

Diss. ETH No. 14731

**Diversity of biocontrol fluorescent pseudomonads  
producing 2,4-diacetylphloroglucinol  
and hydrogen cyanide in disease suppressive soils**

A dissertation submitted to the  
**SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY, ZÜRICH**

For the degree of  
**DOCTOR OF NATURAL SCIENCES**

presented by

**Alban RAMETTE**

D.E.A. ENSAIA, Nancy, France  
Born August 3<sup>rd</sup>, 1974, France  
Citizen of Bellicourt, France

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Geneviève Défago, referent  
Prof. Dr. Bruce A. McDonald, co-referent  
Prof. Dr. Yvan Moëgne-Loccoz, co-referent

Zürich, 2002

## SUMMARY

The antagonistic activity of certain indigenous fluorescent pseudomonads can reduce significantly the incidence of soil-borne diseases caused by fungal plant pathogens, as exemplified by the disease suppressiveness that occurs naturally in certain soils. Depending on whether or not crop monoculture is needed for the establishment of this soil property, soil suppressiveness is designated as induced or long-standing, respectively. Often, for both types of soil suppressiveness, biocontrol fluorescent pseudomonads antagonize soil-borne pathogens by producing the secondary metabolites 2,4-diacetylphloroglucinol (Phl) and/or hydrogen cyanide (HCN). In induced suppressive soils where wheat is cropped continuously for several decades, large populations of root-colonizing Phl<sup>+</sup> fluorescent pseudomonads are present, whereas they are barely detected in the conducive counterparts. Further, within those Phl<sup>+</sup> populations, the diversity of one of the Phl biosynthetic genes (*phlD*) is low, suggesting that crop monoculture could select and enrich particular genotypes in the populations of Phl<sup>+</sup> fluorescent pseudomonads. The objective of this thesis was to determine the prevalence and diversity of populations of fluorescent pseudomonads in long-standing suppressive soils, postulating that the presence of different plant species mediated through crop rotation in those soils may favor a higher bacterial diversity than in induced suppressive soils.

In the first part of this thesis, the prevalence and diversity of Phl<sup>+</sup> and HCN<sup>+</sup> fluorescent pseudomonads were determined in long-standing suppressive soils in Morens, Switzerland, where suppression concerns black root rot of tobacco caused by pathogenic *Thielaviopsis basicola* strains. In both suppressive and conducive Morens soils, large population sizes of Phl<sup>+</sup> and HCN<sup>+</sup> fluorescent pseudomonads were found, and up to eight *phlD* alleles per soil were identified, regardless of the soil suppressiveness status. Thus, it may be that Morens soil suppressiveness is due to the combination of high numbers and high diversity of Phl<sup>+</sup> biocontrol fluorescent pseudomonads. Crop rotation, as practiced in long-standing suppressive soils, may provoke a higher disturbance of bacterial populations over time compared with monoculture, fostering bacterial diversification. In contrast, induced suppressive soils constitute a more stable environment for biocontrol populations, owing to the continuous presence of the same host plant. In addition it is possible that long-standing disease suppressiveness also entails specific environmental conditions promoting biocontrol gene expression, and coordination of this expression within the community of biocontrol root-associated fluorescent pseudomonads.

In a second part, the diversity of *phlD* was examined for a collection of Phl<sup>+</sup> biocontrol fluorescent pseudomonads from worldwide origin, to determine whether the high *phlD* diversity was unique to Morens soils. Remarkably, only two out of the 11 *phlD* alleles found in Morens were not found in the 16 alleles found at a worldwide scale. Surprisingly, no relationships were found between *phlD* polymorphism and (i) the origin of the isolates (i.e., host plant, geographic location), (ii) the pathosystem(s) in which they were found efficient, (iii) their abilities to utilize various carbon sources, (iv) their 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase (ACC) activity, which is implicated in root growth promotion, and (v) their qualitative and quantitative capacities to produce secondary metabolites such as Phl and extracellular proteases.

In a third part, the diversity of *hcnBC*, which along with *hcnA* codes for a HCN synthase, was determined for a bacterial collection mainly composed of Phl<sup>+</sup> HCN<sup>+</sup> biocontrol fluorescent pseudomonads. Gene and protein phylogenies inferred from *phlD* and *hcnBC* were mostly congruent with each other and with the phylogeny inferred from random amplified polymorphic

DNA-generated data, indicating that they may reflect the bacterial whole-genome evolution. Yet, they were not congruent with the 16S rRNA-based phylogeny, suggesting the possibility of past lateral gene transfers at both *phlD* and *hcnBC* loci, and/or different evolutionary rates for protein-coding gene and ribosomal sequences. Further, for most of the isolates, no relationships were found between the polymorphism of *hcnBC* (or *phlD*) and their qualitative or quantitative abilities to produce HCN in vitro and also their biocontrol efficiency in different pathosystems. Therefore, the polymorphism analysis of *phlD* and *hcnBC* did not indicate any ecological differences and biocontrol abilities for most of the biocontrol pseudomonads examined.

In the fourth part, the evolutionary relationships between PhlD in biocontrol fluorescent pseudomonads and plant chalcone synthases involved in essential steps of defense mechanisms against pathogens were determined. Although some striking similarities at the level of the catalytic sites were evidenced between their protein sequences, detailed sequence and phylogenetic analyses revealed that those similarities could originate either from a convergent evolution of similar enzymatic functions, or from an early genetic transfer event that occurred before the divergence of monocots and dicots.

In the discussion, lines of evidence are provided that indicate that *phlD* and *hcnBC* behave as molecular clocks. Thus, the divergence time since descent from a common ancestor was estimated to be about 20 to 50 million years ago. This suggests that the diversification at the two loci in biocontrol fluorescent pseudomonads could have occurred concomitantly with the diversification of their host-plants.

In conclusion, although *phlD* and *hcnBC* polymorphism may reflect whole-genome evolution at a coarse level of resolution, no relationships were generally found between these polymorphisms and the origins or the biocontrol-relevant properties of biocontrol fluorescent pseudomonads. This could be explained by an ancient diversification at those loci, as indicated by estimated divergence times. Further, the results of this thesis suggest that cultural practices may have played a significant role in the shaping of this bacterial diversity in induced vs. long-standing suppressive soils. As the polymorphism of protein-coding genes implicated in biocontrol does not indicate the difference in properties between long-standing suppressive soils and their conducive counterparts, the development of other methods indicating the expression and regulation of those genes in communities of biocontrol fluorescent pseudomonads would be needed in future studies.

## RESUME

Les dégâts causés par les champignons phytopathogènes du sol peuvent être limités significativement par l'action antagoniste de certains *Pseudomonas* spp. fluorescents indigènes. Ce phénomène se produit de manière naturelle dans les sols dits résistants. En fonction de l'importance qu'ont les cultures dans l'installation et le maintien de ce phénomène, la résistance des sols peut être qualifiée d'induite (par une monoculture) ou de longue durée (c'est-à-dire qu'elle persiste malgré la rotation des cultures). Souvent, dans les deux cas de résistance des sols, les *Pseudomonas* fluorescents, agents de lutte biologique, inhibent le développement des champignons pathogènes par la production de 2,4-diacétylphloroglucinol (Phl) et/ou d'acide cyanhydrique (HCN). Dans les sols dont la résistance est induite par la monoculture du blé, les *Pseudomonas* fluorescents producteurs de Phl sont enrichis massivement, mais ils sont peu nombreux dans les sols sensibles adjacents. De plus, la diversité d'un gène impliqué dans la biosynthèse du Phl (*phlD*) est assez faible pour ces populations bactériennes des sols résistants, suggérant que la monoculture pourrait sélectionner et enrichir certains génotypes parmi les populations de *Pseudomonas* fluorescents. L'objectif de cette thèse était de déterminer les niveaux de populations et la diversité des *Pseudomonas* fluorescents dans les sols présentant une résistance durable à la maladie, en faisant l'hypothèse que la rotation des cultures telle qu'elle est pratiquée généralement dans ces sols pourrait favoriser une plus haute diversité bactérienne par rapport à la situation des sols de résistance induite.

Dans une première partie, la taille des populations de *Pseudomonas* fluorescents producteurs de Phl et/ou d'HCN a été examinée dans des sols suisses (Morens) connus pour leur résistance de longue durée contre la pourriture noire des racines du tabac (causée par *Thielaviopsis basicola*). Les effectifs de ces bactéries se sont avérés être élevés, aussi bien dans les sols résistants que sensibles de Morens. Il en était de même pour la diversité de *phlD* car jusqu'à huit différents allèles ont pu être identifiés par sol, indépendamment de leur niveau de résistance. Ainsi, il est probable que la résistance durable des sols de Morens à la maladie soit associée à des niveaux de populations de *Pseudomonas* protecteurs et à une diversité de *phlD* élevés. A l'opposé de la monoculture, la rotation culturale telle qu'elle est pratiquée dans les sols de Morens pourrait générer plus de perturbations à la communauté bactérienne, favorisant ainsi sa diversification. Les sols de résistance induite constitueraient comparativement un environnement plus stable pour les populations de *Pseudomonas* fluorescents, compte tenu de la présence continue d'une seule espèce végétale. Il est aussi possible que la résistance durable des sols à la maladie inclue des conditions environnementales spécifiques favorisant l'expression des gènes impliqués dans l'activité de lutte biologique et aussi une coordination de l'expression de cette expression au niveau de la communauté de *Pseudomonas* fluorescents associés aux racines.

Dans une deuxième partie, la diversité de *phlD* a été examinée pour une collection de *Pseudomonas* fluorescents producteurs de Phl et d'HCN provenant de différents continents, afin de déterminer si la diversité de *phlD* était spécifique des sols résistants de Morens. De manière inattendue, seulement 2 des 11 allèles identifiés à Morens ne furent pas retrouvés chez les autres autres souches. Aucune relation n'a été trouvée entre le polymorphisme de *phlD* et (i) l'origine (plante-hôte, pathosystème) des isolats, (ii) les pathosystèmes dans lesquels ils étaient efficaces, (iii) leur capacité à assimiler des composés organiques variés, (iv) leur activité 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) désaminase, qui est impliquée dans la stimulation de la croissance des plantes, et (v) leurs capacités qualitatives et quantitatives à produire des

métabolites secondaires impliqués dans la lutte biologique tels que Phl, HCN ou encore des protéases extracellulaires.

Dans une troisième partie, la diversité des gènes *hcnBC*, qui avec *hcnA* codent partiellement une HCN synthase, a été déterminée pour une collection de *Pseudomonas* fluorescents qui majoritairement produisent Phl et HCN. Les phylogénies fondées sur les séquences de *phlD* et d'*hcnBC* étaient très concordantes entre elles, mais aussi avec celle dérivée de profils RAPD, indiquant qu'elles pouvaient refléter l'évolution du génome bactérien dans son ensemble. Cependant, elles n'étaient pas congruentes avec la phylogénie fondée sur les séquences de l'ADNr 16S, suggérant la possibilité d'échanges génétiques horizontaux et/ou de différentes vitesses évolutives. De plus, pour la plupart des isolats, aucune relation n'a été trouvée entre le polymorphisme de *hcnBC* (ou de *phlD*) et leurs capacités quantitatives à produire HCN ou encore leur efficacité en tant qu'agents de lutte biologique dans différents pathosystèmes.

Dans une quatrième partie, les relations évolutives entre *PhlD* des *Pseudomonas* fluorescents antagonistes et les polycétones synthases végétales, qui sont impliquées dans les mécanismes de défense des plantes, ont été déterminées. Bien que des similarités significatives au niveau de leurs sites catalytiques existent, l'analyse détaillée des séquences protéiques et de leurs relations phylogénétiques a démontré cependant que ces similarités proviendraient soit d'une évolution convergente des mêmes fonctions enzymatiques, soit d'un transfert génétique ancien qui aurait eu lieu vraisemblablement avant la divergence monocot-dicot.

Dans la discussion générale, des preuves sont apportées démontrant que *phlD* et *hcnBC* peuvent être considérés comme des horloges moléculaires. Ainsi, le temps de divergence depuis un ancêtre commun a pu être estimé à environ 20-50 millions d'années, à une époque concomitante avec la diversification des plantes supérieures.

En conclusion, bien que les diversités de *phlD* et d'*hcnBC* puissent refléter l'évolution de tout le génome bactérien à un niveau grossier de résolution, aucune relation n'a été trouvée entre ce polymorphisme génétique et l'origine des isolats ou encore leurs propriétés liées à l'activité de lutte biologique. Cette situation pourrait peut-être provenir d'une diversification ancienne au niveau de ces loci, comme le suggère l'estimation du temps de divergence. De plus, les résultats de cette thèse suggèrent que les pratiques culturales modèlent significativement la diversité bactérienne dans les sols de résistance induite et de résistance durable. Compte tenu du fait que les gènes codant pour des métabolites impliqués dans la lutte biologique ne permettent pas de différencier les sols résistants des sols sensibles de Morens, le développement d'outils moléculaires reflétant l'expression et la régulation de l'expression de ces gènes au niveau de la communauté de *Pseudomonas* fluorescents bénéfiques sera nécessaire à l'avenir, afin de mieux comprendre le mécanisme naturel de résistance des sols.