

Genetic determinants in bacterial commensals contributing to
Arabidopsis microbiota establishment through interference with
innate immune responses

Inaugural Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln



vorgelegt von

Jana Ordon

aus Gießen, Deutschland

Köln, Juni 2023

Tag der Prüfung: 21.09.2023

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Pflanzenzüchtungsforschung in Köln in der Abteilung für Pflanzen-Mikroben Interaktion von Prof. Dr. Paul Schulze-Lefert angefertigt.



Erstgutachter: Prof. Dr. Paul Schulze-Lefert

Zweitgutachter: Prof. Dr. Gunther Döhlemann

Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. Stanislav Kopriva

Protokollführer: Dr. Ka-Wai Ma



Abstract

Plants grown in natural soil host a multi-kingdom community of microorganisms known as the plant microbiota. Both pathogenic and commensal bacteria encode microbe-associated molecular patterns (MAMPs) that trigger plant immunity typically restricting the proliferation of pathogens *in planta*. Approximately 40% of the bacterial root microbiota suppress MAMP-induced immune responses of *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) roots. The root commensal *Pseudomonas capeferrum* (*P. capeferrum*) lowers pH locally via secretion of gluconic acid, resulting in immune suppression in roots. Gluconic acid biosynthesis depends on the genes *cyoB* and *pqqF* and mutations in these genes reduce root colonization. Here, I tagged wild-type *P. capeferrum* and *cyoB* and *pqqF* mutant derivatives using the newly developed modular bacterial tag (MoBacTag) which facilitates tracking of near-isogenic bacteria in synthetic communities through a DNA barcode. The bacterial community associated with the *A. thaliana* roots was specifically altered in the presence of the *pqqF* mutant and could not be *trans*-complemented by co-inoculation with wild-type *P. capeferrum*. Considering that pyrroloquinoline quinone (PQQ) biosynthesis, and thus indirectly gluconic acid biosynthesis, is abolished in the *pqqF* mutant, I propose that PQQ produced by *P. capeferrum* might serve as a common good shared among microbiota members during root microbiota establishment. Given that the PQQ biosynthesis operon is not conserved among root commensal bacteria and that the occurrence of the PQQ operon does not correlate with strain-specific variation to interfere with MAMP-induced immune responses on *A. thaliana* roots, PQQ-independent immunomodulatory mechanisms likely exist. Intriguingly, all tested Xanthomonadales commensals exhibited conserved suppression of flg22-induced root responses, indicating that immunomodulation is an ancestral trait of Xanthomonadales, a core order of the plant microbiota. Utilizing a newly developed high-throughput assay, I demonstrated that the *Rhodanobacter* R179, which belongs to the deepest branch of the Xanthomonadales, deploys multiple mechanisms to interfere with host defense responses. Analyses of root transcriptomes suggest that R179 hides itself and partially other microbiota members from host recognition upon prolonged colonization. Compromised host recognition or impaired bacterial immunosuppression did not alter R179 root load, suggesting that immunity-associated responses do not *per se* restrict *Rhodanobacter* commensal root colonization. Moreover, the proliferation of different commensal Xanthomonadales strains on roots varied 1000-fold regardless of MAMP treatment, indicating MAMP-response-independent strain-specific proliferation capacities on roots without detrimental impact on the host.



Zusammenfassung

In Erde wachsende Pflanzen beherbergen eine Gemeinschaft von Mikroorganismen, die als Pflanzenmikrobiota bezeichnet wird. Sowohl pathogene als auch kommensale Bakterien kodieren für Immunreaktionen auslösende molekulare Signaturen (MAMPs), welche die Vermehrung pathogener Mikroorganismen in Pflanzen in der Regel einschränken. Etwa 40% der Bakterien der Wurzelmikrobiota unterdrücken Immunreaktionen der *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) Wurzel, die durch exogene MAMPs ausgelöst werden. Der Wurzelkommensale *Pseudomonas capeferrum* (*P. capeferrum*) senkt den pH-Wert lokal durch die Freisetzung von Gluconsäure, wodurch die Immunantwort der Wurzel unterdrückt wird. Die Biosynthese von Gluconsäure hängt von den Genen *cyoB* und *pqqF* ab, und Mutationen in diesen Genen verringern die Wurzelbesiedlung. Hier habe ich den Wildtyp *P. capeferrum* und die davon abgeleiteten *cyoB* und *pqqF* Mutanten mit dem neu entwickelten Modularen Bakterien Tag (MoBacTag) markiert, der die Verfolgung nahezu isogener Bakterien in synthetischen Gemeinschaften durch einen DNA Barcode ermöglicht. Die bakterielle Gemeinschaft an Wurzeln von *A. thaliana* war speziell in Gegenwart der *pqqF*-Mutante verändert und diese Veränderung konnte nicht durch gleichzeitige Wurzelbesiedlung mit dem Wildtyp *P. capeferrum* *trans*-komplementiert werden. Die Tatsache, dass die Biosynthese von Pyrrolochinolinchinon (PQQ) und damit indirekt auch die Biosynthese von Gluconsäure in der *pqqF*-Mutante gestört ist, lässt vermuten, dass PQQ, welches von *P. capeferrum* produziert wird, von anderen Mitgliedern der Mikrobiota während der Etablierung der Wurzelmikrobiota genutzt wird. Da das Operon für die PQQ-Biosynthese nicht in allen kommensalen Bakterien der Wurzelmikrobiota konserviert ist und das Auftreten des PQQ-Operons nicht mit den stammspezifischen Variationen in der Unterdrückung von MAMP-induzierten Immunreaktionen der *A. thaliana* Wurzel korreliert, existieren wahrscheinlich PQQ-unabhängige immunomodulatorische Mechanismen. Interessanterweise zeigten alle getesteten Kommensalen der Gattung Xanthomonadales eine konservierte Unterdrückung von MAMP-induzierten Wurzelreaktionen, was darauf hindeutet, dass die Immunmodulation eine ursprüngliche Eigenschaft der Gattung Xanthomonadales ist, die eine Kerngattung der Pflanzenmikrobiota darstellt. Mithilfe eines neu entwickelten Hochdurchsatztests konnte ich zeigen, dass der Wurzelkommensale *Rhodanobacter* R179, der zum tiefsten Zweig der Xanthomonadales gehört, mehrere Mechanismen besitzt, um die Abwehrreaktionen des Wirts zu reduzieren. Die Analyse von Wurzeltranskriptomen legt nahe, dass R179 sich selbst und teilweise auch andere Mitglieder der Mikrobiota bei längerer Besiedlung vor der Erkennung durch den Wirt schützt. Eine beeinträchtigte Wirtserkennung oder eine verminderte bakterielle Immunsuppression veränderte die R179 Wurzelbesiedlung nicht. Dies lässt vermuten, dass immunitätsassoziierte Reaktionen nicht *per se* die Wurzelbesiedlung durch den kommensalen *Rhodanobacter* einschränken. Des Weiteren variierte die Proliferation verschiedener kommensaler Xanthomonadales-Stämme an Wurzeln unabhängig von der MAMP-Behandlung um das 1000-fache, was auf MAMP-unabhängige stammspezifische Verbreitungsfähigkeiten auf Wurzeln, ohne nachteilige Auswirkungen auf den Wirt, hinweist.