

# Genomics, Molecular Mechanisms and Ecology of Interactions of Plant-Beneficial Pseudomonads with Pest Insects

**Doctoral Thesis**

**Author(s):**

Flury, Pascale C.

**Publication date:**

2016

**Permanent link:**

<https://doi.org/https://doi.org/10.3929/ethz-b-000161389>

**Rights / license:**

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

DISS. ETH NO. 23940

**GENOMICS, MOLECULAR MECHANISMS AND ECOLOGY OF  
INTERACTIONS OF PLANT-BENEFICIAL PSEUDOMONADS  
WITH PEST INSECTS**

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH  
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

PASCALE CHRISTINA FLURY

M Sc in Plant Science, University of Basel  
born on 07.03.1987  
citizen of Basel (BS) and Balsthal (SO)

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Bruce McDonald  
Dr. Monika Maurhofer  
Prof. Dr. Philipp Engel  
Dr. Christoph Keel

2016

## SUMMARY

This thesis focuses on the insecticidal activity of root-colonizing bacteria, phylogenetically belonging to the *Pseudomonas fluorescens* group. Strains of this group have been known for a long time for their plant beneficial effects, such as the suppression of soil-borne diseases, the induction of systemic resistance in the plant, and the promotion of plant growth. The discovery that certain strains have the additional ability to infect and kill insects, raised many questions about the molecular basis, the ecological relevance, and the agronomic potential of this trait. The main goal of this thesis was to gain a better understanding of these different aspects of insecticidal activity, with a focus on the infection process. We specifically aimed at identifying pathogenicity factors, assessing the role of insects as alternative hosts for dispersal, and exploring the insecticidal potential within the *P. fluorescens* group as reservoir for new biocontrol agents against insect pests.

In a first part, the phylogenetic distribution of plant-beneficial and insecticidal traits within the *P. fluorescens* group was investigated in experiments with twenty-six different strains. This revealed that strains with plant-beneficial traits are present throughout the entire *P. fluorescens* group, whereas strong insecticidal activity is restricted to a phylogenetically distinct sub-clade comprising the two species *Pseudomonas protegens* and *Pseudomonas chlororaphis*. It was hypothesized that strains with insecticidal activity may share specific traits that allow the infection of insects. In order to discover these traits, the genomes of twenty-four of the tested strains were sequenced and subjected to a comparative genomics analysis, which revealed over two hundred genes, common and unique to insecticidal strains. This selection of genes comprises the *fit* gene cluster, which is responsible for the production of Fit toxin, the only previously known insecticidal factor, but also several new, promising candidate toxicity factors. Four of them were subsequently deleted in the genome of model strain *P. protegens* CHA0 and mutants lacking either a specific chitinase or a phospholipase were found to exhibit attenuated virulence in oral infections of larvae of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. In addition, mutants deficient for the production of various antimicrobial metabolites, which are important for the suppression of root-pathogenic fungi, were tested for insecticidal activity. This screening revealed that hydrogen cyanide along with different cyclic lipopeptides are essential for full virulence.

The aim of the second part of this thesis was to shed light on ecological aspects of insects as alternative hosts for plant-beneficial pseudomonads, especially on their potential to transmit the bacteria to a new host plant. The adult stage of root-feeding larvae generally emerges from the soil and searches for new host plants to deposit eggs, which could provide a mechanism for dispersal of rhizobacteria with otherwise very limited potential to spread over large distances. We tested *P. protegens* CHA0 for its ability to persist in insects upon ingestion by larvae, a prerequisite for dispersal. Indeed, the bacteria were transstadially transmitted to the pupal and the adult stage in three insect species of different orders. Furthermore, we could show that *P. protegens* CHA0 can be transmitted to the roots of a new plant host by cabbage root flies, *Delia radicum*, that had emerged from larvae feeding on CHA0-colonized roots, which gives first evidence for the possibility of insect-mediated dispersal of this bacterium by a root pest.

The results obtained in this thesis suggest the existence of different kinds of associations of plant-beneficial pseudomonads with insects, from commensal to pathogenic. In many cases, the bacteria are able to persist in insects and potentially use them as vectors, but in others they multiply to high numbers, thereby causing lethal infections and then use the insect cadaver as a source of nutrients. The dual activity of certain fluorescent pseudomonads against both root diseases and insect pests renders these bacteria interesting agents for biocontrol. However, further studies will be needed to comprehensively understand the mechanisms underlying insecticidal activity, to define the host range of different strains, and to assess the biocontrol potential of fluorescent pseudomonads against insects in the field. Moreover, future investigations may unravel specific adaptations that fluorescent pseudomonads have evolved to switch between plant- and insect-associated lifestyles, findings, which could also be of relevance for other bacteria which change between different hosts.

## ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die insektizide Aktivität von wurzelkolonisierenden, phylogenetisch zur *Pseudomonas fluorescens* Gruppe gehörenden Bakterien untersucht. Vertreter dieser Gruppe von Bakterien waren für lange Zeit vor allem für ihre positiven Effekte auf Pflanzen bekannt: die Unterdrückung bodenbürtiger Pflanzenkrankheiten, die Induktion systemischer Resistenz in der Pflanze und die Förderung des Pflanzenwachstums. Mit der Entdeckung, dass gewisse Stämme der *P. fluorescens* Gruppe zusätzlich die Fähigkeit besitzen, Insekten zu infizieren und zu töten, kamen zahlreiche Fragen zu den molekularen Grundlagen, zur ökologischen Relevanz und zum agronomischen Potenzial dieser Eigenschaft auf. Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es daher, neue Erkenntnisse zu den verschiedenen Aspekten insektizider Aktivität zu gewinnen. Der Schwerpunkt lag dabei auf der Untersuchung des Infektionsprozesses, im Speziellen der Suche nach Pathogenitätsfaktoren, der Erforschung der Rolle von Insekten als alternative Wirte für die Bakterienverbreitung und der Ermittlung des insektiziden Potenzials innerhalb der *P. fluorescens* Gruppe als Reservoir für neue Biokontrollagenzien gegen Schadinsekten.

In einem ersten Teil wurde anhand von sechszwanzig verschiedenen Stämmen experimentell die phylogenetische Verbreitung von pflanzenförderlichen und insektiziden Eigenschaften innerhalb der *P. fluorescens* Gruppe bestimmt. Dies ergab, dass Stämme mit pflanzenförderlichen Eigenschaften innerhalb der gesamten *P. fluorescens* Gruppe vorkommen, wohingegen sich starke insektizide Aktivität auf eine bestimmte phylogenetische Untergruppe beschränkt, welche die beiden Arten *Pseudomonas protegens* und *Pseudomonas chlororaphis* beinhaltet. In der Annahme, dass Stämme mit insektizider Aktivität bestimmte Eigenschaften teilen, welche die Infektion von Insekten ermöglichen, wurden die Genome von vierundzwanzig Stämmen sequenziert und eine vergleichende Genomanalyse durchgeführt. Diese identifizierte etwas über zweihundert Gene, welche den insektiziden Stämmen gemeinsam sind und dabei in keinem der Genome der nicht-insektiziden Stämme vorkommen. Diese Auswahl an Genen beinhaltet nebst dem *fit* Gen-Cluster, welches für die Produktion des Fit Toxins, dem einzigen vorgängig bekannten insektiziden Faktor, verantwortlich ist, mehrere neue, vielversprechende Kandidaten für Toxizitätsfaktoren. Deren vier wurden im Folgenden im Genom des Modellstamms *P. protegens* CHA0 deletiert und Mutanten, welchen entweder eine spezifische Chitinase oder Phospholipase fehlte, zeigten in oralen

---

Infektionen von Kohlschabenlarven, *Plutella xylostella*, eine verminderte Virulenz. Zusätzlich dazu wurden Mutanten untersucht, welche nicht in der Lage sind verschiedene antimikrobielle Metaboliten zu produzieren, welche wichtig sind für die Unterdrückung von wurzelpathogenen Pilzen. Dabei zeigte sich, dass Hydrogencyanid und verschiedene zyklische Lipopeptide für die Ausübung vollständiger Virulenz essenziell sind.

Im zweiten Teil dieser Arbeit war das Ziel, Aufschluss über ökologische Aspekte des Insekts als alternativen Wirt für pflanzenförderliche Pseudomonaden zu erlangen. Insbesondere ging es darum, zu untersuchen, ob die Möglichkeit besteht, dass die Bakterien durch Insekten auf neue Wirtspflanzen übertragen werden. Bei Arten mit wurzelfressendem Larvenstadium kommen die adulten Insekten in der Regel aus dem Boden heraus und suchen sich neue Wirtspflanzen zur Eiablage. Dabei könnten sie zur Verbreitung von Wurzelbakterien beitragen, welche ansonsten in ihren Möglichkeiten weite Distanzen zu überwinden stark eingeschränkt sind. Wir untersuchten, ob *P. protegens* CHA0 nach oraler Aufnahme durch das Larvenstadium im Insekt persistieren kann, eine Grundvoraussetzung für die Verbreitung des Bakteriums durch Insekten. In der Tat wurde *P. protegens* CHA0 in drei Insektenarten verschiedener Ordnungen transstadial an das Puppen- und das Adultstadium weitergegeben. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass *P. protegens* CHA0 mittels erwachsener Kohlfliegen, *Delia radicum*, welche als Larven CHA0-besiedelte Wurzeln gefressen hatten, von den Wurzeln einer Pflanze auf die Wurzeln einer anderen Pflanze gelangen kann. Diese Beobachtung zeigt erstmals auf, dass die Ausbreitung dieses Bakteriums mit Hilfe von Insekten möglich ist.

Die in dieser Arbeit generierten Resultate deuten darauf hin, dass verschiedene Arten von Assoziationen zwischen pflanzenförderlichen Pseudomonaden und Insekten existieren, von einer kommensalistischen bis hin zu einer pathogenen Lebensweise der Bakterien im Insekt. In vielen Fällen sind die Bakterien fähig in Insekten zu persistieren und nützen diese möglicherweise auch als Vektoren. In anderen Fällen hingegen vermehren sie sich stark, verursachen letale Infektionen und benützen anschliessend den Kadaver als Nahrungsquelle. Ihre duale Aktivität, gegen Wurzelkrankheiten und Schadinsekten, macht die hier untersuchten fluoreszierenden Pseudomonaden zu interessanten Agenzien für die Biokontrolle. Allerdings sind weitere Studien nötig, um die Mechanismen der insektiziden Aktivität vollständig zu verstehen, um das Wirtsspektrum verschiedener Stämme definieren zu können und, um das Biokontrollpotenzial gegen Insekten im Feld zu ermitteln. Zukünftige Untersuchungen

könnten zudem Aufschluss darüber geben, welche spezifischen Anpassungen diese Bakterien im Laufe der Evolution entwickelten, um den Wechsel zwischen einem Pflanzen- und einem Insekten-assoziierten Lebensstil zu bewältigen; Erkenntnisse, welche auch für viele andere Bakterien mit wechselnden Wirten von Relevanz sein könnten.