



Doctoral Thesis

Identification of Indigenous Phyllosphere Isolates of the Genus *Sphingomonas* as Plant-Protective Bacteria

Author(s):

Innerebner, Gerd

Publication Date:

2011

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-6620246> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH NO. 19649

Identification of Indigenous Phyllosphere Isolates of the Genus *Sphingomonas* as Plant-Protective Bacteria

A dissertation submitted to
ETH Zurich

for the degree of
Doctor of Sciences

Presented by
Gerd Innerebner

Mag. rer. nat., Leopold-Franzens-Universität Innsbruck

Born on 3 January 1980
Citizen of Italy

April 2011

ETH

Eidgenössische Technische Hochschule Zürich
Swiss Federal Institute of Technology Zurich

Referees:

Prof. Dr. Julia A. Vorholt
Prof. Dr. Hans-Martin Fischer
Prof. Dr. Leo Eberl

Thesis Abstract

Leaf surfaces are colonized by a large number and diversity of microorganisms. This habitat, also termed phyllosphere, represents one of the largest biological interphases on Earth and the indigenous microbiota is sufficiently large to have an impact on the global carbon and nitrogen cycles. It is thought that the majority of phyllosphere colonizers are commensal bacteria, which do not harm the plant. However, their role in this "harsh" environment, which is characterized by rapidly fluctuating conditions such as changes in temperature, UV radiation, and nutrient availability, is not clear. Here, complementary cultivation-independent methods were applied to study the composition and physiology of phyllosphere bacterial communities. Metagenomics and 16S rRNA gene based analysis revealed a high consistency of the leaf-associated microbiota on field-grown soybean, clover, and *Arabidopsis thaliana* plants. It was found that members of the alphaproteobacterial genera *Methylobacterium* and *Sphingomonas* were among the dominating bacteria in the phyllosphere. This was confirmed by community proteogenomics, which revealed also information about their physiology. Proteins of *Methylobacterium* were to a large extent related to C1 metabolism, whereas for *Sphingomonas* a remarkably high expression of transport-related proteins was observed. The predominance of these two commensal bacterial genera provoked the question about their role in the phyllosphere ecosystem. To investigate whether they support plants in defending pathogen attacks, a gnotobiotic *in planta* assay with *A. thaliana* as model plant and *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* as model pathogen was developed. When plants were grown in the presence of *Methylobacterium* spp. no effect on disease development was observed. In contrast, *Sphingomonas* spp. showed a striking plant-protective effect by suppressing disease symptoms and diminishing pathogen growth. Most tested plant isolates of the genus *Sphingomonas* were effective against *P. syringae*, suggesting that plant protection might be a common trait of indigenous plant-colonizing *Sphingomonas* spp. Towards understanding the mode of action, different experimental approaches were applied. Substrate utilization profiling and *in planta* feeding experiments indicated that substrate competition might play an important role in plant protection. However, other mechanisms could be involved as well. To reveal more details about this plant-protective effect, a forward genetic *in planta* screen was developed. For that, cells of the model strain *Sphingomonas* sp. Fr1 were randomly mutagenized by insertion of a mini-Tn5 transposon into the genome and bioluminescence of a lux-tagged *P. syringae* strain was used as read-out for pathogen proliferation. A first screening of 1,500 Tn5 mutants resulted in the identification of three mutants impaired in plant protection, demonstrating the potential of this method to uncover molecular details about the mechanisms of antagonism. Such efforts might lead to novel insights into plant-microbe-microbe interactions and pave the way for possible field applications in the future.

Zusammenfassung

Blattoberflächen werden von einer großen Anzahl und Vielfalt an Mikroorganismen besiedelt. Dieses Habitat, auch Phyllosphäre genannt, stellt einen der größten Lebensräume der Erde dar. Die dort vorkommenden Mikroorganismen sind so zahlreich, dass sie die globalen Kohlenstoff- und Stickstoffkreisläufe beeinflussen. Es wird angenommen, dass die meisten dieser Phyllosphären-Bewohner kommensale Bakterien sind, die das Wachstum der Pflanze nicht negativ beeinflussen. Die genaue Rolle jedoch, die diese Bakterien auf Blattoberflächen spielen, ist noch weitgehend unklar. Aus diesem Grund haben wir kultivierungsunabhängige Methoden angewandt, um die Struktur und Lebensweise von bakteriellen Gemeinschaften in der Phyllosphäre zu erforschen. Untersuchungen auf der Basis von Metagenom- und 16S rRNA Gen-Daten haben gezeigt, dass die Zusammensetzung der Bakterien, die auf Blättern von Sojabohnenpflanzen, Klee und *Arabidopsis thaliana* leben, sehr ähnlich ist. Mitglieder der Gattung *Methylobacterium* und *Sphingomonas* dominierten die bakteriellen Gemeinschaften. Dies konnte durch die Analyse von Proteomics Daten bestätigt werden. Darüber hinaus konnten noch zusätzliche Informationen über die physiologischen Eigenschaften der Blattbewohner gesammelt werden. Viele Proteine von *Methylobacterium* konnten dem C1 Stoffwechsel zugeordnet werden, während für *Sphingomonas* eine überdurchschnittlich hohe Expression von Transportproteinen beobachtet wurde. Das dominierende Auftreten dieser beiden nicht-pathogenen Bakteriengruppen veranlasste uns zu untersuchen, ob sie möglicherweise eine spezielle Rolle in der Abwehr von Krankheitserregern spielen. Aus diesem Grund wurde ein gnotobiotisches Testsystem mit *A. thaliana* als Modellpflanze und *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* als phytopathogenem Bakterium aufgebaut. Während sich die Anwesenheit von Methylobakterien nicht auf den Krankheitsverlauf auswirkte, konnten die meisten Pflanzenisolate der Gattung *Sphingomonas* die Vermehrung von *P. syringae* hemmen und damit die Entstehung von Krankheitssymptomen verhindern. Dies ist ein erster Hinweis darauf, dass Blätter-besiedelnde *Sphingomonas* Arten die Eigenschaft besitzen, Pflanzen gegen bakterielle Angreifer zu schützen. Um den Wirkungsmechanismus zu identifizieren, der diesem Antagonismus zugrunde liegt, wurden verschiedene Ansätze verfolgt. Substratverwertungsprofile und Pflanzenexperimente, in denen den Bakterien zusätzliche Nährstoffe angeboten wurden, wiesen darauf hin, dass Nahrungskonkurrenz eine wichtige Rolle spielen könnte. Des Weiteren wurde ein *in planta* Screening-Verfahren entwickelt, bei dem der Modellstamm *Sphingomonas* sp. Fr1 durch die Insertion eines mini-Tn5 Transposons genetisch verändert und die Vermehrung eines markierten *P. syringae* Stammes anhand von Biolumineszenz verfolgt wurde. In einem ersten Screening-Versuch mit 1.500 Tn5 Mutanten konnten drei *Sphingomonas* Stämme identifiziert werden, die nicht mehr in der Lage waren, die Pflanze vollständig gegen *P. syringae* zu schützen. Das zeigt, dass diese Methode das Potenzial hat, auf molekularer Ebene neue Details über den Wirkungsmechanismus zu enthüllen. Weitere Anstrengungen in diese Richtung könnten dazu beitragen, das Zusammenspiel zwischen Pflanzen und Bakterien besser zu verstehen und damit neue Ansätze im biologischen Pflanzenschutz zu finden.