



Doctoral Thesis

**Mechanisms of suppression of plant diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0
influence of antibiotic overproduction, role of the antibiotic
pyoluteorin and induction of resistance in plants**

Author(s):

Maurhofer, Monika

Publication Date:

1994

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000929588> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

21. Feb. 1994

Diss. ETH No 10438

**MECHANISMS OF SUPPRESSION OF PLANT DISEASES BY
PSEUDOMONAS FLUORESCENS CHA0: INFLUENCE OF
ANTIBIOTIC OVERPRODUCTION, ROLE OF THE ANTIBIOTIC
PYOLUTEORIN AND INDUCTION OF RESISTANCE IN PLANTS**

A dissertation submitted to the

SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by

MONIKA MAURHOFER

Dipl. sc. nat. ETH
born April 14th, 1963
citizen of Erlenbach ZH

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. G. Défago, examiner
Prof. Dr. D. Haas, co-examiner
Prof. Dr. M. S. Wolfe, co-examiner

G. Défago
21. 2. 94

SUMMARY

Pseudomonas fluorescens strain CHA0 is an effective biocontrol agent of take-all of wheat caused by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in the field and of various other diseases caused by soilborne pathogens in greenhouse experiments. Strain CHA0 produces the siderophores pyoverdine, pyochelin and salicylic acid as well as the antibiotic metabolites hydrogen cyanide, 2,4-diacetylphloroglucinol (Phl) and pyoluteorin (Plt). Previous studies have shown that in strain CHA0, the production of HCN and Phl, but not of pyoverdine is of importance in the suppression of some diseases caused by soilborne pathogens. The purpose of this study was (i) to test whether improvement of antibiotic production by strain CHA0 can improve its disease suppressive capacity, (ii) to investigate the role of pyoluteorin in disease suppression and (iii) to test whether strain CHA0 is able to induce systemic resistance against leaf pathogens in plants.

A cosmid (pME3090) carrying a 22-kb insert of CHA0 DNA was found which, introduced in strain CHA0, enhanced the production of Phl and Plt *in vitro* and also in the rhizosphere of wheat. The antibiotic overproducing derivative CHA0/pME3090 showed, compared with the wild-type, improved inhibition of several plant pathogenic fungi on agar plates. The disease suppressive capacity of the recombinant strain was tested in different plant-pathogen systems under gnotobiotic conditions. Strain CHA0/pME3090 showed improved protection of cucumber against *Pythium ultimum*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* and *Phomopsis sclerotioides* but protected wheat to the same degree against *G. g.* var. *tritici* and *P. ultimum* as did the wild-type strain. The recombinant strain protected tobacco roots better against *Thielaviopsis basicola* than the wild-type but reduced plant growth. Strain CHA0/pME3090 was also toxic to the growth of cress and sweet corn. The toxicity of the recombinant strain to some plant species is suggested to be due to the enhanced production of Phl and Plt. Tests with synthetic Phl and Plt showed that these antibiotics are as toxic to plants as to fungal pathogens. In conclusion, whether the introduction of cosmid pME3090 into strain CHA0 leads to improved disease suppression or not, seems to be dependent on the plant species. The reason that different results were obtained with different plant species is probably that bacterial antibiotic production varies in the rhizosphere of different plants species due to differences in root exudates. The phytotoxicity of strain CHA0/pME3090 is suggested to be dependent on the sensitivity of a plant to Plt and Phl as well as on the amounts of antibiotics produced in the plant rhizosphere.

To investigate the role of Plt in disease suppression, Tn5 insertion mutants of strain CHA0 were screened for loss of Plt production. Two mutants, CHA660 and CHA661, were found which have lost the capacity to produce Plt, and partially also the capacity to inhibit *P. ultimum* on King's B agar. In a gnotobiotic system, strains CHA660 and CHA661 also had partially lost the capacity to protect cress against *P. ultimum* but were as efficient in the protection of cucumber against this pathogen as was the wild-type strain. Plt therefore plays a role in the protection of cress, but not of cucumber against *P. ultimum*, probably because in the rhizosphere of cress but not in that of cucumber, amounts of Plt are produced which are high enough to be effective against the pathogen.

The ability of strain CHA0 to induce resistance in plants was investigated using *Nicotiana glutinosa* and two different varieties of *Nicotiana tabacum* with tobacco

necrosis virus (TNV) as the pathogen. Tobacco plants were grown in autoclaved natural soil previously inoculated with strain CHA0. After six weeks, one leaf of the plants was challenge inoculated with TNV. Development of leaf necrosis after inoculation with TNV and the production of pathogenesis related (PR) proteins before inoculation with TNV were investigated and compared with control plants in which systemic resistance had been induced in the classical way by first, TNV inoculation on a lower leaf, seven days prior to challenge inoculation. In the leaves of all plants grown in soil inoculated with strain CHA0, the same increase of PR-proteins and the same level of resistance to TNV were found as in the leaves of plants which had previously been immunized with TNV. Strain CHA0 could be reisolated only from the roots and is therefore suggested to be able to induce systemic resistance against leaf pathogens in tobacco plants. Strain CHA96, a *gacA* mutant of strain CHA0 which has lost the capacity to produce antibiotics and to protect tobacco from black root rot, induced resistance in tobacco leaves to the same degree as did the wild-type strain. In contrast, the pyoverdine-negative strain CHA400 which is as effective in the biocontrol of black root rot of tobacco as the wild-type, had lost most its capacity to induce leaf resistance but still induced the same amount of PR proteins as did the wild-type strain.

In conclusion, the results presented show that the role of pyoluteorin in disease suppression by strain CHA0 as well as an improvement of disease suppression by introduction of cosmid pME3090 into strain CHA0, mainly depends on the plant species and not on the pathogen. Antibiotic overproduction in strain CHA0 may result in improved disease suppression, or in contrast, in phytotoxicity. Strain CHA0, when colonizing tobacco roots, is able to induce, in the leaves, (i) resistance to tobacco necrosis virus and (ii) the production of proteins which are suggested to be associated with systemically induced resistance. The induction of resistance against pathogens can therefore be considered as a further mechanism of disease suppression by strain CHA0. The *gacA* gene which is involved in the protection of tobacco roots, is not involved in the induction of leaf resistance and pyoverdine production, which has no role in the protection of the roots seems to be of importance in the induction of resistance in the leaves.

ZUSAMMENFASSUNG

Pseudomonas fluorescens Stamm CHA0 unterdrückt die Schwarzbeinigkeit des Weizens, verursacht durch *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in Feldversuchen und verschiedene andere bodenbürtige Pflanzenkrankheiten in Gewächshausversuchen. Stamm CHA0 produziert die Siderophoren Pyoverdin, Pyochelin und Salicylsäure, sowie die antibiotisch wirksamen Metaboliten Cyanid, 2,4-Diacetylphloroglucinol (Phl) und Pyoluteorin (Plt). In früheren Studien ist bereits gezeigt worden, dass die Produktion von Cyanid und Phl, aber nicht diejenige von Pyoverdin eine wichtige Rolle bei der Unterdrückung einiger bodenbürtigen Krankheiten durch diesen Stamm spielt. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es a) abzuklären, ob eine Erhöhung der Antibiotikaproduktion des Stammes CHA0 eine Verbesserung der Krankheitsunterdrückung bewirken kann, b) die Rolle von Pyoluteorin in der Suppression von bodenbürtigen Krankheiten zu untersuchen und c) zu untersuchen, ob Stamm CHA0 in der Lage ist, in Pflanzen systemische Resistenz gegen Blattpathogene zu induzieren.

Es wurde ein Cosmid (pME3090) gefunden, welches nach Einführung in Stamm CHA0 die Produktion von Plt und Phl *in vitro* und auch in der Rhizosphäre von Weizen erhöhte. Dieses Cosmid beinhaltet ein 22 KB Stück von CHA0-DNA. Verglichen mit dem Wildstamm zeigte der antibiotikaüberproduzierende Stamm CHA0/pME3090 auf Agarplatten eine erhöhte Hemmung von verschiedenen pflanzenpathogenen Pilzen. Die Krankheitsunterdrückung durch diesen rekombinanten Stamm wurde unter gnotobiotischen Bedingungen in verschiedenen Pflanzen-Pathogen-Systemen getestet. Stamm CHA0/pME3090 vermochte Weizen gleich gut vor *Pythium ultimum* und *G. graminis* var. *tritici* zu schützen wie der Wildstamm. Gurkenpflanzen wurden jedoch durch den Antibiotikaüberproduzenten deutlich besser vor *P. ultimum*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* und *Phomopsis sclerotioides* geschützt als durch Stamm CHA0. Der rekombinante Stamm zeigte auch einen verbesserten Schutz von Tabak gegen *Thielaviopsis basicola*, reduzierte jedoch das Wachstum von Tabakpflanzen. Stamm CHA0/pME3090 war ebenfalls toxisch für das Wachstum von Kresse und Zuckermais. Es ist zu vermuten, dass die Toxizität des rekombinanten Stammes gegenüber einigen Pflanzenarten auf die erhöhte Produktion von Plt und Phl zurückzuführen ist. Toxizitätstests mit synthetischem Plt und Phl zeigten, dass diese Antibiotika genauso toxisch für Pflanzen sind wie für pilzliche Pflanzenpathogene. Zusammengefasst kann gesagt werden, dass es von der Spezies der Pflanze abhängt, ob eine Erhöhung der Antibiotikaproduktion des Stammes CHA0 zu einer verbesserten Krankheitsunterdrückung führt. Die unterschiedlichen Resultate, die mit verschiedenen Pflanzenarten erhalten wurden, kamen vermutlich dadurch zustande, dass die Menge der durch Stamm CHA0 in der Rhizosphäre produzierten Antibiotika von der Menge und Beschaffenheit der Wurzelexsudate abhängt, die je nach Pflanzenspezies variieren. Die Phytotoxizität von Stamm CHA0/pME3090 ist wahrscheinlich sowohl von der Empfindlichkeit einer Pflanze auf Plt und Phl abhängig als auch von der Menge an Antibiotika, die in der Rhizosphäre einer Pflanze produziert wird.

Um die Rolle von Plt in der Krankheitsunterdrückung zu untersuchen, wurde unter Transposoninsertionsmutanten von Stamm CHA0 nach solchen gesucht, welche die Fähigkeit, Plt zu produzieren, verloren haben. Es wurden zwei Plt-negative Mutanten (Stamm CHA660 und Stamm CHA661) gefunden, die teilweise auch die Fähigkeit verloren haben, *P. ultimum* auf King's B Agar zu hemmen. In einem gnotobiotischen

System schützten die Stämme CHA660 und CHA661 Gurkenpflanzen gleich gut vor *P. ultimum* wie der Wildstamm, zeigten jedoch eine deutlich verminderte Fähigkeit, Kresse vor demselben Pathogen zu schützen. Plt scheint deshalb eine Rolle im Schutz von Kresse, nicht aber im Schutz von Gurke gegen *P. ultimum* zu spielen. Dieser Unterschied ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass in der Rhizosphäre von Kresse, nicht aber in derjenigen von Gurke, genügend Plt produziert wird, um gegen *P. ultimum* wirksam zu sein.

Die Fähigkeit von Stamm CHA0, Resistenz in Pflanzen zu induzieren, wurde im Pflanzen-Pathogen-System Tabak-Tabak Nekrosis Virus (TNV) mit *Nicotiana glutinosa* und zwei Varietäten von *Nicotiana tabacum* untersucht. Tabakpflanzen wurden in autoklavierter natürlicher Erde angezogen, welche zuvor mit Stamm CHA0 inokuliert worden war. Nach sechs Wochen wurde ein Blatt von jeder Pflanze mit TNV inokuliert (*Challenge*-Inokulation). Die Entwicklung von Blattnekrosen nach der Inokulation und die Produktion von PR (*Pathogenesis-Related*)-Proteinen vor der Inokulation mit TNV wurden untersucht und mit denjenigen von Pflanzen verglichen, in denen systemische Resistenz mit einer ersten TNV-Inokulation sieben Tage vor der *Challenge*-Inokulation induziert worden war. In den Blättern von allen Pflanzen, die in Gegenwart von CHA0 gewachsen waren, wurde dasselbe Mass an Resistenz gegen TNV und dieselbe Menge an PR-Proteinen gefunden wie in Pflanzen, die zuvor mit TNV immunisiert worden waren. Stamm CHA0 konnte nur von den Wurzeln, aber nie von den Blättern oder vom Stengel rückisoliert werden. Es kann deshalb angenommen werden, dass Stamm CHA0 fähig ist, in Tabakpflanzen systemische Resistenz gegen Blattpathogene zu induzieren. Stamm CHA96, eine *gacA* Mutante von Stamm CHA0, welche die Fähigkeit verloren hat, Antibiotika zu produzieren und Tabak vor der schwarzen Wurzelfäule zu schützen, verhielt sich bezüglich der Induktion von Resistenz und PR-Proteinen gleich wie der Wildstamm. Stamm CHA400 hingegen, eine Pyoverdin-negative Mutante von Stamm CHA0, welche dieselbe Fähigkeit hat, die schwarze Wurzelfäule von Tabak zu unterdrücken wie der Wildstamm, konnte im Vergleich zu Stamm CHA0 nur eine geringe Resistenz gegen TNV induzieren, obwohl er die gleiche Menge an PR-Proteinen induzierte.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass sowohl die Rolle von Pyoluteorin in der Krankheitsunterdrückung als auch eine Verbesserung der Krankheitsunterdrückung durch Einführung des Cosmids pME3090 in Stamm CHA0 hauptsächlich von der Pflanzenspezies und weniger vom Pathogen abhängig sind. Antibiotikaüberproduktion kann in Stamm CHA0 einerseits zu einer verbesserten Kontrolle von Pflanzenkrankheiten führen, andererseits aber auch zu Phytotoxizität. Stamm CHA0 war fähig, in Tabakblättern sowohl Resistenz gegen TNV als auch die mit der Induktion von systemischer Resistenz korrelierenden PR-Proteine zu induzieren. Die Induktion von Resistenz gegen Pathogene kann deshalb als ein weiterer Mechanismus der Krankheitsunterdrückung durch Stamm CHA0 betrachtet werden. Das *gacA* Gen, welches wichtig ist für den Schutz von Tabakwurzeln, scheint beim Schutz der Blätter keine Bedeutung zu haben. Die Produktion von Pyoverdin hingegen, die in der Unterdrückung von Wurzelkrankheiten keine Rolle spielt, scheint für die Induktion von Resistenz in den Blättern wichtig zu sein.