

Diss. ETH No. 15724

**Analysis of stress response and type III secretion system
mediated biocontrol in fluorescent pseudomonads
protecting plants from soil-borne diseases**

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

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

Presented by **FABIO REZZONICO**

Dipl. sc. nat. ETH

born February 1st, 1973

citizen of Lugano (TI)

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. G. Défago, referent (Zürich)

Prof. Dr. Yvan Moëgne-Loccoz, co-referent (Lyon)

Prof. Dr. Bruce McDonald, co-referent (Zürich)

The great tragedy of science – the slaying of a beautiful hypothesis by an ugly fact.

T. H. Huxley, Biogenesis and abiogenesis (1870)

TABLE OF CONTENTS

ABBREVIATIONS AND SYMBOLS	3
SUMMARY	5
RIASSUNTO	7
CHAPTER 1 - GENERAL INTRODUCTION	11
CHAPTER 2 Effect of stress on the performance of a <i>phlA</i> -based quantitative competitive PCR assay to monitor biocontrol <i>Pseudomonas fluorescens</i> CHA0	57
CHAPTER 3 Comparison of ATPase-encoding type III secretion system gene <i>hrcN</i> in biocontrol fluorescent pseudomonads and phytopathogenic proteobacteria	73
CHAPTER 4 Evolutionary recycling of phytopathology-related type III secretion system gene(s) leads to development of beneficial plant-microbe interaction	107
CHAPTER 5 - GENERAL DISCUSSION	133
CHAPTER 6 - APPENDIX Sequencing of type III secretion system genes of <i>P. fluorescens</i> KD downstream of <i>hrcN</i>	151
ADDENDUM Annotated TTSS sequence of <i>P. fluorescens</i> KD	158
ACKNOWLEDGEMENTS	161
CURRICULUM VITAE	163
PUBLICATIONS	164

SUMMARY

The utilization of *Pseudomonas* strains as inoculants for biological control of soilborne plant diseases offers a promising alternative solution to the application of chemical pesticides, but their inconsistent performance under field conditions has hindered a widespread commercialization. To overcome these problems, it is therefore important to understand the ultimate fate of released bacteria in a stressful environment such as natural soil and to fully comprehend the mechanisms involved in plant protection. The purpose of this work was to analyze the physiological status and the traceability of stressed *Pseudomonas* cells using a polymerase chain reaction (PCR) approach and to study the potential role of the type III secretion system (TTSS) in biocontrol interactions.

In the first part, the effect of different types of abiotic stresses on the physiological status of the bacteria was investigated and correlated with their enumerability by quantitative competitive PCR (QC-PCR). Good statistical correlations were found between QC-PCR and both culturable and total cell number when studying cells in fresh laboratory cultures, but not when using stressed cultures containing viable but non-culturable cells (VBNC). In the latter case the amount of DNA detected by PCR was in most cases higher than the one expected to be detected in colony forming units (CFUs) alone. Conversely, this was found to be either higher or lower than the amount expected in total cells enumerated by immunofluorescence, depending on the type of stress factor applied. This suggests that different stresses affect DNA availability to PCR (hence also to bacterial RNA polymerase) in different ways, producing distinct types of non-culturable cells. These factors make QC-PCR a method difficult to use for bacterial quantification in environmental samples, but which may however enable to gain insight about the physiological state of bacteria subjected to environmental stresses.

In the second part of this work, the presence of genes belonging to the TTSS was studied among a well-characterized worldwide collection of biocontrol pseudomonads using PCR and DNA hybridization. TTSS gene *hrcN* was found in about 60% of biocontrol fluorescent pseudomonads studied, with no particular predilection for the geographical origin of the strains, their different biocontrol ability or the plant species

from which they were originally isolated. The TTSS sequences found were analyzed to establish the phylogenetic relationships among them and compared to those found in plant pathogenic pseudomonads. Data were used to build a phylogenetic tree, which was compared to the tree derived from 16S-rDNA sequences. The fact that 16S rDNA and *hrcN* have followed a similar evolution points to the ancestral origin of TTSS both in pathogenic and non-pathogenic strains. In the *hrcN* tree most biocontrol pseudomonads clustered separately from their phytopathogenic counterparts, there were however few exceptions suggesting that in some cases, e.g. in *P. fluorescens* KD, TTSS genes might have experienced an horizontal gene transfer (HGT).

The impact of this HGT event on biological control was investigated in the third part of this work, where the biocontrol performance of a *hrcV* mutant of KD against *P. ultimum* in cucumber was compared with those of wildtype KD and found to be significantly lower. This effect was not to ascribe to an altered cucumber root colonization ability, which was unaffected in the mutant strain. In order to understand which interactions are important for the activation of TTSS, the promoter region controlling the *hprJ*-operon of *P. fluorescens* KD, which contains *hrcV*, was fused to an *inaZ* reporter gene and its activity was measured both *in vitro* and *in vivo* in presence of plant and pathogen. The expression of the *hprJ*'-*inaZ* reporter fusion was similar in non-sterile potting mix substratum and in the cucumber rhizosphere, but in both cases it was significantly higher when *P. ultimum* was also present, especially in the rhizosphere. *In vitro*, an increase in *inaZ* activity was observed when strain KD was cultivated in presence of *P. ultimum* but not with wheat pathogen *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, against which KD shows no biocontrol activity. The effect on *P. ultimum* was assessed *in vitro* by measuring the activity of fungal polygalacturonase (PGA), which is a key pathogenicity enzyme for this fungus. When *P. ultimum* was confronted to *P. fluorescens* KD, PGA production was delayed and enzyme levels were statistically lower. In contrast, the *hrcV*⁻ mutant KD-dork did not delay pectinase production in *P. ultimum* and enzyme levels were statistically higher with KD-dork compared to KD. Taken together, these results indicate that the expression of TTSS genes in *P. fluorescens* KD is induced by the presence of the pathogen rather than the root, and they suggest that the contribution of TTSS to the biocontrol activity of this strain targets the pathogen directly.

RIASSUNTO

Analisi della risposta allo stress e ruolo dell'apparato di secrezione delle proteine di tipo III nell'attività di controllo biologico in batteri appartenenti al genere *Pseudomonas* in grado di proteggere le piante da agenti patogeni residenti nel suolo.

L'utilizzo di ceppi batterici appartenenti al genere *Pseudomonas* quali agenti di controllo biologico rappresenta una promettente alternativa all'uso di pesticidi chimici per la protezione delle coltivazioni da agenti patogeni residenti nel suolo, ma la scarsa efficacia della loro applicazione pratica su vasta scala ne ha per ora impedito una loro estesa commercializzazione. Per risolvere questi problemi è perciò importante capire quale è il destino dei batteri rilasciati nell'ambiente a questo scopo e quali sono i meccanismi molecolari coinvolti nell'azione di biocontrollo. L'obiettivo di questo lavoro è quello di analizzare le conseguenze degli stress ai quali sono sottoposti i batteri una volta rilasciati nel suolo, con particolare attenzione all'analisi del loro stato fisiologico e della loro reperibilità attraverso una tecnica basata sulla reazione a catena della polimerasi (PCR), e lo studio del potenziale coinvolgimento dell'apparato di secrezione delle proteine di tipo III (SS3) nell'attività di biocontrollo.

Nella prima parte di questo lavoro è stata studiata l'influenza di differenti tipi di stress abiotici sullo stato fisiologico di *Pseudomonas fluorescens* CHA0. La PCR quantitativa (QC-PCR) è stata utilizzata quale tecnica alternativa per la conta batterica. Una buona correlazione statistica è stata trovata tra i risultati della QC-PCR, il numero di unità formanti colonie (UFC) e il numero totale di cellule rilevate, quando questa tecnica è stata applicata a colture batteriche cresciute in condizioni standard. Quando l'analisi è stata estesa a colture di cellule vitali ma non coltivabili (VBNC, *viable but non culturable*) sottoposte a differenti tipi di stress abiotici questa correlazione non è stata riscontrata. La quantità di DNA rilevata mediante PCR è risultata, nella maggior parte dei casi, più elevata rispetto a quella attesa nelle sole UFC e rispetto al conteggio delle cellule totali al microscopio a immunofluorescenza è stata rilevata una maggiore o minore quantità di DNA a in relazione al tipo di stress applicato.

Questo risultato porta ad ipotizzare che i differenti tipi di stress influenzino diversamente la disponibilità del DNA batterico all'amplificazione durante la PCR (e quindi, di riflesso, probabilmente anche alla RNA polimerasi batterica), producendo tipologie di cellule vitali ma non coltivabili (VBNC) differenti tra loro.

In conclusione, la QC-PCR risulta un metodo di difficile applicazione per la quantificazione dei batteri, ma può essere utilizzata per analizzare la reazione fisiologica dei batteri agli stress ai quali sono sottoposti nel loro ambiente naturale.

Nella seconda parte di questo lavoro, una collezione di ceppi di *Pseudomonas* provenienti da tutto il mondo con proprietà di biocontrollo, è stata studiata mediante PCR ed ibridazione per verificare la presenza di geni appartenenti al SS3. Il gene *hrcN*, codificante per una ATPasi del SS3, è stato trovato in circa 60% dei ceppi di *Pseudomonas* studiati, indipendentemente dal loro luogo di provenienza, dalle proprietà di biocontrollo espresse dal ceppo o dalla specie della pianta dalla quale erano stati originalmente isolati.

Le sequenze *hrcN* trovate nei ceppi di biocontrollo sono state paragonate tra di loro per determinare le relazioni filogenetiche e confrontate con sequenze appartenenti a ceppi fitopatogeni. I dati ottenuti sono stati usati per costruire un albero filogenetico, che è stato comparato a quello ottenuto utilizzando le sequenze dei geni codificanti per l'RNA ribosomale (16S-rDNA).

Come nel caso dell'RNA ribosomale, la maggior parte dei ceppi *Pseudomonas* di biocontrollo rappresentati nell'albero basato sulla sequenza di *hrcN* appartiene ad una clade separata rispetto ai batteri fitopatogeni. Il fatto che entrambi i geni si siano evoluti parallelamente suggerisce che vi sia un'origine ancestrale comune tra l'apparato di secrezione dei ceppi saprofiti e quello dei ceppi patogeni. Alcune incongruenze tra i due alberi filogenetici, come per esempio nel caso di *P. fluorescens* KD, suggeriscono però la possibilità che un trasferimento orizzontale di geni del SS3 da saprofiti a patogeni possa essere in alcuni casi avvenuto.

L'influsso del trasferimento e dell'acquisizione di geni appartenenti al SS3 sull'attività di biocontrollo di *P. fluorescens* KD è stato studiato nella terza parte di questo lavoro, con la creazione e l'analisi di un mutante nel gene *hrcV*. Questo mutante, denominato KD-dork, ha dimostrato una minor efficacia rispetto al ceppo selvatico nel proteggere

piante di cetriolo (*Cucumis sativus*) dagli attacchi causati dal fungo *Pythium ultimum*, agente eziologico della marcescenza delle radici (root rot), ma il minor biocontrollo non è da ascrivere ad una inferiore capacità da parte del batterio di colonizzare le radici della pianta. Allo scopo di analizzare quali sono le interazioni importanti per l'attivazione del SS3 nel processo di biocontrollo, la regione promotrice dell'operone *hrpJ* (contenente anche *hrcV*) è stata fusa a un gene reporter (*inaZ*), la cui attività è stata misurata sia *in vivo* che *in vitro* in presenza di pianta e patogeno. L'espressione del costrutto si è rivelata simile sia in substrato non sterile che nella rizosfera del cetriolo, aumentando sensibilmente in entrambi i casi, ma in modo più accentuato nella rizosfera, nel caso di presenza del patogeno *P. ultimum*. *In vitro*, un aumento dell'attività di *inaZ* è stato osservato in presenza di *P. ultimum* ma non del patogeno del frumento *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* contro il quale KD non mostra alcuna attività di biocontrollo. L'effetto sulla patogenicità di *P. ultimum* è stato misurato *in vitro* analizzando la produzione fungina di poligalatturonasi (PGA). Alla presenza di *P. fluorescens* KD la produzione di PGA da parte di *P. ultimum* è ritardata e risulta statisticamente più bassa. Al contrario, la presenza del mutante *hrcV*⁻ KD-dork non ritarda la produzione di PGA da parte del fungo e gli permette una produzione dell'enzima che è statisticamente più alta rispetto al ceppo selvatico. Concludendo, questi risultati indicano come l'espressione dei geni del SS3 in *P. fluorescens* KD sia indotta proprio dalla presenza del patogeno piuttosto che da quella della pianta e della sua radice, e suggeriscono come probabilmente sia proprio il fungo ad essere l'obiettivo diretto dell'attività del SS3 acquisito da KD.