



## Doctoral Thesis

# **Mechanisms of suppression of plant diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: performance of GACA mutants, influence of salicylic acid overproduction, analysis of extracellular enzymes**

**Author(s):**

Schmidli-Sacherer, Priska

**Publication Date:**

1996

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-001693037> →

**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](#).

Diss ETH Nr. 11761

**MECHANISMS OF SUPPRESSION OF PLANT DISEASES BY  
*PSEUDOMONAS FLUORESCENS* CHA0: PERFORMANCE OF  
GACA MUTANTS, INFLUENCE OF SALICYLIC ACID  
OVERPRODUCTION, ANALYSIS OF EXTRACELLULAR ENZYMES**

A dissertation submitted to the

**SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH**

for the degree of  
Doctor of Natural Sciences

presented by

**PRISKA SCHMIDLI-SACHERER**

Dipl. sc. nat. ETH  
born January 30th, 1965  
citizen of Villmergen AG and Zurich ZH

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. M.S. Wolfe, examiner

Prof. Dr. G. Défago, co-examiner

Prof. Dr. D. Haas, co-examiner

1996

## SUMMARY

*Pseudomonas fluorescens* suppresses soilborne plant diseases in the field and in the greenhouse. Strain CHA0 produces the siderophores pyoverdine (Pvd), pyochelin (Pch) and salicylic acid (Sal). Furthermore, the strain produces the secondary metabolites cyanide (HCN), 2,4-diacetylphloroglucinol (Phl) and pyoluteorin (Plt) which all play an important role in disease suppression. HCN, Phl and Plt are regulated by the *gacA*-gene-product. *GacA* mutants have lost the ability to produce HCN, Phl and Plt and to suppress black root rot of tobacco. The purpose of this study was to test in which plant-pathogen systems *gacA* plays a role in disease suppression, which other metabolites are under the control of the *gacA*-gene-product and, further, to investigate if Sal-overproduction in the wild-type and the *gacA* mutant can improve disease suppression.

Previous analyses showed that the *gacA* mutant CHA89 does not suppress black root rot of tobacco. In this study the performance of the mutant was tested in other plant-pathogen-systems under gnotobiotic conditions. Cress and cucumber plants were not protected against *Pythium* damping-off. In contrast, wheat was still protected against *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and *Pythium ultimum* at wild-type level as well as maize against *P. ultimum*. However, the *gacA* mutant did not inhibit the growth of several plant pathogens on agar plates.

Since mutants defective in pyoverdine biosynthesis or in the *gacA* regulator were able to protect wheat with wild-type efficiency, a *GacA*<sup>-</sup> *Pvd*<sup>-</sup> mutant, named CHA496, was constructed by marker exchange. Strain CHA496 was still able to suppress take-all and root rot of wheat. This mutant overproduced the siderophores Pch and Sal compared to the wild-type and to strain CHA89. The production of siderophores by bacteria is suppressed in iron rich media. When iron was added to the media no Sal and Pch was produced by either strain CHA0 or strain CHA496. Iron addition to soil reduced significantly the suppression of wheat diseases by strain CHA496. Since Sal and Pch are regulated by iron, it might be that they are involved in the disease suppressive ability of the *GacA*<sup>-</sup> *Pvd*<sup>-</sup> mutant. The influence of unknown iron regulated metabolites harboring a suppressive effect cannot be excluded. We demonstrated that the *GacA*<sup>-</sup> mutant has a suppressive activity against diseases of graminaceous species but not against diseases of dicotyledonous plants.

Introduction of the plasmid pME3377, carrying the Sal biosynthetic genes *pchBA* of *P. aeruginosa*, into strain CHA0, resulted in an increased Sal-production *in vitro*. Increased Sal-production by strain CHA0/pME3377 was also measured in the rhizosphere of tobacco. The suppression of *Thielaviopsis basicola* causing black root rot of tobacco was enhanced, i.e. plant fresh weight was increased and the chlamydospores and the endoconidia on the roots were reduced. However, the suppression of *Pythium* root rot on wheat was not increased. Introduction of the plasmid pME3377 in the *gacA* mutant did not increase the suppression of *T. basicola* compared to the *gacA* mutant. These results indicate that the suppression of *T. basicola* infection of tobacco may be important not by enhanced Sal production alone, but probably by additional antibiotics and/or HCN production. Further, we suggest that Sal-production controlled by the chromosomal Sal biosynthetic genes may vary in the rhizosphere of different plant species due to differences in the root exudates.

Three extracellular enzymes, a 47 kDa protease, a phospholipase C and a lipase are produced by *P. fluorescens* strain CHA0. The protease and the phospholipase C, but not

the lipase, are regulated by the *gacA* gene product. We conclude that the *gacA* gene product is required not only for antibiotic synthesis but also for the production of two stationary-phase exoenzymes.

In conclusion, the results presented show that the ability of the GacA<sup>-</sup> mutant and the GacA<sup>-</sup> Pvd<sup>-</sup> mutant to suppress soilborne pathogens, as well as improved disease suppression by the Sal-overproducer, depends on the plant species. Pch and Sal may play a role in the suppression of wheat and maize diseases, but not in the disease suppression of cress and cucumber. Enhanced Sal production can improve protection of tobacco but probably only in the presence of HCN and/or antibiotics. Two enzymes, a protease and a phospholipase C, are regulated by the *gacA*-gene-product in addition to HCN, Phl, Plt and TSO.

## ZUSAMMENFASSUNG

*Pseudomonas fluorescens* Stamm CHA0 unterdrückt bodenbürtige Pflanzenkrankheiten in Feld- und Gewächshausversuchen. Stamm CHA0 produziert die Siderophoren Pyoverdin (Pvd), Pyochelin (Pch) und Salicylsäure (Sal), sowie die Sekundärmetaboliten Cyanid (HCN), 2,4-Diacetylphloroglucinol (Phl) und Pyoluteorin (Plt), welche eine wichtige Rolle in der Krankheitsunterdrückung spielen. HCN, Phl und Plt unterliegen der globalen Regulation durch das *gacA*-Gen. Eine Mutation in diesem Gen hat zur Folge, dass die Fähigkeit zur Cyanid- und Antibiotika-Produktion sowie zur Suppression von *Thielaviopsis basicola* verloren geht. In der vorliegenden Arbeit sollte abgeklärt werden, in welchen Pflanzen-Pathogen-Systemen *gacA* von Bedeutung für die Suppressivität ist und welche weiteren Metaboliten durch *gacA* reguliert werden. Ausserdem wurde der Einfluss einer erhöhten Sal-Produktion, durch Einführung eines Plasmids in Stamm CHA0 und in die GacA<sup>-</sup> Mutante, auf die Krankheitsunterdrückung untersucht.

Da sowohl die *gacA* Mutante als auch eine Pvd<sup>-</sup> Mutante Weizen gleich gut vor Wurzelpathogenen schützte wie der Wildstamm CHA0, wurde durch Genaustausch eine GacA<sup>-</sup> Pvd<sup>-</sup> Mutante, Stamm CHA496, konstruiert. Diese Doppelmutante unterdrückte jedoch die Schwarzbeinigkeit und *Pythium*-Wurzelfäule von Weizen weiterhin. Verglichen mit dem Wildstamm und Stamm CHA89 produzierte Stamm CHA496 in Kulturmedien vermehrt die Siderophoren Pch und Sal. Es ist bekannt, dass Eisenüberschuss in Nährmedien die Siderophoren-Produktion von Bakterien unterdrückt. Sowohl die Produktion von Sal als auch von Pch durch Stamm CHA0 und CHA496 konnte in eisenreichen Medien nicht mehr nachgewiesen werden. Weiter wurde festgestellt, dass auch die Unterdrückung von Weizenkrankheiten durch Zugabe von Eisen signifikant herabgesetzt werden konnte. Es scheint daher, dass die Suppressivität der GacA<sup>-</sup> Pvd<sup>-</sup> Mutanten durch Pch und/oder Sal verursacht wird, da deren Synthese durch Eisen unterdrückt werden kann. Der Einfluss von weiteren bis jetzt unbekanntem Metaboliten mit suppressiver Wirkung, die durch Eisen reguliert werden, kann nicht ausgeschlossen werden. Zusammenfassend kann aber gesagt werden, dass GacA<sup>-</sup> Mutanten eine suppressive Aktivität gegen Krankheiten von Gramineen nicht aber gegen Krankheiten von dikotylen Pflanzen besitzen.

Die Einführung des Plasmids pME3377, welches die Sal-Biosynthesegene *pchBA* von *P. aeruginosa* trägt, in Stamm CHA0 bewirkte eine Erhöhung der Sal-Produktion *in vitro*. Stamm CHA0/pME3377 verbesserte den Schutz von Tabak gegenüber der schwarzen Wurzelfäule verursacht durch *T. basicola*. Es zeigte sich, dass nicht nur das Pflanzenfrischgewicht erhöht war, sondern dass auch die Chlamydosporen und Endokonidien auf den Wurzeln reduziert wurden. Weiter konnte die erhöhte Produktion von Sal durch Stamm CHA0/pME3377 auch direkt in der Rhizosphäre von Tabak nachgewiesen werden. Die durch Einführung des Plasmids pME3377 hervorgerufene erhöhte Sal-Produktion ergab *in vitro* keine erhöhte Wachstumshemmung von *T. basicola* gegenüber dem Wildstamm. Weiter konnte Stamm CHA0/pME3377 Weizenpflanzen gegenüber *P. ultimum* nicht besser schützen als der Wildstamm. Wurde das Plasmid in die GacA<sup>-</sup> Mutante eingeführt, konnte im System Tabak-*T. basicola* keine verbesserte Schutzwirkung gegenüber der GacA<sup>-</sup> Mutanten ohne Plasmid erzielt werden. Es scheint daher, dass die chromosomal gesteuerte Sal-Produktion von der Pflanzenspezies

beeinflusst werden könnte. Ein verbesserter Schutz wurde erreicht, wenn erhöhte Mengen von Sal zusätzlich zu Cyanid und Antibiotika produziert wurde.

Neben der Tryptophan side chain oxidase (TSO) wurden drei weitere extrazelluläre Enzyme, eine Protease, eine Phospholipase C und eine Lipase, welche durch *P. fluorescens* Stamm CHA0 synthetisiert werden, gefunden. Protease und Phospholipase C unterstehen der Regulation durch das *gacA*-Gen-Produkt, nicht aber die Lipase. Eine genauere Analyse der Protease ergab, dass es sich um eine Metalloprotease handelt, die eine Grösse von 47 kDa besitzt. Zusammengefasst kann gesagt werden, dass neben antibiotischen Stoffen auch Enzyme der stationären Wachstumsphase unter der Kontrolle von *gacA* stehen.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass sowohl die Fähigkeit der GacA<sup>-</sup> und der GacA<sup>-</sup> Pvd<sup>-</sup> Mutanten vor Wurzelpathogenen zu schützen, als auch eine Verbesserung der Krankheitsunterdrückung durch den Sal-Überproduzenten von der Pflanzenspezies beeinflusst wird. Pch und/oder Sal könnten eine Rolle in der Suppression von Wurzelkrankheiten bei Weizen und Mais spielen, nicht aber bei Kresse und Gurke. Die erhöhte Produktion von Sal in Stamm CHA0 scheint nur additiv zu Cyanid und/oder Antibiotika zu einer verbessernden Schutzwirkung zu führen. Neben HCN, Phl, Plt und TSO werden weiter auch eine Protease und eine Phospholipase C durch das *gacA*-Gen-Produkt reguliert.