

Diss. ETH No. 18341

**REGULATION OF ANTIFUNGAL ACTIVITY IN ROOT-ASSOCIATED
PSEUDOMONAS FLUORESCENS CHA0 BY PLANT-DERIVED FACTORS AND
ENZYMES INVOLVED IN GLUCOSE METABOLISM**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH
for the degree of
Doctor of Sciences

Presented by
PATRICE DE WERRA
Dipl. Biologist, University of Lausanne

born December 5th, 1978
citizen of St-Maurice VS

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Bruce McDonald, examiner
Dr. Monika Maurhofer, co-examiner
Dr. Christoph Keel, co-examiner
Dr. Guido V. Bloemberg, co-examiner

2009

SUMMARY

Soil-borne fungal pathogens are responsible for several plant diseases causing large losses in crop production. These pathogens are difficult to control with traditional methods, and the application of root-colonizing bacteria which antagonize plant-pathogenic fungi represents a promising alternative. *Pseudomonas fluorescens* CHA0 is an efficient plant-beneficial rhizobacterium promoting plant growth mostly indirectly by preventing damage caused by different plant diseases. Its biocontrol ability is mainly due to the production of the antifungal secondary metabolites 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) and pyoluteorin (PLT) which directly affect fungal pathogens. The regulation of expression of these antifungal compounds, respectively their biosynthetic genes, is complex and orchestrated by many biotic and abiotic factors. The multitrophic interactions between plants, beneficial rhizobacteria and plant pathogens occurring in the rhizosphere as well as the activity of microbial communities living in this niche are strongly influenced by the diversity and abundance of root exudates produced by plants. It is assumed that biocontrol activity of root-associated pseudomonads may be substantially influenced by plant-related metabolites present in root exudates. Therefore the main aim of this thesis was to monitor the expression of antifungal biosynthetic genes in model biocontrol strain *P. fluorescens* CHA0 in response to environmental, mainly plant-derived factors, using reporter fusions based on the green fluorescent protein (GFP).

A new method using flow cytometry combined with GFP-based reporters was developed. It permits the in situ quantification of antifungal genes expression in *P. fluorescens* CHA0 at the single-cell level. With this new approach, in situ detection of plant-modulated alterations in antifungal genes expression was performed and differences in rhizosphere expression of DAPG and pyrrolnitrin biosynthetic genes were measured at the plant species level. Furthermore it could be demonstrated that a plant exposed to stress caused by leaf pathogen infections or mechanical injury can alter the expression of an antifungal compound in a bacterial biocontrol strain colonizing its roots probably by exuding a signal via the roots.

Root exudates are composed of a high diversity of compounds, such as sugars, and phenolics which could be involved in the regulation of the expression of antifungal genes, and thus may play a role in the biocontrol activity of the beneficial pseudomonads. To assess the involvement of such compounds in the regulation of DAPG and PLT antifungal genes expression, an in vitro survey of 61 plant-produced or plant-related phenolic compounds was performed and effects of various phenolics on antifungal gene expression in *P. fluorescens* CHA0 are reported. 36 of the tested compounds were able to induce or repress the expression

of *phlA* and/or *pltA*, two genes involved into the biosynthesis of DAPG and PLT, respectively.

The type and abundance of carbon sources provided by plant root exudates are known to influence the production of antifungal compounds. Glucose is one of the most important oligosaccharide found in these exudates. Therefore, enzymes involved in glucose/gluconic acid metabolism may play a role in plant beneficial activity of pseudomonads by affecting phosphate solubilization through acidification of the surroundings, and the regulation of antifungal compound production. In the last part of this thesis, a mutant of *P. fluorescens* CHA0 was created with a deletion in the *gcd* gene, involved in production of glucose dehydrogenase. The *gcd* mutant was not able to produce gluconic acid anymore, was strongly impeded in phosphate solubilization ability, but overproduced the antifungal compounds DAPG and PLT. The lack of glucose dehydrogenase activity also resulted in an improved biocontrol activity against take-all of wheat. These results show that gluconic acid and enzymes involved in glucose/gluconic acid metabolism can be involved in the regulation of antifungal compound production and disease suppressive activity of biocontrol pseudomonads.

The outcome of this study provides new insights into the importance of environmental and plant-derived factors in the regulation of plant-beneficial traits in *P. fluorescens*. Monitoring the expression of antifungal genes directly in the rhizosphere opens new possibilities to study the activity of beneficial rhizobacteria in their natural habitats.

RÉSUMÉ

Les racines des plantes peuvent être attaquées par de nombreux pathogènes fongiques qui causent d'importantes pertes de récolte. Ces pathogènes sont difficilement contrôlables par les méthodes conventionnelles. L'application de bactéries colonisant les racines, améliorant la croissance des plantes et/ou les protégeant contre ces pathogènes représente donc une alternative intéressante. Une de ces bactéries est la souche modèle *Pseudomonas fluorescens* CHA0. La capacité de biocontrôle de cette bactérie est essentiellement due à la production de métabolites secondaires aux propriétés antifongiques, comme le 2,4-diacétylphloroglucinol (DAPG) et la pyolutéorine (PLT). Ces substances inhibent la croissance de nombreux pathogènes. La production de ces composés, leur régulation et l'expression des gènes de biosynthèse sont complexes et soumises à de nombreux facteurs environnementaux, dont les exsudats racinaires. Par leur abondance et leur diversité, ces exsudats pourraient avoir un rôle clé dans l'activité de biocontrôle des pseudomonades. D'une part ils influencent la production de métabolites antifongiques et d'autre part ils modifient la structure et l'activité des communautés microbiennes de la rhizosphère. L'objectif principal de cette thèse est de mesurer l'influence de facteurs modifiant ou simulant l'environnement végétal sur l'expression des gènes impliqués dans la synthèse du DAPG et de la PLT chez *P. fluorescens* CHA0.

Une nouvelle méthode utilisant la cytométrie de flux ainsi que des fusions rapportrices basées sur la protéine fluorescente verte (GFP) a été développée. L'expression des gènes de biosynthèse du DAPG et de la pyrrolnitrine chez *P. fluorescens* CHA0 a pu être quantifiée au niveau d'une seule et unique cellule. Des différences d'expression de ces gènes ont été mesurées in situ entre différentes espèces de plantes. De plus, l'exposition de la plante à un stress abiotique ou biotique au niveau des feuilles, a induit une altération de l'expression du gène *phlA* impliqué dans la synthèse du DAPG, et ce probablement par la sécrétion d'un signal via les racines.

Afin d'évaluer l'implication de certains composants des exsudats racinaires dans la régulation de l'expression des gènes de biosynthèse du DAPG et de la PLT, une étude comprenant 61 composés (phénoliques produits par les plantes ou composés en relation avec celles-ci) a été effectuée in vitro. Parmi ces composés, 36 sont capables d'induire ou de réprimer l'expression des gènes de biosynthèse du DAPG et de la PLT chez *P. fluorescens* CHA0.

Le type et l'abondance des sources de carbone fournies par les exsudats racinaires peuvent influencer la production des composés antifongiques. Le glucose est l'un des oligosaccharides les plus importants trouvés dans ces exsudats. Dès lors, les enzymes impliquées dans le métabolisme du glucose pourraient jouer un rôle dans l'activité de biocontrôle des pseudomonades. De plus, le glucose est transformé par la bactérie en acide gluconique, acide qui solubilise le phosphate en acidifiant le milieu proche des bactéries. Dans la dernière partie de cette thèse, un mutant de *P. fluorescens* CHA0 a été créé en supprimant le gène *gcd* nécessaire à la production de l'enzyme 'glucose déshydrogénase'. Cette suppression a entraîné (i) la perte de la synthèse de l'acide gluconique et de la solubilisation du phosphate in vitro, (ii) l'augmentation de la synthèse du DAPG et de la PLT, et (iii) l'augmentation de l'activité de biocontrôle contre le piétin échaudage du blé. Ces résultats montrent que l'acide gluconique et les enzymes engagées dans le métabolisme du glucose peuvent être impliqués dans la régulation de la production des composés antifongiques chez les pseudomonades, et donc dans leur activité de suppression des maladies végétales.

Cette étude a mis en lumière le rôle important des facteurs environnementaux, notamment d'origine végétale, dans la régulation de l'activité antifongique chez les pseudomonades. Mesurer l'expression des gènes antifongiques directement dans la rhizosphère ouvre de nouvelles possibilités pour étudier l'activité des bactéries de biocontrôle dans des habitats naturels.