 uur en 48 uur. Deze bevestigt dat alle mutanten orfamide aanmaken daar ze telkens de vier pieken van het wild type bevatten namelijk pieken voor orfamide B, D, E en G (Figuur 25). De piek voor orfamide F is telkens te klein om waar te nemen. De optische densiteit analyse (Figuur 26) toont aan dat de *cmeC* mutant het snelst groeit na 17 uur maar dat na 48 uur alle mutanten en het wild type een ongeveer even grote celdensiteit bevatten. Er wordt vermoed dat het aanmaken van de buitenste membraanproteïne Cmec meer energie vergt in het begin van de groei. Indien Cmec niet hoeft aangemaakt te worden kan deze energie gebruikt worden in de groei, ontwikkeling en reproductie van de cellen (Van Den Broek et al., 2005; De Leij et al., 1998). De piek/OD-analyse van *Pseudomonas* sp. CMR5c (Figuur 27) toont na 17 uur groeien geen verschil wat ook te zien is met de swarmingtest. Na 24 uur wordt nochtans een verschil waargenomen daar de *cmeC* mutant meer orfamide naar buiten brengt. Na 48 uur is het verschil nog duidelijker en brengt de *oprM* mutant meer orfamide buiten de cel dan het wild type. De *oprM-cmeC* dubbelmutant brengt nog meer orfamide in het extracellulair milieu en de *cmeC* mutant brengt het meeste orfamide naar buiten. Wanneer één of beide buitenste membraanproteïnen afwezig zijn wordt dus meer orfamide buiten de cel gebracht ten opzichte van het wild type. Zoals eerder besproken bij *Pseudomonas* sp. CMR12a zou ook hier de reden kunnen zijn dat in de afwezigheid van bepaalde pompen andere pompen worden geactiveerd (Daugelavicius et al., 2010).

Swarmingtest met inhibitoren

Om het pompsysteem iets dieper te onderzoeken worden ook in swarmingtesten van *Pseudomonas* sp. CMR5c inhibitors gebruikt (Tabel 13). Hierbij lijkt enkel NOV steeds een significante invloed te hebben op de swarmingbeweegbaarheid van zowel het wild type als de mutanten. NOV zorgt er in het wild type, de *oprM* mutant en de *cmeC* mutant namelijk voor dat de swarmingbeweegbaarheid stijgt. Het

blokkeren van bepaalde ATP-pompen zorgt er dus voor dat andere pompen actief worden; dit kunnen zowel H^+ -pompen zijn als andere ATP-pompen. Wanneer de H^+ -pompen in de dubbele mutant worden geïnhibieerd treedt een significante stijging op van swarmingbeweegbaarheid (35%). Het toevoegen van NOV en GLB zorgt echter voor een significante daling van respectievelijk -47% en -62% respectievelijk. Het uitschakelen van bepaalde ATP-pompen in de afwezigheid van de OprM en CmeC buitenste membraanproteïnen zorgt voor een verlies in pompactiviteit. Hieruit blijkt dat ofwel *oprM* ofwel *cmeC* nodig is om andere pompen te activeren. Ook hier is het mogelijk dat het gebruik van toxische componenten ervoor zorgt dat bepaalde pompen niet worden gedeactiveerd (Brooun et al., 1999; Sun et al., 2014). De swarmingresultaten kunnen ook hier op een andere manier bekeken worden namelijk door de behandelingen samen te zetten en de invloed van de mutanten op het wild type te bekijken in elke behandeling (Tabel B8). Bij de behandeling waar geen inhibitor werd gebruikt is er geen effect waar te nemen van de mutanten. Bij de behandeling met CCC zorgt de *oprM-cmeC* dubbelmutant voor een stijging van de swarmingbeweegbaarheid ten opzichte van het wild type. Opnieuw zorgen de afwezigheid van *oprM* en *cmeC* voor de activatie van andere pompen. De behandeling met NOV toont een significante stijging bij zowel de *oprM* mutant als de *cmeC* mutant en een significante daling bij de *oprM-cmeC* dubbelmutant. Behandeling met GLB zorgt bij de *oprM-cmeC* dubbelmutant eveneens voor een daling in swarmingbeweegbaarheid. Dit wijst erop dat de afwezigheid van *oprM* en *cmeC* in combinatie met geblokkeerde ATP-pompen ervoor zorgt dat orfamide minder naar buiten wordt gebracht. De afwezigheid van *oprM* en *cmeC* in combinatie met deactivatie van H^+ -pompen zorgt ervoor dat meer orfamide naar buiten wordt gebracht. De combinatie van afwezige en gedeactiveerde pompen zorgt dus ook voor verschillende effecten net als in *Pseudomonas* sp. CMR12a. Het secretiesysteem lijkt daarom onder invloed van meerdere factoren en is meer complex dan gedacht. Variaties te wijten aan samenstelling van het medium, aeratie en/of zoutstress moeten ook in het achterhoofd gehouden worden. De resultaten van *Pseudomonas* sp. CMR5c vergelijken met de resultaten van *Pseudomonas* sp. CMR12a is niet vanzelfsprekend aangezien deze laatste sessiline aanmaakt die dezelfde pompsystemen gebruikt.

5.3.1.3 *Pseudomonas protegens* Pf-5

Swarmingtest met inhibitoren

De swarmingtest met inhibitoren wordt eveneens uitgevoerd op *P. protegens* Pf-5 waarbij enkel naar het wild type gekeken wordt daar geen mutanten beschikbaar waren (Tabel 14). Enkel het toevoegen van NOV heeft een significante invloed (25%) op de swarmingbeweegbaarheid. Wanneer bepaalde ATP-pompen worden geblokkeerd blijkt dit andere pompen te activeren (Daugelavicius et al., 2010). Het gebruik van NOV zelf kan ook hier ervoor zorgen dat bepaalde pompen niet worden gedeactiveerd (Brooun et al., 1999; Sun et al., 2014). *Pseudomonas* sp. CMR5c en *P. protegens* Pf-5 maken beide enkel de CLP orfamide aan. Beide wild types ondergaan een stijgend effect in swarmingbeweegbaarheid bij het toevoegen van NOV. Het kan zijn dat bepaalde pompsystemen in de twee isolaten op dezelfde manier werken en op dezelfde manier beïnvloed worden. Verder onderzoek hieromtrent is nodig.

5.3.3 Conclusie

De buitenste membraanproteïnen NodT en OprM in *Pseudomonas* sp. CMR12a helpen het orfamide buiten de cel te brengen. De afwezigheid van het *nodT* gen blijkt niet meteen een invloed te hebben op

de hoeveelheid orfamide die de cel kan verlaten. Dit is waarschijnlijk doordat sessiline voornamelijk de OprM pomp gebruikt om de cel te verlaten. Dit sessiline blokkeert vervolgens de activiteit van orfamide. Een mutatie in *oprM* zorgt dan weer wel voor een stijging van orfamide secretie. Gedeeltelijk doordat een mutatie in OprM de sessiline secretie doet dalen. De afwezigheid van zowel *nodT* als *oprM* zorgt eveneens voor meer orfamide secretie. Dit suggereert dat de afwezigheid van een bepaalde pomp, andere pompen kan activeren. NodT en OprM zijn echter niet de enige buitenste membraanproteïnen die door orfamide gebruikt worden om de cel te verlaten. Het wordt vermoed dat orfamide voornamelijk bepaalde ATP-pompen gebruikt om de cel te verlaten. Het gebruik van toxische componenten zoals de inhibitoren kan er ook voor zorgen dat pompen niet worden gedeactiveerd. De combinatie van geïnhibeerde en afwezige pompen kan verschillende effecten geven op de hoeveelheid orfamide die de cel kan verlaten. *Pseudomonas* sp. CMR5c bevat de buitenste membraanproteïnen OprM en CmeC die orfamide helpen naar buiten pompen. De afwezigheid van het *oprM* gen lijkt een kleine rol te spelen in de hoeveelheid orfamide dat buiten de cel wordt gebracht. Namelijk wanneer OprM afwezig is wordt er meer orfamide naar buiten gepompt. De mutatie in *cmeC* zorgt er duidelijk voor dat meer orfamide de cel kan verlaten. Het blokkeren van bepaalde ATP-pompen zorgt ervoor dat meer orfamide de cel kan verlaten maar wanneer hierbovenop OprM of CmeC afwezig is wordt minder orfamide uit de cel gebracht. Ook hier is de combinatie van geïnactiveerde en afwezige pompen cruciaal voor de hoeveelheid orfamide die de cel kan verlaten. Zowel OprM als CmeC lijken een grote rol te spelen in orfamide secretie. Toch zijn ook andere pompen aanwezig die orfamide de cel uit kunnen pompen. *P. protegens* Pf-5 heeft eveneens pompen die meer orfamide naar buiten kunnen brengen dan andere pompen. Het inhiberen van bepaalde ATP-pompen zorgt ervoor dat meer orfamide de cel kan verlaten. Deze resultaten van drie verschillende *Pseudomonas* isolaten geven aan dat het secretiesysteem zeer complex is en afhankelijk van het isolaat.

5.4 Bioactiviteit van orfamide

5.4.1 Resultaten

Een *in vitro* inhibitie experiment werd uitgevoerd om te bepalen of *Pseudomonas* species CMR5c en *Pseudomonas protegens* CHA0 *Pythium myriotylum* konden inhiberen. Deze twee *Pseudomonas* isolaten hadden immers reeds aangemaakt orfamide mutanten. Hierbij bezit *P. protegens* CHA0 het *nodT* gen in de orfamide biosynthesecuster terwijl *Pseudomonas* sp. CMR5c dit *nodT* gen niet bevat. Vervolgens werd een plant experiment uitgevoerd met beide isolaten tegen *Pythium myriotylum* op de cocoyamplant.

In vitro inhibitie experiment

De foto's van het *in vitro* inhibitie experiment met *P. protegens* CHA0 en *Pseudomonas* sp. CMR5c tegen *Pythium myriotylum* worden weergegeven in Figuur B2. De zone waar *P. myriotylum* niet groeide was de zone waar inhibitie optrad. De diameter van deze zone werd opgemeten en wordt weergegeven in Tabel 15. Alle behandelingen bleken *P. myriotylum* te kunnen inhiberen daar een significant verschil werd waargenomen ten opzichte van de controle met een p-waarde van 0,002 voor alle behandelingen, weergegeven in Tabel B10 en B11. Er lijkt een klein verschil in inhibitie waar te nemen tussen het wild type van *P. protegens* CHA0 en de orfamide mutant maar dit verschil is echter niet significant op het 5% significantieniveau berekend met de Mann-Whitney Test. Er werd wel een significant verschil in inhibitie

waargenomen tussen het wild type van *Pseudomonas* sp. CMR5C en de orfamide mutant. Om uit te zoeken of er een verschil was in inhibitie van *P. myriotylum* tussen de cellen en het supernatans werden deze apart onderzocht. De resultaten worden weergegeven in Tabel B12 waaruit geconcludeerd kan worden dat de cellen van het wild type van *P. protegens* CHA0 significant minder inhiberen dan het supernatans van het wild type. Tussen de cellen en het supernatans van de orfamide mutant is echter geen significant verschil waar te nemen. Bij het gebruik van supernatans van *Pseudomonas* sp. CMR5c trad significant meer inhibitie op dan wanneer de cellen werden gebruikt zowel voor het wild type als voor de orfamide mutant.

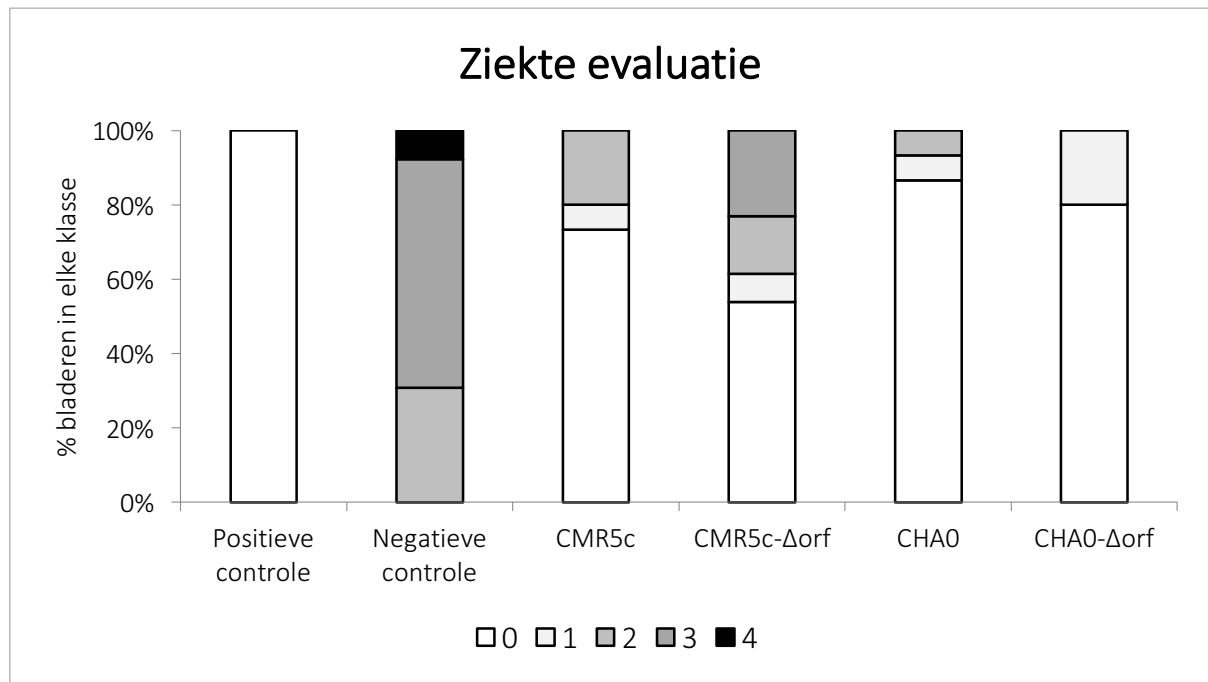
Tabel 15. De gemiddelde diameter met standaardafwijking van *in vitro* inhibitie experiment met *P. protegens* CHA0 en *Pseudomonas* sp. CMR5c en orfamide mutanten. 'Cel' wijst erop dat de bacteriecultuur met cellen is gebruikt, zonder deze aanwijzing betekent dat het supernatans werd gebruikt. μ , gemiddelde; σ , standaardafwijking; %RSD, relatieve standaardafwijking; p-waarde van de Mann-Whitney Test met significantieniveau 5% met als nulhypothese dat het wild type gelijk is aan de orfamide mutant; % Effect geeft aan wat het effect is van het uitschakelen van de orfamide biosynthesecuster op de inhibitie van *Pythium myriotylum*. De vetgedrukte waarden in %Effect-kolom zijn significant op het 5% significantieniveau.

Behandeling	μ (cm)	σ (cm)	% RSD	p-waarde	% Effect
Control	0,00	0,00	0%		
CHA0	1,90	0,10	5%		
CHA0- Δ orf	1,80	0,13	7%	0,24	-5%
CHA0 cel	1,72	0,12	7%		
CHA0- Δ orf cel	1,68	0,11	6%	0,669	-2%
CMR5c	2,32	0,11	5%		
CMR5c- Δ orf	1,90	0,08	4%	0,002	-18%
CMR5c cel	2,07	0,09	5%		
CMR5c- Δ orf cel	1,73	0,07	4%	0,002	-16%

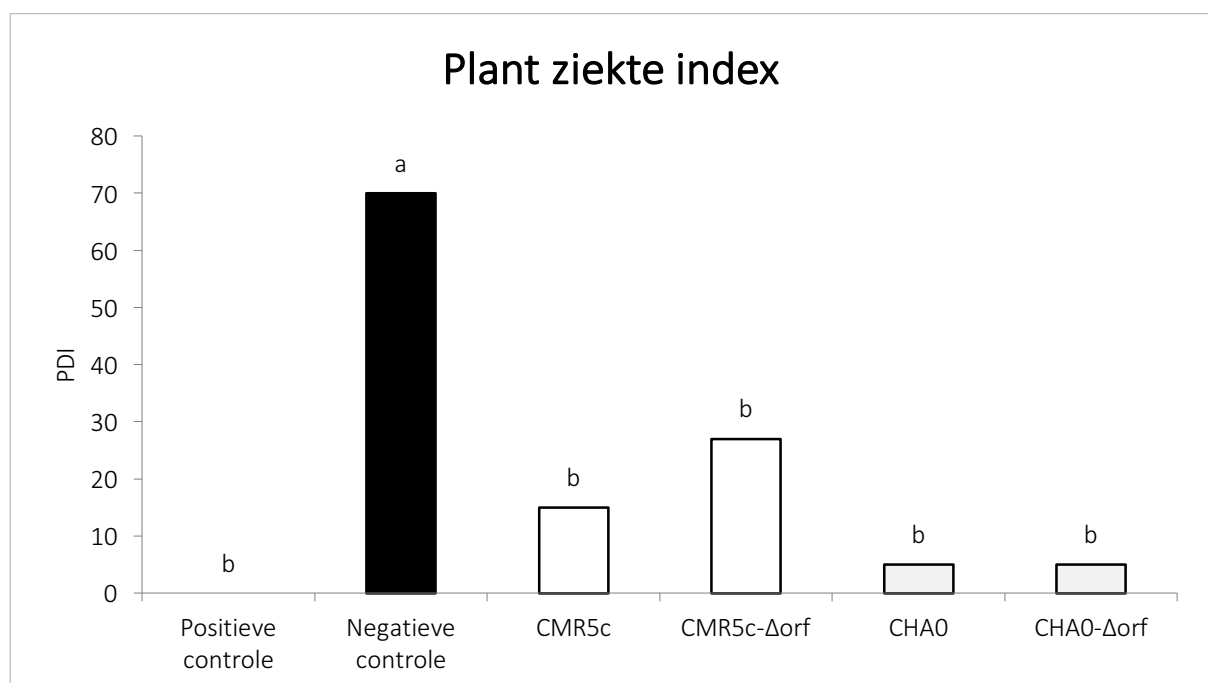
In planta inhibitie experiment

Een plant experiment met *P. protegens* CHA0 en *Pseudomonas* sp. CMR5c werd uitgevoerd tegen *P. myriotylum*. De positieve controleplanten bleven gezond terwijl de negatieve controleplanten werden aangetast door de *P. myriotylum* daar alle blaadjes geel werden en er geen wortels overbleven. De bladeren werden gescoord op verkleuring. Een '0' werd toegekend aan de bladeren die geen verkleuring toonde; een '1' wanneer minder dan 50% van het blad geel kleurde; een '2' wanneer meer dan 50% van het blad geel kleurde; een '3' wanneer heel het blad geel kleurde en een '4' wanneer het blad dood was. De scores van de planten worden weergegeven in een gestapeld diagram in Figuur 30. De plantziekte index (PDI) werd vervolgens bepaald met Formule 7. Op deze PDI-waarden werd statistiek toegepast met het programma SPSS. Er werd gebruik gemaakt van de Kruskal-Wallis test en de Mann-Whitney-U-test. De p-waarde van de Kruskal-Wallis Test bedroeg 0,005 waardoor de nulhypothese verworpen werd. De behandelingen zijn dus niet allemaal gelijk. De p-waarden van de Mann-Whitney Testen tussen alle behandelingen worden weergegeven in Tabel B13. Hierbij zijn *P. protegens* CHA0 en orfamide mutant beiden significant verschillend van de negatieve controle met $p=0,008$ op het 5% significantieniveau. Het wild type van *Pseudomonas* sp. CMR5c is significant verschillend van de negatieve controle op het 5% significantieniveau aangezien de p-waarde eveneens 0,008 bedraagt. *Pseudomonas* sp. CMR5c orfamide mutant is echter net niet significant verschillend op significantieniveau 5% aangezien p-waarde 0,056 bedraagt. Zowel het wild type als de mutanten van *P.*

protegens CHA0 en *Pseudomonas* sp. CMR5c zijn niet significant verschillend van de positieve controle. De PDI-waarden worden grafisch weergegeven in Figuur 31.



Figuur 30. Ziekte evaluatie met stapeldiagram van de bladscores van *P. protegens* CHA0 en *Pseudomonas* sp. CMR5c en orfamide mutanten.



Figuur 31. Plantziekte index (PDI) diagram van *P. protegens* CHA0 en *Pseudomonas* sp. CMR5c en orfamide mutanten. Behandeling met dezelfde letter zijn niet significant verschillend op het 5% significantieniveau volgens de Mann-Whitney Test.

Vervolgens werd een kwantificatie uitgevoerd van de bacteriën op de wortels van de cocoyamplant. De meeste wortels waren echter weggerot door de aantasting van *P. myriotylum* waardoor ook geen statistiek kon worden toegepast. Van de weinige wortels die overbleven worden de resultaten weergegeven in Tabel 16. Deze tabel geeft het gewicht van de overgebleven wortels en de gemiddelde $\log_{10}$ waarde van het aantal CFU op de wortels. Zowel bij *P. protegens* CHA0 als bij *Pseudomonas* sp. CMR5c is de $\log_{10}$ van het aantal CFU op de wortels redelijk hoog en is er niet veel verschil tussen het wild type en de orfamide mutant. De standaardafwijkingen bij de $\log_{10}$ van de CFU zijn wel hoog, waardoor deze $\log_{10}$ waarde dus minder betrouwbaar zijn.

Tabel 16. Kwantificatie van *P. protegens* CHA0 en *Pseudomonas* sp. CMR5c op de wortels van de cocoyamplant. Het plantnummer van de plant waarvan de wortels nog niet waren weggerot wordt meegegeven samen met het gewicht van de wortels en de $\log_{10}$ van het aantal bacteriën aanwezig op de wortels. $\mu \log_{10}$, gemiddelde $\log_{10}$ van de twee platen; $\sigma \log_{10}$, standaardafwijking; %RSD, relatieve standaardafwijking.

Behandeling	Plantnr.	Gewicht wortels (g)	$\mu \log_{10}$ (CFU/g)	$\sigma \log_{10}$ (CFU/g)	%RSD
CHA0	2	0,02	9,81	0,00	0,000
CHA0- Δ orf	4	0,07	8,89	0,62	0,069
CHA0- Δ orf	5	0,04			
CMR5c	2	0,01	9,97	0,24	0,023
CMR5c- Δ orf	4	0,04	9,49	0,02	0,002

5.4.2 Discussie

De activiteit van orfamide werd reeds eerder bestudeerd en blijkt geschikt voor tal van toepassingen. Orfamide kan namelijk zoösporen immobiel maken; zorgt voor groeionderdrukking van het mycelium van de schimmel *Rhizoctonia solani* op boon en kool; kan biocontrole activiteit uitoefenen op cocoyamwortels door *Pythium myriotylum* te onderdrukken en vertoont insecticide activiteit tegen de groene perzikluise (D'aes et al., 2011; Gross et al., 2007; Jang et al., 2013; Ma et al., 2016; Olorunleke et al., 2014; Perneel et al., 2007).

In vitro inhibitie experiment

Om na te gaan of orfamide, aangemaakt door *P. protegens* CHA0 en *Pseudomonas* sp. CMR5c, de groei van *Pythium myriotylum* kan inhiberen, wordt eerst een *in vitro* experiment uitgevoerd om snel een eerste beeld te krijgen. Hierbij bevat *P. protegens* CHA0 het *nodT* gen in de biosynthesecuster van orfamide terwijl *Pseudomonas* sp. CMR5c dit gen niet bevat (Ma et al., 2016). Het is reeds bekend dat *P. protegens* CHA0 een breed spectrum van bioactieve metabolieten aanmaakt waaronder 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG), pyrrolnitrin (PRN), waterstof cyanide (HCN), pyoluteorin (PLT), indool-3-azijnzuur, salicylzuur en pyochelin. Deze stam heeft dan ook een grote potentiële biocontrole activiteit. Zo onderdrukt *P. protegens* CHA0 onder andere zwarte wortelrot op de tabaksplant veroorzaakt door *Thielaviopsis basicola* door de aanmaak van DAPG en HCN (Keel et al., 1992; Stutz et al., 1986; Voisard et al., 1994). Ook wortelrot op de tomaatplant veroorzaakt door *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* wordt onderdrukt door de aanmaak van DAPG (Duffy and Défago, 1997). Kiemplantziekte op de komkommer veroorzaakt door *Pythium ultimum* wordt dan weer onderdrukt door de aanmaak van PLT (Maurhofer et al., 1992). Tarwehalmdoder ziekte op tarwe veroorzaakt door *Gaeumannomyces graminis* variatie *tritici* wordt voornamelijk onderdrukt door de productie van DAPG (Keel et al., 1992). *Pseudomonas* sp. CMR5c kan eveneens verschillende bioactieve metabolieten aanmaken zoals PRN,

HCN, PLT, phenazine-1-carboxylaat en phenazine-1-carboxamide. Deze metabolieten kunnen ziekten veroorzaakt door *Pythium* species onderdrukken (Anjaiah et al., 1998; Maurhofer et al., 1992; Thomashow and Weller, 1988). Beide stammen maken dus buiten orfamide nog een tal van andere bioactieve metabolieten aan. Het is dan ook niet verbazend dat resultaten van een *in vitro* inhibitie test met *P. protegens* CHA0 en *Pseudomonas* sp. CMR5c aantonen dat *P. myriotylum* wordt onderdrukt (Tabel 15). Deze resultaten voor *Pseudomonas* sp. CMR5c werden reeds gesuggereerd aangezien *Pseudomonas* sp. CMR12a eveneens biocontrole activiteit bevat tegen *P. myriotylum* op cocoyamwortels (Perneel et al., 2007). Wat echter interessant is om waar te nemen is dat in *P. protegens* CHA0 wanneer orfamide niet wordt geproduceerd nog steeds inhibitie van *P. myriotylum* optreedt. Er is zelfs geen significant verschil op te merken in inhibitie tussen het wild type en de orfamide mutant. Dit is te verklaren door de grote hoeveelheid bioactieve metabolieten die *P. protegens* CHA0 aanmaakt. Deze metabolieten zijn waarschijnlijk mede verantwoordelijk voor de biocontrole activiteit van *P. myriotylum* terwijl orfamide hierin een niet al te grote rol blijkt te spelen. Andere resultaten worden waargenomen bij *Pseudomonas* sp. CMR5c waar de orfamide mutant de *P. myriotylum* significant minder kan onderdrukken. Dit komt waarschijnlijk doordat *Pseudomonas* sp. CMR5c minder bioactieve metabolieten aanmaakt dan *P. protegens* CHA0 waardoor orfamide één van de grotere spelers is in het inhiberen van *P. myriotylum*. Deze resultaten zijn terug te vinden voor zowel het experiment waar enkel de cellen werden gebruikt als het experiment waar enkel het supernatans werd gebruikt. Wanneer de intacte cellen werden gebruikt kunnen deze reproduceren en secundaire metabolieten aanmaken. Wanneer het supernatans werd gebruikt bevat dit enkel de reeds aangemaakte en gesecreteerde metabolieten. Om te zien of er een verschil was in inhibitie van *P. myriotylum* tussen de metabolieten in de cel en de reeds gesecreteerde metabolieten werden beide experimenten met elkaar vergeleken (Tabel B12). Hierbij vertoonde het wild type van *P. protegens* CHA0 een significant verschil terwijl de orfamide mutant geen verschil toonde. De metabolieten in de cellen inhiberen dus minder de *P. myriotylum* dan de reeds gesecreteerde metabolieten. Bij *Pseudomonas* sp. CMR5c toonden zowel het wild type als de orfamide mutant een significant verschil tussen de cellen en het supernatans. Ook hier inhiberen de metabolieten in de cellen de *P. myriotylum* minder dan de reeds gesecreteerde metabolieten.

***In planta* inhibitie experiment**

In een cocoyam plant experiment met *P. protegens* CHA0 en *Pseudomonas* sp. CMR5c trad significant inhibitie op van *P. myriotylum* in vergelijking met de negatieve controle die geen bacterie behandeling kreeg (Figuren 30 en 31). Er werd geen significant verschil waargenomen tussen het wild type en de orfamide mutant in zowel *P. protegens* CHA0 als *Pseudomonas* sp. CMR5c. Doordat beide stammen vele bioactieve metabolieten aanmaken kunnen ze *P. myriotylum* goed onderdrukken maar is de invloed van orfamide op deze inhibitie miniem. Het valt wel op dat *P. protegens* CHA0 de *P. myriotylum* meer kan inhiberen dan *Pseudomonas* sp. CMR5c ook al is het verschil niet significant. *Pseudomonas* sp. CMR5c maakt minder bioactieve metabolieten aan waardoor hogere inhibitie verklaard zou kunnen worden. Door de bacteriën te kwantificeren die zich op de wortels bevinden kon een $\log_{10}$ CFU/g wortel bepaald worden (Tabel 16). Doordat de meeste wortels weggerot waren konden maar een paar wortels gebruikt worden voor de CFU/g wortel bepaling en zijn de $\log_{10}$ waarden niet representatief. Toch geeft het een idee doordat de $\log_{10}$ waarden zo hoog zijn. Voor *P. protegens* CHA0 ligt de $\log_{10}$ namelijk tussen 8 en 10 CFU/g wortel. Deze waarden zijn veel hoger dan de reeds beschreven $\log_{10}$ waarden in de literatuur. Wanneer fluorescente *Pseudomonas* die DAPG aanmaken op boon (*Phaseolus vulgaris*) worden

gebruikt, wordt een $\log_{10}$ van 7,4 bekomen. Op linze (*Lens culinaris*), lupine (*Lupinus*) en erwt (*Pisum sativum*) worden respectievelijke $\log_{10}$ waarden bekomen van 5,8; 6,9 en 6,4 CFU/g wortel (De La Fuente et al., 2006). Deze waarden zijn lager dan de $\log_{10}$ waarden van *P. protegens* CHA0 op de cocoyam. Het lijkt dat wortelkolonisatie afhankelijk is van het gewas wat ook reeds eerder werd aangetoond met de fluorescente *Pseudomonas* op verschillende gewassen (De La Fuente et al., 2006). De $\log_{10}$ waarde van de orfamide mutant is lager dan die van het wild type. Door het kleine aantal populaties kon geen statistiek toegepast worden en dus geen significant verschil opgemerkt worden. Door de biosurfactants activiteit van orfamide zou toch verwacht worden dat kolonisatie van de wortels vlotter gebeurt in het wild type dat orfamide bevat dan in de orfamide mutant (D'aes et al., 2010; Raaijmakers et al., 2006). Dit kon echter niet bevestigd worden met dit experiment. De $\log_{10}$ waarden van *Pseudomonas* sp. CMR5c voor zowel het wild type als orfamide mutant lagen tussen de 9 en 10 CFU/g wortel. Deze stam maakt geen DAPG aan maar koloniseert desondanks goed de wortel. DAPG lijkt dus weinig rol te spelen in de kolonisatie van de bacteriën. Het kleine verschil waar te nemen tussen het wild type en de orfamide mutant zou ook hier te wijten kunnen zijn aan de afwezigheid van het biosurfactants orfamide (D'aes et al., 2010; Raaijmakers et al., 2006). *Pseudomonas* sp. CMR12a heeft eveneens biocontrole activiteit tegen *P. myriotylum*. Deze stam maakt namelijk fenazines en cyclische lipopeptiden aan doch geen pyrrolnitrin en pyoluteorin zoals *Pseudomonas* sp. CMR5c. Toch lijkt *Pseudomonas* sp. CMR5c geen grotere bioactiviteit te bevatten tegen *P. myriotylum* dan *Pseudomonas* sp. CMR12a. Om die reden wordt gesuggereerd dat fenazine en cyclische lipopeptiden de voornaamste oorzaak zijn van biocontrole activiteit en niet pyrrolnitrin en pyoluteorin (Perneel et al., 2007). Ook zouden de CLP's en fenazines een synergistisch of additief effect kunnen hebben. De samenwerking tussen deze twee moleculen zou dan misschien de bioactiviteit kunnen vergroten (D'aes et al., 2010). Voorgaand onderzoek op *Pseudomonas* sp. CMR12a toonde eveneens aan dat wortelkolonisatie waarschijnlijk afhankelijk is van het gewas. *Pseudomonas* sp. CMR12a op cocoyam had immers een $\log_{10}$ rond 9 CFU/g wortel terwijl dezelfde stam op boon een $\log_{10}$ van 5 CFU/g wortel had (data nog niet gepubliceerd). De cocoyam maakt misschien exudaten aan die helpen bij de kolonisatie van de bacteriën op de wortels.

Een laatste opmerking moet gemaakt worden in verband met de p-waarden van de statistische testen. Aangezien de gemiddelden van meerdere behandelingen meervoudig met elkaar werden vergeleken is de kans groter dat twee waarden significant verschillend zijn van elkaar. Hiervoor wordt best een correctie toegepast zoals de Bonferroni correctie zodat de kans op significantie verlaagd. De Bonferroni correctie deelt het bestaande significantieniveau 0,05 door het aantal testen die werden uitgevoerd. In het geval van de *in vitro* inhibitie test zou 0,05 gedeeld moeten worden door acht wat een nieuw significantieniveau geeft van 0,00625. Enkel de p-waarden kleiner als deze waarde zouden als significant mogen beschouwd worden. Met dit nieuwe significantieniveau blijven de behandelingen met bacteriën significant verschillend van de controle. Ook is wild type *Pseudomonas* sp. CMR5c significant verschillend van de orfamide mutant, zowel indien het supernatans werd gebruikt als wanneer de cellen werden gebruikt. Indien de Bonferroni correctie wordt toegepast op het cocoyamplant experiment, moet 0,05 gedeeld worden door 13 wat een nieuw significantieniveau van 0,00385 geeft. Hiermee blijkt geen enkele behandeling meer significant verschillend te zijn. Er kan echter opgemerkt worden dat de Bonferroni correctie als de strengst mogelijke correctie methode wordt gezien waardoor deze vaak niet gebruikt wordt. Het bekijken van de resultaten en het interpreteren van verschillende mogelijkheden zou goed genoeg moeten zijn om een redelijke verklaring te vinden en conclusies te trekken (Perneger, 1998). Een Bonferroni correctie is in deze gevallen dus niet nodig.

5.4.3 Conclusie

Zowel *P. protegens* CHA0 als *Pseudomonas* sp. CMR5c kunnen *P. myriotylum* inhiberen in een *in vitro* experiment. De orfamide van *P. protegens* CHA0 heeft echter geen invloed op het inhiberen van *P. myriotylum* doordat dit isolaat verscheidene andere bioactieve metabolieten aanmaakt. De orfamide van *Pseudomonas* sp. CMR5c heeft wel een significant effect in het inhiberen van *P. myriotylum*. Het maakt eveneens andere bioactieve metabolieten aan maar minder verschillende als *P. protegens* CHA0. In een *in planta* experiment op cocoyam hebben zowel het wild type als de orfamide mutant van *P. protegens* CHA0 en *Pseudomonas* sp. CMR5c een significant effect op de inhibitie van *P. myriotylum*. Deze inhibitie is echter eveneens onafhankelijk van de aanmaak van orfamide doordat andere bioactieve metabolieten een grotere rol spelen in de inhibitie van *P. myriotylum*. De orfamide lijkt wel een rol te spelen in wortelkolonisatie. Dit is tevens ook afhankelijk van het soort gewas aangezien cocoyamwortels een hoger aantal CFU bevatten. De cocoyam zou exudaten kunnen aanmaken die de bacteriën helpen de wortels te koloniseren.

6. Algemene conclusies

Cyclische lipopeptiden zijn een type biosurfactants die door tal van plantgeassocieerde *Pseudomonas* species worden aangemaakt. Dit onderzoek focust zich op de biosynthese, regulatie, secretie en bioactiviteit van het CLP orfamide door een aantal *Pseudomonas protegens* stammen en enkele nauw verwante stammen.

De aanmaak van orfamide in *P. protegens* Pf-5, *Pseudomonas* sp. CMR12a en CMR5c werd in dit onderzoek bevestigd. In *Pseudomonas* sp. CMR5c kon enkel de aanmaak van orfamide B, D, E en G worden aangetoond en niet de aanmaak van orfamide F daar de piek in HPLC-MS-analyse te klein was. Nu blijkt dat de transcriptie van de biosynthesegenen tijdsafhankelijk is in *Pseudomonas* sp. CMR12a en *P. protegens* Pf-5 en dat de orfamide biosynthese transcripten verschillen van stam tot stam. Beiden hebben waarschijnlijk te maken met de activiteit van de promotors. Dit wijst erop dat elke stam zijn eigen systeem heeft voor de aanmaak van orfamide en dat bepaalde factoren de ene stam meer kunnen beïnvloeden dan andere. Welke factoren deze precies zijn is nog niet geweten.

De *luxUp* en *luxDown* regulator genen spelen in *Pseudomonas* sp. CMR12a en CMR5c een rol in het reguleren van de orfamide daar *luxUp* en *luxDown* mutanten de productie van orfamide verliezen. Door de vermindering in metabolische belasting kunnen deze mutanten sneller groeien en reproducen. Deze regulatiegenen dienen tevens in *Pseudomonas* sp. CMR5c waarschijnlijk als transcriptionele repressors van *macB* ook al worden *macA* en *macB* door andere genen gereguleerd. Ook worden aanwijzingen teruggevonden van de aanwezigheid van antisense RNA's die eveneens een rol kunnen spelen in de regulatie van genexpressie. Door te begrijpen op welke manieren orfamide gereguleerd wordt kan de aanmaak ervan verhinderd worden indien gewenst. Deze bestudeerde *Pseudomonas* species met mutanten in *luxUp* of *luxDown* groeien namelijk sneller en maken geen orfamide meer aan.

Indien orfamide wordt aangemaakt verlaat het de cel via secretiesystemen. De afwezigheid van buitenste membraanproteïnen NodT en OprM in *Pseudomonas* sp. CMR12a, en OprM en CmeC in *Pseudomonas* sp. CMR5c hebben aangetoond dat orfamide nog andere buitenste membraanproteïnen gebruiken om de cel te verlaten. Het inactiveren of afwezig zijn van bepaalde pompen zorgt ook voor de activatie van andere pompen. De combinatie van actieve en geïnactiveerde pompen beïnvloedt dan de hoeveelheid orfamide dat de cel kan verlaten. Dit hele secretiesysteem is met andere woorden veel complexer dan initieel gedacht. Het begrijpen van het secretiesysteem kan bijdragen tot het stimuleren van de secretie van orfamide indien gewenst. Aangezien orfamide biosurfactants activiteit bevat kan het de oppervlaktespanning verlagen wat kan helpen bij de beweegbaarheid van de bacterie en bij het koloniseren van de wortels van een plant welke gewenste effecten kunnen zijn.

Ook bevat orfamide biocontrole activiteit, wat van belang is voor de landbouw. *P. protegens* CHA0 en *Pseudomonas* sp. CMR5c konden beiden *P. myriotylum* inhiberen zowel *in vitro* als in de rhizosfeer van de cocoyamplant. De functie van orfamide hierin is echter te verwaarlozen daar beide stammen tal van andere bioactieve metabolieten aanmaken zoals PRN, HCN, PLT... Orfamide blijkt dus niet al te veel effect te hebben in biocontrole op de cocoyam maar eerder in het koloniseren van de wortels. De functie van orfamide blijkt te liggen in het helpen van andere metabolieten om de plant te bereiken.

7. Ideeën voor verder onderzoek

Pseudomonas species zijn reeds wel bestudeerde bacteriën maar zijn door hun diversiteit nog lang niet voldoende uitgepluisd. De orfamide producerende bacteriën worden nog maar recent onderzocht naar hun aanmaak van orfamide en de invloed ervan als biocontrole agentia.

Dat *luxUp* en *luxDown* zorgen voor het verlies van orfamide productie is in dit onderzoek bevestigd. Het zou echter interessant zijn een dubbele mutant in *luxUp* en *luxDown* te maken in *Pseudomonas* sp. CMR12a en CMR5c om de invloed van de regulatiegenen op de secretiegenen verder te bestuderen via qPCR-analyse. Ook interessant zou zijn te weten welke genen instaan voor de regulatie van de secretiegenen zelf. Om na te gaan of deze onder invloed staan van quorum sensing (QS) zouden de QS-siginaalmoleculen geblokkeerd kunnen worden. Andere systemen zouden ook een rol kunnen spelen zoals het GacS/GacA twee componentensysteem of heat shock proteïnen. In *P. protegens* Pf-5 worden best de *luxUp* en *luxDown* mutant aangemaakt alsook meteen de dubbelmutant. Via swarmingtesten kan snel nagegaan worden of de aanmaak van orfamide in *P. protegens* Pf-5 eveneens onder de regulatie staat van deze genen. Een qPCR-analyse kan de invloed van deze genen op de secretiegenen bestuderen. Ook kunnen de stammen onderling vergeleken worden.

Het meeste onderzoek is nodig in verband met het secretiesysteem aangezien dit systeem veel complexer in elkaar zit dan initieel gedacht. Allereerst kunnen genen in *Pseudomonas* sp. CMR12a en CMR5c via bio-informatica worden gevonden die homologie vertonen met de genen in *P. aeruginosa* die instaan voor secretie. Niet alleen binnenste membraanproteïnen maar ook buitenste en periplasmaproteïnen. Door mutanten te maken in deze homologe genen en hiermee swarmingtesten uit te voeren kan te weten gekomen worden of orfamide nog steeds de cel kan verlaten en welke genen hiervoor precies verantwoordelijk zijn. Hiervoor zullen ook meerdere mutaties moeten aangemaakt worden in één bacterie. Ook mutanten in *macA* en *macB* zouden moeten worden aangemaakt om na te gaan of andere systemen orfamide voorbij het binnenste celmembraan kan brengen. Het is voornamelijk interessant dit onderzoek te starten in *Pseudomonas* sp. CMR5c aangezien deze geen sessiline aanmaakt wat wel het geval is in *Pseudomonas* sp. CMR12a. Verder kan het secretiesysteem in *P. protegens* Pf-5 onderzocht worden om verschillen in de drie isolaten waar te kunnen nemen.

De activiteit van orfamide lijkt miniem bij te dragen aan biocontrole maar is dan misschien wel belangrijk voor andere factoren zoals beweegbaarheid in de bodem en wortelkolonisatie. Om dit na te gaan zouden orfamide mutanten moeten worden aangemaakt in bovengenoemde isolaten en onderzocht worden onder de microscoop in de nabijheid van plantwortels zoals cocoyam. Het is in dit opzicht ook interessant andere plantwortels te gebruiken aangezien cocoyamwortels misschien wel exudaten aanmaken die beweegbaarheid en wortelkolonisatie stimuleren. Om die reden zou best ook eens gescreend worden op mogelijk exudaten zodat, indien aanwezig, hun invloed bestudeerd kan worden.

Indien deze onderzoeken niet te tijdrovend zijn en nuttige informatie bijdragen zou het ook interessant zijn de testen uit te voeren op alle andere orfamide producerende *Pseudomonas* species om na te gaan welke verschillen optreden tussen de isolaten en welke factoren waar van belang zijn.

8. Bronnen

- Anjaiah V, Koedam N, Nowak-thompson B, Loper JE, Höfte M, Tambong JT, Cornelis P. 1998. Involvement of phenazines and anthranilate in the antagonism of *Pseudomonas aeruginosa* PNA1 and Tn5 derivatives toward *Fusarium* spp. and *Pythium* spp. *Am. Phytopathol. Soc.* **11**:847–854.
- Pseudomonas* Genome Database. 2014. . <http://www.pseudomonas.com/strain/show?id=2466>.
- Bender CL, Alarcón-Chaidez F, Gross DC. 1999. *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**:266–292.
- Berti AD, Greve NJ, Christensen QH, Thomas MG. 2007. Identification of a biosynthetic gene cluster and the six associated lipopeptides involved in swarming motility of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *J. Bacteriol.* **189**:6312–6323. <http://jb.asm.org/cgi/doi/10.1128/JB.00725-07>.
- von Bodman SB, Majerczak DR, Coplin DL. 1998. A negative regulator mediates quorum-sensing control of exopolysaccharide production in *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**:7687–7692.
- Botelho GR, Mendonça-Hagler LC. 2006. Fluorescent *Pseudomonads* associated with the rhizosphere of crops - An overview. *Brazilian J. Microbiol.* **37**:401–416.
- Van Den Broek D, Bloemberg G V., Lugtenberg B. 2005. The role of phenotypic variation in rhizosphere *Pseudomonas* bacteria. *Environ. Microbiol.* **7**:1686–1697.
- Brooun A, Tomashek JJ, Lewis K. 1999. Purification and ligand binding of EmrR , a regulator of a multidrug transporter. *J. Bacteriol.* **181**:5131–5133.
- de Bruijn I, de Kock MJD, de Waard P, van Beek T a., Raaijmakers JM. 2008. Massetolide A biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens*. *J. Bacteriol.* **190**:2777–2789.
- de Bruijn I, Raaijmakers JM. 2009a. Diversity and functional analysis of LuxR-type transcriptional regulators of cyclic lipopeptide biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**:4753–4761.
- de Bruijn I, Raaijmakers JM. 2009b. Regulation of cyclic lipopeptide biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens* by the ClpP Protease. *J. Bacteriol.* **191**:1910–1923.
- de Bruijn I, de Kock MJD, Yang M, de Waard P, van Beek T a., Raaijmakers JM. 2007. Genome-based discovery, structure prediction and functional analysis of cyclic lipopeptide antibiotics in *Pseudomonas* species. *Mol. Microbiol.* **63**:417–428.
- Campbell R. 1989. Biological control of microbial plant pathogens. Cambridge University Press 218 p.
- Caswell CC, Gaines JM, Roop RM. 2012. The RNA chaperone Hfq independently coordinates expression of the VirB type IV secretion system and the LuxR-type regulator BabR in *Brucella abortus* 2308. *J. Bacteriol.* **194**:3–14.
- Chin-A-Woeng TFC, Bloemberg G V., Lugtenberg BJJ. 2003. Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria. *New Phytol.* **157**:503–523.
- Cho H, Kang H. 2012. The PseEF efflux system is a virulence factor of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*.

- J. Microbiol.* **50**:79–90.
- Costa TRD, Felisberto-Rodrigues C, Meir A, Prevost MS, Redzej A, Trokter M, Waksman G. 2015. Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**:343–359. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3456>.
- Cui X, Harling R, Mutch P, Darling D. 2005. Identification of N-3-hydroxyoctanoyl-homoserine lactone production in *Pseudomonas fluorescens* 5064, pathogenic to broccoli, and controlling biosurfactant production by quorum sensing. *Eur. J. Plant Pathol.* **111**:297–308.
- D'aes J, Hua Hoang KG, De Maeyer K, Pannecouque J, Forrez I, Ongena M, Dietrich LEP, Thomashow LS, Mavrodi D V., Höfte M. 2011. Biological control of *Rhizoctonia* root rot on bean by phenazine- and cyclic lipopeptide-producing *Pseudomonas* CMR12a. *Am. Phytopathol. Soc.* **101**:996–1004.
- D'aes J, Kieu NP, Léclère V, Tokarski C, Olorunleke FE, De Maeyer K, Jacques P, Höfte M, Ongena M. 2014. To settle or to move? The interplay between two classes of cyclic lipopeptides in the biocontrol strain *Pseudomonas* CMR12a. *Environ. Microbiol.* **16**:2282–2300.
- D'aes J, De Maeyer K, Pauwelyn E, Höfte M. 2010. Biosurfactants in plant-*Pseudomonas* interactions and their importance to biocontrol. *Environ. Microbiol. Rep.* **2**:359–372.
- Daugelavicius R, Buivydas A, Sencilo A, Bamford DH. 2010. Assessment of the activity of RND-type multidrug efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* using tetraphenylphosphonium ions. *Int. J. Antimicrob. Agents* **36**:234–238.
- Daury L, Orange F, Taveau J, Verchère A. 2016. Tripartite assembly of RND multidrug efflux pumps. *Nat. Commun.* **7**:1–30.
- Dubern JF, Coppoolse ER, Stiekema WJ, Bloemberg G V. 2008. Genetic and functional characterization of the gene cluster directing the biosynthesis of putisolvin I and II in *Pseudomonas putida* strain PCL1445. *Microbiology* **154**:2070–2083.
- Dubern JF, Lugtenberg BJJ, Bloemberg G V. 2006. The *ppul-rsaL-ppuR* quorum-sensing system regulates biofilm formation of *Pseudomonas putida* PCL1445 by controlling biosynthesis of the cyclic lipopeptides putisolvins I and II. *J. Bacteriol.* **188**:2898–2906.
- Dubern J-F, Lagendijk EL, Lugtenberg BJJ, Bloemberg G V. 2005. The heat shock genes *dnaK*, *dnaJ*, and *grpE* are involved in regulation of putisolvin biosynthesis in *Pseudomonas putida* PCL1445. *J. Bacteriol.* **187**:5967–5976.
- Duffy BK, Défago G. 1997. Zinc improves biocontrol of *Fusarium* crown and root rot of tomato by *Pseudomonas fluorescens* and represses the production of pathogen metabolites inhibitory to bacterial antibiotic biosynthesis. *Phytopathology* **87**:1250–1257.
- Egland KA, Greenberg EP. 2000. Conversion of the *Vibrio fischeri* transcriptional activator, LuxR, to a repressor. *J. Bacteriol.* **182**:805–811.
- Evans K, Poole K. 1999. The MexA-MexB-OprM multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa* is growth-phase regulated. *FEMS Microbiol. Lett.* **173**:35–39.
- Finking R, Marahiel M a. 2004. Biosynthesis of Nonribosomal Peptides. *Annu. Rev. Microbiol.* **58**:453–488.
- Fogliano V, Ballio A, Gallo M, Woo S, Scala F, Lorito M. 2002. *Pseudomonas* lipodepsipeptides and fungal

- cell wall-degrading enzymes act synergistically in biological control. *Mol. plant-microbe Interact.* **15**:323–333.
- Fuqua C, Greenberg EP. 1998. Self perception in bacteria: quorum sensing with acylated homoserine lactones. *Curr. Opin. Microbiol.* **1**:183–189.
- Gardener BBM. 2007. Diversity and ecology of biocontrol *Pseudomonas* spp. in agricultural systems. *Am. Phytopathol. Soc.* **97**:221–226.
- Garrido-Sanz D, Meier-Kolthoff JP, Göker M, Martín M, Rivilla R, Redondo-Nieto M. 2016. Genomic and genetic diversity within the *Pseudomonas fluorescens* complex. *PLoS One* **11**:1–30.
- Golstein PE, Boom A, Van Geffel J, Jacobs P, Masereel B, Beauwens R. 1999. P-glycoprotein inhibition by glibenclamide and related compounds. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* **437**:652–660.
- Gomila M, Pena A, Mulet M, Lalucat J, Garcia-Valdes E. 2015. Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas*. *Front. Microbiol.* **6**:1–13.
- Grewal SI, Han B, Johnstone K. 1995. Identification and characterization of a locus which regulates multiple functions in *Pseudomonas tolaasii*, the cause of brown blotch disease of *Agaricus bisporus*. *J. Bacteriol.* **177**:4658–68.
- Gross DC. 1985. Regulation of syringomycin synthesis in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and defined conditions for its production. *J. Appl. Bacteriol.* **58**:167–74.
- Gross H, Loper JE. 2009. Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp. *Nat. Prod. Rep.* **26**:1408–1446.
- Gross H, Stockwell VO, Henkels MD, Nowak-Thompson B, Loper JE, Gerwick WH. 2007. The genomisotopic approach: a systematic method to isolate products of orphan biosynthetic gene clusters. *Chem. Biol.* **14**:53–63.
- Hamley IW. 2015. Lipopeptides: from self-assembly to bioactivity. *Chem. Commun.* **51**:8574–8583.
- Heeb S, Haas D. 2001. Regulatory roles of the GacS / GacA two-component system in plant-associated and other gram-negative bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**:1351–1363.
- Höfte M, Altier N. 2010. Fluorescent pseudomonads as biocontrol agents for sustainable agricultural systems. *Res. Microbiol.* **161**:464–471.
- Horio M, Gottesman MM, Pastan I. 1988. ATP-dependent transport of vinblastine in vesicles from human multidrug-resistant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**:3580–3584.
- Howell CR, Stipanovic RD. 1979. Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium. *Phytopathology* **69**:480–482.
- Hrabak EM, Willis DK. 1992. The *lemA* gene required for pathogenicity of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on bean is a member of a family of two-component regulators. *J. Bacteriol.* **174**:3011–3020.
- Hua GKH, Höfte M. 2015. The involvement of phenazines and cyclic lipopeptide sessilin in biocontrol of *Rhizoctonia* root rot on bean (*Phaseolus vulgaris*) by *Pseudomonas* sp. CMR12a is influenced by substrate composition. *Plant Soil* **388**:243–253.
- Jang JY, Yang SY, Kim YC, Lee CW, Park MS, Kim JC, Kim IS. 2013. Identification of orfamide A as an

- insecticidal metabolite produced by *Pseudomonas protegens* F6. *J. Agric. Food Chem.* **61**:6786–6791.
- Keel C, Schnider U, Maurhofer M, Voisard C, Laville J, Burger U, Wirthner P, Haas D, Defago G. 1992. Suppression of root disease by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: importance of the bacterial secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol. *Mol. Plant-Microbe Interact.* <Go to ISI>://A1992GZ72200001.
- Kinscherf TG, Willis DK. 2002. Global regulation by *gidA* in *Pseudomonas syringae*. *J. Bacteriol.* **184**:2281–6.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=134964&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Kitten T, Kinscherf TG, McEvoy JL, Willis DK. 1998. A newly identified regulator is required for virulence and toxin production in *Pseudomonas syringae*. *Mol. Microbiol.* **28**:917–929.
- Kobayashi N, Nishino K, Yamaguchi A. 2001. Novel macrolide-specific ABC-type efflux transporter in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183**:5639–5644.
- Koch B, Nielsen TH, Sorensen D, Andersen JB, Christophersen C, Molin S, Givskov M, Sorensen J, Nybroe O. 2002. Lipopeptide production in *Pseudomonas* sp. strain DSS73 is regulated by components of sugar beet seed exudate via the Gac two-component regulatory system. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:4509–4516.
- Kourtesi C, Ball AR, Huang Y, Jachak SM, Vera DM a, Khondkar P, Gibbons S, Hamblin MR, Tegos GP. 2013. Microbial efflux systems and inhibitors: approaches to drug discovery and the challenge of clinical implementation. *Open Microbiol. J.* **7**:34–52.
- De La Fuente L, Landa BB, Weller DM. 2006. Host crop affects rhizosphere colonization and competitiveness of 2,4-Diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology* **96**:751–62. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18943149>.
- De Leij FAAM, Thomas CE, Bailey MJ, Whipps JM, Lynch JM. 1998. Effect of insertion site and metabolic load on the environmental fitness of a genetically modified *Pseudomonas fluorescens* isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:2634–2638.
- Li J, Zhang Y. 2014. Relationship between promoter sequence and its strength in gene expression. *Eur. Phys. J. E* **37**:1–6.
- Li W, Rokni-Zadeh H, De Vleeschouwer M, Ghequire MGK, Sinnaeve D, Xie G-L, Rozenski J, Madder A, Martins JC, De Mot R. 2013. The antimicrobial compound xantholysin defines a new group of *Pseudomonas* cyclic lipopeptides. *PLoS One* **8**:1–16.
- Li XZ, Nikaido H, Poole K. 1995. Role of *mexA-mexB-oprM* in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:1948–1953.
- Lim SP, Roongsawang N, Washio K, Morikawa M. 2009. Flexible exportation mechanisms of arthrofactin in *Pseudomonas* sp. MIS38. *J. Appl. Microbiol.* **107**:157–166.
- Lindow SE, Brandl MT. 2003. Microbiology of the phyllosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:1875–1883.
- Lu S-E, Doule JD, Gross D. 2003. Characterization of the *argA* gene required for arginine biosynthesis and syringomycin production by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Appl. Environ. Microbiol.*

69:7272–7280.

- Lu S-E, Scholz-Schroeder BK, Gross DC. 2002a. Characterization of the *salA*, *syrF*, and *syrG* regulatory genes located at the right border of the syringomycin gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **15**:43–53.
- Lu S-E, Scholz-Schroeder BK, Gross DC. 2002b. Characterization of the *salA*, *syrF*, and *syrG* regulatory genes located at the right border of the syringomycin gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **15**:43–53.
- Ludwig-Müller J. 2015. Plants and endophytes: equal partners in secondary metabolite production? *Biotechnol. Lett.* **27**:1325–1334.
- Ma Z, Geudens N, Kieu NP, Sinnaeve D, Ongena M, Höfte M. 2016. Biosynthesis, chemical structure and structure-activity relationship of orfamide lipopeptides produced by *Pseudomonas protegens* and related species. *Front. Microbiol.*:1–24.
- De Maeyer K, D’aes J, Hua GKH, Perneel M, Vanhaecke L, Noppe H, Hofte M. 2011. N-Acylhomoserine lactone quorum-sensing signalling in antagonistic phenazine-producing *Pseudomonas* isolates from the red cocoyam rhizosphere. *Microbiology* **157**:459–472.
- Marahiel M a, Stachelhaus T, Mootz HD. 1997. Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. *Chem. Rev.* **97**:2651–2674. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11851476>.
- Marquez B. 2005. Bacterial efflux systems and efflux pumps inhibitors. *Biochimie* **87**:1137–1147.
- Maurhofer M, Keel C, Schnider U, Voisard C, Haas D, Defago G. 1992. Influence of enhanced antibiotic production in *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 on its disease suppressive capacity. *Phytopathology*.
- Mazzola M, de Bruijn I, Cohen MF, Raaijmakers JM. 2009. Protozoan-induced regulation of cyclic lipopeptide biosynthesis is an effective predation defense mechanism for *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**:6804–6811.
- McSpadden Gardener BB, Gutierrez LJ, Joshi R, Edema R, Lutton E. 2005. Distribution and biocontrol potential of *phlD*+ *Pseudomonads* in Corn and Soybean fields. *Phytopathology* **95**:715–724.
- Mnif I, Ghribi D. 2015. Lipopeptides biosurfactants: mean classes and new insights for industrial, biomedical, and environmental applications. *Biopolymers* **104**:129–147.
- Mulet M, Lalucat J, García-Valdés E. 2010. DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. *Environ. Microbiol.* **12**:1513–1530.
- “Multiple Primer Analyser.” Multiple Primer Analyzer. <https://www.thermofisher.com/be/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/multiple-primer-analyzer.html>.
- “NCBI.” National Center for Biotechnology Information. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- Neidig N, Paul RJ, Scheu S, Jousset A. 2011. Secondary metabolites of *Pseudomonas fluorescens* CHA0 drive complex non-trophic interactions with bacterivorous nematodes. *Microb. Ecol.* **61**:853–859.
- Neu TR. 1996. Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Microbiol. Rev.* **60**:151–166.

- Nielsen MN, Sørensen J, Fels J, Pedersen HC. 1998. Secondary metabolite- and endochitinase-dependent antagonism toward plant-pathogenic microfungi of *Pseudomonas fluorescens* isolates from sugar beet rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:3563–3569.
- Nielsen TH, Thrane C, Christophersen C, Anthoni U, Sørensen J. 2000. Structure, production characteristics and fungal antagonism of tensin - a new antifungal cyclic lipopeptide from *Pseudomonas fluorescens* strain 96.578. *J. Appl. Microbiol.* **89**:992–1001.
- Nielsen TH, Christophersen C, Anthoni U, Sørensen J. 1999. Viscosinamide, a new cyclic depsipeptide with surfactant and antifungal properties produced by *Pseudomonas fluorescens* DR54. *J. Appl. Microbiol.* **86**:80–90.
- Nielsen TH, Sørensen D, Tobiasen C, Andersen JB, Christophersen C, Givskov M, Sørensen J. 2002. Antibiotic and biosurfactant properties of cyclic lipopeptides produced by fluorescent *Pseudomonas* spp. from the sugar beet rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:3416–3423.
- Nikaido H. 1989. Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**:1831–1836.
- Lo Nostro P, Ninham BW, Lo Nostro A, Pesavento G, Fratoni L, Baglioni P. 2005. Specific ion effects on the growth rates of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Phys. Biol.* **2**:1–7.
- Olorunleke FE, Kieu NP, Höfte M. 2014. Recent advances in *Pseudomonas* biocontrol 1–27 p.
- Olorunleke F, Hua H, Kieu P, Ma Z, Höfte M. 2007. Interplay between orfamides, sessilins and phenazines in the control of *Rhizoctonia* diseases by *Pseudomonas* sp. CMR12a. *Environ. Microbiol. Environ. Microbiol. Reports*:1–25.
- Pagès JM, Masi M, Barbe J. 2005. Inhibitors of efflux pumps in Gram-negative bacteria. *Trends Mol. Med.* **11**:382–389.
- Perneel M, Heyrman J, Adiobo A, De Maeyer K, Raaijmakers JM, De Vos P, Höfte M. 2007. Characterization of CMR5c and CMR12a, novel fluorescent *Pseudomonas* strains from the cocoyam rhizosphere with biocontrol activity. *J. Appl. Microbiol.*:1–14.
- Perneel M, Tambong JT, Adiobo A, Floren C, Saborio F, Levesque A, Höfte M. 2006. Intraspecific variability of *Pythium myriotylum* isolated from cocoyam and other host crops. *Mycol. Res.* **110**:583–593.
- Perneger T V. 1998. What's wrong with Bonferroni adjustments. *Educ. debate* **316**:1236–1238.
- “Primer3.” Primer3. <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>. Bron geraadpleegd op 03/11/2015 & 22/02/2016.
- Raaijmakers JM, de Bruijn I, de Kock MJD. 2006. Cyclic lipopeptide production by plant-associated *Pseudomonas* spp.: diversity, activity, biosynthesis, and regulation. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **19**:699–710.
- Rich JJ, Kinscherf TG, Kitten T, Willis DK. 1994. Genetic evidence that the *gacA* gene encodes the cognate response regulator for the *lemA* sensor in *Pseudomonas syringae*. *J. Bacteriol.* **176**:7468–7475.
- Rodrigues L, Banat IM, Teixeira J, Oliveira R. 2006. Biosurfactants: potential applications in medicine. *J. Antimicrob. Chemother.* **57**:609–618.
- Ron EZ, Rosenberg E. 2001. Natural roles of biosurfactants. *Environ. Microbiol.* **3**:229–236.

- Roongsawang N, Hase K, Haruki M, Imanaka T, Morikawa M, Kanaya S. 2003. Cloning and characterization of the gene cluster encoding arthrofactin synthetase from *Pseudomonas* sp. MIS38. *Chem. Biol.* **10**:869–980.
- Roongsawang N, Washio K, Morikawa M. 2011. Diversity of nonribosomal peptide synthetases involved in the biosynthesis of lipopeptide biosurfactants. *Int. J. Mol. Sci.* **12**:141–172.
- Schröder H, Langer T, Hartl FU, Bukau B. 1993. DnaK, DnaJ and GrpE form a cellular chaperone machinery capable of repairing heat-induced protein damage. *EMBO J.* **12**:4137–4144.
- Sesto N, Wurtzel O, Archambaud C, Sorek R, Cossart P. 2012. The excludon: a new concept in bacterial antisense RNA-mediated gene regulation. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**:75–82.
- Soetaert W. 2014. Cursus Industriële biotechnologie UGent. In: . *Ind. Biotechnol.*, pp. 1–100.
- Song C, Aundy K, van de Mortel J, Raaijmakers JM. 2014. Discovery of new regulatory genes of lipopeptide biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens*. *FEMS Microbiol. Lett.* **356**:166–75.
- Song C, Sundqvist G, Malm E, de Bruijn I, Kumar A, van de Mortel J, Bulone V, Raaijmakers JM. 2015. Lipopeptide biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens* is regulated by the protease complex ClpAP. *BMC Microbiol.* **15**:367.
- Stutz EW, Défago G, Kern H. 1986. Naturally occurring fluorescent Pseudomonads involved in suppression of black root rot of Tobacco. *Phytopathology* **76**:181.
- Sun J, Deng Z, Yan A. 2014. Bacterial multidrug efflux pumps: mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **453**:254–267.
- Sung-Chyr L. 1996. Biosurfactants: recent advances. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **66**:109–120.
- Takeuchi K, Noda N, Someya N. 2014. Complete genome sequence of the biocontrol strain *Pseudomonas protegens* Cab57 discovered in Japan reveals strain-specific diversity of this species. *PLoS One* **9**:1–13.
- Tambong JT, Höfte M. 2001. Phenazines are involved in biocontrol of *Pythium myriotylum* on cocoyam by *Pseudomonas aeruginosa* PNA1. *Eur. J. Plant Pathol.* **107**:511–521.
- Tambong JT, Poppe J, Höfte M. 1999. Pathogenicity, electrophoretic characterisation and *in planta* detection of the cocoyam root rot disease pathogen, *Pythium myriotylum*. *Eur. J. Plant Pathol.* **105**:597–607.
- Thomashow LS, Weller DM. 1988. Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *J. Bacteriol.* **170**:3499–3508.
- Tran H, Kruijt M, Raaijmakers JM. 2007. Diversity and activity of biosurfactant-producing *Pseudomonas* in the rhizosphere of black pepper in Vietnam. *J. Appl. Microbiol.* **104**:839–851.
- Trögl J, Chauhan A, Ripp S, Layton AC, Kuncová G, Sayler GS. 2012. *Pseudomonas fluorescens* HK44: lessons learned from a model whole-cell bioreporter with a broad application history. *Sensors* **12**:1544–1571.
- Troxler J, Zala M, Natsch A, Moënné-Loccoz Y, Défago G. 1997. Autecology of the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in the rhizosphere and inside roots at later stages of plant development. *FEMS Microbiol. Ecol.* **23**:119–130.

- Urbatsch IL, Sankaran B, Weber J, Senior AE. 1995. P-glycoprotein is stably inhibited by vanadate-induced trapping of nucleotide at a single catalytic site. *J. Biol. Chem.*
- Vallet-Gely I, Novikov A, Augusto L, Liehl P, Bolbach G, Péchy-Tarr M, Cosson P, Keel C, Caroff M, Lemaitre B. 2010. Association of hemolytic activity of *Pseudomonas entomophila*, a versatile soil bacterium, with cyclic lipopeptide production. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**:910–921.
- Vasconcellos RLF, Mendes R, Taketani RG, Zucchi TD, Melo IS. 2013. Draft genome sequence of *Pseudomonas* sp. strain CMAA1215, a plant growth-promoting bacterium isolated from a Brazilian Mangrove. *Genome Announc.* **1**:2164.
- Voisard C, Bull CT, Keel C, Laville J, Maurhofer M, Schnider U, Défago G, Haas D. 1994. Molecular ecology of rhizosphere microorganisms. Chapter 6: Biocontrol of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: current concepts and experimental approaches. Ed. F. O’Gara, D. N. Dowling, B. Boesten. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH 67-89 p.
- Wang N, Lu S-E, Records AR, Gross DC. 2006. Characterization of the transcriptional Activators SalA and SyrF, which are required for syringomycin and syringopeptin production by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *J. Bacteriol.* **188**:3290–8.
- Zhang JH, Quigley NB, Gross DC. 1997. Analysis of the *syrP* gene, which regulates syringomycin synthesis by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:2771–2778.

9. Bijlage

9.1 Tabellen

Tabel B1. Verschillende *Pseudomonas* species en bepaalde mutanten.

<i>Pseudomonas</i> soort	Karakteristiek	Bron
CMR12a	Wild type	(Perneel et al., 2007)
CMR12a- $\Delta nodT$	Mutant met deletie in <i>nodT</i>	Niet gepubliceerd
CMR12a- $\Delta oprM$	Mutant met deletie in <i>oprM</i>	Niet gepubliceerd
CMR12a- $\Delta nodT-oprM$	Dubbelmutant met deletie in <i>nodT</i> en <i>oprM</i>	Niet gepubliceerd
CMR12a-Clp1	Mutant met insertie in <i>sesA</i>	(D'aes et al., 2011)
CMR12a- ΔGI	Mutant met deletie van sessiline cluster	Niet gepubliceerd
CMR5c	Wild type	(Perneel et al., 2007)
CMR5c- $\Delta nodT$	Mutant met deletie in <i>nodT</i>	Niet gepubliceerd
CMR5c- $\Delta oprM$	Mutant met deletie in <i>oprM</i>	Niet gepubliceerd
CMR5c- $\Delta nodT-oprM$	Dubbelmutant met deletie in <i>nodT</i> en <i>oprM</i>	Niet gepubliceerd
CMR5c- $\Delta luxUp$	Mutant met deletie in <i>luxUp</i>	(Ma et al., 2016)
CMR5c- $\Delta luxDown$	Mutant met deletie in <i>luxDown</i>	(Ma et al., 2016)
CMR5c- Δofa	Mutant met deletie in orfamide cluster	Niet gepubliceerd
<i>P. protegens</i> Pf-5	Wild type	(Howell & Stipanovic, 1979)
<i>P. protegens</i> CHA0	Wild type	(Stutz et al., 1986)
<i>P. protegens</i> CHA0- Δofa	Mutant met deletie in orfamide cluster	Niet gepubliceerd
Primers (5' → 3')		
PCR - CMR5c - <i>luxUp</i>	F: GGTAGGTCTCGATGGAGCTG R: GAAATGGATGATTGCTGCT	Deze studie
PCR - CMR5c - <i>ofaA</i>	F: GATCTGGACCAGGACAGCAT R: GTTGACCAGGTGATGGAAGC	Deze studie
PCR - CMR5c - <i>ofaB</i>	F: TGAACATGTACGGCATCACC R: CGATCACATAGGCCACCAG	Deze studie
PCR - CMR5c - <i>ofaC</i>	F: ATCCTCGTTACCTGCTGTG R: AGCAGGTAGTTCAGGCGTTC	Deze studie
PCR - CMR5c - <i>macA</i>	F: CAGGAAGGCCAGACTGTGAT R: GCACCTTGACGTTGTTGTTG	Deze studie
PCR - CMR5c - <i>macB</i>	F: AGCATCAGCGTGAAGATCAA R: CCCATGGAGAACACCATCTC	Deze studie
PCR - CMR5c - <i>luxDown</i>	F: CGCTGATGTGCTTTTCCAC R: ACAAGCACTGTTCCCCATA	Deze studie
PCR - CMR5c - <i>luxUp-ofaA</i>	F: AATTGCGTGTTTCCAGGTTG R: GATGTTGTACAAGGCGAGTC	Deze studie
PCR - CMR5c - <i>ofaA-ofaB</i>	F: CAGTTGCAACAGGTGGACAT R: CTTGTGCTCGACCAGACTGT	Deze studie
PCR - CMR5c - <i>ofaB-ofaC</i>	F: SEQ GACCCGTTCACTGATCAACC R: TGGACGTCTTTTCCTTCAG	Deze studie
PCR - CMR5c - <i>ofaC-macA</i>	F: CAACCACTTCAGCCTGCTC R: ACTTCAATTGCCGGAGAC	Deze studie
PCR - CMR5c - <i>macA-macB</i>	F: CTACAACGCGCTGTTGAT R: AACCGAGGATGTTTCATCAGG	Deze studie
PCR - CMR5c - <i>macB-luxDown</i>	F: CTCGATCATTACTGCGTTG R: CATGGTGGAAGACACATCA	Deze studie
PCR - Pf-5 - <i>nodT</i>	F: AGGAACACCAGGTTGCTGTC R: GACATTCTCCAGGCCGAGTA	Deze studie

PCR – Pf-5 - <i>luxUp</i>	F: GACAGTTCGGACAGGGAAAA R: GAACTGGGGCAGTTGATTTTC	Deze studie
PCR - Pf-5 - <i>ofaA</i>	F: GGCTGGACAAGTACCAGAGC R: CAATTCGTAGGACAGCGACA	Deze studie
PCR - Pf-5 - <i>ofaB</i>	F: TCGATCACTACACCCTGCTG R: AATTTCTCGGCGTTGAGTTC	Deze studie
PCR - Pf-5 - <i>ofaC</i>	F: GCCTACTACACCACCGTTGC R: GTAGATCAGGTTGGCCGGTA	Deze studie
PCR - Pf-5 - <i>macA</i>	F: AAAATCGGTATGGGGCTGTT R: CTCGTAATCCTGCTGGGAAA	Deze studie
PCR - Pf-5 - <i>macB</i>	F: GCATTTCTTCAGCGAGAAC R: GATGTTTCATCACCCGATTC	Deze studie
PCR - Pf-5 - <i>luxDown</i>	F: CGGTATTGACCTTGAGCTTGA R: CAACACCCTGATGCAGACC	Deze studie
PCR - Pf-5 - <i>nodT-luxUp</i>	F: CAGGGTCAGTGGGGAGTTAC R: TTTTCCCTGTCCGAACTGTC	Deze studie
PCR - Pf-5 - <i>luxUp-ofaA</i>	F: TCGCAATACTGCTGGTCAGA R: TCAGTTGGTCGAGCCAGATA	Deze studie
PCR - Pf-5 - <i>ofaA-ofaB</i>	F: CCGAGGTACTGCAAGTGGA R: TCAATTCGCTGAACTGCATC	Deze studie
PCR - Pf-5 - <i>ofaB-ofaC</i>	F: AACGAATGGAGATCGTCCTG R: GCACTGACGTGGTGGTAGAG	Deze studie
PCR - Pf-5 - <i>ofaC-macA</i>	F: CAGGGGGAGGTCATGTCATA R: CCTTGACCTTGAGCGACTTC	Deze studie
PCR - Pf-5 - <i>macA-macB</i>	F: CGCAGAACTTTCTCGAAACC R: ATGCTCAGGTCGATGTGCTT	Deze studie
PCR - Pf-5 - <i>macB-luxDown</i>	F: GATATCCGCCAGCAGTTCCT R: AGCAGCTCAAGCTCAAGGTC	Deze studie
qPCR - CMR12a&CMR5c - <i>rpoD</i>	F: GAAGGCATCCGTGAAGTGAT R: GTGTCGACAGGTGGAGGAAT	Deze studie
qPCR - CMR12a - <i>macA</i>	F: AGGAAACCAAGGCCACCTAC R: ATCTGGATCTGCGCACTCTT	Deze studie
qPCR - CMR12a - <i>macB</i>	F: GCACCAAGGACTTCTTCACC R: GGTAAACGACACCAACATGA	Deze studie
qPCR - CMR12a - <i>luxDown</i>	F: GCCGACACAGACTTCCATTT R: GGTGGAGAAGCACATCAGTG	Deze studie
qPCR - CMR12a – <i>macB-luxDown</i>	F: GTGGTCTTCGGCTTCGTC R: GATGTACTCGCCCCAGGAG	Deze studie
qPCR - CMR5c - <i>macA</i>	F: GATCTCCAAGCAGGACTTCG R: GATCACAGTCTGGCCTTCCT	Deze studie
qPCR - CMR5c - <i>macB</i>	F: AGGAGCACGTCAAGAAGCTC R: GATGTTTCATCACCCGATG	Deze studie
qPCR - CMR5c - <i>luxDown</i>	F: GCGTTTCTCAAGCTGTTGGT R: GAACGGCCTATCAAGGATGA	Deze studie
qPCR - CMR5c - <i>macB-luxDown</i>	F: GTGGTCTTCGGGTTTCGTC R: GGGCGTCTCTGGTCTTTCTC	Deze studie

Tabel B2. Preparaties van media die gebruikt werden tijdens de experimenten. ‘*’, media dat eerst moet worden opgelost door op te warmen in microgolf, ‘**’, media dat geautoclaveerd werden na samenstelling voor 25 minuten op 121°C, ‘***’, pH aanpassen tot 5,7 door KOH toe te voegen.

Media	Hoeveelheid	Nodige stof
Agarosegel 1% *	1g	Agarose
	100mL	Bidest water
LB-vloeistof **	10g	Tryptone (Bacto)
	5g	Yeast Extract (Bacto)
	10g	NaCl
	1L	Bidest water
LB-medium **	10g	Tryptone (Bacto)
	5g	Yeast Extract (Bacto)
	10g	NaCl
	15g	Agar
	1L	Bidest water
LB 0,6% medium **	10g	Tryptone (Bacto)
	5g	Yeast Extract (Bacto)
	10g	NaCl
	6g	Agar
	1L	Bidest water
KB-vloeistof **	20g	Proteose pepton nr.3 (Difco)
	1,5g	K ₂ HPO ₄
	1,5g	MgSO ₄
	10mL	Glycerol
	1L	Bidest water
KB-medium **	20g	Proteose pepton nr.3 (Difco)
	1,5g	K ₂ HPO ₄
	1,5g	MgSO ₄
	10mL	Glycerol
	15g	Agar
	1L	Bidest water
PDA medium *, **	39g	Potato Dextrose Agar (Difco)
	1L	Bidest water
MS medium ***, **	4,33g	Murashige&Skoog medium
	7g	Plant Agar
	1L	Bidest water
Normale saline oplossing	g	NaCl
	1L	Bidest water

Tabel B3. Preparaties van inhibitoren waarbij het molecuulgewicht wordt weergegeven, de te bereiden oplossing om aan de concentratie in kolom 4 te geraken en de uiteindelijke concentratie die gebruikt wordt voor de experimenten aangepast door bidest water toe te voegen.

Inhibitor	Moleculair gewicht	Oplossing	Concentratie	Gebruikte concentratie
Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCC)	204,62g/mol	5,1155mg in 1mL DMSO	25mM	25µM
Natriumorthovanadaat (NOV)	183,91g/mol	1,8391mg in 10mL bidest water	1mM	1mM
Glybenclamide (GLB)	494g/mol	2,47mg in 1mL DMSO + 4mL bidest water	1mM	10µM

Tabel B4. De concentratie van het geëxtraheerde RNA en de zuiverheid 260/280 van *Pseudomonas* sp. CMR5c en mutanten en *P. protegens* Pf5.

Staal	<i>Pseudomonas</i>	Concentratie (ng/µL)	260/280 zuiverheid
1	CMR5c-17u	988,23	1,72
2	CMR5c-17u	1135,87	1,63
3	CMR5c-17u	527,65	1,93
4	CMR5c-24u	707,61	1,93
5	CMR5c-24u	920,93	1,77
6	CMR5c-24u	1062,40	1,74
7	CMR5c-LuxUp-17u	2173,30	1,81
8	CMR5c-LuxUp-17u	2947,87	2,01
9	CMR5c-LuxUp-17u	1916,37	1,97
10	CMR5c-LuxUp-24u	1468,03	1,89
11	CMR5c-LuxUp-24u	1375,88	1,94
12	CMR5c-LuxUp-24u	1621,19	1,84
13	CMR5c-LuxDown-17u	1344,43	1,93
14	CMR5c-LuxDown-17u	2422,68	1,93
15	CMR5c-LuxDown-17u	1504,96	1,93
16	CMR5c-LuxDown-24u	1471,20	1,90
17	CMR5c-LuxDown-24u	1043,49	1,86
18	CMR5c-LuxDown-24u	1318,86	1,84
19	Pf5-17u	2543,34	1,90
20	Pf5-17u	2016,49	1,84
21	Pf5-17u	2251,71	2,00
22	Pf5-17u	2447,56	1,72
23	Pf5-17u	2136,82	1,63
24	Pf5-17u	1999,44	1,93

Tabel B5. Analyse van de optische densiteit voor de *Pseudomonas* sp. CMR5c en zijn mutanten op de tijdstippen 17 uur, 24 uur en 48 uur.

OD-analyse van CMR5c en mutanten

<i>Pseudomonas</i> sp.	OD 17 uur	OD 24 uur	OD 48 uur
------------------------	-----------	-----------	-----------

CMR5c	1,44	1,62	1,64
CMR5c- <i>nodT</i>	1,79	1,67	1,69
CMR5c- <i>oprM</i>	1,2635	1,31	1,63
CMR5c- <i>nodT-oprM</i>	1,31	1,34	1,62
CMR5c- <i>LuxUp</i>	2,33	2,38	2,91
CMR5c- <i>LuxDown</i>	2,57	2,50	2,35

Tabel B6. Concentratie van cDNA in ng/μL van *Pseudomonas* sp. CMR5c na 17 uur en 24 uur opgroeien nodig voor qPCR-analyse.

<i>Pseudomonas</i> sp.	Concentratie (ng/μL)
CMR5c – 17u	527,65
CMR5c – 24u	707,61
CMR5c - $\Delta luxUp$ – 17u	1916,37
CMR5c - $\Delta luxUp$ – 24u	1375,80
CMR5c - $\Delta luxDown$ – 17u	1504,96
CMR5c - $\Delta luxDown$ – 24u	1471,20

Tabel B7. Ct-waarden van qPCR-analyse van *Pseudomonas* sp. CMR5c na 17 uur en 24 uur opgroeien in LB-vloeistof op 28°C.

Gen	<i>Pseudomonas</i> species CMR5c		
17 uur	CMR5c	CMR5c- <i>LuxUp</i>	CMR5c- <i>luxDown</i>
<i>rpoD</i>	26,830	26,350	26,740
<i>macA</i>	34,370	34,010	33,980
<i>macB</i>	35,320	33,045	30,670
<i>luxDown</i>	32,905	33,100	34,635
<i>macB-luxDown</i>	Geen Ct	Geen Ct	Geen Ct
24 uur	CMR5c	CMR5c- <i>LuxUp</i>	CMR5c- <i>luxDown</i>
<i>rpoD</i>	30,050	27,845	27,530
<i>macA</i>	32,655	32,780	32,740
<i>macB</i>	34,645	33,690	33,855
<i>luxDown</i>	34,050	32,815	32,800
<i>macB-luxDown</i>	Geen Ct	Geen Ct	Geen Ct

Tabel B8. Swarmingtest resultaten van *Pseudomonas* sp. CMR12a, CMR5c, *P. protegens* Pf-5 en mutanten met drie verschillende inhibitoren: Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCC), natriumorthovanadaat (NOV) en glybenclamide (GLB). μ , gemiddelde; σ , standaardafwijking; %RSD, relatieve standaardafwijking; p-waarde van de Mann-Whitney Test met significantieniveau 5% met als nulhypothese dat het wild type met en zonder behandeling gelijk is aan de de mutanten met en zonder behandeling; %Effect, stijgend (+) of dalend (-) effect van de mutatie ten opzichte van het wild type. De vetgedrukte waarden in %Effect-kolom zijn significant.

Behandeling	μ	σ	% RSD	p-waarde	% Effect
CMR12a	1,25	0,05	4%		
CMR12a- <i>nodT</i>	1,45	0,05	3%	0,014	16%
CMR12a- <i>oprM</i>	3,35	0,46	14%	0,014	168%
CMR12a- <i>nodT-oprM</i>	1,70	0,90	53%	0,029	36%
CMR12a + CCC	3,30	0,30	9%		
CMR12a- <i>nodT</i> + CCC	1,65	0,11	7%	0,014	-50%
CMR12a- <i>oprM</i> + CCC	3,38	0,23	7%	0,043	2%
CMR12a- <i>nodT-oprM</i> + CCC	4,55	0,85	19%	0,014	38%
CMR12a + NOV	1,10	0,00	0%		
CMR12a- <i>nodT</i> + NOV	1,25	0,09	7%	0,014	14%
CMR12a- <i>oprM</i> + NOV	1,68	0,28	17%	0,014	53%
CMR12a- <i>nodT-oprM</i> + NOV	1,40	0,00	0%	0,014	27%
CMR12a + GLB	1,05	0,05	5%		
CMR12a- <i>nodT</i> + GLB	1,20	0,00	0%	0,014	14%
CMR12a- <i>oprM</i> + GLB	4,20	0,17	4%	0,014	300%
CMR12a- <i>nodT-oprM</i> + GLB	4,35	0,36	8%	0,014	314%
CMR5c	3,95	0,61	15%		
CMR5c- <i>oprM</i>	4	1,16	29%	1	1%
CMR5c- <i>cmeC</i>	4,33	0,58	13%	0,343	10%
CMR5c- <i>oprM-cmeC</i>	3,88	0,59	15%	0,886	-2%
CMR5c + CCC	4,25	0,36	9%		
CMR5c- <i>oprM</i> + CCC	4,63	0,18	4%	0,343	9%
CMR5c- <i>cmeC</i> + CCC	5	0,24	5%	0,057	18%
CMR5c- <i>oprM-cmeC</i> + CCC	5,23	0,48	9%	0,029	23%
CMR5c + NOV	5,03	0,18	4%		
CMR5c- <i>oprM</i> + NOV	5,65	0,11	2%	0,029	12%
CMR5c- <i>cmeC</i> + NOV	6,15	0,35	6%	0,029	22%
CMR5c- <i>oprM-cmeC</i> + NOV	2,05	0,15	7%	0,029	-59%
CMR5c + GLB	3,7	0,52	14%		
CMR5c- <i>oprM</i> + GLB	3,6	0,1	3%	1	-3%
CMR5c- <i>cmeC</i> + GLB	3,65	0,35	10%	0,886	-1%
CMR5c- <i>oprM-cmeC</i> + GLB	1,48	0,28	19%	0,029	-60%

Tabel B9. Analyse van het piekoppervlak van orfamide gedeeld door de optische densiteit voor *Pseudomonas* sp. CMR5c en zijn mutanten op de tijdstippen 17 uur, 24 uur en 48 uur. De mutanten *LuxUp* en *LuxDown* worden niet weergegeven doordat zij geen orfamide produceren.

<i>Pseudomonas</i> sp.	Piekoppervlak 17 uur	Piekoppervlak 24 uur	Piekoppervlak 48 uur
CMR5c	3364739,57	19928485,99	32388381,11
CMR5c- <i>nodT</i>	4951556,64	32054106,39	53566484,34
CMR5c- <i>oprM</i>	4696705,59	17504900,45	40536131,99
CMR5c- <i>nodT-oprM</i>	4944455,13	16853539,52	47263262,48

Tabel B10. P-waarden van de Mann-Whitney Test in matrixvorm van de *in vitro* inhibitie test van *P. protegens* CHA0. Vetgedrukte waarden zijn significant op het 5% significantieniveau.

p-waarden	Controle	CHA0	CHA0-Δorf	CHA0 cel	CHA0-Δorf cel
Controle		0,002	0,002	0,002	0,002
CHA0			0,240	0,026	
CHA0-Δorf					0,180
CHA0 cel					0,699
CHA0-Δorf cel					

Tabel B11. P-waarden van de Mann-Whitney Test in matrixvorm van de *in vitro* inhibitie test van *Pseudomonas* sp. CMR5c. Vetgedrukte waarden zijn significant op het 5% significantieniveau.

p-waarden	Controle	CMR5c	CMR5c -Δorf	CMR5c cel	CMR5c -Δorf cel
Controle		0,002	0,002	0,002	0,002
CMR5c			0,002	0,009	
CMR5c -Δorf					0,015
CMR5c cel					0,002
CMR5c -Δorf cel					

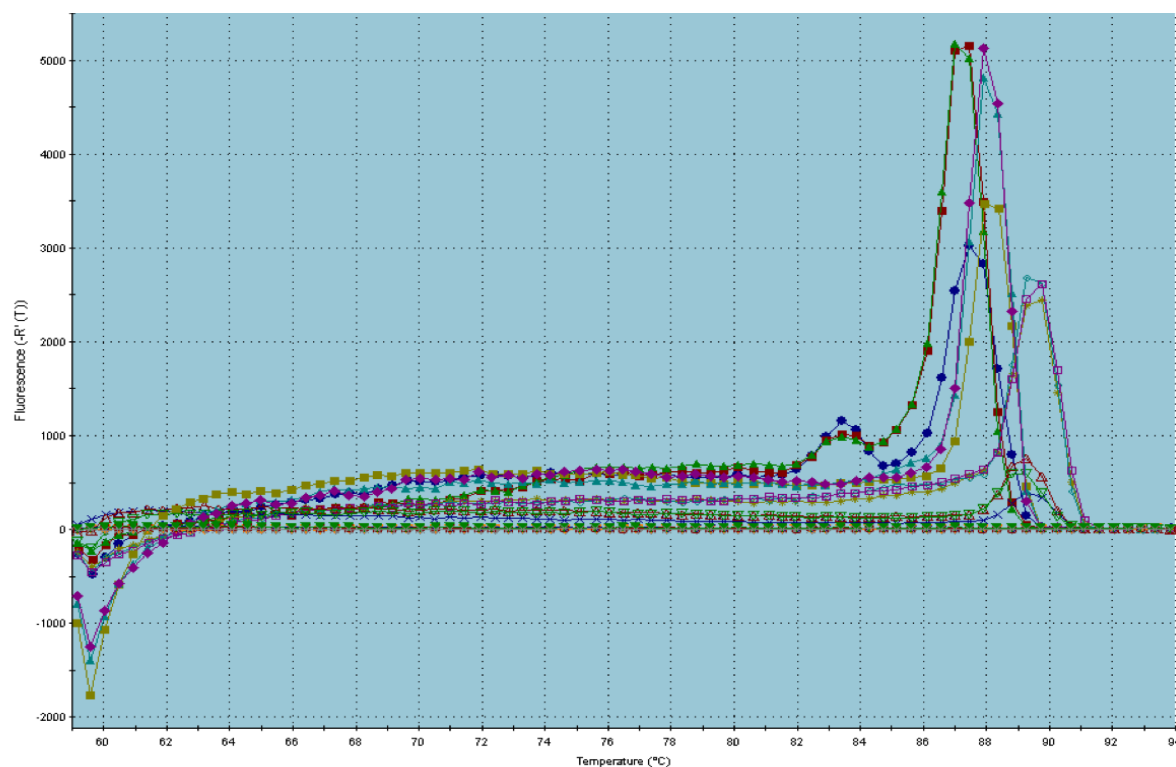
Tabel B12. De gemiddelde diameter met standaardafwijking van *in vitro* inhibitie experiment met *P. protegens* CHA0 en *Pseudomonas* sp. CMR5c en orfamide mutanten. 'Cel' wijst erop dat de bacteriecultuur met cellen is gebruikt, zonder deze aanwijzing betekent dat het supernatans werd gebruikt. μ , gemiddelde; σ , standaardafwijking; %RSD, relatieve standaardafwijking; p-waarde van de Mann-Whitney Test met significantieniveau 5% met als nulhypothese dat de behandeling met cellen gelijk is aan de behandeling met supernatans; % Effect geeft aan wat het effect is van het gebruiken van de cellen in vergelijking met supernatans op de inhibitie van *Pythium myriotylum*. De vetgedrukte waarden in %Effect-kolom zijn significant op het 5% significantieniveau.

Behandeling	μ	σ	% RSD	p-waarde	% Effect
CHA0	1,90	0,10	5%		
CHA0 cel	1,72	0,12	7%	0,026	-9%
CHA0-Δorf	1,80	0,13	7%		
CHA0-Δorf cel	1,68	0,11	6%	0,18	-7%
CMR5c	2,32	0,11	5%		
CMR5c cel	2,07	0,09	5%	0,009	-11%
CMR5c-Δorf	1,90	0,08	4%		
CMR5c-Δorf cel	1,73	0,07	4%	0,015	-9%

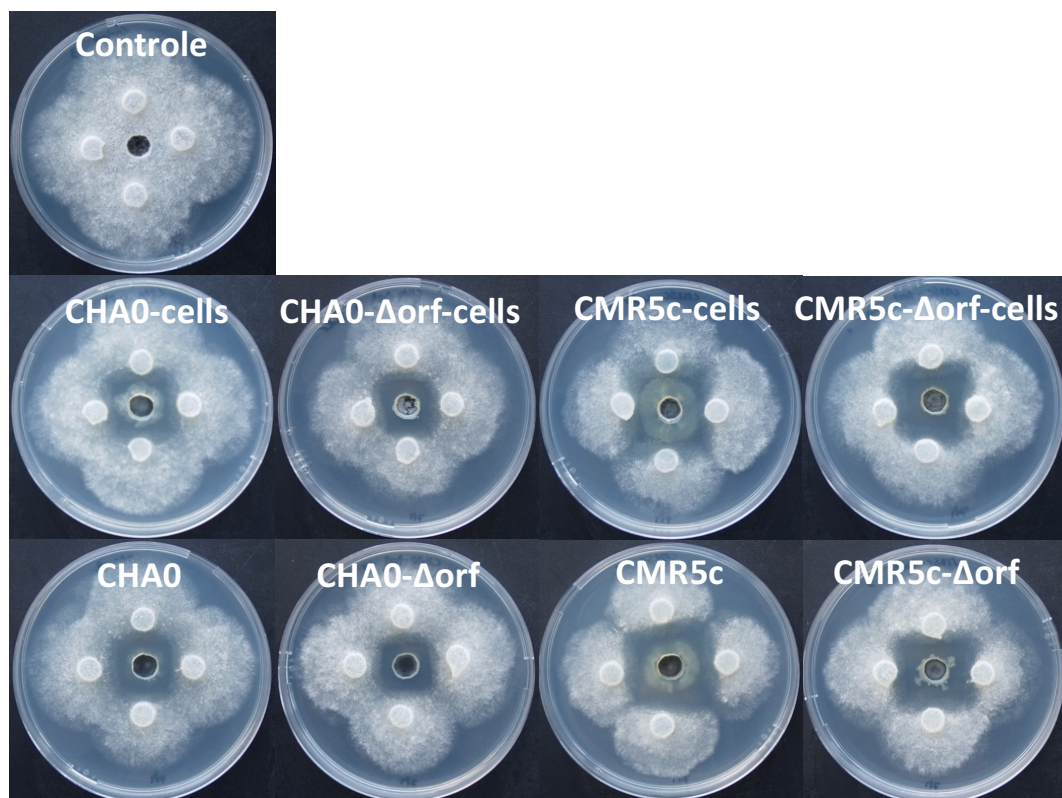
Tabel B13. P-waarden van de Mann-Whitney Test in matrixvorm van het cocoyamplant experiment van *P. protegens* CHA0 en *Pseudomonas* sp. CMR5c. Vetgedrukte waarden zijn significant op het 5% significantieniveau.

p-waarden	Positieve controle	Negatieve controle	CHA0	CHA0- Δ orf	CMR5c	CMR5c- Δ orf
Positieve controle		0,008	0,151	0,151	0,310	0,690
Negatieve controle			0,008	0,056	0,008	0,008
CHA0				0,690	0,548	
CHA0- Δ orf						0,310
CMR5c						0,841
CMR5c- Δ orf						

9.2 Figuren



Figuur B1. Dissociatiecurves van *Pseudomonas* sp. CMR5c voor de genen *rpoD*, *macA*, *macB* en *luxDown* bij qPCR-analyse.



Figuur B2. *In vitro* experiment met *Pythium myriotylum* en bacteriën *P. protegens* CHA0 en zijn orfamide mutant en *Pseudomonas* sp. CMR5c en zijn orfamide mutant. Controle bevat vier agarblokjes *P. myriotylum* maar geen bacteriën.