

Thèse EPFZ No 8663

**ETUDE GENETIQUE DE *PSEUDOMONAS FLUORESCENS*
CHAO,
UNE SOUCHE ANTAGONISTE
DE CHAMPIGNONS PHYTOPATHOGENES**

présentée à
l'école polytechnique fédérale de ZÜRICH
pour l'obtention
du titre
de Docteur ès sciences naturelles

par
CHRISTOPHE VOISARD
dipl. ing. agr. EPFZ
né le 20 octobre 1959
originaire de FONTENAI (JU)

acceptée sur proposition
du privatdocent Dr. D. Haas, rapporteur
du privatdocent Dr. G. Défago, corapporteuse
du professeur Dr. H. Hennecke, corapporteur



ADAG Administration & Druck AG

Zürich 1988

5. RESUME

La souche de Pseudomonas fluorescens CHA0 supprime les infections de certains champignons phytopathogènes teluriques sur leur hôtes végétaux. Le but de ce travail est la mise au point d'un système génétique spécifique à P. fluorescens CHA0 pour l'étude des facteurs impliqués dans la suppression des agents phytopathogènes par CHA0. Les instruments génétiques mis au point au cours de cette étude pour P. fluorescens CHA0 sont le transfert conjugatif de plasmides à large spectre d'hôtes, la mutagenèse par insertion de transposon, la construction d'une banque génomique et la mutagenèse dirigée par remplacement de gènes.

Le transfert conjugatif du plasmide à large spectre d'hôtes RP1 (IncP-1) dans CHA0 se heurte à une barrière due à un ou plusieurs facteurs portés par le plasmide même. La délétion d'une région de RP1 située entre les coordonnées 30 kb et 43 kb incluant les gènes de la résistance à la kanamycine, de la séquence d'insertion IS21, de la primase et d'autres fonctions non-déterminées permet d'améliorer le transfert de RP1 dans CHA0 d'un facteur de 1000. La mutagenèse de P. fluorescens CHA0 par insertion des transposons Tn5-259 et Tn1733 et la mobilisation de cosmides dérivés de plasmides IncP-1 dans cette souche sont réalisables grâce des dérivés de pME305, un plasmide provenant de RP1 ayant une délétion dans la région inhibant le transfert de RP1 dans CHA0.

Plusieurs autres systèmes de mutagenèse par insertion de transposon sont testés chez CHA0. Le plasmide pLG221 (IncI α), porteur de Tn5, donne les meilleures résultats et permet d'obtenir des insertions de Tn5 dans CHA0 avec une fréquence de 10^{-7} par donneur. Les mutants auxotrophes pour plusieurs acides aminés obtenus par insertion de Tn5 indiquent que ce transposon s'insère de manière aléatoire dans le génome de CHA0.

La mutagenèse par insertion de transposon a permis d'obtenir 10 mutants affectés dans la production de sidérophores et 4 mutants affectés dans la production d'acide cyanhydrique, deux métabolites produit par P. fluorescens CHA0 et susceptibles d'être responsables de la suppression des agents phytopathogènes.

Par complémentation de CHA500, un mutant Hcn⁻ obtenu lors d'une mutagenèse par transposon avec pME12 (=pME305::Tn5-259), avec une banque génomique de CHA0 construite dans le vecteur pVK100, 2 groupes de cosmides ne partageant pas d'homologie sont isolés. Le premier groupe porte un fragment HindIII commun de 8,4 kb, sous-cloné sur pME3013. Le second groupe porte un fragment HindIII commun de 19,1 kb présent entre autre sur pME3008. Les expériences d'hybridation révèlent que l'insertion Tn5-259 dans CHA500 ne se trouve dans aucune des 2 régions portées par pME3013 et pME3008, complétant son phénotype Hcn⁻. Par contre, une délétion de 4,9 kb est

présente dans le fragment de CHA500 correspondant au fragment HindIII de 19,1 kb cloné sur pME3008.

Les 3 autres mutants Hcn⁻ obtenus par insertion de Tn5 dans CHA0, CHA501, CHA503 et CHA505 sont complémentés par pME3013, mais pas par pME3008. P. fluorescens P3, une souche sauvage naturellement Hcn⁻, est capable de produire de l'acide cyanhydrique lorsqu'elle porte pME3013, par contre elle reste Hcn⁻ lorsqu'elle héberge pME3008.

Une méthode de mutagenèse dirigée par recombinaison homologue, mise au point pour CHA0, a permis d'obtenir des mutants Hcn⁻ dont les gènes hcn, clonés sur pME3013, sont inactivés par l'insertion d'une résistance au mercure.

Une technique permettant l'introduction stable des gènes hcn par transposition dans le génome de la souche de P. fluorescens P3 est également mise au point.

Un mutant Hcn⁻, CHA5, obtenu par le remplacement des gènes hcn⁺ dans la souche sauvage CHA0 par des gènes hcn inactivés, et un mutant Hcn⁺ de P. fluorescens P3, obtenu par transposition des gènes hcn dans le génome de la souche P3, permettent de démontrer que la production d'acide cyanhydrique par les bactéries du sol supprime en partie les attaques de Thielaviopsis basicola sur Nicotiana glutinosa (C.KEEL, communication personnelle).

6. SUMMARY

Pseudomonas fluorescens strain CHA0 suppresses the infections caused by certain soil-borne phytopathogenic fungi. The aim of this work is to establish genetic tools specific to P. fluorescens CHA0 for the study of the mechanisms by which CHA0 suppresses phytopathogenic agents. Conjugative transfer of broad-host-range plasmid, mutagenesis by transposon insertion, the construction of a genomic bank and directed mutagenesis by gene replacement are the tools which have been established for the study of P. fluorescens CHA0 during this work.

The conjugative transfer of the broad-host-range plasmid RP1 (IncP-1) into CHA0 is impeded by a barrier formed by one or more factors encoded on the plasmid itself. The deletion of an RP1 region between the RP1 coordinates 30 kb and 43 kb inclusive of the genes coding for kanamycin resistance, primase, the IS21 insertion and different yet undetermined functions element improves the transfer of RP1 into CHA0 by a factor of 1000. Mutagenesis of P. fluorescens CHA0 by the insertion of the transposon Tn5-259 and Tn1733 and mobilization of cosmids derived from IncP-1 plasmids into CHA0 become possible with the aid of pME305 derivatives; pME305 is a plasmid derived from RP1 lacking the region hindering the conjugative transfer of RP1 into CHA0.

Other transposon mutagenesis systems were tested with CHA0. The IncI α plasmid pLG221, carrying Tn5, allows the generation of Tn5 insertions in CHA0 with a frequency of 10^{-7} per donor. Auxotrophic mutants for many amino acids were obtained by Tn5 insertion, indicating that this transposon inserts randomly in the CHA0 genome.

Transposon mutagenesis has permitted the isolation of 10 mutants affecting siderophore production (Pvd $^{-}$) and 4 mutants affecting cyanide production (Hcn $^{-}$). These two metabolites which are produced by P. fluorescens CHA0 are thought to be involved in the suppression of phytopathogenic agents.

The complementation of CHA500, a Hcn $^{-}$ mutant obtained by transposon mutagenesis with pME12 (=pME305::Tn5-259), with a genomic bank of CHA0 cloned in the vector pVK100 allowed the isolation of 2 groups of unrelated cosmids. The cosmids of the first group carry a common 8,4 kb HindIII fragment which has been subcloned in pME3013. Those of the second group carry a common 19,1 kb HindIII fragment which has been cloned in pME3008. Hybridization experiments show that the Tn5-259 insertion in CHA500 is in none of the 2 regions cloned in pME3013 and pME3008. In contrast, CHA500 has a 4,9 kb deletion within the fragment corresponding to the 19,1 kb HindIII fragment cloned in pME3008.

Three other Hcn $^{-}$ mutants obtained by Tn5 insertion in CHA0, CHA501, CHA503 and CHA505 are complemented by pME3013 but not pME3008. In addition, P. fluorescens P3,

a Hcn⁻ wild-type , is able to produce cyanide when it carries pME3013, but it remains Hcn⁻ carrying pME3008.

A mutagenesis method allowing the replacement of wild-type genes by mutated alleles was developed for CHA0. By this method the hcn genes, cloned in pME3013, were replaced by hcn genes inactivated by the insertion of a mercury resistance, leading to Hcn⁻ strain CHA5.

The hcn genes were introduced stably into the genome of P. fluorescens P3 by transposition of a Tn5-derivative carrying hcn genes, leading to the Hcn⁺ strain P3::Tnhcn.

The Hcn⁻ mutant CHA5 and the Hcn⁺ P3::Tnhcn allowed to demonstrate that cyanide production by these soil-bacteria suppresses in part the symptoms caused by the infections of Thielaviopsis basicola on Nicotiana glutinosa (C.KEEL, personal communication).