

DISS. ETH NO. 26822

**PLANT-BENEFICIAL FLUORESCENT PSEUDOMONADS WITH
INSECTICIDAL ACTIVITY: MOLECULAR TRAITS AND ECOLOGY
OF INSECT-ASSOCIATED LIFESTYLES**

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

MARÍA DEL PILAR VESGA AGUADO

*Máster Universitario en Microbiología
Universidad Autónoma de Madrid
born on 31.07.1990
citizen of Spain*

accepted on the recommendation of

*Prof. Monika Maurhofer
Dr. Christoph Keel
Prof. Robert Jackson
Prof. Bruce McDonald*

2020

SUMMARY

This thesis focuses on a special group of plant-beneficial pseudomonads with insecticidal activity. Bacteria belonging to the *Pseudomonas fluorescens* group are excellent root-colonizers with many plant beneficial effects. These bacteria can promote plant growth through the production of hormones and increase the availability of certain soil nutrients. Fluorescent *Pseudomonas* are also able to control the emergence of soil-borne diseases mainly by the production of antimicrobial secondary metabolites and to induce systemic resistance in the plant host rendering it ready for the attack of pathogens or predators. Intriguingly, two species within the fluorescent pseudomonads, *P. chlororaphis* and *P. protegens*, possess the ability to colonize and kill Lepidopteran insects in addition to all these plant beneficial activities. In the last decade, several factors contributing to the insecticidal activity of these fascinating bacteria were identified, and insecticidal pseudomonads have emerged as promising candidates for the biological control of soil-derived insect pests for which no satisfactory control methods exist.

The major aims of this thesis were to study the nature of *Pseudomonas*-insect interactions and its ecological significance, and to investigate, in a susceptible insect species, the pathogenicity process and the factors required at different phases during insect colonization and killing.

In the first part of the thesis, we investigated whether the inability, of model strain *P. protegens* CHA0, to kill certain insect species, is due to its failure to persist in the animals. Based on feeding assays in combination with bacterial monitoring we showed that *P. protegens* CHA0 is highly lethal to larvae of *Plutella xylostella* (Lepidoptera) and *Pieris brassicae* (Lepidoptera) while being pathogenic, but less effective against larvae of *Delia radicum* (Diptera). *P. protegens* CHA0 had no effect on larvae of *Otiorhynchus sulcatus* (Coleoptera). However, *P. protegens* CHA0 persisted from larval to adult stage in all these

species and was transmitted to a new plant host by *D. radicum* flies. These findings indicate that insecticidal pseudomonads can establish different relationships with insects ranging from exploiting insects as food source to using them as vectors for dispersal.

A central part of the thesis concentrated on identifying the specific sets of genes a pseudomonad needs when colonizing a plant or an insect hosts, and to identify the specific role of individual factors during insect colonization and throughout disease progression. To this end, a large-scale transcriptomics dataset of *P. protegens* strain CHA0 was generated which includes data from the colonization of wheat roots, the gut of *P. xylostella* after oral uptake and the *Galleria mellonella* hemolymph after injection. The transcriptomic profiles strongly varied depending on the environment. Furthermore, we could associate specific factors to different hosts or different stages of insect infection. In addition, new traits contributing to insecticidal activity were identified, such as effector proteins (toxins) released by two-partner secretion systems (TPS). Their role during infection of *P. xylostella* was verified using a mutational approach. Altogether, this data allowed us to propose a comprehensive insect colonization and pathogenesis model for *P. protegens* CHA0.

The ecological relevance of non-pathogenic interactions with insects described in the first part of the thesis, and the natural association of *P. protegens* and *P. chlororaphis* to insects, still remains unknown. To address these questions, we searched for insecticidal *Pseudomonas* in arthropods collected from a wheat field, a potato field and neighbouring grassland. We found that *P. protegens* and *P. chlororaphis* are naturally present in healthy insects and myriapods and isolated a set of new strains from arthropods, soil and roots. Although all strains, independently of their host of origin or their phylogenetic position, had oral activity against *P. xylostella*, the insecticidal capacities of different *P. chlororaphis* isolates were not as homogeneous as observed for *P. protegens*.

Phylogenetically closely related *P. chlororaphis* strains differed in insect killing speed and efficiency. We hypothesize that the lower insecticidal activity observed for two Coleoptera isolates could be related to mutations in key insecticidal factors, such as the Fit toxin and TPSA proteins, that we discovered using a single nucleotide polymorphism analysis based on the whole genomes. These findings point towards an order-specificity or adaptation to certain insect hosts and show the ubiquitous nature of these special pseudomonads.

This thesis substantially improves our knowledge about the pathogenesis of insect infecting *Pseudomonas* and the ecology of arthropod-*Pseudomonas* relationships. The novel information we gained is of great scientific, but also agricultural and environmental value, since it is highly important for the development of new biocontrol tools within the frame of a sustainable agriculture relying on environmentally friendly pest control methods.

ZUSAMENFASSUNG

Im Rahmen dieser Dissertation wurden Pseudomonaden mit insektizider Aktivität untersucht, eine spezielle Gruppe innerhalb der fluoreszierenden Pseudomonaden. Diese Bakterien sind bekannt für ihre Fähigkeit Wurzeln zu kolonisieren und auch für ihre vielen nützlichen Effekte auf Pflanzen. So können sie das Pflanzenwachstum fördern und die Verfügbarkeit von gewissen Nährstoffen im Boden erhöhen. Fluoreszierende Pseudomonaden sind auch fähig Pflanzen vor bodenbürtigen Krankheiten zu schützen und in ihnen systemische Resistenz gegen Pathogene und Insekten zu induzieren. Faszinierenderweise gibt es zwei Arten unter ihnen, *Pseudomonas protegens* und *Pseudomonas chlororaphis*, die nicht nur alle diese nützlichen Eigenschaften haben, sondern zusätzlich noch die Fähigkeit besitzen, Lepidopterenlarven zu besiedeln und zu töten. Im letzten Jahrzehnt wurden mehrere insektenpathogene Faktoren bei diesen Bakterien entdeckt und insektizide Pseudomonaden werden als vielversprechende Kandidaten für die Entwicklung von Biokontrollprodukten angesehen, welche gegen schwer zu bekämpfende bodenbürtige Insekten eingesetzt werden können.

Die Hauptziele dieser Arbeit waren, erstens die Natur der *Pseudomonas*-Insekten Interaktion und ihre ökologische Bedeutung zu untersuchen und zweitens, in einer anfälligen Insektenart, den Prozess der Pathogenese zu studieren mit dem Ziel die Zeitpunkte, an denen verschiedene Faktoren wirken zu identifizieren.

Im ersten Teil der Dissertation haben wir untersucht, ob die Unfähigkeit des Modellstammes *P. protegens* CHA0 gewisse Insektenarten zu töten daran liegen könnte, dass die Bakterien im Innern des Insektes nicht überleben. Aufgrund von Fütterungsversuchen mit anschließendem Monitoring der Bakterien im Insekt konnten wir zeigen, dass die beiden Lepidoptera Arten *Plutella xylostella* und *Pieris brassicae* hoch anfällig auf CHA0 sind, die Diptera Art *Delia radicum* weit weniger anfällig und die Coleoptera Art

Otiorhynchus sulcatus weitgehend resistent ist. Interessanterweise konnte das Bakterium aber in allen vier Arten vom Larven- über das Puppenstadium bis zum adulten Insekt überleben und wir konnten zeigen, dass CHA0 sogar von adulten *Delia* Fliegen auf neue Wirtspflanzen übertragen werden kann. Unsere Resultate deuten darauf hin, dass insektizide Pseudomonaden verschiedene Arten von Beziehungen mit Insekten eingehen können und diese in manchen Fällen als Nahrungsquelle, in andern als Vektoren für ihre Verbreitung nutzen können.

Ein zentraler Teil dieser Arbeit beschäftigte sich damit zu untersuchen, welche spezifischen Gene die Pseudomonaden für die Besiedelung von Wurzeln und welche sie für die Kolonisierung von Insekten brauchen. Dazu sollte herausgefunden werden, welche Faktoren die Bakterien zu welchem Zeitpunkt der Kolonisierung und des Infektionsprozesses brauchen. Zu diesem Zweck haben wir einen Vergleich von *P. protegens* CHA0 Transkriptomen gemacht d.h. von Bakterien während der Besiedelung von Weizenwurzeln, während verschiedener Phasen der Besiedelung des Darms von *P. xylostella* nach oraler Applikation sowie von Bakterien nach Injektion in die Hämolymphe von *Galleria mellonella*. Die Transkriptome unterschieden sich stark voneinander in Abhängigkeit des Wirtes und der verschiedenen Infektionsphasen und wir konnten einzelne Pathogenitätsfaktoren bestimmten Phasen der Infektion zuordnen. Zudem gelang es uns, neue Faktoren zu identifizieren wie z.B. Effektoren (Toxine), die von Zwei-Partner-Sekretionssystemen (TPS) gebildet werden und ihre Rolle in der Pathogenese mittels Deletionsmutanten zu verifizieren. Die Erkenntnisse dieses Dissertationsteiles ermöglichten uns, ein umfassendes Modell für die Insektenkolonisierung und -pathogenität von *P. protegens* CHA0 aufzustellen.

Die ökologische Relevanz von nicht-pathogenen Interaktionen mit Insekten, wie sie im ersten Teil der Dissertation beschrieben wurden, sowie die Frage, ob *P. protegens* und *P.*

chlororaphis in der Natur mit Insekten assoziiert sind, sind noch ungeklärt. Diesen Fragen wurde im letzten Teil der Dissertation nachgegangen. Dazu untersuchten wir verschiedene Arthropoden, die wir in einem Weizenfeld, einem Kartoffelfeld und einer benachbarten natürlichen Wiese gesammelt hatten. Tatsächlich konnten wir beide *Pseudomonas*-Arten von gesunden Tieren, die zu verschiedenen Insekten- und Myriopoda-Arten gehören isolieren. Wir verglichen die phenotypischen Eigenschaften einer Sammlung von Pflanzen- und Insekten-Isolaten. Wir stellten fest, dass unabhängig vom Wirt, von dem sie isoliert worden waren und von ihrer Position im phylogenetischen Stammbaum, alle Isolate orale Aktivität gegen Larven von *P. xylostella* haben, aber dass die *P. chlororaphis* Isolate viel diverser bzgl. insektizider Aktivität sind als wir es für *P. protegens* beobachten konnten. Phylogenetisch sehr nahe verwandte *P. chlororaphis* Isolate unterschieden sich deutlich in ihrer Effizienz und Geschwindigkeit *Plutella* Larven zu töten. Wir vermuten, dass die reduzierte insektizide Wirkung, die wir bei zwei Käferisolaten festgestellt haben, auf einige Mutationen in für die Pathogenese wichtigen Genen zurückzuführen sein könnte. Eine „single nucleotide polymorphism“ Analyse der Genome zeigte, dass die Käferisolate, im Vergleich zu hoch aggressiven Wurzelisolaten, aminosäureverändernde Mutationen des Fit Toxingens sowie zweier TPS Gene aufweisen. Diese Resultate deuten auf eine mögliche Spezifität für verschiedene Insektenordnungen, respektive auf eine Adaptation an verschiedene Insektenwirte innerhalb dieser speziellen Gruppe von Pseudomonaden hin und verdeutlichen ihre unglaublichen Fähigkeiten, sich an verschiedene Umgebungen anzupassen.

Diese Dissertation verbessert unser Wissen über die Pathogenese von Insekten-infizierenden Pseudomonaden und die Ökologie von *Pseudomonas*-Arthropoden Beziehungen wesentlich. Die gewonnenen Informationen sind nicht nur von Bedeutung für die Wissenschaft, sondern auch für die Landwirtschaft und die Umwelt, da sie äusserst

wichtig sind für die Entwicklung von *Pseudomonas*-Bakterien als neue Biokontrollwerkzeuge im Rahmen einer nachhaltigen Landwirtschaft und der Nutzung von umweltfreundlichen Methoden für die Kontrolle von Schadinsekten.