

Diss. ETH No. 20200

IMPACT OF GENETICALLY MODIFIED WHEAT ON PLANT-BENEFICIAL ROOT-COLONIZING PSEUDOMONADS

A dissertation submitted to
ETH ZURICH

for the degree of

DOCTOR OF SCIENCES

presented by

JOANA BEATRICE MEYER
Master of Science in Biology, Evolution and Conservation
University of Lausanne

born June 17, 1982
citizen of Basel and Pratteln (BL)

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Bruce McDonald
Prof. Dr. Josef Zeyer
Dr. Monika Maurhofer
Dr. Christoph Keel

2012

ABSTRACT

Plant-beneficial fluorescent pseudomonads are widely recognized as a crucial natural component of agricultural soil. They are associated with many different crops and are especially known to be important for wheat production. The main aim of this thesis - in the context of the National Research Program (NRP) 59 - was to evaluate the impact of genetically modified (GM) wheat on specific groups of beneficial pseudomonads that can improve plant growth by increasing the bioavailability of phosphate (P) through P-solubilization and that suppress soil-borne diseases through production of the antifungal compound 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG).

In a risk assessment study of GM plants it is necessary to dispose of molecular tools, which are sensitive enough to distinguish between microbial communities colonizing roots of different plant genotypes. Within this thesis, molecular methods for the study of *Pseudomonas* communities in the wheat rhizosphere were tested, optimized or newly developed. At first, the methods Most Probable Number (MPN) combined with *phlD*-PCR for determination of population sizes, *phlD*-DGGE for studying community diversity and a *phlA* expression assay were used to study DAPG producing pseudomonads. These methods allowed the detection of differences, in *Pseudomonas* abundance, diversity and antifungal substance expression between different wheat cultivars and gave insight into the complex interaction between different soil environments, pseudomonads and crop plants at the cultivar level.

Studies investigating the diversity of P-solubilizing pseudomonads had so far relied on their isolation on insoluble P-containing media and subsequent genotyping using mostly the 16S rRNA gene. Therefore, in a second part of the thesis, a cultivation-independent method was developed, allowing to study the diversity of P-solubilizing pseudomonads based on a gene involved in the solubilization process. To this end *Pseudomonas*-specific primers targeting the *pqqC* gene involved in P-solubilization were developed and *pqqC* fragments from a collection of *Pseudomonas* reference strains and wheat root isolates were amplified and sequenced. The *pqqC* phylogenetic tree obtained with these sequences displayed the same resolution power than the tree constructed with the sequences of the two-reference genes *rpoD* and *gyrB*. *pqqC* sequence analysis showed that *pqqC* is a conserved gene and under purifying selection. In summary, *pqqC* proved to be a suitable molecular marker for the study of diversity and evolution of plant-beneficial pseudomonads. The *pqqC* phylogeny was furthermore linked to the phosphate-solubilization activity and among fluorescent pseudomonads a group of DAPG-producing pseudomonads showed to be particularly strong P-solubilizers. Finally, a *pqqC*-DGGE technique to study the diversity of P-solubilizing pseudomonads with DNA amplified directly from roots of field-grown wheat was developed.

The impact of GM wheat carrying the race-specific mildew resistance gene *pm3b* or the general disease resistance genes *chi/glu* encoding a barley glucanase and a chitinase on population sizes and

structure of plant-beneficial pseudomonads was assessed in a large field study over three years and two locations. Bacterial abundance and diversity on the roots of GM wheat in comparison to non-GM wheat were studied with the optimized or newly developed MPN, *phlD*-PCR-MPN, *phlD*-and *pqqC*-DGGE techniques mentioned above. Additionally a *phlD*-T-RFLP and a *phlD* cloning/sequencing approach were used. In order to assess the amplitude of putative transgene impacts, they were compared with impacts of other factors related to wheat production, such as wheat cultivar, plant age, mildew infection, fungicide and fertilizer application, field location and the cropping season.

The obtained results showed that GM lines had certain effects on abundance, and diversity of P-solubilizing and DAPG-producing pseudomonads. These effects were, however, minor and inconsistent as i) they changed from one sampling time to the other, ii) differences between GM and non-GM wheat remained within the natural variation found for conventional wheat cultivars and iii) transgene impacts were considerably smaller than impacts caused by other factors acting on an agricultural ecosystem. A further important result was that differences found between GM lines and the parental cultivar (especially with respect to *Pseudomonas* abundance, *pqqC* diversity and DAPG gene expression) were often also present between the non-GM control sister lines and the parental line. This indicates that plant production procedures had a strong effect on root-colonizing pseudomonads. GM and non-GM control sister lines were generated through callus cultures and subsequently propagated in the greenhouse, whereas conventional cultivars were propagated in the field. This might have caused physiological changes in the plant resulting in altered activity and community structures of the bacteria colonizing the roots.

In summary, GM wheat with inserted *pm3b*, *chi* and *glu* transgenes had a minor and negligible impact on natural plant-beneficial *Pseudomonas* communities. Through repeated samplings over three seasons and two plant development stages it was possible to gain a close insight into the population dynamics of DAPG producing and P-solubilizing pseudomonads in wheat fields and to identify different factors shaping communities of these important microorganisms. Furthermore, this study demonstrates that *phlD*-T-RFLP, *phlD*-DGGE and *pqqC*-DGGE in combination with cloning/sequencing are highly sensitive molecular tools which detect even very subtle differences in *Pseudomonas* communities and are thus valuable tools which would be well suited for further impact studies, also on other GM crops than wheat.

ZUSAMMENFASSUNG

Pflanzennützliche fluoreszierende Pseudomonaden sind wichtige natürliche Komponenten landwirtschaftlicher Erde. Diese Bakterien sind mit vielen Pflanzenkulturen assoziiert und vor allem als wichtige Komponenten in der Weizenproduktion bekannt. Das Hauptziel dieser Arbeit war, im Rahmen des Nationalen Forschungsprojekt NFP59, die Einflüsse genetisch manipulierter (GM) Weizenpflanzen auf nützliche Bodenbakterien zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden spezifische Gruppen von Pseudomonaden ausgewählt. Diese fördern das Pflanzenwachstum, indem sie schwerlösliche Phosphate (P) für die Pflanzen verfügbar machen und bodenbürtige Pflanzenpathogene durch die Produktion der antimykotischen Substanz 2,4-Diacetylphlorogucinol (DAPG) unterdrücken.

Für eine Risikostudie über GM-Pflanzen ist es notwendig, über Methoden zu verfügen, die genügend sensitiv sind, um Unterschiede zwischen wurzelkolonisierenden mikrobiellen Konsortien auf verschiedenen Pflanzengenotypen zu detektieren. In dieser Dissertation wurden molekulare Methoden für die Untersuchung von *Pseudomonas*-Konsortien in der Weizen-Rhizosphäre getestet, optimiert und neu entwickelt. Zuerst wurden die Methoden Most Probable Number (MPN) und *phlD*-PCR kombiniert und Aussagen über die Populationsgrößen von *Pseudomonas* gemacht. Die Methode *phlD*-DGGE wurde verwendet, um die bakterielle Vielfalt zu studieren und die Expression von dem *phlA* Gen wurde gemessen, um die DAPG Produktion zu untersuchen. Diese Methoden ermöglichten es, die Häufigkeit der Pseudomonaden, die Vielfalt und die Expression antimikrobieller Substanzen auf verschiedenen Weizensorten zu vergleichen. Zusätzlich wurden einige der komplexen Interaktionen, welche zwischen verschiedene Bodentypen, Bakterien und Kulturpflanzen vorkommen, erforscht.

Studien, welche die Vielfalt der P-lösenden Pseudomonaden untersuchen, beruhten bisher auf der Kultivierung der Bakterien auf Medien, die schwerlösliche Phosphate enthalten und anschließender Genotypisierung, hauptsächlich anhand des 16S rRNA-Genes. Deshalb wurde in einem zweiten Teil dieser Arbeit eine kultivierungsunabhängige Methode entwickelt. Diese erlaubt es, die Vielfalt der P-lösenden Pseudomonaden basierend auf einem Gen, welches im Prozess der P-Lösung beteiligt ist, zu studieren. Zu diesem Zweck wurden *Pseudomonas*-spezifische Primer entwickelt, die das *pqqC* Gen amplifizieren. Damit wurden *pqqC* Fragmente aus einer Sammlung von *Pseudomonas*-Stämmen und Weizenwurzelisolaten sequenziert. Der phylogenetische Stammbaum, welcher aus diesen *pqqC*-Sequenzen erstellt wurde, zeigte eine gleich gute Auflösung wie der Stammbaum, welcher mit den zwei Vergleichsgenen *rpoD* und *gyrB* erstellt wurde. *pqqC* Sequenzanalysen zeigten, dass das *pqqC* Gen konserviert ist und unter reinigende Selektion steht. Zusammenfassend erwies sich *pqqC* als ein geeigneter molekularer Marker für die Untersuchung der Vielfalt und Evolution pflanzennützlicher Pseudomonaden. Die *pqqC* Phylogenie wurde zudem mit der P-lösenden Aktivität verglichen und es wurde eine Gruppe von DAPG-produzierenden fluoreszierenden Pseudomonaden identifiziert, die

besonders gut P lösen können. Schliesslich konnte eine *pqqC*-DGGE-Technik zur Untersuchung der Vielfalt der P-lösenden Pseudomonaden, welche mit direkt von der Wurzel amplifizierter DNA arbeitet, entwickelt werden.

Der Einfluss von GM Weizen, welchem das sortenspezifische Mehltaresistenzgen *pm3b* oder die generellen Gersten Krankheitsresistenzgene *chi/glu*, die für Chitiniase und Glukanase kodieren, eingeführt wurde, auf die Populationsgrösse und Struktur von pflanzennützlichen Pseudomonaden wurde analysiert. Dieser GM Weizen wurde in einem Feldversuch angepflanzt, welcher an zwei Standorten über drei Jahre durchgeführt wurde. Die Menge und Vielfalt der Bakterien auf den Wurzeln des GM Weizens wurde mit derjenigen auf nicht GM Weizen verglichen. Dieser Vergleich wurde mithilfe der oben erwähnten optimierten oder neu entwickelten Techniken MPN, *phlD*-PCR-MPN, *phlD*- und - *pqqC* DGGE durchgeführt. Zusätzlich wurde eine *phlD*-T-RFLP und eine *phlD*-Klonierung/Sequenzierung verwendet. Um eine Aussage über die Tragweite des hypothetischen Einflusses der Transgene machen zu können, wurde dieser mit dem Einfluss von anderen Faktoren auf die Weizenproduktion verglichen, wie zum Beispiel die Weizensorte, das Pflanzenentwicklungsstadium, die Mehltauinfektion, die Verwendung von Fungizid und Dünger, der Standort und das Versuchsjahr.

Die erhaltenen Resultate zeigten Effekte von GM-Linien auf die Häufigkeit und Vielfalt von P-lösenden und DAPG-produzierenden Pseudomonaden. Diese Effekte war jedoch klein und inkonsistent da sie i) von Probennahme zu Probennahme änderten ii) der Unterschied zwischen GM und nicht GM im Bereich der natürlichen Variation zwischen normalen Weizensorten und blieb und iii) transgene Einflüsse vergleichsweise kleiner waren als Einflüsse anderer Faktoren, welche in der Landwirtschaft auftreten. Als weiteres wichtiges Resultat stellte sich heraus, dass Unterschiede, die zwischen den GM Linien und den Ursprungslinien vorkamen, oft auch zwischen den nicht-GM Kontroll-Schwesterlinien und den Ursprungslinien gefunden wurden, besonders was die Pseudomonaden Häufigkeit, die *pqqC* Vielfalt und DAPG Genexpression anbelangt. Dies impliziert einen starken Einfluss der Pflanzenproduktionsprozesse auf wurzelkolonisierende Pseudomonaden. GM- und nicht-GM-Kontroll-Schwesterlinien wurden aus Kalluskulturen hervorgegangen und anschließend im Gewächshaus vermehrt worden, wohingegen konventionelle Weizensorten im Feld vermehrt wurden. Dies könnte eine Veränderung der pflanzenspezifischen Aktivitäten und Konsortienstrukturen der wurzelkolonisierenden Bakterien zur Folge gehabt haben.

Abschließend kann gesagt werden, dass GM-Weizen mit eingefügten *pm3b* und *chi/glu* Genen nur einen kleinen und unerheblichen Einfluss auf natürliche Konsortien von pflanzennützlichen Pseudomonaden hatte. Durch wiederholtes Untersuchen von Bakterien-Proben über drei Saisons und zwei Pflanzenentwicklungsstadien hinweg war es möglich eine detaillierte Einsicht in die Populationsdynamik von DAPG-produzierenden und P-lösenden Pseudomonaden auf Weizenfelder zu erlangen und verschiedene wichtige Faktoren zu identifizieren, welche die mikrobiellen Konsortien

beeinflussen. Diese Studie zeigt, dass die Methoden *phlD* - DGGE und -T-RFLP, sowie *pqqC*-DGGE in Kombination mit Klonierung/Sequenzierung hochsensitive molekulare Instrumente sind, mit denen sogar äusserst subtile Unterschiede zwischen *Pseudomonas*-Konsortien aufgezeigt werden können. Diese Methoden stellen daher wertvolle Werkzeuge dar, welche in weiteren Risikostudien auch mit anderen GM-Kulturpflanzen angewendet werden können.