

Anwendung der Immunfluoreszenz-Mikroskopie zur Lokalisation eines krankheitsunterdrückenden *Pseudomonas fluorescens*- Stammes auf Tabakwurzeln

Doctoral Thesis

Author(s):

Berling, Carl-Heinz

Publication date:

1991

Permanent link:

<https://doi.org/https://doi.org/10.3929/ethz-a-000611975>

Rights / license:

In Copyright - Non-Commercial Use Permitted

18 Nov 1991

DISS. ETH Nr. 9474

**Anwendung der Immunfluoreszenz-Mikroskopie zur Lokalisation
eines krankheitsunterdrückenden *Pseudomonas fluorescens*-Stammes
auf Tabakwurzeln**

ABHANDLUNG

zur Erlangung des Titels

DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN
der
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZÜRICH

vorgelegt von

CARL-HEINZ BERLING

Dipl. Natw. ETH Zürich
geboren am 11. Mai 1957
von Zürich

Angenommen auf Antrag von:

Prof. Dr. G. Défago, Referentin
Prof. Dr. M. Wolfe, Korreferent
Prof. Dr. V. Delucchi, Korreferent

G. Défago
28. 10. 91

1991

Zusammenfassung

Das Bakterium *Pseudomonas fluorescens*, Stamm CHA0, besitzt die Fähigkeit, die vom Pilz *Thielaviopsis basicola* verursachte schwarze Wurzelfäule des Tabaks zu unterdrücken. Basierend auf der indirekten Immunfluoreszenzfärbung wurde eine Methode entwickelt, um den Stamm CHA0 und den pathogenen Pilz auf der Oberfläche und im Innern von Tabakwurzeln mikroskopisch zu beobachten. Autoklavierte Erde war von verschiedenen geprüften Kultursubstraten am besten geeignet für die Untersuchungen. Es wurden Kaninchen-Antiseren gegen *P. fluorescens* Stamm CHA0 und gegen *T. basicola* Stamm D127 hergestellt. Das *P. fluorescens*-Antiserum reagierte spezifisch mit dem Stamm CHA0 und dessen Mutanten, während das *T. basicola*-Antiserum art- und gattungsspezifisch reagierte. Zur Untersuchung der Wurzeloberfläche wurden Totalpräparate verwendet, für die Herstellung von Schnitten wurden die Wurzeln in Hydroxypropyl-methacrylat eingebettet. Vor der Immunfluoreszenzfärbung wurden die Präparate mit einem Konjugat aus Gelatine und Rhodamin-B-isothiocyanat behandelt, was die Autofluoreszenz und die unspezifische Fluoreszenz verminderte sowie eine erwünschte Gegenfärbung ergab.

In Abwesenheit von *P. fluorescens* Stamm CHA0 drang *T. basicola* innerhalb von 18-30 Stunden in die Wurzeln ein und bildete dabei appressorienartige Strukturen. Es wurden keine speziell bevorzugten Eintrittsstellen beobachtet. Der Pilz bildete ein intrazelluläres Myzel und breitete sich auch auf der Wurzeloberfläche aus. Nach vier bis sieben Tagen bildeten sich Endokonidien und Chlamydosporen auf der Wurzeloberfläche. *P. fluorescens* kolonisierte innerhalb von 24 Stunden die ganze Wurzeloberfläche. Anfänglich bevorzugten die Bakterien vor allem die Kontaktstellen zwischen den Epidermiszellen als Aufenthaltsort. *P. fluorescens* drang in der Folge in die Wurzeln ein und besiedelte innerhalb von ein bis vier Tagen Interzellularräume, Cortex- und Epidermiszellen sowie Xylemgefäße. In Anwesenheit von Stamm CHA0 verzögerte sich die Infektion durch *T. basicola* und der Krankheitsbefall war stark reduziert. Der Stamm CHA625, eine Mutante von Stamm CHA0 mit stark reduzierter Fähigkeit zur Krankheitsunterdrückung, besiedelte die Wurzeln in ähnlicher Weise wie der Wildstamm. Auch der Stamm CHA625 wurde nach vier Tagen im Innern der Wurzeln gefunden. Der Verlust der Schutzwirkung von Stamm CHA625 war also nicht korreliert mit einem Verlust der Fähigkeit, das Wurzelinnere zu besiedeln. Direkte Interaktionen zwischen *P. fluorescens* Stamm CHA0 und *T. basicola* (z. B. Bakterien auf Hyphen oder Sporen) wurden nur in Ausnahmefällen beobachtet. Der Stamm CHA0 kolonisiert die Wurzeln und dringt in diese ein. Diese Fähigkeit erlaubt ihm möglicherweise, phytotoxische Stoffe in die Wurzeln zu bringen, was in der Pflanze systemisch induzierte Resistenz verursachen und so zur Krankheitsunterdrückung beitragen könnte.

Abstract

The bacterium *Pseudomonas fluorescens*, strain CHA0, is able to suppress the black root rot disease of tobacco, caused by the fungus *Thielaviopsis basicola*. A method was developed for microscopical visualisation of strain CHA0 and the pathogenic fungus on the surface of, and inside, tobacco roots, based upon an indirect immunofluorescent staining technique. Among different substrates tested, autoclaved soil was most suitable for the culture of plants for this investigation. Rabbit antisera were prepared against *P. fluorescens* strain CHA0 and *T. basicola* strain D127. The antiserum against *P. fluorescens* stained strain CHA0 and its mutants specifically, whereas the antiserum against *T. basicola* was genus and species specific. The root surface was examined on whole root preparations. In order to be able to cut the roots, they were embedded in hydroxypropyl methacrylate. Prior to immunofluorescent staining, all root preparations were treated with a conjugate of gelatin and rhodamine isothiocyanate. This treatment reduced autofluorescence and non-specific staining and served as an efficient counterstain.

When *P. fluorescens* strain CHA0 was absent, *T. basicola* penetrated the roots within 18 to 30 hours, forming appressoria-like structures. No preferred sites of penetration were observed. The fungus formed intracellular mycelium and spread on the root surface. Formation of endoconidia and chlamydospores occurred four to seven days after inoculation. *P. fluorescens* colonised the whole root surface within 24 hours. Initially, the bacteria were found primarily along the longitudinal junctions between epidermal cells. *P. fluorescens* penetrated the roots rapidly and colonised intercellular spaces, cortical and epidermal cells as well as xylem vessels within four to seven days. When strain CHA0 was present, the infection by *T. basicola* was retarded and the final extent of disease was strongly reduced. *P. fluorescens* strain CHA625, a mutant of strain CHA0 with reduced ability to suppress disease, colonised roots in a similar way as did the wild-type strain. Strain CHA625 was also found within the roots after four days. Thus, the loss of disease suppression capacity of this strain could not be correlated with a loss of ability to penetrate roots. Direct interactions between *P. fluorescens* strain CHA0 and *T. basicola* (e. g. bacteria on hyphae or spores) were observed only exceptionally. Strain CHA0 colonises and penetrates roots. This capability possibly enables the bacteria to produce phytotoxic substances inside the roots, causing induced systemic resistance in the plant and thereby contributing to disease suppression.