



Doctoral Thesis

Molecular interactions of *Arabidopsis thaliana* and *Sphingomonas melonis* Fr1 provide plant protection against *Pseudomonas syringae*

Author(s):

Vogel, Christine Maria

Publication Date:

2016

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010878292> →

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. 23726

Molecular interactions of *Arabidopsis thaliana* and *Sphingomonas melonis* Fr1 provide plant protection against *Pseudomonas syringae*

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

Christine Maria Vogel

MSc. ETH Zürich, Zurich

born on 01.12.1986

citizen of

Kottwil (LU) and Willisau-Land (LU)

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Julia A. Vorholt

Prof. Dr. Wolf-Dietrich Hardt

Prof. Dr. Wilhelm Grissem

2016

Summary

Plants in nature do not live as isolated entities but are rather an integral part of their environment and supply nutrients and a habitat for a variety of microorganisms. Plant-associated microbe communities form the so-called microbiota which affect its host's growth and health. The above-ground parts of plants, collectively called the phyllosphere, host microbial communities that are taxonomically structured and dominated by bacteria. Members of the genus *Sphingomonas* are abundantly found on leaves of different plant species and constitute a part of the core phyllosphere microbiota. Various members of the indigenous *Sphingomonas* population have been shown to provide plant protection in a tripartite *Arabidopsis thaliana* – *Pseudomonas syringae* model pathosystem, reducing pathogen proliferation and disease symptom formation. While competition for limited nutrients was proposed to contribute to plant protection, direct bacteria-bacteria interactions as well as a plant-mediated protection could also play a role. This thesis describes the identification of molecular aspects of both *Sphingomonas melonis* Fr1 and *Arabidopsis thaliana* required for plant protection in a gnotobiotic model system.

A forward genetic *in planta* screen of over 7000 *S. melonis* Fr1 transposon mutants resulted in the identification of several genes and operons of *S. melonis* Fr1 that are required for plant protection. Among the *Sphingomonas* mutants that showed reduced plant protection several were potentially affected in the regulation of various genes and potentially impaired in the proper functioning of other gene products. Interestingly, an operon encoding for a putative molybdenum-dependent formate dehydrogenase was identified that could explain the reduced plant protection phenotype of an independently identified mutant impaired in its molybdenum cofactor biosynthesis. Characterization of another mutant affected in the *rsh* gene involved in alarmone biosynthesis revealed that the same formate dehydrogenase showed lower protein abundances on leaves compared to the wildtype. Constitutive expression of the formate dehydrogenase operon could partly complement the reduced plant protection phenotype of the regulatory *rsh* mutant, corroborating the importance of this formate dehydrogenase for plant protection. However, also other targets identified by screening showed altered protein abundance in the *rsh* mutant *in planta*.

Plants have a sophisticated innate immune system that recognizes conserved microbe-associated molecular patterns (MAMPs) through pattern-recognition receptors present on the plasma membrane as well as manipulation of the plant host through other receptors. Leaf transcriptome analysis revealed striking differences in the response of *A. thaliana* to two representative phyllosphere model strains, namely *S. melonis* Fr1 and the non-protective *Methylobacterium extorquens* PA1. The overlap of plant response to the protective *S. melonis* Fr1 and the pathogenic *P. syringae* DC3000 suggested that plant protection could also be plant-mediated. Indeed functional pattern-triggered plant immunity is required for full plant protection as a plant mutant lacking functional co-receptors for different pattern-recognition receptors showed attenuated plant protection by *S. melonis* Fr1. It is as yet not known how the plant detects *S. melonis* Fr1 colonization and what molecular determinants are recognized. Experiments with an *S. melonis* Fr1 mutant devoid of flagellin as well as with plant mutants impaired in recognition of other well-studied MAMPs such as elongation factor Tu revealed that these are not required for plant protection, indicating that other not well-studied MAMPs must be recognized. Whether some of the *Sphingomonas* mutants with reduced plant protection are less well recognized by the plant and whether plant responses to these mutants differ from the response to the wildtype will be addressed in the future and likely further improve the understanding of plant protection by *S. melonis* Fr1.

The recently created systematic strain collection of phyllosphere isolates from environmental *Arabidopsis thaliana* leaves allowed to test how widespread plant protection traits are among *Sphingomonas* isolates. A first screen of over 40 environmental *Sphingomonas* isolates revealed that

plant protection is not common and that the degree of plant protection provided by the different isolates varies. Comparing the genomes of most of these isolates revealed that plant protection cannot be solely explained by the presence or absence of individual genes. More in-depth analysis is therefore required.

To conclude, it was demonstrated that plant protection by *Sphingomonas* is not a single gene trait but rather a more complex trait that requires several genetic elements on both the plant- and bacterial side for full plant protection. This thesis provides a basis for further analysis of plant protection both on the plant and on the bacterial side and clearly reveals that plant protection is not solely based on bacteria-bacteria antagonism but also requires the plant's innate immune system.

Zusammenfassung

In der Natur leben Pflanzen nicht isoliert, sondern als wichtiger Bestandteil ihrer Umwelt und liefern Nährstoffe und Lebensraum für eine Vielfalt von Mikroorganismen, der sogenannten Mikrobiota. Diese mikrobiellen Gemeinschaften leben in enger Assoziation mit der Pflanze und beeinflussen deren Wachstum und Gesundheit. Die Teile der Pflanzen, welche oberhalb der Erde wachsen, bilden die Phyllosphäre. Auf ihnen finden sich Mikroorganismen, am häufigsten Bakterien, in wiederkehrenden taxonomischen Verhältnissen. Mitglieder des Genus *Sphingomonas* finden sich häufig auf Blättern von verschiedenen Pflanzenarten und bilden einen Teil der Kernmikrobiota der Phyllosphäre. Verschiedene natürlich vorkommende Sphingomonaden schützen Pflanzen in einem dreiteiligen Modellsystem, bestehend aus letzteren, der Pflanze *Arabidopsis thaliana* und dem Pflanzenpathogen *Pseudomonas syringae*, indem sie die Proliferation des Pathogens und die Entstehung von Krankheitssymptomen reduzieren oder gar verhindern. Neben Konkurrenz um Nährstoffe können auch direkte Bakterien-Bakterien Interaktionen und pflanzenvermittelte Immunantworten zu dem Schutzeffekt beitragen. Diese Arbeit beschreibt die Identifizierung molekularer Aspekte sowohl von *S. melonis* Fr1 als auch von *A. thaliana*, welche zum Pflanzenschutz beitragen. Dabei wird ein gnotobiotisches System verwendet in dem ausschließlich die zu untersuchenden Organismen vorhanden sind.

Eine systematische genetische Analyse von über 7000 *S. melonis* Fr1 Transposonmutanten erlaubte die Identifizierung von mehreren Genen und Operons, welche für den Pflanzenschutzeffekt wichtig sind. Unter den Transposonmutanten, die eine reduzierte Schutzwirkung zeigten, fanden sich solche mit potentiell beeinträchtigter Regulierung mehrerer Gene, als auch solche bei denen die Funktion anderer Genprodukte selber ihre Funktion nicht richtig ausführen konnten. Es konnte ein Operon identifiziert werden, welches für eine putative Molybdän-abhängige Formiat-Dehydrogenase kodiert. Dies ist interessant, da unabhängig ebenfalls eine Mutante mit Beeinträchtigung in der Molybdänkofaktorbiosynthese gefunden wurde. Zusätzlich zeigte die Charakterisierung einer weiteren Mutante, in welcher das für die Alarmon Biosynthese zuständige *rsh* Gen beeinträchtigt ist, reduziertes Vorkommen von Formiat-Dehydrogenase verglichen mit dem Wildtyp auf der Pflanze. Eine konstitutive Expression des Formiat Dehydrogenase Operons konnte den reduzierten Schutz der *rsh* Mutante teilweise komplementieren, was die Wichtigkeit des Enzyms für den Pflanzenschutz weiter unterstreicht. Auch weitere Produkte, welche durch das systematische Untersuchen von Sphingomonas-Mutanten identifiziert wurden, zeigten veränderte Mengen in der *rsh* Mutante.

Pflanzen haben ein ausgeklügeltes Immunsystem, welches konservierte Mikroben-assoziierte molekulare Muster (microbe-associated molecular pattern, MAMPs) über Mustererkennungsrezeptoren in der Plasmamembran und auch durch weitere Rezeptoren wahrnimmt. Eine Analyse des Blatttranskriptoms zeigte bemerkenswerte Unterschiede, wenn *A. thaliana* von zwei verschiedenen Repräsentanten der Phyllosphäre, dem schützenden *S. melonis* Fr1 beziehungsweise dem nicht schützenden *Methylobacterium extorquens* PA1, besiedelt wurde. Die Analyse offenbarte auch eine Überschneidung der Pflanzenantwort nach einer Behandlung mit dem pflanzenschützenden *S. melonis* Fr1 oder dem Pathogen *Pseudomonas syringae* DC3000. Dies könnte ein Hinweis auf eine Rolle der Modifikation der Pflanzenimmunantwort durch *S. melonis* Fr1 in Bezug auf Pflanzenschutz sein. Dafür spricht ebenfalls, dass eine Pflanzenmutante, in der funktionale Ko-rezeptoren der Mustererkennungsrezeptoren fehlten, einen schwächeren Schutz durch *S. melonis* Fr1 aufwies. Durch welche molekularen Strukturen die Pflanze die Kolonisierung durch *S. melonis* Fr1 erkennt, ist noch nicht bekannt. Experimente mit einer *S. melonis* Fr1 Mutante, die kein Flagellin besitzt, sowie mit Pflanzenmutanten, die beeinträchtigt sind in der Erkennung von anderen gut beschriebenen MAMPs wie dem Elongationsfaktor Tu, haben gezeigt, dass die Wahrnehmung dieser nicht erforderlich ist für das Auslösen der Immunantwort der Pflanze und dem damit einhergehenden Schutz vor Pathogenen. Deshalb scheint es wahrscheinlich, dass andere weniger bekannte MAMPs von der Pflanze

wahrgenommen werden. Ob einige der beobachteten *Sphingomonas* Mutanten mit reduziertem Pflanzenschutz weniger gut von der Pflanze erkannt werden oder ob die Antwort auf die Erkennung anders ausfällt im Vergleich zum Wildtyp wird weiter untersucht und wird wahrscheinlich zu einem besseren Verständnis des Pflanzenschutzes durch *S. melonis* Fr1 führen.

Kürzlich wurde eine systematische Stammsammlung von Phyllosphären Isolaten von *A. thaliana* Blättern aus der Umwelt angelegt. Diese erlaubte es zu untersuchen, wie weit die pflanzenschützende Eigenschaft innerhalb der Sphingomonaden verbreitet ist. Eine erste Analyse von über 40 natürlich vorkommenden *Sphingomonas* Isolaten zeigte, dass die pflanzenschützende Eigenschaft nicht weit verbreitet ist und auch in der Stärke variiert. Das Vergleichen der Genome der meisten untersuchten Isolate liess den Schluss zu, dass nicht die An- beziehungsweise Abwesenheit einzelner Gene für den Pflanzenschutz verantwortlich ist. Eine weitergehende Untersuchung ist daher nötig.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass der Pflanzenschutz durch Sphingomonaden nicht von einem einzelnen Gen abhängt, sondern komplexer ist und verschiedene genetische Elemente sowohl auf Pflanzen- als auch auf bakterieller Seite erfordert. Diese Arbeit stellt eine Basis für die weitere Untersuchung des Schutzeffektes dar und zeigt klar, dass der Schutz nicht nur auf Bakterien-Bakterien Antagonismus beruht, sondern auch die Mitwirkung des Pflanzenimmunsystems benötigt.