

Diss ETH Nr. 13023

Environmental factors influencing ecological interactions between biocontrol pseudomonads and fungal pathogens

A dissertation for the degree of Doctor of Technical Sciences submitted to the
Swiss Federal Institute of Technology, Zürich

Presented by **Brion DUFFY**

BSc Crop Protection, University of Hawaii at Hilo
MSc Plant Pathology, Washington State University
Born 21 August 1967 USA

Accepted on the recommendation of:

Prof. Dr. Geneviève Défago, referent
Prof. Dr. Emmanuel Frossard, co-referent
Dr. David M. Weller, co-referent

1999

G. Défago
14.5.99

General Summary

Biocontrol using beneficial *Pseudomonas fluorescens* is one of the most promising approaches to manage soilborne diseases, for which agrochemicals are generally ineffective. Variable strain performance, however, has hampered commercialization efforts. With the aim of overcoming this problem, this thesis identified factors that directly and indirectly influence the level and reliability of biocontrol.

- **Genetic stability and minerals:** High frequency (>1%) spontaneous mutation in *gacS-gacA* global regulators abolished antibiotic production and reduced the biocontrol efficacy of *Pseudomonas* inoculants against *Pythium* damping-off of cucumber. Mutants had a distinct colony appearance (ie, dark, flat, transparent, hyperfluorescent). Mutants were favored in nutrient/electrolyte rich media. Trace minerals added to media (Zn, Co, Cu, Mn, NH₄Mo) improved genetic stability in strains from Switzerland, Ghana, and Italy.
- **Minerals and antibiotic biosynthesis:** Trace minerals and carbon sources modulated biosynthesis of antimicrobial compounds in genetically and ecologically diverse biocontrol strains. In the model Swiss strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0, Zn stimulated the antibiotics 2,4-diacetylphloroglucinol (PHL) and pyoluteorin (PLT), while glucose stimulated PHL but repressed PLT. A mixture of Zn + NH₄Mo with various carbon sources further enhanced antibiotic production. Zn and glucose had the same effect on all strains genetically closest to CHA0 (ARDRA group 1), but the effect was strain dependent in other ARDRA groups. Inorganic phosphate repressed PHL and PLT but not pyrrolnitrin.
- **Pathogen signals, minerals and biocontrol:** Fusaric acid is a *Fusarium oxysporum* phytotoxic pathogenicity factor. Here it was also found to block biosynthesis of PHL by biocontrol *Pseudomonas fluorescens*, the first example of molecular signalling between pathogens and antagonistic microbes. Fusaric acid also repressed PLT but did not affect hydrogen cyanide and protease suggesting it acted downstream of *gacS-gacA*. In a soilless rockwool system, the biocontrol activity of CHA0 against *Fusarium* crown and root rot of tomato was improved by 25% with Zn or Cu amendments (33 mg/L). Cu was fungitoxic, but Zn worked via a less direct mechanism. Zn did not directly stimulate PHL production by CHA0 in situ as anticipated from the above in vitro studies. Rather, Zn repressed fusaric acid production by the pathogen. Thus, Zn created a 'fusaric acid free-zone' where CHA0 produced PHL and was able to suppress the pathogen. Genetic analysis indicated that the moderate level of biocontrol observed with CHA0 in the presence of fusaric acid was largely due to HCN production.

An ecologically distinct collection of strains was then tested for sensitivity to fusaric acid *in vitro*. This pathogen signal blocked PHL production in all strains genetically related to CHA0 (PHL and PLT biosynthetic genes), but had no effect on PHL production by genetically distinct strains (only PHL biosynthetic genes). Biocontrol of *Fusarium* crown and root rot of tomato was negatively correlated with sensitivity to fusaric acid. Thus, strains selected for the ability to produce PHL in the presence of fusaric acid were more effective. The primary importance of PHL in biocontrol of *Fusarium* was demonstrated by the fact that in a fusaric acid-resistant strain (Q2-87) interruption of PHL genes abolished disease suppression.

- **Mineral non-target effects:** Potential non-target effects must be considered before manipulating crop mineral nutrition. Regression analysis indicated that *Fusarium* crown and root rot of tomato was increased by ammonium-N, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Fe-EDDHA, MnSO_4 , MoO_3 , and $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Low NH_4NO_3 rates (39-79 mg N/liter) reduced disease, but this effect was reversed as rates increased above 100 mg N/liter. The Zn concentration (33 mg/L) used above to improve biocontrol was the upper limit possible without aggravating disease. Fertilization with nitrate-N or $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ reduced disease and could be exploited for crown and root rot management. Non-target effects on other beneficial bacteria must also be considered. All strains genetically similar to CHA0 were relatively tolerant to 0.7 mM Zn-sulphate, whereas, growth of biocontrol strains in other ARDRA groups was inhibited by concentrations above 0.2 mM.

This thesis documents for the first time the risks posed by genetic instability and negative pathogen (fusaric acid) signals in biocontrol. Approaches to improve genetic stability, stimulate antibiotic biosynthesis and enhance biocontrol, particularly using mineral amendments (eg, zinc), were developed.

Résumé Général

L'utilisation de *Pseudomonas* spp fluorescents contre les maladies microbiennes d'origine tellurique est une alternative prometteuse à la lutte chimique, peu efficace pour ce type de maladies. Néanmoins, le manque de reproductibilité des effets bénéfiques de la bactérisation en retarde la commercialisation. Le but de cette thèse était d'identifier certains des facteurs environnementaux qui modulent l'efficacité de la lutte biologique.

- **Stabilité génétique et élément-traces :** Une haute fréquence (>1%) de mutations des gènes de régulation *gacS-gacA* a supprimé la production de substances antimicrobiennes. De plus, elle a réduit l'efficacité des inoculants contre le *Pythium ultimum* sur concombre. Les mutants forment des colonies plus sombres, plus transparentes et plus fluorescentes que les souches sauvages. Les mutants sont favorisés par les milieux riches en nutriments ou en électrolytes. L'addition d'éléments-traces (Zn, Co, Cu, Mn ou NH₄Mo) aux milieux de culture a amélioré la stabilité génétique des souches provenant de Suisse, du Ghana ou d'Italie.
- **Élément-traces et biosynthèse des substances antimicrobiennes :** les éléments-traces et les sources de carbone ont modulé la biosynthèse des substances antimicrobiennes chez des souches de *Pseudomonas fluorescens*, génétiquement et écologiquement diverses. Chez la souche-modèle CHA0, le Zn a stimulé la production du 2,4-diacétylphloroglucinol (PHL) et de la pyolutéorine (PLT), deux substances antimicrobiennes. Le glucose, quant à lui, a stimulé la production de PHL mais réprimé celle de la PLT. Un mélange de Zn, de NH₄Mo et de diverses sources de carbone a augmenté encore davantage la production d'substances antimicrobiennes. Le Zn et le glucose ont eu le même effet sur toutes les souches génétiquement proches de CHA0 (groupe ARDRA 1), mais l'effet était dépendant de la souche dans d'autres groupes ARDRA. Le phosphate minéral a réprimé la biosynthèse du PHL et de la PLT mais pas de la pyrrolnitrine.
- **Signaux de l'agent pathogène, élément-traces et biocontrôle :** l'acide fusarique, une phytotoxine du *Fusarium oxysporum*, a bloqué la biosynthèse du PHL chez *Pseudomonas fluorescens* CHA0. C'est le premier exemple d'un signal moléculaire entre un pathogène et un agent de biocontrôle. L'acide fusarique a réprimé aussi la synthèse du PLT mais non celle de l'HCN ni des protéases, suggérant que l'acide fusarique agit en aval de *gacS-gacA*. Dans un système hors sol, l'apport de Zn (33 mg/L) ou de Cu a amélioré l'efficacité du contrôle biologique par CHA0. L'analyse des solutions nutritives, à la fin de l'expérience, a

montré que le Cu avait inhibé la croissance du champignon. Le Zn, quant à lui, n'avait pas inhibé la croissance du champignon ni augmenté la synthèse du PHL, ce que laissent supposer les expériences *in vitro*. Il avait agi indirectement, en réprimant la synthèse de l'acide fusarique. Le Zn avait donc créé un espace sans acide fusarique, permettant ainsi à CHA0 de synthétiser du PHL et de protéger les plantes.

- **Effets secondaires des éléments-traces :** l'apparition d'effets secondaires indésirables doit être prise en considération avant de modifier la nutrition minérale des plantes. Une analyse de régression a indiqué que la pourriture du collet et des racines de tomate causée par le *F. oxysporum* f. sp. *radicis* était augmentée par l'apport de NH_4^+ , de NaH_2PO_4 , Fe-EDDHA, MnSO_4 , MoO_3 ou ZnSO_4 . Des taux bas de NH_4NO_3 (39-79 mg N/L) ont réduit le degré de maladie, mais des taux élevés (plus de 100 mg N/L) ont eu un effet contraire. La concentration de Zn (33 mg/L), utilisée pour améliorer l'efficacité du contrôle biologique, était la concentration la plus élevée possible pour ne pas aggraver la maladie. La fertilisation avec du $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ou du CuSO_4 a réduit l'intensité de la maladie et pourrait être exploitée pour contrôler la pourriture du collet et des racines de tomate. Les effets indésirables sur d'autres bactéries, agents de lutte biologique, doivent aussi être pris en considération. Toutes les souches génétiquement proches de CHA0 (groupe ARDRA 1) ont poussé relativement bien en présence de 0.7 mM de sulfate de Zn, alors que les souches des autres groupes ARDRA ont été inhibées par des concentrations supérieures à 0.2 mM.

Cette thèse documente, pour la première fois, les risques posés par l'instabilité génétique des inoculants et par les signaux moléculaires négatifs (acide fusarique) de l'agent pathogène sur l'efficacité de la lutte biologique. L'utilisation d'éléments-traces, en particulier du Zn, a permis d'améliorer la stabilité génétique, de stimuler la synthèse de substances antimicrobiennes et d'augmenter l'efficacité de la lutte biologique par des *Pseudomonas fluorescens*.