

Diss. ETH Nr. 9779

**Untersuchungen zur Unterdrückung bodenbürtiger
Pflanzenkrankheiten durch *Pseudomonas fluorescens* Stamm CHA0:
Phenylpropanderivate in Tabakwurzeln und Rolle der bakteriellen
Tryptophan Side Chain Oxidase**

ABHANDLUNG

zur Erlangung des Titels

DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN

der

EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZÜRICH

vorgelegt von

Thomas Oberhänsli

Dipl. Natw. ETH

geboren am 11. Januar 1961

von Engwilen TG

Angenommen auf Antrag von:

Prof. Dr. G. Défago, Referentin

Prof. Dr. D. Haas, Korreferent

Prof. Dr. M.S. Wolfe, Korreferent

1992

G. Défago

14. 7. 92

ZUSAMMENFASSUNG

Pseudomonas fluorescens Stamm CHA0 unterdrückt die durch *Thielaviopsis basicola* verursachte schwarze Wurzelfäule des Tabaks und die durch *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* verursachte Schwarzbeinigkeit des Weizens. In der vorliegenden Arbeit wurde unter gnotobiotischen Bedingungen der Einfluss von Stamm CHA0 auf den Phenol- und Ligningehalt in Wurzeln von *Nicotiana glutinosa* untersucht, da das Resistenzverhalten von Pflanzen gegen Pathogene oft mit der erhöhten Akkumulation von Metaboliten des Phenylpropan-Stoffwechsels korreliert ist. In Böden mit einem Matrixpotential von $\Psi_m \approx -40$ mbar (lockere Bodenstruktur) bewirkte Stamm CHA0 keine Änderung im Gehalt an Chlorogensäure, dem einzigen nachweisbaren löslichen Phenol in gesunden Tabakwurzeln. Bei einem Matrixpotential $\Psi_m \approx 0$ mbar (Staunässe) induzierte Stamm CHA0 hingegen eine erhöhte Akkumulation von Chlorogensäure. Da ein hohes Matrixpotential keinen Einfluss auf die Unterdrückung der schwarzen Wurzelfäule durch den Antagonisten hatte, scheint die beobachtete Erhöhung des Phenolgehaltes der Pflanzen für die Schutzwirkung von Stamm CHA0 keine Bedeutung zu haben.

Im Boden mit dem tieferen Matrixpotential enthielten die Wurzeln, die durch Stamm CHA0 kolonisiert waren, weniger Lignin als diejenigen, die in Abwesenheit von Mikroorganismen gewachsen waren. Zudem zeigten sie eine geringere Peroxidase-Aktivität. Diese Abnahmen waren mit einer vermehrten Wurzelhaarbildung und einer Wurzelverkürzung korreliert. In einem zweiten Teil dieser Arbeit wurde deshalb die Indol-essigsäure (IES)-Produktion von Stamm CHA0 untersucht, da IES einen Einfluss auf das Wachstum und die Morphologie von Wurzeln haben kann. Die Aktivität von zwei Schlüsselenzymen wurde bestimmt, die bei der IES-Synthese involviert sind: 'Tryptophan-Side-Chain-Oxidase' (TSO) und L-Tryptophan-Transaminase. TSO wurde in der stationären Wachstumsphase induziert. Durch die Fraktionierung eines Zellextraktes von Stamm CHA0 über DEAE-Sephrose wurden zwei getrennte Fraktionen mit konstitutiver L-Tryptophan-Transaminase-Aktivität bestimmt. Tryptophan-Monooxygenase-, Tryptophan-Decarboxylase- und Tryptophan-Racemase-Aktivitäten, die in anderen Bakterien als Schlüsselenzyme an der IES-Synthese beteiligt sind, wurden in Stamm CHA0 nicht nachgewiesen. Maximal 1,5 % des von ruhenden Zellen von Stamm CHA0 metabolisierten Tryptophan wurde in IES umgesetzt. Dies deutet darauf hin, dass der grösste Teil von Tryptophan über einen anderen Stoffwechselweg, der via Anthranilat verläuft, umgesetzt wird.

Stamm CHA750, dem spezifisch die TSO-Aktivität fehlte, wurde nach einer Tn5-Insertionsmutagenese von Stamm CHA0 erhalten. Wachsende Zellen von Stamm CHA0 und CHA750 synthetisierten in Flüssigkulturen (pH 6,8) bei einer Zugabe von 10 mM L-Tryptophan die gleiche Menge IES. In diesem Fall synthetisierten wahrscheinlich beide Stämme IES über den L-Tryptophan-Transaminase-Stoffwechselweg. Im Gegensatz dazu produzierten ruhende Zellen von Stamm CHA750 in einem Puffer (pH 6), der 1 mM L-Tryptophan enthielt, fünf mal weniger IES als Stamm CHA0. Dies zeigt, dass TSO unter diesen Bedingungen dominierend zur IES-Synthese beiträgt. In einem künstlichen Boden (pH \approx 6) wiesen durch Stamm CHA0 kolonisierte und mit Ammonium-N gedüngte Weizenpflanzen ein signifikant ($P = 0,05$) höheres Spross/Wurzelverhältnis auf als Pflanzen, die durch Stamm CHA750 kolonisiert waren. Bei Suppressionsversuchen bei einem Boden-pH von \approx 7 oder \approx 6 hatten beide Stämme jedoch dieselbe Schutzwirkung gegen die Schwarzbeinigkeit des Weizens und die schwarze Wurzelfäule des Tabaks. Damit kann die TSO-abhängige IES-Synthese unter sauren Bedingungen einen Einfluss

auf das Spross/Wurzel-Verhältnis bei Weizen haben, scheint aber keine Bedeutung bei der Krankheitsunterdrückung durch Stamm CHA0 zu haben.

TSO war ein guter Marker für spontane Mutationen, die in Stamm CHA0 unter Laborbedingungen auftraten. Mutanten, die die TSO-Aktivität verloren hatten, konnten durch Übergiessen mit Substratagar festgestellt werden. Kolonien mit hoher TSO-Aktivität verfärbten sich braun-schwarz, während Kolonien, die sich nicht verfärbten, keine TSO-Aktivität mehr zeigten. In einem kleineren Ausmass wurden auch Kolonien mit intermediärem TSO-Phänotyp beobachtet. Spontan TSO-negative Mutanten unterschieden sich von Stamm CHA0 durch grössere Kolonien auf Agar und durch eine erhöhte Produktion des Antibiotikums Pyoluteorin. Die Produktion von 2,4-Diacetylphloroglucinol (Phl), einem anderen Antibiotikum, war hingegen reduziert; in einigen Fällen war sogar die HCN-Produktion betroffen. Der Verlust der Phl-Produktion der spontanen TSO⁻-Mutanten korrelierte positiv mit einer signifikanten Reduktion ihrer Fähigkeit die Schwarzbeinigkeit des Weizens zu unterdrücken. Die Unterdrückung der schwarzen Wurzelfäule des Tabaks durch die spontanen Mutanten war hingegen nicht reduziert; wahrscheinlich ist dies durch ihre erhöhte Pyoluteorin-Produktion bedingt. Keine der spontanen Mutanten verlor die Fähigkeit zur Agglutination mit Antikörpern, die spezifisch gegen Oberflächenantigene von Stamm CHA0 waren. Eine Zugabe von subletalen Dosen der 'curing agents' Acridin-Orange und Ethidiumbromid zu Kulturen von Stamm CHA0 hatte keinen Effekt auf das Auftreten von spontanen TSO⁻-Mutanten. TSO⁺-Revertanten traten in einer Kultur von TSO⁻-Mutanten mit einer ca. hundert mal geringeren Frequenz auf als TSO⁻-Kolonien in einer Kultur von Stamm CHA0. Die Bestimmung der TSO-Aktivität könnte in der Qualitätskontrolle bei der Anzucht und Formulierung von TSO⁺-Pseudomonaden, die in der biologischen Bekämpfung von bodenbürtigen Krankheiten eingesetzt werden, von Bedeutung sein.

ABSTRACT

Pseudomonas fluorescens strain CHA0 is a biocontrol agent effective against black root rot of tobacco caused by *Thielaviopsis basicola* and take-all of wheat caused by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. This thesis investigates the influence of strain CHA0 on the content of phenols and lignin of roots of *Nicotiana glutinosa* grown under gnotobiotic conditions. In soil with a low matric potential (loose texture; $\Psi_m \approx -40$ mbar), strain CHA0 caused no change in the content of chlorogenic acid, the only detectable phenolic substance in healthy roots. In soil with a higher matric potential (water logging; $\Psi_m \approx 0$ mbar), however, strain CHA0 increased significantly the content of chlorogenic acid. Since the matric potential had no influence on the suppression of black root rot by strain CHA0, this increase in phenol content seems not to be of importance for the suppressive capacity of strain CHA0.

In soils with the lower matric potential, the lignin content and the peroxidase activity of the roots colonized by strain CHA0 was reduced compared with roots grown in the absence of microorganisms. These reductions were correlated with an increased root hair formation and with a decreased root elongation. Therefore, in a second part of this work, biosynthesis of indole-3-acetic acid (IAA) by strain CHA0 was investigated, because IAA is known to influence growth and morphology of roots. Two key enzyme activities were found to be involved: tryptophan side chain oxidase (TSO) and tryptophan transaminase. TSO was induced in the stationary growth phase. By fractionation of a cell extract of strain CHA0 on DEAE-Sepharose, two distinct peaks of constitutive tryptophan transaminase activity were detected. Activities of other key enzymes such as tryptophan mono-oxygenase, tryptophan decarboxylase and tryptophan racemase, which are involved in IAA synthesis by other bacteria, were not present in strain CHA0. IAA synthesis accounted for $\leq 1.5\%$ of exogenous tryptophan consumed by resting cells of strain CHA0, indicating that the bulk of tryptophan was catabolized via yet another pathway involving anthranilic acid as an intermediate.

Strain CHA750, a mutant lacking TSO activity, was obtained after Tn5-mutagenesis of strain CHA0. In liquid cultures (pH 6.8) supplemented with 10 mM L-tryptophan, growing cells of strains CHA0 and CHA750 synthesized the same amount of IAA, presumably using the tryptophan transaminase pathway. In contrast, resting cells of strain CHA750 produced five times less IAA in a buffer (pH 6.0) containing 1 mM L-tryptophan than did resting cells of the wild type, illustrating the major contribution of TSO to IAA synthesis under these conditions. Wheat plants grown in a soil (pH 6.2) fertilized with ammonia-nitrogen and inoculated with strain CHA0 showed a significant ($P = 0.05$) increase in the shoot/root ratio (w/w) in comparison with plants cultivated without bacteria. Inoculation with strain CHA750 did not produce this increase in the shoot/root ratio. However, there was no difference in the suppression capacity between strain CHA0 and strain CHA750 towards take-all of wheat or black root rot of tobacco. We conclude that the TSO-initiated IAA production of strain CHA0 may affect the shoot/root ratio under acid conditions but has no significance in disease suppression.

TSO was a good marker for genetic instability of strain CHA0. Mutants which have lost TSO activity can be screened on King's B agar by overlaying with substrate agar. Colonies with high TSO activity turned tan-coloured, whereas uncoloured colonies showed no or poor TSO activity. TSO⁻ mutants of strain CHA0 appeared spontaneously after eight days in nutrient yeast broth (NYB) at 27°C; intermediate TSO phenotypes were also observed. However, no TSO⁻ mutants could be isolated in field and greenhouse experiments after

four months. The TSO⁻ mutants differed from the wild-type strain CHA0 by an increased colony size on agar and an increased production of the antibiotic pyoluteorin. In contrast, the production of 2,4-diacetylphloroglucinol, another antibiotic compound, was reduced; in some cases, the production of HCN was also affected. The lack of production of 2,4-diacetylphloroglucinol by the spontaneous TSO⁻ mutants correlated positively with a significant reduction in the suppression of take-all disease of wheat. In contrast, the suppression of black root rot of tobacco by the spontaneous mutants was not reduced, probably due to the increased production of pyoluteorin. None of the TSO⁻ mutants had lost their antigenic surface characteristics, i.e. recognition by antibodies directed against strain CHA0, and no TSO⁻ mutants could be detected in overnight NYB-cultures supplemented with sub-lethal doses of the curing agents acridine orange or ethidium bromide. TSO⁺ revertants could be isolated in NYB cultures of some TSO⁻ mutants, but with a frequency a hundred times less than the occurrence of TSO⁻ mutants in wild-type cultures. Loss of TSO activity is a suitable marker for genetic instability of TSO⁺ biocontrol agents.