

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS  
ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL ZAIDÍN**



**UNIVERSIDAD DE GRANADA  
FACULTAD DE CIENCIAS**



**Genómica funcional de transportadores MDR  
bacterianos en infecciones de plantas**

**Tesis Doctoral**

**Lida Vivian Carvajal Rodríguez**

**2014**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Lida Vivian Carvajal Rodríguez  
D.L.: GR 2117-2014  
ISBN: 978-84-9083-139-7



# **Genómica funcional de transportadores MDR bacterianos en infecciones de plantas**

Memoria que presenta la licenciada en Biología,  
Lida Vivian Carvajal Rodríguez, para optar al título de Doctor

Fdo. Lida Vivian Carvajal Rodríguez

VºBº  
De las Directoras de Tesis

Fdo. María Trinidad Gallegos Fernández  
Doctora en Biología  
Investigadora Científica del CSIC

Fdo. Matilde Barón Ayala  
Doctora en Biología  
Investigadora Científica del CSIC

Universidad de Granada  
2014



Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en los grupos de Interacciones Planta-Bacteria, perteneciente al Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, y de Respuesta del aparato fotosintético a estrés biótico y abiótico, perteneciente al Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular de Plantas, de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC), gracias a una beca de un Proyecto de Excelencia de la Junta de Andalucía P08-CVI-03475, cofinanciado por FEDER.

Parte de los resultados de este trabajo han sido presentados en los siguientes congresos y publicaciones:

### **Publicaciones**

Vargas, P., Farias, G.A., Nogales, J., Prada, H., Carvajal, V., Barón, M., Rivilla, R., Martín, M., Olmedilla, A., y Gallegos, M.T. 2013. Plant flavonoids target *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 flagella and type III secretion system. *Environmental Microbiology Reports* 5: 841-850.

### **Congresos**

Castillo-Lizardo, M.G.; Aragón, I.M.; Carvajal, V.; Matas, I.M.; Gallegos, M.T.; Barón, M.; Ramos, C. 2012. La virulencia de *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 es dependiente de la expresión de los genes *iaaL* y *matE*. XVI Congreso Nacional Sociedad Española de Fitopatología. Málaga, España.



La doctoranda D<sup>a</sup> Lida Vivian Carvajal Rodríguez y las directoras de la tesis D<sup>a</sup> María Trinidad Gallegos Fernández y la D<sup>a</sup> Matilde Barón Ayala, garantizamos al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de las directoras de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, Mayo de 2013.

María Trinidad Gallegos Fernández  
Directora de Tesis Doctorando

Fdo.:

Matilde Barón Ayala  
Directora Tesis Doctorando

Fdo.:

Lida Vivian Carvajal Rodríguez  
Doctorando

Fdo.:



“El éxito está en la satisfacción de una oportunidad bien aprovechada, y el fruto puesto al servicio de la humanidad”



A Dios,  
A mi familia y  
A mis amigos



## Agradecimientos

Esta tesis ha sido una experiencia maravillosa y muy enriquecedora no sólo a nivel académico y científico, sino también a nivel personal; que no hubiese podido hacer realidad sin la ayuda de tantas personas que estuvieron durante todo este tiempo apoyándome de alguna manera.

Es así como quiero empezar agradeciendo a mis dos directoras de tesis la Dra. Matilde Barón y la Dra. Mari Trini Gallegos, por su contribución científica y apoyo personal a lo largo de este doctorado; por su paciencia y conocimientos de excelencia.

Al Dr. Juan Sanjuán, al Dr. Juan José Lázaro, a la Dra. María José Soto, al Dr. José Olivares, a la Dra. Mariam Sahrawy por darme la oportunidad de formar parte de su grupo y apoyarme con sus conocimientos científicos y compañía en este camino.

Un agradecimiento muy especial al Dr. Cayo Ramos y su grupo de investigación, por sus aportes científicos que apoyaron el desarrollo de esta tesis, y por permitirme trabajar con algunos de los mutantes construidos por sus investigadores.

A todos mis amigos en Granada que fueron mi familia durante estos años: Teresa, David, Paty, Paito, Ione, Mónica, Lydia, Marisa, Isa, Dani, Alfonso, Lorena, Nieves, Espen, Virgi, Katy, Isa, Carol, Irene, Harold y Mafe; por todos los momentos compartidos que fueron mi sostén para continuar y terminar con éxito este objetivo propuesto.

A todo el personal técnico, doctoral y post-doctoral de mis dos grupos de investigación: Toñi, Soco, Gabriela, Quina, María José Lorite y Adela; porque sin su apoyo y colaboración en la realización de los experimentos no hubiera logrado finalizar esta tesis.

A todo el personal de la EEZ administrativo, técnico, de limpieza, de seguridad y de informática, porque con su compañía hicieron más agradable mi estancia en la EEZ.

A toda mi familia en Colombia, porque sin su amor y apoyo incondicional no hubiese podido seguir adelante en el día a día, gracias por confiar en mí y permanecer a cada instante a mi lado de corazón.

También a todos mis amigos en Colombia por creer en mí y verme como un ejemplo de lucha en la consecución de los sueños.

A Dios por darme la fortaleza necesaria para mantenerme en este camino, por ser siempre la luz y la inspiración para continuar.



## RESUMEN

Los microorganismos están expuestos a diversos compuestos con actividad antimicrobiana como son los antibióticos semisintéticos o biocidas, desarrollados específicamente para el tratamiento de agentes infecciosos, compuestos orgánicos e inorgánicos producto de la actividad industrial, agrícola y urbana, compuestos tóxicos generados por las plantas frente al ataque de patógenos, etc. Todos estos compuestos actúan sobre la pared celular, la membrana citoplasmática o sobre rutas biosintéticas esenciales para el crecimiento bacteriano; sin embargo, existen bacterias resistentes a la acción de los mismos gracias a mecanismos protectores especiales. El método más efectivo y extendido de resistencia microbiana es la eliminación de compuestos tóxicos mediante transportadores de amplio espectro en un proceso dependiente de energía, que reducen así su concentración intracelular a niveles sub-tóxicos. Estos transportadores pueden ser específicos para un sustrato o pueden transportar una gama de compuestos estructuralmente diferentes. Estos últimos están asociados a la multirresistencia (MDR, *multidrug resistance*) y tienen una gran importancia clínica, ya que provocan infecciones bacterianas intratables, pero también se encuentran en bacterias del suelo y en aquellas asociadas a plantas. Existen cinco familias de transportadores MDR bacterianos, que se clasifican en varias familias según su modo de acción y los sustratos que exportan: ABC (*ATP binding cassette*), MFS (*major facilitator superfamily*), MATE (*multidrug and toxic compounds extrusion*), SMR (*small multidrug resistance*) y la superfamilia RND (*resistance, nodulation and cell-division*).

Cada vez hay más evidencias de que los transportadores bacterianos que confieren multirresistencia son importantes en virulencia. Así, se han descrito en bacterias patógenas de animales y humanos algunos transportadores que no sólo expulsan antibióticos sino también compuestos antimicrobianos producidos por el hospedador, lo que permite a la bacteria sobrevivir en su nicho ecológico. Además, algunos transportadores pueden exportar también determinantes de virulencia, como adhesinas, toxinas u otras proteínas importantes para la colonización y la infección de células humanas y animales, y su mutación limita su virulencia. Las bacterias fitopatógenas también poseen transportadores MDR que confieren resistencia a compuestos tóxicos producidos por la planta hospedadora, lo que favorece la invasión y el desarrollo de la enfermedad.

Las bacterias Gram-negativas pertenecientes al complejo *Pseudomonas syringae* constituyen un grupo de patógenos de gran importancia económica y agrícola, ya que infectan una gran variedad de plantas, tanto herbáceas como leñosas, causando síntomas diversos: moteados y necrosis en hojas, podredumbre de frutas, tumores en tallos y chancros, entre otros, dependiendo del tipo de planta y del sitio de la infección. En esta tesis doctoral se han utilizado dos cepas modelo: *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448A (Pph), agente causal de la grasa de la judía (*Phaseolus vulgaris*), una enfermedad sistémica cuyos síntomas son lesiones acuosas rodeadas de un halo clorótico que acaban provocando la necrosis del tejido, tanto a nivel de fruto como de hoja, y *P. syringae* pv. *tomato* DC3000, agente causal de la mancha negra del tomate y patógeno de la planta modelo *A. thaliana*.

Este trabajo se centró en el estudio de varios transportadores MDR: MexAB-OprM de Pph 1448A, TpsABC de Pto DC3000 y MatE de Pto DC3000. Estos transportadores se estudiaron con el fin de caracterizarlos funcionalmente mediante técnicas moleculares con objeto de determinar su papel

fisiológico y su implicación en los procesos infectivos y analizando mediante fluorescencia multicolor la respuesta de la planta frente a la enfermedad desarrollada por la bacteria en cada caso.

En resumen, los resultados obtenidos en este trabajo de tesis demuestran que el transportador MexAB-OprM Pph 1448A está implicado en su resistencia intrínseca a múltiples antibióticos, biocidas, agentes mutagénicos y, en especial, a varios flavonoides, por lo que contribuye a la colonización de las hojas de judía por Pph 1448A y le permite competir eficientemente en su nicho ecológico. En cuanto al transportador TpsABC de Pto DC3000, se determinó que se expresa desde un operón que codifica dos proteínas de fusión (MFPs) y que su inactivación no afecta la capacidad de Pto DC3000 para colonizar ni para invadir las plantas de tomate, pero sí a su capacidad para provocar los síntomas de la enfermedad, indicando que podría tener un papel en la virulencia de esta bacteria. Por último, la eliminación del transportador MatE en Pto DC3000 disminuye la capacidad de esta bacteria para producir síntomas en plantas de tomate, por lo que posiblemente tiene un papel en virulencia.

Finalmente, utilizamos la técnica de captación de imágenes de fluorescencia multiespectral (*multicolor fluorescence imaging*, MCFI) inducida por iluminación UV para detectar el efecto de las distintas cepas mutantes en los transportadores estudiados sobre la planta hospedadora. La excitación de una hoja en el rango UV-A ( $\lambda = 355$  nm) conduce a la emisión, no sólo de fluorescencia roja y en el rojo lejano (Chl-FI, 690 y 740 nm), sino también azul y verde (BGF, 440 y 520 nm). La primera está ligada a la concentración de clorofila foliar y la BGF, a distintos fenoles, polifenoles y fenilpropanoides. Aumentos en las emisiones de F440 y F520 se corresponden con una activación del metabolismo secundario para la producción de estos metabolitos de defensa en la planta hospedadora. Los cambios en los patrones foliares de F440 y F520 observados tras la infección con los mutantes en los transportadores reflejaron los cambios en virulencia de éstos y ofrecieron la posibilidad de un diagnóstico presintomático de la infección, resultando ser F520 un parámetro especialmente sensible.

# ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS .....	xxiii
ÍNDICE DE TABLAS .....	xxv
INTRODUCCIÓN .....	1
1. <i>Pseudomonas syringae</i> .....	3
1.1. Características de <i>P. syringae</i> que facilitan su adaptación a la filosfera.....	4
1.2. Factores de virulencia.....	6
1.2.1. El sistema de secreción tipo III .....	6
1.2.2. Producción de toxinas.....	10
1.3. <i>P. syringae</i> pv. tomato .....	11
1.4. <i>P. syringae</i> pv. phaseolicola .....	13
2. Transportadores implicados en multirresistencia .....	15
2.1. Transportadores RND.....	16
2.1.1. Sistema MexAB-OprM .....	18
2.2. Transportadores MATE.....	22
3. Técnicas de captura de imágenes para la detección del estrés biótico.....	24
3.1. Fluorescencia multiespectral inducida por UV .....	25
3.1.1. Instrumentación .....	26
3.1.2. Aplicaciones de la MCF inducida por luz UV en el entorno agrario.....	28
3.1.3. Aplicaciones de la MCF inducida por luz UV a la detección y seguimiento de patógenos vegetales 29	
OBJETIVOS .....	31
MATERIALES Y MÉTODOS .....	35
1. Cepas bacterianas .....	37
2. Plásmidos y oligonucleótidos .....	37
2.1. Plásmidos utilizados en este trabajo.....	37
2.2. Plásmidos construidos en este trabajo .....	37
2.3. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.....	40
3. Medios y condiciones de cultivo .....	41
3.1. Medios .....	41
3.1.1. Medios ricos.....	41
3.1.2. Medios mínimos.....	41
3.2. Condiciones de cultivo.....	41
3.3. Antibióticos .....	41
3.4. Otras soluciones .....	41
3.5. Conservación de los cultivos bacterianos.....	43
3.6. Transformación bacteriana .....	43
3.6.1. Preparación de células competentes de <i>E. coli</i> .....	43
3.6.2. Transformación de células competentes de <i>E. coli</i> .....	43

3.6.3. Preparación de células electrocompetentes.....	44
3.6.4. Electrotransformación .....	44
3.6.5. Selección de intercambio alélico y cointegración .....	44
4. Ensayos <i>in vivo</i> .....	45
4.1. Curvas de crecimiento .....	45
4.2. Ensayos de competencia en medio líquido.....	45
4.3. Ensayos de sensibilidad a compuestos antimicrobianos (MIC) .....	45
4.4. Ensayos de motilidad bacteriana .....	46
4.4.1. Ensayos de <i>swimming</i> .....	46
4.4.2. Ensayos de <i>swarming</i> .....	46
4.5. Fenotipos provocados por altos niveles de c-di-GMP .....	46
4.5.1. Determinación de la producción de exopolisacáridos con CR .....	46
4.5.2. Formación de biopelículas .....	47
5. Técnicas de manipulación de ADN.....	47
5.1. Aislamiento de ADN.....	47
5.1.1. Aislamiento de ADN total .....	47
5.1.2. Extracción de ADN plasmídico.....	47
5.2. Determinación de la concentración de ADN .....	47
5.3. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción.....	48
5.4. Reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasa termorresistente (PCR) .....	48
5.4.1. PCR de colonias .....	48
5.5. Clonaje de fragmentos.....	49
5.5.1. Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa.....	49
5.5.2. Ligación de fragmentos de restricción en vectores de clonación .....	49
5.5.3. Secuenciación y análisis de secuencias .....	49
5.6. Electroforesis de ADN.....	49
5.6.1. Electroforesis en geles de agarosa .....	50
5.6.2. Marcadores de peso molecular .....	50
5.7. Hibridación ADN-ADN (Southern Blot).....	50
5.7.1. Transferencia alcalina por capilaridad.....	50
5.7.2. Marcaje de la sonda.....	51
5.7.3. Hibridación y lavados .....	52
5.7.4. Detección inmunológica .....	52
6. Técnicas de manipulación de ARN.....	52
6.1. Aislamiento de ARN.....	53
6.2. Tratamiento con DNasa I .....	53
6.3. Determinación de la integridad y concentración del ARN total .....	53
6.4. Reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasa termorresistente acoplada a una reacción de transcripción reversa (RT-PCR) .....	54
7. Análisis de proteínas .....	54

7.1. Obtención de extractos proteicos .....	54
7.2. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) .....	55
7.3. Tinción de proteínas .....	55
7.3.1. Tinción de proteínas con azul de Comassie .....	55
7.3.2. Tinción de proteínas con plata .....	55
7.4. Determinación de la concentración de proteínas .....	56
7.5. Preparación de muestras para identificación de proteínas por MALDI-TOF .....	56
8. Ensayos en plantas .....	56
8.1. Cultivo de las plantas objeto de estudio.....	56
8.2. Preparación de los inóculos bacterianos .....	56
8.3. Inoculación de las plantas.....	57
8.3.1. Inoculación por infiltración.....	57
8.3.2. Inoculación por rociado .....	57
8.4. Conteo de unidades formadoras de colonia .....	57
8.5. Ensayos de competencia en planta .....	58
9. Técnicas de imagen .....	58
9.1. Fluorescencia multicolor (MCFI) inducida por UV.....	58
RESULTADOS .....	61
Capítulo 1.....	63
Obtención y caracterización de mutantes del transportador MexAB-OprM en <i>Pseudomonas syringae</i> pvs. phaseolicola 1448A y tomate DC3000.....	63
1. Caracterización in vivo del sistema PmeR/MexAB-OprM de Pph .....	65
1.1. Generación de mutantes carentes de la bomba y el regulador.....	65
1.2. Determinación del perfil de sustratos de la bomba MexAB-OprM.....	66
1.3. Ensayos de motilidad bacteriana .....	68
1.3.1. Motilidad tipo <i>swimming</i> .....	69
1.3.2. Motilidad tipo <i>swarming</i> .....	69
2. Ensayos de infección bacteriana en plantas de judía.....	71
2.1. Inoculación por rociado.....	71
2.2. Inoculación por infiltración .....	72
3. Ensayos de competencia <i>in vivo</i> .....	74
3.1. Curvas de crecimiento en medio líquido .....	74
3.2. Competencia en medio de cultivo.....	74
3.3. Ensayos de competencia en plantas de judía.....	75
4. Estudio de la infección bacteriana con técnicas no invasivas de imagen en plantas de judía y tomate .....	76
4.1. Sistema <i>P. vulgaris</i> cv. Canadian Wonder- <i>P. syringae</i> pv. phaseolicola 1448A.....	76
4.2. Sistema <i>S. lycopersicum</i> variedad MoneyMaker- <i>P. syringae</i> pv. tomato DC3000.....	82
Capítulo 2. Obtención y caracterización de mutantes del transportador TpsABC en <i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato DC3000 .....	89

1. Caracterización <i>in silico</i> del transportador TpsABC.....	91
1.1. TpsC .....	92
1.2. TpsB .....	94
1.3. TpsA .....	96
1.4. Relación entre TpsA y TpsB .....	98
1.5. TpsABC .....	99
1.6. PSPTO_5194.....	105
2. Obtención de mutantes en el transportador TpsABC y en PSPTO_5194 .....	106
2.1. Mutagénesis al azar con <i>Tn5</i> .....	106
2.2. Mutagénesis dirigida .....	107
2.2.1. Generación de un mutante carente de PSPTO_5191 .....	107
2.2.2. Generación de un mutante carente de PSPTO_5194.....	108
3. Caracterización <i>in vivo</i> del transportador TpsABC .....	109
3.1. Análisis de la organización transcripcional de los genes <i>tpsABC</i> .....	109
3.2. Determinación del perfil de sustratos del transportador TpsABC.....	110
3.2.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) .....	110
3.2.2. Determinación de posibles sustratos mediante proteómica .....	111
4. Caracterización fenotípica del mutante $\Delta$ TpsC y $\Delta$ 5194 .....	113
4.1. Curvas de crecimiento en medio líquido .....	113
4.2. Ensayos de motilidad bacteriana tipo <i>swimming</i> y <i>swarming</i> .....	114
4.3. Fenotipos provocados por altos niveles intracelulares de c-di-GMP .....	115
4.3.1. Producción de exopolisacáridos.....	115
4.3.2. Formación de biopelículas .....	116
5. Ensayos de infección en plantas de tomate .....	118
5.1. Mutante $\Delta$ TpsC.....	118
5.1.1. Inoculación por infiltración.....	118
5.1.2. Inoculación por rociado .....	120
5.2. Mutante $\Delta$ 5194.....	121
5.3. Estudio de la infección con técnicas no invasivas de imagen .....	122
Capítulo 3. Caracterización con MCFI de mutantes de un transportador de la familia MATE de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato DC3000 .....	127
1. Mutantes objeto de estudio .....	129
2. Caracterización <i>in silico</i> del transportador <i>matE</i> y del gen <i>iaaL</i> .....	130
3. Estudio de la infección con técnicas no invasivas de imagen.....	132
3.1. Sintomatología provocada por los mutantes .....	132
3.2. Análisis de imágenes de fluorescencia multiespectral (MCFI) .....	133
DISCUSIÓN .....	139
1. Transportador MexAB-OprM .....	141
2. Transportador TpsABC.....	145
3. Transportador MatE.....	147

CONCLUSIONES.....	149
BIBLIOGRAFÍA .....	153
APÉNDICE.....	183



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Proceso de infección de una planta por <i>P. syringae</i>	3
<b>Figura 2.</b> Características de <i>P. syringae</i> que mejoran su adaptación a la filosfera	5
<b>Figura 3.</b> Sistema de secreción tipo III	7
<b>Figura 4.</b> Organización génica de la isla de patogenicidad Hrp de <i>P. syringae</i>	8
<b>Figura 5.</b> Modelo de regulación de los genes <i>hrpI/hrc</i> en <i>P. syringae</i>	10
<b>Figura 6.</b> Sintomatología provocada por <i>P. syringae</i> pv. tomato en hojas de tomate	11
<b>Figura 7.</b> Sintomatología causada por <i>P. syringae</i> pv. phaseolicola en hojas de judía	13
<b>Figura 8.</b> Representación esquemática de las cinco familias de transportadores MDR caracterizados en bacterias	16
<b>Figura 9.</b> Modelo de organización estructural de los componentes de una bomba de la familia RND	17
<b>Figura 10.</b> Organización de los genes del transportador MexAB-OprM y su regulador en tres patovares de <i>P. syringae</i>	20
<b>Figura 11.</b> Funciones propuestas para los transportadores MATE bacterianos	23
<b>Figura 12.</b> Espectro de emisión de fluorescencia inducido por luz UV en una hoja verde	25
<b>Figura 13.</b> Asimetría de una hoja de dicotiledónea	26
<b>Figura 14.</b> Esquema del sistema de fluorescencia de imagen (FL-FIS) de la Universidad de Karlsruhe	27
<b>Figura 15.</b> Imágenes de F440/520, F440/690, F440/740 and F690/740 de hojas asintomáticas de <i>Nicotiana benthamiana</i> control e infectadas con el PMMoV	30
<b>Figura 16.</b> Distribución en una única sección óptica	30
<b>Figura 17.</b> Áreas de la hoja de judía (A) y tomate (B) inoculadas con las suspensiones	57
<b>Figura 18.</b> Modelo del fluorcam Open FluorCam FC 800-O	59
<b>Figura 19.</b> Equipo disponible en nuestro laboratorio	59
<b>Figura 20.</b> Comprobación de los mutantes <i>pmeR</i> y <i>mexAB-oprM</i> construidos mediante doble recombinación en Pph 1448A	66
<b>Figura 21.</b> Motilidad tipo <i>swimming</i> de Pph 1448A	69
<b>Figura 22.</b> Motilidad tipo <i>swimming</i> de Pph y PphA	69
<b>Figura 23.</b> Motilidad tipo <i>swarming</i> de Pph 1448A	70
<b>Figura 24.</b> Ensayos de motilidad tipo <i>swarming</i> con Pph y PphA	70
<b>Figura 25.</b> Evolución de las poblaciones bacterianas de Pph y PphA en hoja de judía tras su inoculación por rociado	71
<b>Figura 26.</b> Desarrollo de síntomas inducidos por Pph y PphA en hoja de judía tras su inoculación por rociado	72
<b>Figura 27.</b> Evolución de las poblaciones bacterianas en hojas de judía tras infiltración con Pph, PphA y PphR	73
<b>Figura 28.</b> Sintomatología inducida en hojas de judía por Pph y sus mutantes a distintos tiempos post-infección	73
<b>Figura 29.</b> Curvas de crecimiento de las cepas Pph y PphA en medio líquido KB	74
<b>Figura 30.</b> Ensayos de competencia en medio de laboratorio	75
<b>Figura 31.</b> Ensayos de colonización competitiva de Pph y PphA en hojas de judía	75
<b>Figura 32.</b> Patrones foliares de fluorescencia verde-azul de plantas de judía F440 y F520	78
<b>Figura 33.</b> Patrones foliares de fluorescencia roja de plantas de judía F690 y F740	79
<b>Figura 34.</b> Patrones foliares de los cocientes de emisiones de fluorescencia F440/F690 y F440/740 de plantas de judía	80
<b>Figura 35.</b> Patrones foliares de cocientes de emisiones de fluorescencia F520/690 y F520/740 de plantas de judía	81
<b>Figura 36.</b> Sintomatología inducida en hojas de tomate por Pto DC3000 y sus mutantes a distintos tiempos post-infección	82
<b>Figura 37.</b> Patrones foliares de fluorescencia F440 y F520 de plantas de tomate	84
<b>Figura 38.</b> Patrones foliares de fluorescencia F690 y F740 de plantas de tomate	85
<b>Figura 39.</b> Patrones foliares de los cocientes F440/690 y F440/740 de plantas de tomate	86
<b>Figura 40.</b> Patrones foliares de cocientes F520/690 y F520/740 de plantas de tomate	87
<b>Figura 41.</b> Representación de la organización génica de TpsABC en DC3000	91
<b>Figura 42.</b> Organización en dominios de las proteínas TpsABC y PSPTO_5194 según Pfam	92

<b>Figura 43.</b> Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de TpsA y TpsB	98
<b>Figura 44.</b> Árbol filogenético de las proteínas de fusión TpsA y TpsB	100
<b>Figura 45.</b> Organización génica de <i>tpsABC</i> y otros sistemas homólogos de distintas bacterias	103
<b>Figura 46.</b> Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de Ser39006_1998 de <i>Serratia</i> 39006 y OprM de Pto DC3000	104
<b>Figura 47.</b> Diagrama de la organización génica de los transportadores RND con 2 MFPs encontrados en el genoma de Pto DC3000	105
<b>Figura 48.</b> Esquema del transposón <i>Tn5</i>	106
<b>Figura 49.</b> Comprobación del mutante PSPTO_5191 obtenido mediante mutagénesis al azar en Pto DC3000	107
<b>Figura 50.</b> Comprobación del mutante PSPTO_5191 construido mediante doble recombinación en Pto DC3000	108
<b>Figura 51.</b> Hibridaciones ADN-ADN para la comprobación de mutantes construidos mediante delección de PSPTO_5194 en Pto DC3000	109
<b>Figura 52.</b> Análisis de la organización transcripcional de los genes <i>tpsABC</i> y PSPTO_5194 de Pto DC3000	110
<b>Figura 53.</b> Perfiles de proteínas del sobrenadante de cultivos de distintas cepas de Pto DC3000	112
<b>Figura 54.</b> Curvas de crecimiento de la cepa silvestre y de los mutantes $\Delta$ TpsC y $\Delta$ 5194	114
<b>Figura 55.</b> Ensayos de <i>swimming</i> y <i>swarming</i> con Pto DC3000 y los mutantes $\Delta$ TpsC y $\Delta$ 5194	115
<b>Figura 56.</b> Apariencia de las colonias de Pto en presencia de altos niveles de c-di-GMP	116
<b>Figura 57.</b> Formación de biopelículas de Pto y sus mutantes en la interfase líquido-aire en ausencia y presencia de PleD*	117
<b>Figura 58.</b> Tinción con calcoflúor white de las biopelículas formadas en la interfase líquido-aire por Pto DC3000 y sus mutantes en ausencia y presencia de PleD*	117
<b>Figura 59.</b> Evolución de las poblaciones bacterianas de DC3000 y del mutante $\Delta$ TpsC en hoja de tomate tras infiltración	119
<b>Figura 60.</b> Sintomatología inducida en hojas de tomate por DC3000 y el mutante $\Delta$ TpsC a distintos tiempos post-infección tras inoculación por infiltración	119
<b>Figura 61.</b> Evolución de las poblaciones bacterianas de Pto DC3000 y $\Delta$ TpsC en hoja de tomate tras inoculación por rociado	120
<b>Figura 62.</b> Sintomatología inducida en hojas de tomate por Pto DC3000 y el mutante $\Delta$ TpsC a distintos tiempos post-infección tras inoculación por rociado	121
<b>Figura 63.</b> Sintomatología inducida en hojas de tomate por Pto DC3000 y el mutante $\Delta$ 5194 a distintos tiempos post-infección tras inoculación por infiltración	121
<b>Figura 64.</b> Patrones foliares de fluorescencia verde-azul de plantas de tomate	123
<b>Figura 65.</b> Patrones foliares foliares de fluorescencia roja de plantas de tomate	124
<b>Figura 66.</b> Patrones foliares de cocientes de emisiones de fluorescencia de plantas de tomate	125
<b>Figura 67.</b> Patrones foliares de cocientes de emisiones de fluorescencia de plantas de tomate	126
<b>Figura 68.</b> Mutantes <i>iaaL</i> y <i>matE</i> construidos mediante doble recombinación en Pto DC3000	129
<b>Figura 69.</b> Organización génica del transportador MATE y otros sistemas homólogos de distintas bacterias del género <i>Pseudomonas</i>	130
<b>Figura 70.</b> Organización en dominios de las proteínas <i>laaL</i> y <i>MatE</i> según Pfam	132
<b>Figura 71.</b> Sintomatología inducida en hojas de tomate por DC3000 y mutantes <i>iaaL</i> y <i>matE</i> a distintos tiempos post-infección	133
<b>Figura 72.</b> Patrones foliares de fluorescencia F440 y F520 de plantas de tomate	134
<b>Figura 73.</b> Patrones foliares de fluorescencia F690 y F740 de plantas de tomate	135
<b>Figura 74.</b> Patrones foliares de cocientes de emisiones de fluorescencia F440/690 y F440/740 de plantas de tomate	136
<b>Figura 75.</b> Patrones foliares de cocientes de emisiones de fluorescencia F520/690 y F520/740 de plantas de tomate	137

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Proteínas homólogas a los componentes de la bomba MexAB-OprM de Pto DC3000	19
<b>Tabla 2.</b> Estructura de los sustratos de la bomba MexAB-OprM, inductores de su expresión y efectores de PmeR	21
<b>Tabla 3.</b> Cambios en los cocientes de fluorescencia	28
<b>Tabla 4.</b> Cepas bacterianas	37
<b>Tabla 5.</b> Plásmidos y vectores utilizados	37
<b>Tabla 6.</b> Plásmidos construidos en este trabajo	38
<b>Tabla 7.</b> Oligonucleótidos utilizados en este trabajo	40
<b>Tabla 8.</b> Composición de medios utilizados en este estudio	42
<b>Tabla 9.</b> Antibióticos utilizados en este estudio	42
<b>Tabla 10.</b> Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de RT-PCR	54
<b>Tabla 11.</b> Susceptibilidad de la cepa Pph y los mutantes PphA y PphR a diferentes compuestos antimicrobianos	67
<b>Tabla 12.</b> Perfil de susceptibilidad a compuestos antimicrobianos de Pph y Pph $\Delta mexAB-oprM$	68
<b>Tabla 13.</b> Proteínas ortólogas a TpsC de Pto DC3000	93
<b>Tabla 14.</b> Proteínas parálogas de TpsC en Pto DC3000	94
<b>Tabla 15.</b> Proteínas ortólogas a TpsB de Pto DC3000	95
<b>Tabla 16.</b> Proteínas parálogas de TpsB en Pto DC3000	96
<b>Tabla 17.</b> Proteínas ortólogas a TpsA de Pto DC3000	97
<b>Tabla 18.</b> Proteínas parálogas de TpsA en Pto DC3000	98
<b>Tabla 19.</b> Bombas homólogas a TpsABC	101
<b>Tabla 20.</b> Proteínas homólogas a los componentes de la bomba TpsABC de Pto DC3000	102
<b>Tabla 21.</b> Proteínas ortólogas a PSPTO_5194 de Pto DC3000	106
<b>Tabla 22.</b> Perfil de susceptibilidad de la cepa silvestre y los mutantes $\Delta TpsC$ y TpsC: <i>Tn5</i>	111
<b>Tabla 23.</b> Proteínas identificadas en los sobrenadantes de cultivos de DC3000 que no estaban presentes en los del mutante $\Delta TpsC$	112



## ABREVIATURAS

AB	Abaxial
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
AD	Adaxial
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AI	Área infiltrada
ANI	Área no infiltrada
Ap	Ampicilina
Ap <sup>s</sup>	Ampicilina sensible
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATP	Adenosín trifosfato
Avr	Avirulencia
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato
BCP	1-bromo-3-cloropropano
BGF	<i>blue-green fluorescence</i>
°C	Centígrado
CCD	<i>Charge-coupled device</i>
c-di-GMP	Diguanilato cíclico
CF-W	Calcoflúor <i>White</i>
Chl a	Clorofila a
Chl F	Fluorescencia emitida por la clorofila
Chl	Clorofila
Cm	Cloranfenicol
cm <sup>2</sup>	Centímetro cuadrado
CR	Congo red
cv	Cultivar
Δ5194	Mutante carente de PSPTO_5194 de Pto DC3000
ΔTpsC	Mutante <i>tpsABC</i> de Pto DC3000
DC3000A	Mutante <i>mexAB-oprM</i> de Pto DC3000
DC3000R	Mutante <i>pmeR</i> de Pto DC3000
DEPC	Dietilpirocarbonato
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
DO	Densidad óptica
dpi	Días post-inoculación
ECF	<i>Extracytoplasmic function</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
F440	Fluorescencia azul
F440/690	Cociente de fluorescencia azul/rojo
F440/740	Cociente de fluorescencia azul/rojo lejano
F520	Fluorescencia verde
F520/690	Cociente de fluorescencia verde/rojo
F520/740	Cociente de fluorescencia verde/rojo lejano
F690	Fluorescencia roja
F740	Fluorescencia en el rojo lejano
Flo	Floretina
Flz	Floridzina
g	Gramos
<i>g</i>	gravedades
Gm	Gentamicina
GSP	<i>General Secretion Pathway</i>
h	Hora
Hop	<i>Hrp outer protein</i>
HR	Respuesta de hipersensibilidad

<i>hrp</i>	<i>Hipersensitive response and pathogenicity</i>
HTH	<i>Helix-turn-helix</i>
IAA	<i>Indole-3-acetic acid</i>
In	Indol
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
ISs	Secuencias invertidas repetidas
kb	Kilo base
KB	Medio B de King
kDa	Kilo Dalton
Km	Kanamicina
Km <sup>R</sup>	Kanamicina resistente
kV	Kilo voltio
LB	Medio Luria Bertani
LIF	<i>laser induced fluorescence</i>
$\mu$ g	Microgramo
$\mu$ l	Microlitro
$\mu$ m	Micrometro
$\mu$ M	Micromolar
M	Molar
MALDI	<i>Matriz assisted laser desorption/ionization</i>
MATE	<i>Multidrug and toxic compounds extrusion</i>
MCFI	<i>Multicolour fluorescence imaging</i>
MDR	<i>Multidrug resistance</i>
MFP	<i>Membrane fusion protein</i>
MFS	Major facilitator superfamily
mg	Miligramos
MI	Membrana interna
MIC	Concentración inhibitoria mínima
min	Minuto
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MMF	Medio mínimo inductor del T3SS
MMS	Medio mínimo con sacarosa
Mo	Morina
MS	Huella peptídica
MSMS	Fragmentaciones MS
N	Normalidad
Nal	Ácido nalidíxico
NBT	Azul de nitrotetrazolio
nm	Nanómetro
nM	Nanomolar
nt	Nucleótido
OMF	<i>Outer membrane factor</i>
ORF	Marco abierto de lectura
p/v	Peso/volumen
PAI	Isla de patogenicidad
pb	pares de bases
PBP	<i>Penicillin binding protein</i>
PCR	Reacción en cadena con ADN polimerasa
Pp	<i>Pseudomonas putida</i>
Pph	<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>
PphA	Mutante <i>mexAB-oprM</i> en Pph
PphR	Mutante <i>pmeR</i> en Pph
PSII	Fotosistema II
Psy	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>
Pto DC3000	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>

pv.	Patovar
Rhs	<i>Repeat associated core</i>
Rif	Rifampicina
RND	<i>Resistance, nodulation cell-division</i>
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	PCR acoplada a una reacción de transcripción reversa
s	Segundos
SDS PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS
SDS	Dodecil sulfato sódico
Sm	Estreptomicina
SMR	<i>Small multidrug resistance</i>
Sp	Espectinomicina
SSC	<i>Saline sodium citrate buffer</i>
t	Tiempo
T2SS	Sistema de secreción tipo II
T3SS	Sistema de secreción tipo III
TAE	Tampón Tris-acetato-EDTA
Tc	Tetraciclina
TE	Tampón Tris-EDTA
TOF	<i>Time of flight</i>
ufc	Unidades formadoras de colonias
UV	Ultravioleta
v/v	Volumen/volumen
wt	Cepa silvestre
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido



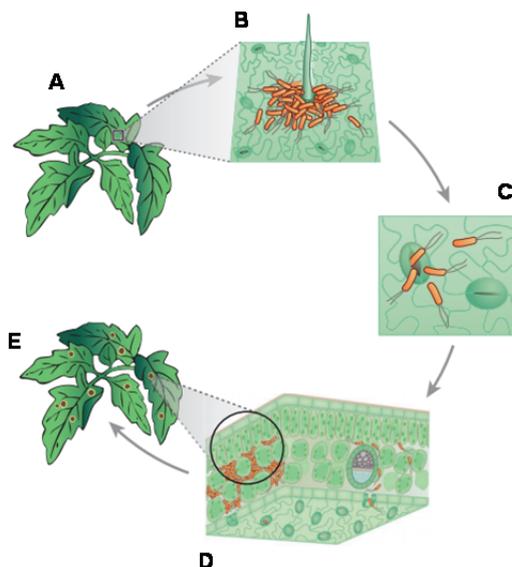
# INTRODUCCIÓN



## 1. *Pseudomonas syringae*

Las bacterias del género *Pseudomonas* se clasifican filogenéticamente dentro del grupo  $\gamma$ -proteobacteria como bacilos Gram-negativos, quimiorganotróficos, aerobios y móviles, con flagelos generalmente polares (Palleroni, 1984). Son muy versátiles desde el punto de vista metabólico ya que pueden utilizar un amplio rango de compuestos orgánicos como fuentes de carbono y energía, colonizan nichos ecológicos diversos y se encuentran ampliamente distribuidas en suelos y aguas (Palleroni, 1984). Las especies del género *Pseudomonas* poseen distintos modos de vida: hay cepas patógenas oportunistas de animales y humanos implicadas normalmente en infecciones nosocomiales, como *Pseudomonas aeruginosa*, hay cepas patógenas de plantas de importancia en agricultura, como *Pseudomonas syringae*, y cepas que estimulan el crecimiento de plantas y/o que son empleadas en procesos de biorremediación, como *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida* (Silby *et al.*, 2011).

Las *P. syringae* son bacterias que se pueden encontrar viviendo de forma epifita en la superficie de las hojas o produciendo diversas enfermedades en plantas de interés agrícola y económico. *P. syringae* fue inicialmente aislada de una planta de lila (*Syringa vulgaris*) con síntomas de enfermedad en 1899 por M.W. Beijerinck y posteriormente caracterizada y nombrada por C.J.J. van Hall. Las bacterias pertenecientes a este grupo están descritas como patógenos hemibiotróficos (Xin *et al.*, 2013) y se pueden encontrar viviendo de forma epifita en la superficie de las hojas o produciendo diversas enfermedades en una gran variedad de plantas, tanto herbáceas como leñosas, de interés económico. Como patógeno, *P. syringae* entra en la planta a través de heridas o por los estomas de las hojas, se multiplica en el espacio intercelular (apoplasto) y con el tiempo produce síntomas diversos (manchas y necrosis en hojas, podredumbre en frutos, tumores y chancros en tallos, etc.) que dependen del tipo de planta, del sitio de infección y del patovar bacteriano (Hirano y Upper, 2000; Figura 1).



**Figura 1. Proceso de infección de una planta por *P. syringae*.** A. hoja de una planta saludable. B. Bacterias en la superficie de la hoja formando agregados alrededor del tricoma. C. Bacterias entrando por los estomas. D. Colonización y multiplicación bacteriana en el apoplasto de la hoja. E. Síntomas de la enfermedad: clorosis y necrosis (Xin *et al.*, 2013; Melotto *et al.*, 2008).

La especie *P. syringae* se divide en al menos 50 variedades patogénicas o patovares (pvs.) que se distinguen genética y fenotípicamente por su patogenicidad y rango de hospedador. Sin embargo, los resultados de hibridaciones ADN-ADN y la secuenciación de genes esenciales han establecido la división de *P. syringae* en al menos nueve genomoespecies (Gardan *et al.*, 1999; Sarkar y Guttman, 2004). Dentro de esta clasificación, *P. syringae* pv. tomato (Pto) pertenece a la genomoespecie 3, denominada también “tomato”. Otros patovares incluidos en este grupo son persicae, antirrhini, maculicola, viburni, apii, delphinii, passiflorae, philadelphia, ribicola y primulae (Gardan *et al.*, 1999; Cai *et al.*, 2011). Dentro de la genomoespecie 2 se encuentra la especie *P. savastanoi*, que incluye los pvs. fraxini, nerii, retacarpa, savastanoi, glycinea y phaseolicola (Gardan *et al.*, 1992; Anzai *et al.*, 2000). En el presente trabajo, se utilizarán los términos “complejo *P. syringae*” o “*P. syringae*”, para referirnos a las nueve genomoespecies como un todo.

Actualmente está disponible la secuencia completa de los genomas de tres patovares de *P. syringae*: pv. phaseolicola (Pph) (Joardar *et al.*, 2005), pv. syringae (Psy) (Feil *et al.*, 2005) y pv. tomato (Pto) (Buell *et al.*, 2003), causantes de la grasa y el moteado de la judía y el moteado del tomate, respectivamente. Además, están parcialmente secuenciados y en proceso de ensamblaje los genomas de al menos 35 patovares de *P. syringae* ([www.pseudomonas-syringae.org](http://www.pseudomonas-syringae.org)), cuyo análisis comparativo y funcional está permitiendo caracterizar, tanto los factores de virulencia conservados en el complejo *P. syringae*, como aquellos presentes únicamente en algunos patovares y que probablemente determinen la especificidad de hospedador (Baltrus *et al.*, 2011; Cai *et al.*, 2011). En esta memoria nos referiremos al patovar phaseolicola como *P. syringae* pv. *phaseolicola* o Pph, y al patovar tomato como *P. syringae* pv. *tomato* o Pto, denominaciones aceptadas mayoritariamente por la comunidad científica.

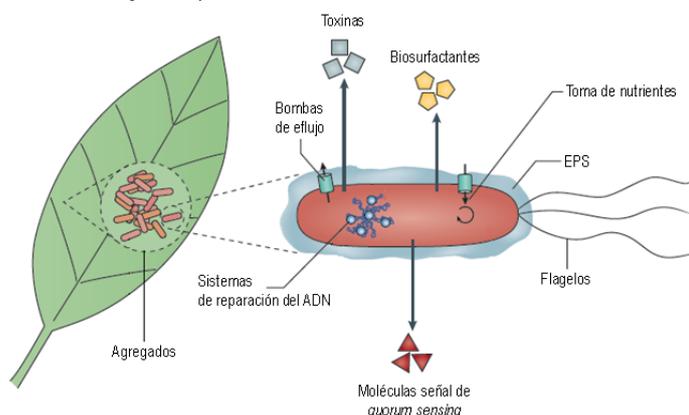
### 1.1. Características de *P. syringae* que facilitan su adaptación a la filosfera

La filosfera es un ambiente adverso para los microorganismos que la habitan debido a que la disponibilidad de nutrientes es limitada y a los cambios rápidos y frecuentes que tienen lugar en ella de temperatura, humedad y radiación ultravioleta. Sin embargo, *P. syringae* es bastante resistente a distintos tipos de estreses abióticos gracias a diversos mecanismos (Figura 2). La tolerancia a radiación UV está mediada por el sistema RulAB y por otros sistemas de reparación del ADN, pero no por la producción de pigmentos (Sundin y Murillo, 1999; Kim y Sundin, 2000; Dulla *et al.*, 2005; Gunasekera y Sundin, 2006). En Pto DC3000, los pili tipo IV tienen un papel importante en el crecimiento epifítico y la tolerancia a radiación UV en la superficie de las hojas (Roine *et al.*, 1998). Las bombas de eflujo constituyen el principal mecanismo de resistencia frente a los compuestos antimicrobianos producidos por las plantas o por otros microorganismos presentes en esos hábitats y contribuyen a la supervivencia bacteriana en los tejidos vegetales (Osborn, 1996; Dixon, 2001).

Debido a la naturaleza hidrofóbica de la cutícula, la producción de compuestos surfactantes por las bacterias permite la solubilización y difusión de sustratos y facilita el movimiento de las mismas en la superficie de las hojas (Lindow y Brandl, 2003; Schreiber *et al.*, 2005; Burch *et al.*, 2012). En *P. syringae* pv. syringae se ha demostrado que la siringomicina, además de ser un importante factor de virulencia, es un potente tensoactivo en cepas no patógenas, lo que les permite modificar el microhábitat de la hoja (Lindow y Brandl, 2003).

La motilidad mediada por flagelos y la adherencia estable de las bacterias a la superficie de la hoja también son importantes en las primeras etapas de la colonización en algunos patovares de *P. syringae*. Así, se ha demostrado que mutantes con motilidad reducida o inmóviles están afectados en el crecimiento, supervivencia y/o competencia sobre la superficie de las hojas en comparación con las cepas móviles (Haefele y Lindow, 1987; Hattermann y Ries, 1989; Hirano y Upper, 2000; Ichinose *et al.*, 2003). Esto se debe a que los flagelos permiten a las bacterias localizar nutrientes, acceder a sitios protegidos del estrés ambiental, colonizar los tejidos vegetales y, posteriormente, dispersarse de nuevo en el medio ambiente (Ottemann y Miller, 1997; Melotto *et al.*, 2006). En algunas cepas de *P. syringae* la adhesión a la superficie de la hoja dependiente de pili tipo IV juega un papel importante en su supervivencia y en la colonización (Romantschuk *et al.*, 1993; Suoniemi *et al.*, 1995; Roine *et al.*, 1998). En el pv. tabaci, los pili tipo IV no solo contribuyen a la supervivencia, sino que también son un importante factor de virulencia (Taguchi e Ichinose, 2011; Nguyen *et al.*, 2012).

La formación de agregados o microcolonias en las hojas de las plantas permite a las bacterias modificar su entorno, mejorando sus posibilidades de supervivencia en la filosfera. Varios estudios han demostrado que *P. syringae* no se encuentra en la hoja como células aisladas sino formando agregados en los que el tamaño está directamente relacionado con una mayor resistencia a la desecación (Monier y Lindow, 2003; 2004). En este sentido, algunas características de *P. syringae* son dependientes de la densidad celular, es decir, de *quorum sensing*. Así, Quiñones *et al.* (2005) demostraron que el sistema AhII-AhIR y el regulador AefR estimulaban la producción de polisacáridos extracelulares (EPS, *exopolysaccharide*), la tolerancia al estrés oxidativo y la maceración del tejido vegetal. En *P. syringae* pv. *syringae*, el alginato es importante para la vida epifítica y como factor de virulencia, ya que protege a las bacterias de la desecación y de las especies reactivas de oxígeno, amortigua los cambios osmóticos y provoca lesiones acuosas en los tejidos (Yu *et al.*, 1999; Keith *et al.*, 2003; Quiñones *et al.*, 2005).



**Figura 2. Características de *P. syringae* que mejoran su adaptación a la filosfera.** *P. syringae* es resistente a distintos tipos de estreses abióticos gracias a diversos mecanismos: la síntesis de polisacáridos extracelulares (EPSs), que protegen a las células de la desecación y ayudan a la formación de agregados; la producción de biosurfactantes, que permiten la solubilización de sustratos y facilitan el movimiento de las bacterias; los sistemas de reparación de ADN, como protección frente a la radiación. Asimismo, las bombas de eflujo permiten a la bacteria eliminar compuestos tóxicos producidos por la planta o por otras bacterias epifitas. La expresión de distintos sistemas para la captación de nutrientes, la motilidad flagelar y la detección de moléculas implicadas en *quorum sensing*, son también características importantes para la colonización de la planta hospedadora. Por otra parte, la bacteria produce toxinas que le permiten manipular el metabolismo y/o la señalización de la planta, llegando a ser cruciales para el proceso de infección. Modificado de Vorholt (2012).

Por otra parte, las bacterias del complejo *P. syringae* han adaptado su metabolismo a la composición y condiciones del apoplasto vegetal siendo capaces de utilizar un número restringido de azúcares, ácidos orgánicos y aminoácidos (Rico y Preston, 2008). La presencia de numerosos transportadores de tipo ABC en *P. syringae*, incluyendo aquellos involucrados en la captación de mono, disacáridos y aminoácidos, sugiere que son necesarios para acceder a nutrientes que pueden ser limitantes en esas condiciones (Vorholt, 2012).

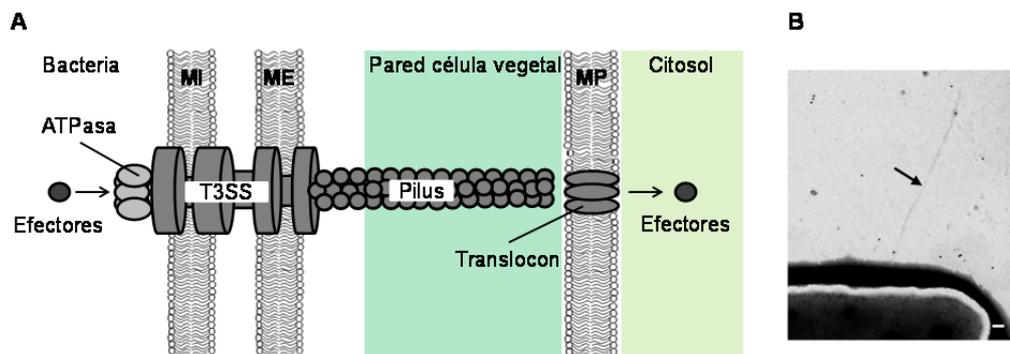
## 1.2. Factores de virulencia

Las bacterias fitopatógenas poseen factores de virulencia que alteran y/o suprimen las defensas de la planta hospedadora de modo que pueden multiplicarse en ella y obtener nutrientes a la vez que inducen los síntomas (Abramovitch y Martin, 2004; Nomura *et al.*, 2005). *P. syringae* es capaz de multiplicarse en plantas susceptibles causando la enfermedad, o de provocar una respuesta de defensa rápida y localizada en plantas no hospedadoras y resistentes conocida como respuesta hipersensible (HR, *hypersensitive response*), gracias al sistema de secreción tipo III (T3SS, *type 3 secretion system*) (Hirano y Upper, 2000; Marco *et al.*, 2005; Lindeberg *et al.*, 2006).

### 1.2.1. El sistema de secreción tipo III

El sistema de secreción tipo III (T3SS), denominado también sistema *hrp* (*hypersensitive response and pathogenicity*), es el principal determinante de virulencia en *P. syringae* y se identificó por primera vez en *P. syringae* pv. *phaseolicola* (Lindgren *et al.*, 1986). Es una maquinaria de secreción especializada utilizada por numerosas bacterias Gram-negativas patógenas de plantas y animales que permite a la bacteria inyectar proteínas (efectores) directamente en el citoplasma de las células del hospedador o en el espacio intercelular (Alfano y Collmer, 2004). Una vez allí, los efectores provocan la enfermedad alterando y/o suprimiendo las respuestas de defensa a diferentes niveles, o desencadenan una respuesta inmune exitosa si son reconocidos por las proteínas de resistencia (Jones y Dangl, 2006).

El T3SS es una jeringa molecular que consiste en un aparato de translocación de membrana formado por dos anillos, uno interior en la membrana plasmática y otro exterior en la membrana externa, y un filamento llamado *pilus*, que sobresale de la célula (Figura 3). El *pilus* tipo III tiene un diámetro de 6-8 nm de diámetro, su ensamblaje en la superficie de la célula depende del T3SS y es necesario para la secreción en medio de cultivo y para la transferencia de los efectores a las células vegetales, ya que funciona como un conducto por el que se transportan (Roine *et al.*, 1997; Hueck, 1998; Kubori *et al.*, 1998; Wei *et al.*, 2000; Jin y He, 2001; Jin *et al.*, 2001). La proteína estructural del *pilus* Hrp es HrpA, que muestra un alto grado de divergencia entre patovares, lo que parece ser consecuencia de su localización extracelular y de la presión selectiva a la que está sometida para evadir los mecanismos de detección de cada planta (Roine *et al.*, 1997; Preston, 2000). Morfológicamente el *pilus* Hrp parece ser más largo y flexible que el de los patógenos animales, lo que probablemente es necesario para atravesar la gruesa pared celular de la célula vegetal (Ramos *et al.*, 2007; Büttner y He, 2009).



**Figura 3. Sistema de secreción tipo III.**

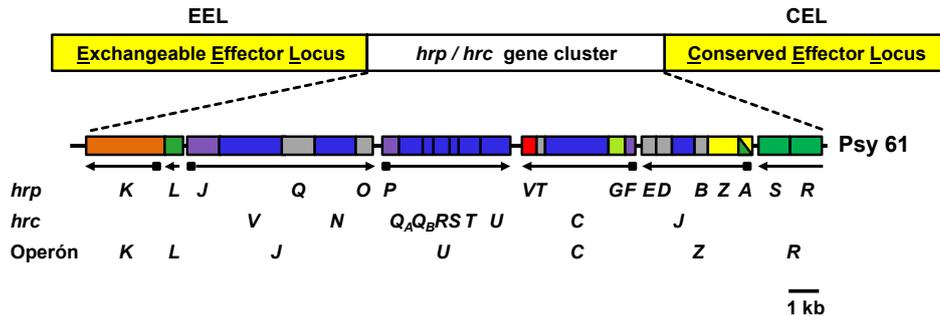
**A.** Representación esquemática del T3SS de una bacteria fitopatógena. El sistema de secreción conectado al pilus (extracelular) atraviesa las dos membranas bacterianas, sirviendo como canal para el transporte de las proteínas secretadas, también llamadas efectores. El translocón forma un canal proteico en la membrana citoplasmática de la célula vegetal permitiendo la entrada de los efectores al citosol de la célula del hospedador. MI, membrana interna; ME, membrana externa; MP, membrana plasmática. Modificado de Büttner y He (2009).

**B.** *Pilus Hrp*. Fotografía de microscopía electrónica de transmisión de células de Pto DC3000 cultivadas en medio inductor de *hrp*. La flecha señala el *pilus Hrp* y la escala representa 100 nm. Imagen tomada de Jin y He (2001).

El T3SS está codificado en el cluster génico *hrp/hrc* (*hypersensitive response and pathogenicity / hrp conserved*), de aproximadamente 25 kb. En *P. syringae* los genes *hrp/hrc* suelen tener adyacentes genes que codifican efectores y se localizan en una isla de patogenicidad (PAI, *pathogenicity island*) que está claramente definida en el genoma y flanqueada por ARNt o por elementos genéticos móviles (Figura 4) (Alfano *et al.*, 2000). La región central conservada de la PAI Hrp incluye 7 operones, que contienen 26 genes que codifican el T3SS y sus reguladores. Las proteínas codificadas por los genes *hrc* son los componentes del sistema de secreción (altamente conservados en diversos patógenos de plantas y animales) y forman el núcleo del cuerpo basal del aparato de secreción, que está localizado en la membrana celular bacteriana o en el citoplasma débilmente asociado con la membrana (Galán y Collmer, 1999; Alfano *et al.*, 2000). Según la estructura del operón *hrp* y el sistema de regulación, los T3SS de las bacterias fitopatógenas se clasifican en dos grupos: grupo I, al que pertenecen *P. syringae*, *Erwinia* spp. y *Pantoea stewartii*, y grupo II, al que pertenecen *Ralstonia solanacearum* y *Xanthomonas* spp. (Alfano y Collmer, 1997; Tang *et al.*, 2006). Ocho de las proteínas Hrc son muy similares en secuencia a los componentes del cuerpo basal flagelar y se localizan en la superficie de la membrana interna, formando un complejo similar al sistema de exportación de la flagelina. HrcC es la única que no tiene homólogo entre las proteínas flagelares, pertenece a la superfamilia de proteínas de membrana externa PulD/pIV y funciona como una proteína formadora de poros en la membrana externa (Alfano y Collmer, 1997; Tampakaki *et al.*, 2010).

Las proteínas que se transportan a través del T3SS de *P. syringae* se denominan Hop (*Hrp outer protein*) y, entre estas, algunas se secretan en el espacio intercelular y funcionan como proteínas accesorias, mientras que otras, denominadas efectores, se secretan en el citoplasma de las células vegetales donde actúan (Alfano y Collmer, 2004). Algunos efectores requieren la interacción específica con chaperonas que actúan de distintas maneras: mantienen las proteínas efectoras desplegadas o parcialmente desplegadas, protegen a los efectores de la interacción prematura entre sí o con otras

proteínas evitando la agregación o la proteólisis de los mismos en el citoplasma bacteriano, o bien funcionan como señales de secreción para dirigir el efector al aparato tipo III (Feldman y Cornelis, 2003; Losada y Hutcheson, 2005).



**Figura 4. Organización genética de la isla de patogenicidad Hrp de *P. syringae*.** La PAI Hrp se organiza en tres partes: la región central (genes *hrp/hrc*), que abarca aproximadamente 25 kb y está conservada en las PAIs de *P. syringae* pv. *syringae* 61, B728a y pv. *tomato* DC3000, contiene los genes que codifican para el T3SS y su regulación. Adyacentes se encuentran las regiones EEL (*exchangeable effector locus*) y CEL (*conserved effector locus*), que codifican proteínas que se secretan a través del T3SS. En la parte inferior de la figura se muestran los nombres de los genes y de los operones. Las flechas indican el sentido de la transcripción y los cuadrados la presencia de una caja *hrp* en los promotores dependientes de HrpL. Los otros genes codifican proteínas reguladoras (control positivo, verde y control negativo, rojo), los componentes Hrc asociados a la maquinaria del T3SS (azul), proteínas secretadas (amarillo), la proteína del translocón (naranja), proteínas reguladoras o que contribuyen a la secreción (violeta) y proteínas de función desconocida (gris). Las regiones EEL y CEL son de tamaño variable y no están representadas a escala. Modificado de Alfano *et al.* (2000).

Algunos genes que codifican efectores se denominaron *avr* porque se identificaron inicialmente como proteínas que determinaban un fenotipo de avirulencia (resistencia) en plantas (Leach y White, 1996; Galán y Collmer, 1999). Los genes R presentes en las plantas resistentes interactúan con las proteínas Avr desencadenando la respuesta hipersensible (HR), una muerte celular programada rápida y localizada asociada con respuestas defensivas que, en la mayoría de los casos, limita el crecimiento y la propagación del patógeno desde el sitio de infección. Por el contrario, en las plantas susceptibles, que carecen de los correspondientes genes R, los efectores del T3SS funcionan como determinantes de virulencia, ya que interfieren con las rutas de señalización de defensa, suprimiendo las respuestas de resistencia (como la HR) y modulando la fisiología celular con objeto de favorecer el crecimiento y la multiplicación del patógeno, lo que desencadena la enfermedad (Alfano y Collmer, 2004; Oguiza y Asensio, 2005; Jones y Dangl, 2006).

Como se ha mencionado anteriormente, los genes que codifican los componentes del sistema de secreción tipo III y algunos efectores están agrupados en la PAI Hrp, pero la mayoría de efectores están dispersos en el genoma o localizados en plásmidos (Alfano *et al.*, 2000; Buell *et al.*, 2003). A pesar de su diferente ubicación, la expresión de todos ellos está coordinada y sometida a un estricto control que responde a señales ambientales. Estos genes se expresan a niveles muy bajos en medios ricos en aminoácidos y se inducen tras el contacto con las células hospedadoras o en medios mínimos de composición definida que simulan las condiciones de la planta (Lindgren *et al.*, 1986; Xiao *et al.*, 1992; 1994; Wei *et al.*, 2005). Un ejemplo es el medio mínimo inductor de *hrp* (denominado MMF) que posee una

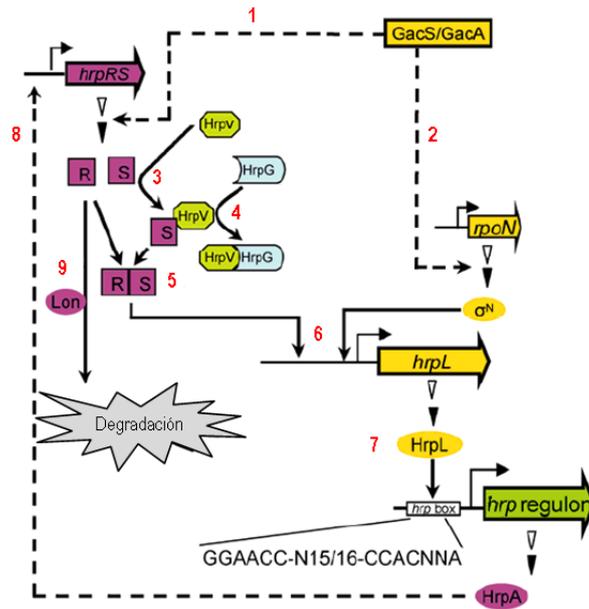
baja fuerza osmótica, un pH de aproximadamente 5,7 y azúcares simples, como la fructosa, como fuente de carbono (Huynh *et al.*, 1989; Rahme *et al.*, 1992; Hutcheson *et al.*, 2001).

La regulación del T3SS depende de HrpL, un factor sigma alternativo de la ARN polimerasa que pertenece a la familia ECF (*extracytoplasmic function*) (Xiao *et al.*, 1994; Xiao y Hutcheson, 1994; Zwiesler-Vollick *et al.*, 2002; Ferreira *et al.*, 2006). HrpL activa los genes del T3SS en respuesta a las condiciones de inducción reconociendo una secuencia consenso denominada “caja *hrp*” que está ubicada aguas arriba de los genes que controla (Xiao y Hutcheson, 1994; Fouts *et al.*, 2002). La transcripción del gen *hrpL* es, a su vez, dependiente del factor sigma alternativo  $\sigma^{54}$  (RpoN) y de las proteínas HrpR y HrpS (Figura 5), dos activadores transcripcionales pertenecientes a la familia de NtrC (Xiao *et al.*, 1994; Grimm *et al.*, 1995; Hendrickson *et al.*, 2000a; 2000b; Hutcheson *et al.*, 2001; Alarcón-Chaidez *et al.*, 2003; Chatterjee *et al.*, 2003). Tanto HrpR como HrpS portan un motivo para interactuar con el complejo  $\sigma^{54}$ -ARN polimerasa y un dominio de unión al ADN pero, a diferencia de la mayoría de las proteínas reguladoras de la familia, carecen del dominio receptor que se fosforila por acción de un regulador de respuesta (Hutcheson *et al.*, 2001; Jovanovic *et al.*, 2011). La activación máxima de *hrpL* requiere que ambas proteínas se unan como heterodímero a su promotor (Hutcheson *et al.*, 2001). En *P. syringae* el mecanismo por el cual HrpR y HrpS regulan la transcripción de *hrpL* difiere entre cepas. En *P. syringae* pv. *syringae* 61 y pv. *tomato* DC3000, *hrpR* y *hrpS* se expresan como un operón a partir de un promotor situado por encima de *hrpR* (Xiao *et al.*, 1994; Hutcheson *et al.*, 2001). Además, la transcripción de *hrpRS* está regulada por HrpA, ya que en un mutante carente de *hrpA*, la transcripción del operón *hrpRS*, *hrpL* y otros genes del T3SS se reduce drásticamente, pero el mecanismo por el que HrpA regula esos genes es desconocido hasta el momento (Wei *et al.*, 2000) (Figura 5).

Estudios recientes han demostrado que la función de HrpS está regulada por HrpV y HrpG (Wei *et al.*, 2000). HrpV es un regulador negativo de los genes del T3SS en condiciones de inducción, de modo que su delección provoca un aumento de la expresión de varios operones *hrp/hrc* y su hiperproducción el efecto contrario (Preston *et al.*, 1998). Se ha demostrado que HrpV interactúa con HrpS y HrpG *in vivo*, por lo que es probable que HrpG suprima el efecto de HrpV interactuando con ella y liberando a HrpS en condiciones de inducción (Wei *et al.*, 2005).

La proteólisis de HrpR por la proteasa Lon proporciona un mecanismo adicional de regulación de la expresión de *hrpL* y del T3SS (Figura 5). Determinadas condiciones que imitan las que se dan en el apoplasto vegetal, suprimen la degradación de HrpR mediada por Lon, permitiendo así la formación del complejo HrpR/HrpS y la inducción de la expresión de *hrpL* (Bretz *et al.*, 2002; Tsilibaris *et al.*, 2006; Lan *et al.*, 2007; Ortiz-Martín *et al.*, 2010). Asimismo, se ha demostrado que la proteasa Lon regula la estabilidad de determinados efectores del T3SS en *P. syringae* (Losada y Hutcheson, 2005).

La expresión del T3SS también se encuentra regulada a nivel global por el sistema de dos componentes GacS/GacA. Así, en un mutante de Pto DC3000 carente de *gacA* se observó una reducción significativa de los niveles de ARNm de *hrpRS*, *hrpL* y *rpoN* (Chatterjee *et al.*, 2003).



**Figura 5. Modelo de regulación de los genes *hrp/hrc* en *P. syringae*.** La detección de la planta o de un medio inductor de *hrp* activan la expresión de los genes *hrpRS*. Esta inducción parece estar mediada en parte por el sistema de dos componentes GacS/GacA (1), que también activa *rpoN* a nivel post-transcripcional (2). HrpV interacciona con HrpS e inhibe su acción (3). HrpG, por el contrario, interacciona con HrpV liberando a HrpS (4). HrpS y HrpR forman un heterodímero (5) activando la transcripción de *hrpL* desde un promotor dependiente de  $\sigma^{54}$  (RpoN) (6). HrpL reconoce la caja *hrp* en la región promotora de los genes *hrp/hrc* iniciando la expresión del T3SS, con lo que se forma un aparato de secreción funcional que moviliza los efectores (7). HrpA tiene un efecto positivo sobre la transcripción de *hrpRS*, estimulando la expresión del T3SS (8). En condiciones represoras (p. ej., en medio rico), los niveles de HrpR se mantienen bajos porque la proteasa Lon la degrada (9); sin embargo, en condiciones de inducción, la alta expresión de *hrpR* garantiza unos niveles de proteína suficientes para activar el sistema, a pesar de que Lon mantiene su actividad degradativa. Modificado de Tang *et al.* (2006).

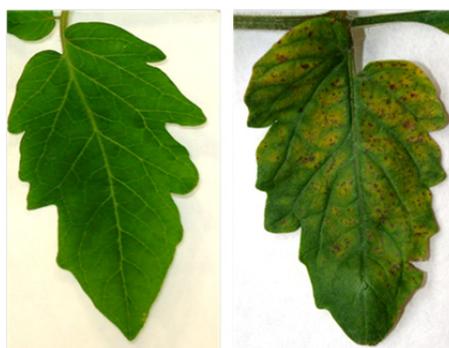
### 1.2.2. Producción de toxinas

El T3SS no es el único factor de virulencia del que se vale *P. syringae* para desencadenar la enfermedad, diferentes toxinas también contribuyen en el proceso infeccioso. Las fitotoxinas de *P. syringae* son péptidos no ribosomales sintetizados por enzimas específicas (revisado en Bender *et al.*, 1999). Así, la estructura anfipática de los lipopéptidos siringomicina y siringopeptina facilita su inserción en las membranas de las células vegetales y la formación de poros que incrementan la permeabilidad a los cationes y provocan la pérdida del potencial de membrana, lo que conduce a la muerte celular y a la necrosis del tejido afectado (Bender *et al.*, 1999; Hutchison y Gross, 1997). Otras toxinas como la faseolotoxina, la tabtoxina o la mangotoxina inducen clorosis actuando sobre rutas metabólicas específicas del hospedador. La faseolotoxina inhibe la ornitina carbamoiltransferasa, una enzima clave en el ciclo de la urea, la tabtoxina inhibe la glutamina sintetasa, esencial para la síntesis de glutamina y la eliminación de amonio, y la mangotoxina inhibe la ornitina acetiltransferasa, clave en la ruta biosintética de la ornitina y arginina (Bender *et al.*, 1999; Arrebola *et al.*, 2009). Recientemente, se han descrito otras toxinas pertenecientes al grupo de las siringofactinas que tienen actividad surfactante y son necesarias para la motilidad tipo *swarming* (Berti *et al.*, 2007; Lindeberg *et al.*, 2008; Kong *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2013).

Determinadas fitotoxinas también pueden imitar la acción de las hormonas vegetales manipulando distintas rutas de señalización de la planta con el fin de acceder a nutrientes y contrarrestar las respuestas de defensa. *P. syringae* pv. tomato produce coronatina, una toxina que afecta la señalización mediada por el ácido jasmónico y que promueve la apertura de los estomas favoreciendo la entrada de las bacterias, el crecimiento bacteriano en el apoplasto, la susceptibilidad sistémica y el desarrollo de síntomas, manifestados como clorosis (Bender *et al.*, 1999; Melotto *et al.*, 2006).

### 1.3. *P. syringae* pv. tomato

*P. syringae* pv. tomato (Pto) es el agente causante de la mancha negra del tomate, una enfermedad ampliamente distribuida y de gran importancia económica que se manifiesta con lesiones de color marrón oscuro a negro de diferentes tamaños y formas en las hojas, frutos y tallos, pudiendo estar rodeadas por un halo clorótico (Figura 6). Las lesiones con frecuencia se concentran en los bordes de las hojas, provocando una extensa necrosis marginal. En el fruto, las lesiones generalmente son pequeñas, con forma de lunar y superficiales aunque también pueden alcanzar los 3 mm de diámetro y ser más profundas; en frutos inmaduros están rodeadas por un halo verde. El desarrollo de esta enfermedad en la planta puede provocar una clorosis generalizada, seguida de desecación y, en casos severos, las plantas infectadas retrasan la maduración del fruto y reducen su producción. Las bacterias pueden sobrevivir en el suelo, en restos de plantas enfermas y en semillas y se propagan en el agua de lluvia o de riego. La infección en las plantas susceptibles se ve favorecida por el clima fresco y húmedo, mientras que el progreso de la enfermedad se detiene en ambientes calurosos (Hirano y Upper, 2000; Preston, 2000).



**Figura 6. Sintomatología provocada por *P. syringae* pv. tomato en hojas de tomate.** Fotografías de hojas de plantas de tomate sin infectar (izquierda) e infectada (derecha) con Pto DC3000. Se observan los síntomas característicos: puntos necróticos rodeados por halos cloróticos.

*P. syringae* pv. tomato DC3000 (Pto DC3000) es una cepa resistente a rifampicina derivada de *P. syringae* pv. tomato NCPPB1106. En ella se han estudiado los factores de virulencia de la bacteria y los mecanismos moleculares de la respuesta del hospedador frente a la infección, no sólo por la importancia de la enfermedad que provoca en tomate y crucíferas, sino porque la cepa Pto DC3000 también infecta la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (Cuppels, 1986; Cuppels y Ainsworth, 1995). Además, provoca una respuesta hipersensible (HR) en plantas no hospedadoras como tabaco (*Nicotiana tabacum*), *Nicotiana benthamiana* o judía (*Phaseolus vulgaris*) (Preston, 2000; Fouts *et al.*, 2003; Rodríguez-Moreno *et al.*, 2008). Sin embargo, en ausencia del efector HopQ1-1, Pto DC3000 causa enfermedad en la planta

modelo *N. benthamiana* y la severidad de la lesión es similar a la observada en tomate y *A. thaliana* (Wei *et al.*, 2007).

El genoma de Pto DC3000 se compone de un cromosoma circular de 6.397.126 pb y dos plásmidos: pDC3000A (73.661 pb) y pDC3000B (67.473 pb), que en conjunto portan alrededor de 5.800 genes. El análisis comparativo de su genoma con el de otras especies de *Pseudomonas*, ha permitido establecer que DC3000 posee rutas metabólicas clave como glucolisis, gluconeogénesis, ruta de las pentosas fosfato y ciclo de Krebs, pero es incapaz de convertir el piruvato en lactato, ya que carece de la enzima lactato deshidrogenasa (Buell *et al.*, 2003). Además, Pto DC3000 posee un amplio repertorio de transportadores para la adquisición de nutrientes, especialmente azúcares, y un número limitado de transportadores para aminoácidos en comparación con *P. putida* y *P. aeruginosa*. Como bacteria asociada a plantas, DC3000 puede establecerse como epífita o como patógena, de ahí que aproximadamente el 12% de sus genes está implicado en regulación génica, transducción de señales y transcripción, lo que le permite responder a diversas condiciones ambientales (Ullrich *et al.*, 1995; Bender *et al.*, 1999; Hutcheson *et al.*, 2001; Buell *et al.*, 2003; Chatterjee *et al.*, 2003). El genoma de DC3000 codifica también un gran número de proteínas implicadas directa o indirectamente en virulencia, como aquellas relacionadas con motilidad, adhesión, síntesis del T3SS, producción de toxinas, bloqueo de la respuesta inmune de la planta hospedadora, sistemas de captación de hierro o enzimas extracelulares, entre otras.

En Pto DC3000, el T3SS y la coronatina son los principales factores de virulencia. En el genoma de DC3000 alrededor de 40 genes, entre efectores y proteínas accesorias secretadas por el T3SS, tienen un papel en la translocación de proteínas a las células vegetales (Petnicki-Ocwieja *et al.*, 2002; Alfano y Collmer, 2004; Lindeberg *et al.*, 2006). Curiosamente, algunos de ellos están en el plásmido pDC3000A, pero aún no se ha establecido el papel de los mismos en la virulencia de Pto, debido probablemente a que algunos de los efectores codificados en pDC3000A tienen parálogos en el cromosoma (Buell *et al.*, 2003).

Pto DC3000 produce coronatina, una toxina compuesta de ácido coronafálico y un derivado de isoleucina, el ácido coronámico. En DC3000 los genes implicados en la síntesis de los ácidos coronafálico y coronámico están codificados en el cromosoma y separados entre sí 26 kb, a diferencia de lo que ocurre en otros patovares de *P. syringae* en los que esos genes están agrupados y codificados en plásmidos (Brooks *et al.*, 2004). Su expresión depende del factor sigma alternativo HrpL, necesario también para la transcripción de los genes *hrp* (Cuppels y Ainsworth, 1995; Fouts *et al.*, 2002). Además de su papel en la supresión de la defensa mediada por el ácido salicílico (Kloek *et al.*, 2001) y la activación de la vía de señalización del ácido jasmónico (JA) gracias a su mimetismo con el JA (Zhao *et al.*, 2003), investigaciones recientes han revelado un papel fundamental de la coronatina en la supresión de la defensa estomática (Melotto *et al.*, 2006; Underwood *et al.*, 2007). Aunque en el genoma de DC3000 no se han identificado genes para la síntesis de otras fitotoxinas como siringomicina, siringotoxina o siringopeptina, se han encontrado 5 genes que codifican para péptido sintetasas. Uno de ellos, *syfA*, codifica un lipopéptido necesario para la motilidad tipo *swarming* y con posible actividad antibacteriana (Berti *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2013). Adicionalmente, ciertos patovares de *P. syringae* producen la fitohormona ácido indolacético (IAA, *indole-3-acetic acid*), que influye en el crecimiento bacteriano *in planta* y provoca la aparición de tumores (Mazzola y White, 1994; Glickmann *et al.*, 1998). En el genoma de

DC3000 se ha identificado el gen *iaaL*, que convierte el IAA en el conjugado IAA-lisina y en su región promotora se encuentra la caja *hrp*, lo que sugiere un papel en virulencia (Fouts *et al.*, 2002).

Otros genes identificados en el genoma de Pto DC3000 importantes para el crecimiento epifito y colonización son los relacionados con la adhesión a superficies, como los de los pili tipo IV y la producción de exopolisacáridos (Roine *et al.*, 1998; Keith *et al.*, 2003). Asimismo, hay genes que codifican para posibles enzimas degradadoras de pared celular: pectina liasa, poligalacturonasa y otras con posible actividad celulolítica. Cabe destacar que DC3000 carece del gen que codifica para la proteína nucleadora de hielo (*InaZ*, *ice\_nucleation\_activity*), responsable de los daños por heladas en plantas infectadas y que sí se encuentra presente en otras cepas del complejo *P. syringae* (Lindow *et al.*, 1989; Buell *et al.*, 2003).

#### 1.4. *P. syringae* pv. *phaseolicola*

*P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448A (Pph) es el agente causal de la enfermedad conocida como grasa de la judía (*Phaseolus vulgaris*). Los síntomas característicos en hoja son unas lesiones acuosas rodeadas de un halo clorótico que acaban necrosándose pudiendo estar rodeadas por un halo verde pálido, mientras que en las vainas aparecen unas manchas de aspecto aceitoso que también acaban necrosándose (Figura 7). La infección de las hojas en desarrollo las distorsiona y, en casos de infección severa, se puede producir una clorosis sistémica generalizada y la pérdida total de la cosecha (Murillo *et al.*, 2010). Es una enfermedad transmitida fundamentalmente por semillas pero también por la lluvia, el agua de riego y el viento a partir de los exudados o de residuos vegetales infectados. Las bacterias penetran en la planta a través de aberturas naturales (los estomas, principalmente) o heridas durante los períodos de alta humedad relativa. A temperaturas frías (inferiores a 22°C), el patógeno produce una toxina, la faseolotoxina, que es responsable de la clorosis sistémica pero que no es imprescindible para el desarrollo de la enfermedad (Mitchell *et al.*, 1978; Arnold *et al.*, 2011).



**Figura 7. Sintomatología causada por *P. syringae* pv. *phaseolicola* en hojas de judía.** Fotografías de una hoja (izquierda) y vainas (derecha) de judía infectadas con Pph. Se observan los síntomas característicos: halos necróticos rodeados en algunos casos de otros cloróticos.

La enfermedad de la grasa de la judía fue caracterizada por Burkholder (1926) y la bacteria aislada se denominó inicialmente *Phytomonas medicaginis* variedad *phaseolicola*, antes de ser renombrada como *Pseudomonas medicaginis* variedad *phaseolicola* (Dowson, 1943), hasta recibir su nombre actual: *P. syringae* pv. *phaseolicola* (Young *et al.*, 1978). El rango de hospedadores de Pph incluye todas las especies de la subfamilia *Phaseoleae*, excepto *Desmodium* spp. y *Pisum sativum*. Además, provoca una respuesta hipersensible en plantas de tabaco, pero normalmente no causa HR en *Arabidopsis* (Arnold *et*

al., 2011). Las cepas de Pph se clasifican en 9 razas (Taylor *et al.*, 1996) según su virulencia y capacidad para causar enfermedad en los distintos cultivares de *Phaseolus vulgaris*. La cepa objeto de estudio en el presente trabajo, *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448A (race 6), se aisló originalmente en 1985 de *P. vulgaris* en Etiopía y es capaz de infectar todas las variedades de judía ensayadas (Taylor *et al.*, 1996).

Pph es un bacilo Gram-negativo de aproximadamente 1,5 mm de largo y 0,7-1,2 mm de diámetro, aerobio, móvil, con al menos un flagelo polar y cuya temperatura óptima de crecimiento oscila entre 25 y 30°C. Es oxidasa negativo, arginina dihidrolasa negativo y produce levano. El genoma de 1448A consiste en un cromosoma circular de 5.928.787 pb y dos plásmidos: p1448A-A (131.950 pb) y p1448A-B (51.711 bp) que, en conjunto, portan unos 5.353 genes, 3,626 de los cuales tienen función asignada: un 14% están implicados en el transporte de proteínas, un 13% en distintos procesos celulares y aproximadamente el 10% tiene un papel regulador presumiblemente facilitando la adaptación a los diferentes entornos en los que vive Pph 1448A como patógeno, epífita o en semillas durante las diferentes fases de su ciclo de vida. (Joardar *et al.*, 2005). El análisis comparativo de su genoma con el de otras especies de *Pseudomonas*, ha permitido establecer que 1448A posee rutas metabólicas clave como glucolisis, gluconeogénesis, ruta de las pentosas fosfato y ciclo de Krebs, pero es incapaz de utilizar algunos compuestos que sí metaboliza Pto DC3000, como mioinositol, D-sorbitol, D-arabitol y D-manitol, ácido D-galacturónico, L-histidina, ácido D-glucosamínico y D-serina, ácido  $\alpha$ -cetoglutárico, ácido D,L-láctico o L-leucina (Rico y Preston, 2008). Pph 1448A no posee *iaaL*, que codifica la enzima indolacetato-lisina ligasa, ni los genes *wss* para la síntesis de celulosa acetilada, ni dos hemaglutininas filamentosas no degeneradas (FHA, *filamentous hemagglutinin*), que sí están presentes en Pto DC3000 (Lindeberg *et al.*, 2008). Sin embargo, Pph 1448A posee los genes para la producción de alginato, exopolisacárido Psl, pili de tipo IV y siringofactinas, al igual de Pto DC3000, y genes que codifican fimbrias y hemaglutininas que son ortólogos distantes de los encontrados en DC3000.

En Pph 1448A, el T3SS y la faseolotoxina son los principales factores de virulencia. Los primeros mutantes del T3SS se obtuvieron en Pph mediante la inserción de Tn5 (Niepold *et al.*, 1985; Lindgren *et al.*, 1986), observándose que no eran virulentos en judía ni provocaban HR el tabaco. Posteriormente se ha demostrado que los genes *hrp* están conservados en otros patovares de *P. syringae* y se agrupan en una isla de patogenicidad (PAI) que comprende al menos seis operones (Alfano *et al.*, 2000, Figura 4). La regulación transcripcional de los componentes del T3SS y de sus efectores se ha estudiado con cierto detalle en Pph (Thwaites *et al.*, 2004; Ortiz *et al.*, 2010a; b).

La aureola de clorosis característica que rodea a las lesiones acuosas en una planta infectada con Pph es el resultado de la acción de la faseolotoxina. Esta toxina inhibe la ornitina carbamoil transferasa, un enzima crítico en el ciclo de la urea (Moore *et al.*, 1984). La producción de faseolotoxina depende de la temperatura, siendo óptima entre 18 y 20°C y no se produce a 30°C (Nüske y Fritsche, 1989). Los perfiles de transcripción han demostrado que para la expresión óptima de la faseolotoxina no sólo se requiere una temperatura baja, sino también componentes específicos de la planta presentes en la hoja y el apoplasto (Hernández-Morales *et al.*, 2009). Los genes implicados en la biosíntesis de faseolotoxina se organizan en el cluster génico *argK-tox*, que incluye cinco unidades transcripcionales, comprende 23 genes, está flanqueado por secuencias de inserción y transposasas y situado en un fragmento de ADN de 38 kb altamente conservado y con características de isla génica (Peet *et al.*, 1986; Genka *et al.*, 2006; Aguilera

*et al.*, 2007). *argK* codifica una ornitil carbamoil transferasa resistente a la acción de la faseolotoxina (Mosqueda *et al.*, 1990). Sin embargo, la importancia de la faseolotoxina en la patogénesis de Pph está en entredicho tras un estudio llevado a cabo en Castilla y León ya que, de una colección de 138 aislados de Pph obtenidos de campo, 95 no produjeron faseolotoxina *in vitro* y 94 aislados no parecían tener los genes para su síntesis (Rico *et al.*, 2003).

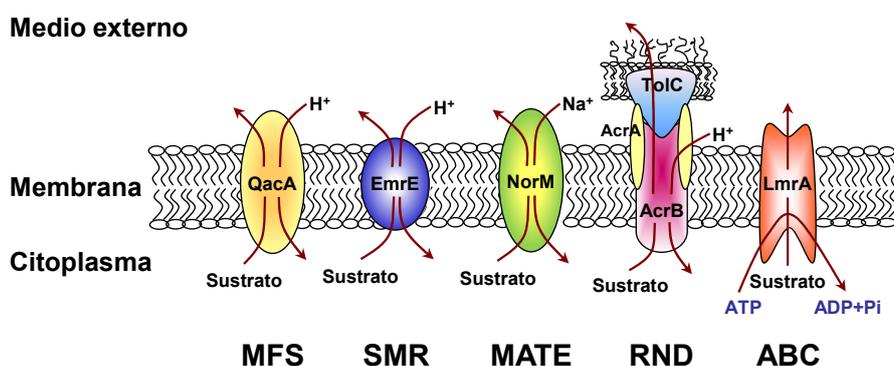
## 2. Transportadores implicados en multirresistencia

Los microorganismos se encuentran expuestos a diversos compuestos con efecto deletéreo presentes en el medio ambiente de forma natural, como antibióticos sintetizados por comunidades microbianas, sales biliares producidas en el tracto intestinal de animales superiores o compuestos tóxicos generados por las plantas frente al ataque de patógenos (Dixon, 2001; Piddock, 2006; Bednarek y Osbourn, 2009). Asimismo, están expuestos a compuestos químicos nocivos, tanto orgánicos como inorgánicos, a antibióticos semisintéticos y biocidas producto de la actividad industrial, agrícola, urbana y médica (Levy y Marshall, 2004; Russell, 2000). Todos estos compuestos con actividad antimicrobiana actúan sobre la pared celular, la membrana citoplasmática o sobre rutas biosintéticas esenciales para el crecimiento bacteriano; sin embargo, existen bacterias resistentes a la acción de estos compuestos porque han desarrollado mecanismos protectores. Uno de los métodos más extendidos de resistencia microbiana es la eliminación de compuestos tóxicos mediante transportadores de amplio espectro en un proceso dependiente de energía, reduciendo así la concentración de agentes antimicrobianos en la célula a niveles sub-tóxicos (Poole, 2001; Ramos *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2003). Estos transportadores pueden ser específicos para un sustrato o pueden transportar una gama de compuestos estructuralmente diferentes, incluyendo antibióticos, biocidas, colorantes, detergentes, inhibidores metabólicos, disolventes orgánicos, toxinas, metales pesados, factores de virulencia e incluso moléculas producidas por el organismo hospedador, como flavonoides (Li y Nikaido, 2009; Vargas *et al.*, 2011; Taylor *et al.*, 2012; Hinchliffe *et al.*, 2013; Wong *et al.*, 2014). Los transportadores que expulsan varios compuestos están asociados a la multirresistencia (MDR, *multidrug resistance*) y tienen una gran importancia clínica, ya que provocan infecciones bacterianas intratables.

Los transportadores bacterianos de tipo MDR se clasifican en varias familias según su modo de acción y los sustratos que exportan (Figura 8): la superfamilia ABC (*ATP-binding cassette*), la superfamilia MFS (*major facilitator superfamily*), la familia MATE (*multidrug and toxic compound extrusion*), la familia SMR (*small multidrug resistance*) y la superfamilia RND (*resistance, nodulation, cell division*) (Paulsen *et al.*, 1996; Pao *et al.*, 1998; Tseng *et al.*, 1999; van Veen *et al.*, 2001; Omote *et al.*, 2006).

La expresión de los genes implicados en MDR está controlada a nivel transcripcional y/o traduccional, manteniendo unos niveles bajos del transportador, dado que la producción excesiva de proteínas integrales de membrana que utilizan la fuerza protón motriz tiene efectos perjudiciales para la célula (Alonso *et al.*, 2004; Hillen y Berens, 1994; Johanesen *et al.*, 2001; Lee y Edlin, 1985; Ma *et al.*, 1996; Martínez *et al.*, 2009; Nguyen *et al.*, 1989). De hecho, la expresión de la mayoría de los genes que codifican transportadores está controlada por reguladores transcripcionales (la mayoría represores, aunque algunos son activadores) cuyos genes se sitúan adyacentes al gen (o genes) del transportador

MDR. La capacidad de reconocer múltiples compuestos no es exclusiva de los transportadores, sino que también la presentan estos reguladores transcripcionales, de modo que responden a los mismos compuestos que expulsa el transportador (Alguel *et al.*, 2007; Grkovic *et al.*, 1998; Lomovskaya *et al.*, 1995; Ma *et al.*, 1996; Terán *et al.*, 2003, 2006; Vargas *et al.*, 2011). Hasta la fecha, los reguladores estudiados que modulan sistemas MDR pertenecen a las familias de TetR, MarR, IclR, LysR y LacI/GalR. Además, en muchos casos, existe un control adicional por reguladores globales (Grkovic *et al.*, 2001b; Li y Nikaido, 2009; Vargas *et al.*, 2011; Kawakita *et al.*, 2012).



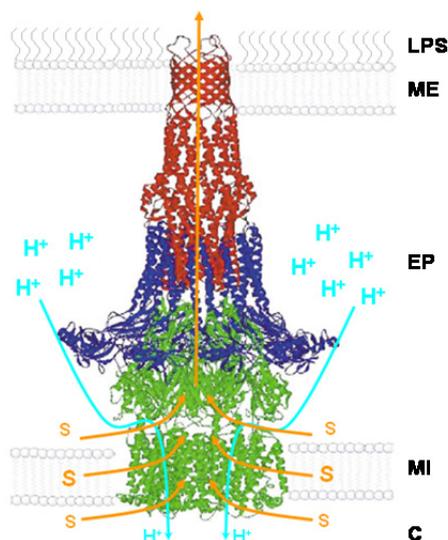
**Figura 8. Representación esquemática de las cinco familias de transportadores MDR caracterizados en bacterias.** Ejemplo de cada familia de transportadores: QacA de *Staphylococcus aureus*, de la familia MFS; EmrE de *E. coli*, de los transportadores SMR; NorM de *Vibrio parahaemolyticus*, de la familia MATE; AcrAB-TolC de *E. coli*, miembro de la familia RND y LmrA de *Lactococcus lactis* de la familia ABC. Modificado de Paulsen (2003).

## 2.1. Transportadores RND

Los transportadores de tipo RND son los más relevantes desde el punto de vista clínico en bacterias Gram-negativas porque proporcionan resistencia a múltiples antibióticos (Poole, 2003; Saier *et al.*, 2006; [www.tcd.org/tcdb/index.php?tc=2.A.6](http://www.tcd.org/tcdb/index.php?tc=2.A.6)). En su mayoría, se organizan como sistemas tripartitos en el que el transportador RND, localizado en la membrana citoplasmática y que actúa como una bomba de extrusión dependiente de energía, funciona conjuntamente con una porina (OMF, *outer membrane factor*), que se sitúa en la membrana externa pero se expande hacia el espacio periplásmico formando un canal transitorio y continuo entre ambas proteínas de forma que el compuesto tóxico se expulsa directamente al medio externo. El tercer componente es una proteína de fusión periplásmica (MFP, *membrane fusion protein*) que facilita el acoplamiento entre el transportador y la proteína de membrana externa y la eliminación de los compuestos tóxicos desde periplasma o desde la cara externa de la membrana interna (Eswaran *et al.*, 2004; Murakami *et al.*, 2006; Hinchliffe *et al.*, 2013; Figura 9).

Los transportadores de la familia RND están ampliamente distribuidos en bacterias Gram-negativas oportunistas y patógenas de animales y humanos, patógenas y simbiontes de plantas y bacterias del suelo inocuas (revisado en Nikaido, 2009). Expulsan un amplio rango de sustratos, entre los que se encuentran antibióticos lipofílicos y anfifílicos, agentes quimioterapéuticos, inhibidores metabólicos, colorantes, detergentes, biocidas, hidrocarburos aromáticos, ácidos grasos tóxicos, metales pesados, sales biliares e incluso homoserin lactonas asociadas con *quorum sensing*. Aunque en un principio estos transportadores

se estudiaron porque exportaban antibióticos, se ha demostrado que eliminan también agentes antimicrobianos producidos por el hospedador. En algunas cepas incluso exportan determinantes de virulencia, como adhesinas, toxinas u otras proteínas importantes para la colonización y la infección de células humanas y animales (Pidcock, 2006; Poole, 2004; Taylor *et al.*, 2012). Estos hallazgos han llevado a pensar que el papel fisiológico de estos transportadores es permitir la supervivencia de la bacteria que los porta en su nicho ecológico (Martínez *et al.*, 2009).



**Figura 9. Modelo de organización estructural de los componentes de una bomba de la familia RND.**

La bomba está compuesta por tres unidades estructurales: el transportador de membrana interna (verde), formado por un trímero que atraviesa la membrana interna con 36 fragmentos helicoidales transmembrana (12 por monómero) y se expande hacia el espacio periplásmico hasta contactar con la porina (OMF, en rojo). La porina se organiza como un trímero con una estructura en barril  $\beta$  atravesando la membrana externa y expandiéndose hacia el espacio periplásmico. Un tercer componente periplásmico, la proteína de fusión de membrana (MFP, en azul) parece formar un anillo con 9 monómeros estabilizando el acoplamiento de los otros dos componentes. Modificado de Eswaran *et al.* (2004). LPS, lipopolisacárido; ME, membrana externa; EP, espacio periplásmico; MI, membrana interna; C, citoplasma; S, sustrato.

Entre los metabolitos secundarios sintetizados por las plantas superiores, los flavonoides, isoprenoides y alcaloides son los que tienen un papel más importante en la protección frente a patógenos. Estos compuestos participan en multitud de procesos fisiológicos, por lo que pueden estar presentes en el tejido sano de la planta o pueden ser sintetizados *de novo* en respuesta al ataque de patógenos (Dixon, 2001; Osbourn, 1996; Treutter, 2005). Entre las estrategias desarrolladas por los patógenos para combatir el efecto tóxico de estos compuestos están la modificación de sus grupos funcionales, la reducción de su absorción, la alteración de sus rutas biosintéticas en la planta y el empleo de transportadores MDR (VanEtten *et al.*, 2001; Walsh, 2000; Wong *et al.*, 2014).

Las bacterias fitopatógenas poseen transportadores MDR similares a los presentes en bacterias que infectan a humanos y a animales, algunos de los cuales confieren resistencia a compuestos tóxicos producidos por la planta, lo que favorece la invasión del hospedador y el desarrollo de la enfermedad (Pidcock, 2006; VanEtten *et al.*, 2001). Asimismo, se ha descrito que la actividad antimicrobiana de algunos compuestos vegetales se debe a su capacidad para inhibir transportadores MDR (Pagès *et al.*,

2005; Stavri *et al.*, 2007; Tegos *et al.*, 2002), lo que apoya la hipótesis de que la multirresistencia tiene un papel importante en la patogénesis bacteriana.

Al inicio de esta tesis doctoral, los datos existentes sobre la implicación de transportadores MDR del complejo *P. syringae* en la virulencia o en la supervivencia epifítica eran prácticamente inexistentes, aunque sí se habían descrito algunos transportadores en otras bacterias fitopatógenas; sin embargo, a lo largo de estos últimos años se han ido caracterizando más sistemas. Por ejemplo, el transportador IfeAB de *Agrobacterium tumefaciens* está implicado en la colonización competitiva de las raíces de alfalfa al impedir la acumulación intracelular de isoflavonoides (Palumbo *et al.*, 1998; Peng y Nester, 2001; Nies, 2003). En *Dickeya dadantii* (antes *Erwinia chrysanthemi*) el sistema AcrAB está implicado en virulencia y colonización epifita, ya que proporciona resistencia a péptidos antimicrobianos (Maggiorani-Valecillos *et al.*, 2006). Además, se ha demostrado que su expresión se activa en presencia de compuestos fenólicos y ácido salicílico (Ravirala *et al.*, 2007). También en *D. dadantii*, se ha demostrado que la inactivación de TolC disminuye la virulencia de esta cepa (Barabote *et al.*, 2003). TolC es el componente de membrana externa de varias bombas de tipo RND, por lo que es probable que esta mutación afecte a la función de un gran número de transportadores a la vez. Asimismo, en *Erwinia amylovora*, que causa el fuego bacteriano en manzano y peral, se demostró que el transportador AcrAB está implicado en supervivencia, colonización de los tejidos vegetales y virulencia en plántulas de manzana debido a que tiene un importante papel en la resistencia a compuestos antibacterianos vegetales, tales como flavonoides, isoprenoides y alcaloides (Burse *et al.*, 2004a). Por otra parte, se han descrito dos transportadores pertenecientes a la familia RND implicados en la secreción de fitotoxinas: el sistema ToxGHI de *Burkholderia glumae* BGR1 es el encargado de exportar la toxoflavina (Kim *et al.*, 2004) y PseABC de *P. syringae* pv. *syringae*, codificado dentro de la isla de patogenicidad *syr-syp* para la síntesis de siringomicina y siringopeptina, es el responsable de la secreción de esas fitotoxinas (Kang y Gross, 2005).

En *P. syringae* recientemente se han caracterizado 2 transportadores. MexAB-OprM está presente en Pto DC3000, Pph 1448A y Psyr B728a y tiene un papel muy importante en la supervivencia y colonización en plantas de tomate, *Arabidopsis* y judía por estas bacterias y en la resistencia intrínseca a múltiples antibióticos (como ampicilina, cefotaxima, piperacilina, ácido nalidixico o tetraciclina), a biocidas, agentes mutagénicos y flavonoides (Stoitsova *et al.*, 2008; Fan *et al.*, 2011; Vargas *et al.*, 2011). MexEF-OprN de *P. syringae* pv. *tabaci* 6605 confiere resistencia a cloranfenicol, trimetoprim, fluoroquinolonas y triclosan y su expresión está regulada negativamente por AefR (Kawakita *et al.*, 2012).

### 2.1.1. Sistema MexAB-OprM

En el genoma de Pto DC3000 se encuentran anotados 12 transportadores de tipo RND, incluyendo los probables ortólogos de los sistemas Mex de *P. aeruginosa* y de otros sistemas descritos hasta el momento (Buell *et al.*, 2003; Ren *et al.*, 2004; [www.membranetransport.org](http://www.membranetransport.org)). El transportador MexAB-OprM es uno de los sistemas RND de Pto DC3000 codificado por un operón que comprende los marcos abiertos de lectura *mexA* (PSPTO\_4303), *mexB* (PSPTO\_4304) y *oprM* (PSPTO\_4305). El análisis comparativo de este con otros transportadores tipo RND disponibles en las bases de datos permitió establecer que era un 96-97% idéntico en secuencia de aminoácidos al de otras cepas del complejo *P. syringae* (pv. *tomato*, *syringae* y *phaseolicola*) (Tabla 1). También se encuentran ortólogos de este transportador en varias cepas

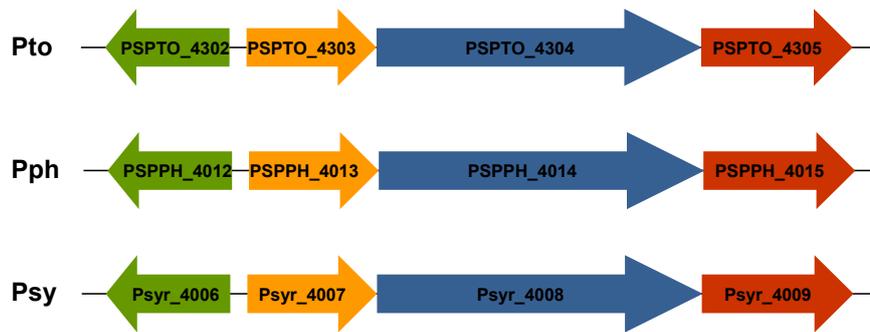
de *P. putida*: TtgABC de *P. putida* DOT-T1E y KT2440, que expulsa tanto disolventes orgánicos como diferentes antibióticos (Ramos *et al.*, 1998; Nelson *et al.*, 2002); MepABC de *P. putida* KT2442, que mejora la tolerancia de esta cepa a disolventes orgánicos como tolueno y xileno (Fukumori *et al.*, 1998); ArpABC de *P. putida* S12, que confiere resistencia múltiple a antibióticos (Kieboom y de Bont, 2001). Otros transportadores con menor identidad de secuencia son SrpABC de *P. putida* S12 (61% de identidad), que está implicado en la expulsión de disolventes orgánicos, o AcrAB de *E. amylovora* (66% de identidad), que confiere resistencia a compuestos antibacterianos de origen vegetal. Por otra parte, uno de los sistemas mejor caracterizados, MexAB-OprM de *P. aeruginosa* que confiere resistencia a múltiples antibióticos (Poole *et al.*, 1993; Poole, 2001), se incluye dentro de los transportadores de *Pseudomonas* con menor homología.

**Tabla 1. Proteínas homólogas a los componentes de la bomba MexAB-OprM de Pto DC3000.**

Organismo	MFP	Transportador	OMF	Referencia
<i>P. syringae</i>				
pv. tomato DC3000	PSPTO_4303 MexA	PSPTO_4304 MexB	PSPTO_4305 OprM	Buell <i>et al.</i> , 2003
pv. syringae B728a	PSYR_4007 (96%)	PSYR_4008 (97%)	PSYR_4009 (95%)	Feil <i>et al.</i> , 2005
pv. phaseolicola 1448A	PSPPH_4013 (96%)	PSPPH_4014 (96%)	PSPPH_4015 (96%)	Joardar <i>et al.</i> , 2005
<i>P. putida</i>				
DOT-T1E	TtgA (70%)	TtgB (82%)	TtgC (79%)	Ramos <i>et al.</i> , 1998
KT2440	TtgA (70%)	TtgB (82%)	TtgC (79%)	Nelson <i>et al.</i> , 2002
KT2442	MepA (70%)	MepB (82%)	MepC (79%)	Fukumori <i>et al.</i> , 1998
S12	ArpA (72%)	ArpB (82%)	ArpC (79%)	Kieboom y de Bont, 2001
S12	SrpA (57%)	SrpB (61%)	SrpC (56%)	Kieboom <i>et al.</i> , 1998
<i>P. aeruginosa</i>	MexA (65%)	MexB (79%)	OprM (68%)	Poole <i>et al.</i> , 1993
<i>E. amylovora</i>	AcrA (53%)	AcrB (66%)	-	Burse <i>et al.</i> , 2004
<i>E. coli</i>	AcrA (55%)	AcrB (65%)	-	Ma <i>et al.</i> , 1993

MFP (*membrane fusion protein*), proteína de fusión periplásmica; OMF (*outer membrane factor*), porina de membrana externa. Entre paréntesis, se indica el porcentaje de identidad en la secuencia de aminoácidos para cada proteína respecto a cada componente, MexA, MexB y OprM de Pto DC3000.

En 5' y en sentido opuesto a los genes estructurales *mexAB-oprM* de Pto DC3000, se identificó un gen que codifica un regulador transcripcional: *pmeR* (*Pseudomonas multidrug efflux regulator*, PSPTO\_4302) (Stoitsova *et al.*, 2008). Según su secuencia de aminoácidos, PmeR pertenece a la familia de reguladores transcripcionales de TetR (Ramos *et al.*, 2005). Al buscar en las bases de datos proteínas similares, aparecieron en primer lugar las de los diferentes patovares del complejo *P. syringae* (95% de identidad) que también se disponen en el genoma de la misma manera (Figura 10). PmeR es también similar a reguladores de *P. fluorescens* (68-74% de identidad), como EmhR (Hearn *et al.*, 2003), de *P. putida* (66-67% de identidad), como TtgR (Terán *et al.*, 2003) o de *Erwinia* (42-44% de identidad), como AcrR de *E. amylovora* (Burse *et al.*, 2004a), entre otros. Sin embargo, no se encontró homología significativa con MexR, proteína de la familia de reguladores transcripcionales MarR que actúa como represor de la bomba *mexAB-oprM* de *P. aeruginosa* (Poole *et al.*, 1996).



**Figura 10. Organización de los genes del transportador MexAB-OprM y su regulador en tres patovares de *P. syringae*.** Representación esquemática de la organización en *P. syringae* pv. tomato (Pto), phaseolicola (Pph) y syringae (Psyr) de los tres genes que codifican la bomba MexAB-OprM y el gen *pmeR*, que se transcribe en sentido opuesto.

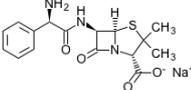
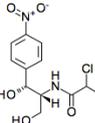
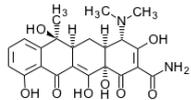
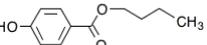
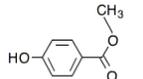
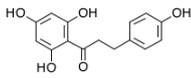
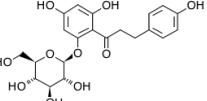
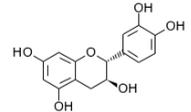
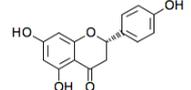
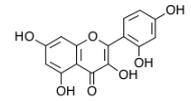
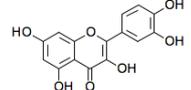
El mutante DC3000A presenta el gen *mexA* interrumpido con un interposón, lo que impide la expresión del operón *mexAB-oprM*. La comparación de la susceptibilidad a diferentes compuestos antimicrobianos entre la cepa silvestre y un mutante carente de la bomba MexAB-OprM (DC3000A) permitió identificar los sustratos que expulsa. Otro mutante desprovisto de *pmeR*, DC3000R, permitió determinar nuevos sustratos de la bomba tras observar que la resistencia a varios compuestos aumentaba en DC3000R por una mayor expresión del transportador (Vargas *et al.*, 2011). Los resultados de varios investigadores indican que el transportador MexAB-OprM de Pto DC3000 posee un amplio rango de sustratos y confiere resistencia a múltiples antibióticos ( $\beta$ -lactámicos, cefalosporinas, quinolonas, tetraciclina y cloranfenicol), biocidas (butilparabeno y metilparabeno) y metabolitos secundarios de plantas (berberina, (+)-catequina, isotiocianatos, morina, naringenina, floridzina y floretina) (Stoitsova *et al.*, 2008; Fan *et al.*, 2011; Vargas *et al.*, 2011). Esta resistencia múltiple a compuestos de distinta naturaleza y estructura ya se había observado también en transportadores RND de otras bacterias, como TtgABC y MepABC de *P. putida* DOT-T1E y KT2442, respectivamente, que expulsan diferentes disolventes orgánicos y antibióticos (Fukumori *et al.*, 1998; Ramos *et al.*, 1998) o en el transportador AcrAB de los patógenos de plantas *D. dadantii* y *E. amylovora*, que confiere resistencia a antibióticos, colorantes y compuestos derivados de plantas, como floretina y naringenina (Burse *et al.*, 2004a; Maggiorani-Valecillos *et al.*, 2006).

Curiosamente, la transcripción de los genes de la bomba y del regulador incrementa en presencia de varios sustratos del transportador MexAB-OprM, como butil y metilparabeno, floretina o naringenina, ya que provocan la desrepresión de los promotores de *mexAB-oprM* y *pmeR* *in vivo*. Estas observaciones, junto con el hecho de que la expresión de *mexAB-oprM* y *pmeR* incrementa en el mutante DC3000R en comparación con la cepa silvestre y el ligero pero reproducible aumento de la resistencia a varios compuestos antimicrobianos en la cepa DC3000R, demuestran que PmeR es el represor local de *mexAB-oprM* y que también regula su propia expresión (Vargas *et al.*, 2011).

La purificación del regulador PmeR permitió llevar a cabo su caracterización funcional: se identificó su operador en la región intergénica *pmeR-mexA* y se demostró que PmeR se disocia del mismo tras la unión a los compuestos que inducen su expresión *in vivo* (Vargas *et al.*, 2011). PmeR es miembro de la familia de reguladores transcripcionales TetR, que poseen una región N-terminal muy conservada con un motivo

hélice-giro-hélice (HTH, *helix-turn-helix*) de unión a ADN y una región C-terminal variable que comprende el dominio de dimerización y el de unión a efectores (Ramos *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2010). PmeR se une a un operador de 22 pb que solapa con los promotores de *mexAB-oprM* y *pmeR*, específicamente con la región -10 del promotor *pmeR* y su inicio de transcripción, y con la caja -35 del promotor *mexAB-oprM*, reprimiendo la transcripción de *mexAB-oprM* y *pmeR*. Esta represión revierte tras la unión de PmeR a moléculas efectoras, lo que provoca su disociación del ADN y permite la expresión de su propio gen y la del transportador. En este sentido, es importante destacar que el perfil de efectores de PmeR es más limitado que el rango de sustratos de MexAB-OprM, lo que significa que la expresión de la bomba se induce solo en presencia de algunos de los compuestos que puede expulsar (Tabla 2).

**Tabla 2. Estructura de los sustratos de la bomba MexAB-OprM, inductores de su expresión y efectores de PmeR (Vargas *et al.*, 2011)**

Tipo de compuesto	Nombre	Estructura	Sustrato	Inductor	Efector
Antibióticos	Ampicilina		+	-	-
	Cloranfenicol		+	-	-
	Tetraciclina		+	- *	-
Biocidas	Butilparabeno		+	+	++
	Metilparabeno		+	++	++
Flavonoides	Floretina (dihidrocalcona)		+	++	++
	Flordizina (dihidrocalcona)		+	-	-
	(+)-Catequina (flavanol)		+	-	+/-
	Naringenina (flavanona)		+	++	++
	Morina (flavonol)		+	ND	++
	Quercetina (flavonol)		-	ND	++

ND, no determinado; \*, no mostrado; el número de + indica mejor inductor o efector; +/-, inhibe la formación del complejo PmeR/operador pero no causa su disociación.

Se han identificado compuestos vegetales que son efectores de la proteína reguladora PmeR y sustratos de la bomba de flujo y se ha confirmado que el transportador MexAB-OprM de Pto DC3000 confiere resistencia a compuestos antimicrobianos de origen vegetal, principalmente flavonoides (Stoitsova *et al.*, 2008; Fan *et al.*, 2011; Vargas *et al.*, 2011; Tabla 2). Otros autores han demostrado que *A. thaliana* y *S. lycopersicum* (tomate) responden a la infección por Pto DC3000 produciendo ácidos orgánicos, flavonoides como rutina (quercetina glicosilada), fenilpropanoides y otros compuestos fenólicos (Hagemaijer *et al.*, 2001; López-Gresa *et al.*, 2010, 2011). Por tanto, la bomba MexAB-OprM parece tener un papel fisiológico relevante en el hábitat natural de Pto como mecanismo de defensa frente a esos compuestos. Además, algunas moléculas señal de plantas, como la floretina y la naringenina, promueven significativamente la expresión de *mexAB-oprM*, lo que reduciría en gran medida el efecto de estos compuestos en los estadios iniciales de la interacción planta-bacteria. De hecho, la mutación de *mexAB-oprM* provoca una disminución de la capacidad de Pto para colonizar la planta hospedadora y competir eficientemente con la cepa silvestre (Vargas *et al.*, 2011; 2013).

En resumen, la bomba MexAB-OprM de Pto DC3000 media la resistencia a compuestos antimicrobianos producidos por las plantas confiriéndole protección, facilitando la supervivencia inicial en la superficie de las hojas, la posterior colonización de la planta hospedadora y el desarrollo de la enfermedad. Además, MexAB-OprM es capaz de eliminar otros agentes antimicrobianos, como antibióticos, lo que podría permitir a Pto DC3000 competir eficientemente con otras bacterias epifitas presentes en las hojas.

## 2.2. Transportadores MATE

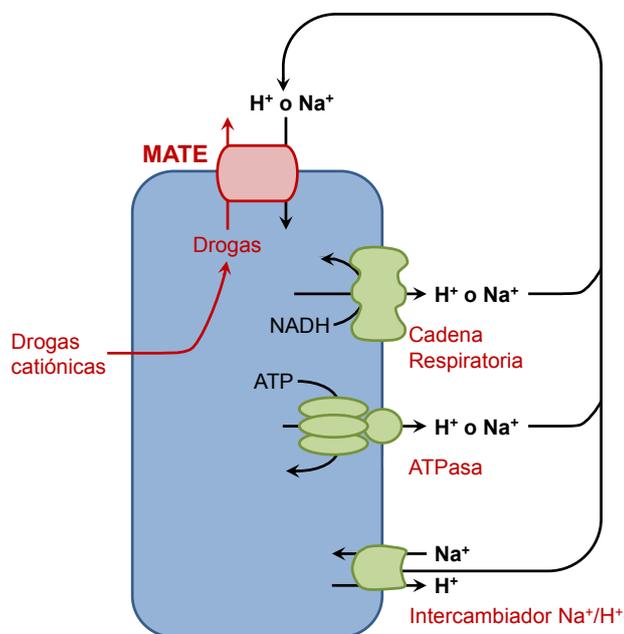
Los transportadores de la familia MATE (*multidrug and toxic compound extrusion*) funcionan por un mecanismo de antiporte droga:Na<sup>+</sup> o H<sup>+</sup> eliminando compuestos tóxicos al medio externo (Figura 8). En la actualidad, se pueden encontrar en las bases de datos más de 1.000 proteínas de este tipo y, curiosamente, están presentes en todos los reinos (arqueas, bacterias y eucariotas), lo que sugiere que estos transportadores son comunes a todos los organismos vivos (Putman *et al.*, 2000; Hvorup *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 1999). Así, se han identificado dos genes en el cromosoma 17 humano, denominados hMATE1 y hMATE. Cuando hMATE1 se expresa en células HEK293, media el intercambio H<sup>+</sup>/cationes orgánicos (Otsuka *et al.*, 2005; Matsumoto *et al.*, 2008). Aunque la longitud de las proteínas de la familia MATE oscila entre 400 y 700 aminoácidos, la mayoría posee 400-550 residuos con 12 hélices transmembrana (TMS). Aparentemente, no se existe conservación de secuencia en estos transportadores, pero todas estas proteínas muestran un 40% de similitud de secuencia (Omote *et al.*, 2006).

Solo se han caracterizado unos 20 transportadores MATE en bacterias, pero las secuencias de los genomas bacterianos contienen muchos más ejemplos (Omote *et al.*, 2006; Kuroda y Tsuchiya, 2009). Los transportadores MATE bacterianos confieren resistencia frente a las fluoroquinolonas (p.ej., norfloxacina), tintes catiónicos (acriflavina y etidio), aminoglucósidos (especialmente kanamicina y estreptomicina) o flavonoides (berberina); es decir, actúan como transportadores de múltiples compuestos mostrando una preferencia por cationes orgánicos. Los sustratos de los transportadores MATE identificados hasta ahora son diferentes y no tienen estructuras químicas relacionadas y, aunque la gama de sustratos es más estrecha que la de los transportadores de tipo RND, no hay duda de que los transportadores MATE

también están implicados en MDR (Kuroda y Tsuchiya, 2009). Se debe mencionar que la mayoría de los transportadores MATE bacterianos se han identificado tras expresarlos en un hospedador heterólogo, una cepa de *E. coli* hipersusceptible a compuestos antimicrobianos porque carece del transportador AcrAB (Morita et al., 2000). Por lo tanto, el papel y la importancia de estas bombas en sus correspondientes cepas nativas no están claros.

El primer transportador de la familia MATE que se caracterizó funcionalmente fue NorM de *Vibrio parahaemolyticus*, que confiere resistencia a múltiples agentes catiónicos tóxicos (incluyendo las fluoroquinolonas) gracias su antiporte con  $\text{Na}^+$ . Otros transportadores caracterizados son una putativa proteína de resistencia a etionina de *Saccharomyces cerevisiae*, una bomba de eflujo de drogas:cationes de *A. thaliana* y la proteína DinF (*DNA damage-inducible protein F*) de *E. coli* (Morita et al., 2000; Li y Nikaido, 2004; Kuroda y Tsuchiya, 2009). Las proteínas bacterianas poseen alrededor de 450 aminoácidos y presentan 12 putativos segmentos transmembrana (TMS), que parece que surgieron tras una duplicación interna en un gen que codificaba una proteína con 6 TMS. Las proteínas de levaduras son más grandes, de hasta 700 residuos, y también poseen 12 TMS; algunas de las proteínas de origen animal presentan una hélice C-terminal adicional.

La extrusión de cationes orgánicos por la mayoría de los transportadores de tipo MATE a través de la membrana plasmática, incluido NorM de *V. parahaemolyticus*, está energéticamente acoplada a la fuerza  $\text{Na}^+$ -motriz. Esta fuerza se genera gracias a la acción de bombas de  $\text{Na}^+$  o de antitransportadores de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  acoplados a la cadena respiratoria (Figura 11). Sin embargo, la actividad de los transportadores AbeM de *Acinetobacter baumannii* y PmpM de *P. aeruginosa* está acoplada a la fuerza de  $\text{H}^+$ -motriz (Su et al., 2005; He et al., 2004). Por tanto, los transportadores MATE bacterianos caracterizados hasta el momento son antitransportadores de  $\text{H}^+$  o  $\text{Na}^+$  y cationes orgánicos (Figura 11).



**Figura 11. Funciones propuestas para los transportadores MATE bacterianos.** Las bacterias acumulan compuestos catiónicos tóxicos en su citoplasma, pero son eliminados por transportadores de tipo MATE a expensas de la fuerza  $\text{H}^+$ - o  $\text{Na}^+$ -motriz. Esta fuerza se establece por acción de bombas primarias de  $\text{H}^+$  o de  $\text{Na}^+$  (translocación de  $\text{H}^+$  o  $\text{Na}^+$  por ATPasas o por la cadena respiratoria) o de un intercambiador secundario de  $\text{H}^+$  y  $\text{Na}^+$ . El uso de  $\text{H}^+$  o  $\text{Na}^+$  en el antiporte parece depender de la especie bacteriana. Modificado de Omote et al. (2006).

Otras proteínas bacterianas caracterizadas son MepA de *Staphylococcus aureus*, que tiene una gran importancia clínica ya que su sobreexpresión confiere resistencia a la tigeciclina, un antibiótico recientemente desarrollado con buena actividad antimicrobiana frente a cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA) o vancomicina (McAleese *et al.*, 2005). PmpM de *P. aeruginosa*, uno de los transportadores de esta familia que usa el mecanismo antiporter droga/H<sup>+</sup>, confiere resistencia a acriflavina, bromuro de etidio, norfloxazina y rodamina (He *et al.*, 2004).

En bacterias fitopatógenas, se han descrito algunos transportadores MATE, como DinF de *Ralstonia solanacearum*, que expulsa ácido nalidíxico, acriflavina, ampicilina, berberina, bromuro de etidio, DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), esculetina, tomatina o tetrafenilfosfonio (Brown *et al.*, 2007), o NorM de *Erwinia amylovora*, implicado en la tolerancia a ampicilina, azul de metileno, berberina, bromuro de etidio, ciprofloxacina, floretina, kanamicina, norfloxazina y violeta cristal (Burse *et al.*, 2004b). *Erwinia amylovora* provoca el tizón de fuego, una enfermedad necrotrófica que afecta a miembros de la familia Rosaceae (como manzanos y perales). Se observó que sobrenadantes de cultivos de *Pantoea agglomerans*, una bacteria epífita capaz de controlar las poblaciones de *E. amylovora*, inhibían el crecimiento de un mutante de *E. amylovora* carente de NorM, pero no afectaban a la cepa silvestre. Es decir, este transportador contribuye a la resistencia intrínseca a uno o varios compuestos producidos por *P. agglomerans* (Burse *et al.*, 2004b).

### 3. Técnicas de captura de imágenes para la detección del estrés biótico

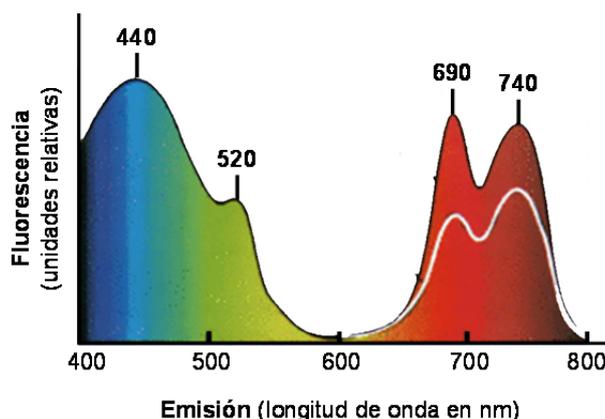
Uno de los principales problemas que plantean los estudios de la planta huésped infectada por un patógeno vegetal es que no se produce una alteración uniforme del metabolismo foliar, ni de la actividad fotosintética del hospedador enfermo, ni del desarrollo de síntomas. La aparición de distintas técnicas de imagen para el diagnóstico del estrés vegetal ha resuelto en parte este problema, proporcionando mapas foliares o de frutos de los procesos fisiológicos de la planta huésped sobre los que actúa el agente fitopatógeno (Barón *et al.*, 2012; Ducruet *et al.*, 2012). Pueden aplicarse a distintos niveles: en el laboratorio para investigar el mecanismo de acción del patógeno, en invernadero mediante la instalación de sensores en movimiento, hasta en campo a pequeña escala con equipos portátiles o a gran escala mediante sensores aerotransportados (Chaerle y Van Der Straeten, 2000; 2001).

El desarrollo de técnicas de captura de imágenes, como las de la fluorescencia de la clorofila (Chl-FI, emisión a 650-720 nm) y azul y verde (BGFI, emisión a 400-500 nm) ha permitido el análisis de la funcionalidad del proceso fotosintético y la activación del metabolismo secundario, respectivamente. Además, la termografía de imagen (radiación infrarroja) ofrece información sobre los patrones de transpiración de las hojas. Todas estas técnicas pueden ser aplicadas de forma simultánea a la misma planta, lo que permite una evaluación del complejo "síndrome de estrés" y han demostrado su utilidad en el análisis de las interacciones planta-patógeno (Chaerle y Van Der Straeten, 2001; Nedbal y Whitmarsh, 2004; Chaerle *et al.*, 2007).

### 3.1. Fluorescencia multiespectral inducida por UV

El uso de las técnicas de imagen para el seguimiento y diagnóstico de patógenos vegetales se ha basado en gran parte en el efecto que éstos tienen sobre el proceso fotosintético y en medidas de Chl-FI. Sin embargo, además de las imágenes de distintos parámetros de la cinética de la Chl-F, son de gran utilidad las de fluorescencia azul y verde. La excitación de una hoja en el rango UV-A ( $\lambda = 355$  nm) conduce a la emisión, no sólo de fluorescencia roja y en el rojo lejano (Chl-FI, 690 y 740 nm), sino también azul y verde (BGF, 440 y 520 nm) (Figura 12).

Las emisiones F690 y F740 tienen un origen común que es la clorofila a (Chl a), único fluoróforo presente en las hojas que emite en esta parte del espectro puesto, que la Chl b transfiere toda su energía de excitación a la Chl a *in vivo* (Cerovic *et al.*, 1999). La BGF, a diferencia de la Chl-F, tiene un origen heterogéneo, puesto que son varios los fluoróforos que pueden contribuir a esta emisión. Son generalmente metabolitos secundarios como fenoles, polifenoles y fenilpropanoides relacionados con la ruta del shikimato (Cerovic *et al.*, 1999), destacando los ácidos hidroxicinámicos, como el ferúlico (Lichtenthaler y Schweiger, 1998; Morales *et al.*, 1994; 1996; Meyer *et al.*, 2003) el cumárico y el clorogénico (Lichtenthaler y Schweiger 1998; Cerovic *et al.*, 1999). Algunas nicotinamidas, (NAD, NADH), flavinas (FMN, FAD, riboflavina) y coenzimas (piridoxal-5'-fosfato) también emiten fluorescencia en el verde y en el azul, pero esta emisión está enmascarada por la del resto de fluoróforos y necesita de fluorímetros altamente sensibles para su detección (Cerovic *et al.*, 1999).



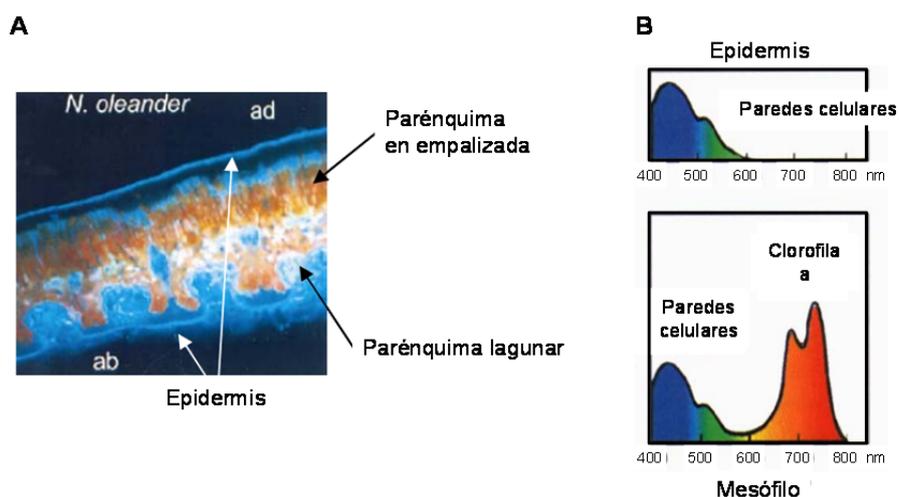
**Figura 12. Espectro de emisión de fluorescencia inducido por luz UV en una hoja verde.** Los máximos de emisión están indicados como 440 nm, 520 nm, 690 nm y 740 nm. Modificado de Buschmann *et al.* (2000).

La emisión de F440, F520, F690 y F740 varía dependiendo del origen de la hoja, especie vegetal, cantidad de pigmentos foliares, edad, si consideramos el haz o el envés y de las condiciones ambientales o los factores de estrés a los que ha estado expuesta la planta (Buschmann *et al.*, 2000; Lichtenthaler, 1998). La asimetría estructural del haz y el envés de las hojas en plantas dicotiledóneas afecta la emisión de BGF y Chl-F (Figura 13). En estas hojas, la mayor parte de la BGF procede de la cutícula, de las paredes celulares de la epidermis y del tejido vascular, mientras que la Chl-F procede del mesófilo y de los cloroplastos de las células oclusivas de los estomas, ya que la epidermis carece de cloroplastos. En la cara adaxial (haz) de la hoja, expuesta a la luz, con una epidermis gruesa y un parénquima en empalizada, compuesto por células altamente empaquetadas, se favorece la reabsorción de la Chl-F y por ello presenta una menor fluorescencia inducida por UV que la cara abaxial (envés), que tiene una epidermis más fina y

un parénquima lagunar, en el que las células dejan entre sí grandes espacios intercelulares (Buschmann y Lichtenthaler, 1998).

Ya que la fluorescencia BGF y la Chl-F poseen distintos orígenes y están afectadas de forma independiente por factores fisiológicos y ambientales, en ocasiones se hace necesario emplear cocientes de fluorescencia: F690/740, F440/520, F440/690, F440/740, F520/690, F520/740. El cociente F690/740 tiene una relación inversa con la cantidad de clorofila, puesto que la clorofila *in vivo* absorbe en la región cercana a los 690 nm (Gitelson *et al.*, 1998) y, a mayor concentración del pigmento, habrá una mayor reabsorción de la fluorescencia emitida. Sin embargo, esto no sucede con la fluorescencia en el rojo lejano, que es independiente de la concentración de la clorofila (Gitelson *et al.*, 1998; Buschmann *et al.*, 2000).

Los cocientes F440/690 y F440/740 han demostrado ser los más sensibles para el diagnóstico de estrés (Schweiger *et al.*, 1996). También el cociente F440/520 es muy útil como indicador de estrés a largo plazo; debido a que los fluoróforos que emiten en el verde son más constantes en el tiempo, generando cambios en este cociente en horas y días; contrario a lo que sucede con los parámetros que dependen de la clorofila, que cambian cada milisegundo, convirtiéndose en un indicador a corto plazo (Buschmann y Lichtenthaler, 1998).

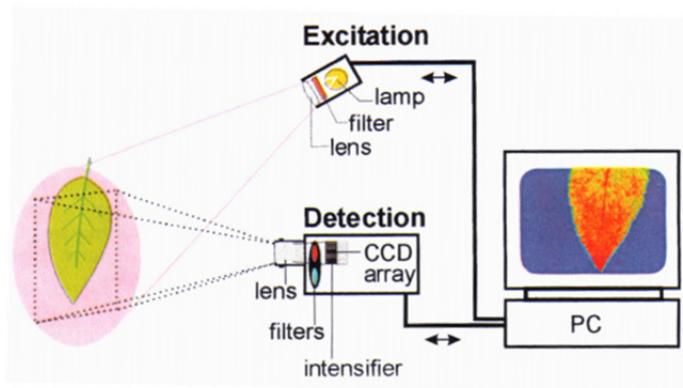


**Figura 13. Asimetría de una hoja de dicotiledónea.** A. Micrografía de epifluorescencia (200x) de la emisión en el visible de una sección longitudinal de una hoja. Adaxial (ad); abaxial, (ab) B. Espectros de emisión de la epidermis ad y de las células del mesófilo (tomado de Mantha *et al.*, 2001 y Buschmann *et al.*, 2000 y modificado por Pineda, 2007).

### 3.1.1. Instrumentación

Las técnicas de MCF inducidas por luz UV, tienen distintos niveles de aplicación, todos de gran utilidad para la detección del estrés vegetal. Desde la utilización de microscopios de epifluorescencia, que proporcionan una valiosa información sobre la localización celular de los fluoróforos vegetales (Stober y Lichtenthaler 1993b; Agati *et al.*, 2002; Mantha *et al.*, 2001; Hideg *et al.*, 2002) hasta el uso de sensores adecuados en teledetección para la monitorización de cultivos (Nilsson, 1995; Luedeker *et al.*, 1997; Apostol *et al.*, 2003; Moya *et al.*, 2003; Apostol *et al.*, 2005).

También está extendido el uso de espectrofluorímetros, en los que se registra el espectro de emisión de fluorescencia de áreas seleccionadas de una hoja tras su excitación con luz UV producida por lámparas de xenon o láseres (LIF, *laser-induced fluorescence*). La necesidad de obtener información espacial más completa, propició el diseño de aparatos de captura de imágenes MCFI (Lang *et al.*, 1996; Lichtenthaler *et al.*, 1996; Lichtenthaler y Miehe, 1997) tipo LIF o FL-FIS (*flash lamp-fluorescence imaging system*), según la procedencia de la luz de excitación. En ambos casos, se adquieren imágenes de F440, F520, F690 y F740 secuencialmente para el mismo campo de visión, cada una con el filtro apropiado, mediante una cámara CCD (*charge-coupled device*) sincronizada con la fuente lumínica. Los filtros están montados en una ruleta frente a la cámara CCD y se cambian automáticamente. Con la ayuda de un software adecuado se integran los datos de fluorescencia y se obtienen las imágenes, que suelen presentarse en escala de grises, pero es posible la aplicación de una escala de falsos colores que resulta más intuitiva (Buschmann y Lichtenthaler, 1998; Buschmann *et al.*, 2000; Lichtenthaler y Babani, 2000). Varios laboratorios han desarrollado sus propios equipos de MCFI. En la Figura 14 se muestra el del grupo Dr. Lichtenthaler, de la Universidad de Karlsruhe.



**Figura 14. Esquema del sistema de fluorescencia de imagen (FL-FIS) de la Universidad de Karlsruhe.**  
Tomado de Buschmann *et al.* (2000).

El Dr. Szigeti dispone de un equipo similar que nuestro grupo utilizó para la detección del estrés biótico (Szigeti *et al.*, 2002; Szigeti, 2008; Pineda *et al.*, 2008). También se han diseñado otros equipos en los que son LEDs (*light-emitting diode*) los que proporcionan la luz de excitación (Marcelis *et al.*, 2006). Lenk *et al.* (2007) han revisado, tanto la instrumentación (detectores, fuentes de alimentación, adquisición de datos y procesamiento de imágenes) como las diferentes aplicaciones de la MCFI. En la presente tesis se ha utilizado el equipo de MCFI descrito en el apartado 9.1 de Materiales y Métodos, que es una adaptación del FluorCam 800-C (P.S.I., Brno Czech Republic, [www.psi.cz](http://www.psi.cz)) en el que la luz de excitación es proporcionada por un panel de LEDs que emiten a 360 nm. Estudios realizados con un equipo similar han combinado el uso de la microscopía de excitación de dos fotones para la detección de fluorescencia verde en las capas más profundas de la hoja. (Benediktyová y Nedbal, 2009).

### 3.1.2. Aplicaciones de la MCF inducida por luz UV en el entorno agrario

En las últimas décadas, se han encontrado múltiples aplicaciones de la fluorescencia multiespectral inducida por luz UV en la identificación y clasificación de plantas (Chapelle *et al.*, 1985), así como en la investigación de su crecimiento y desarrollo, ya que los cocientes BGF/Chl-F varían dependiendo si la planta es mono o dicotiledónea, con la edad y durante el enverdecimiento (Stober y Lichtenthaler, 1992; Babani y Lichtenthaler, 1996; Babani *et al.*, 1996) o la senescencia (Meyer *et al.*, 2003). La relación entre ambos tipos de fluorescencias ha sido también de utilidad para el seguimiento y control de la calidad de frutos (Wulf *et al.*, 2003; Zude, 2006; Ariana *et al.*, 2006).

Merece especial atención el uso de la MCF para la detección del estrés vegetal y de respuestas de defensa. Diversos autores han señalado que los distintos cocientes de fluorescencia pueden ser muy útiles para comprobar el grado de protección de una planta frente a la luz UV (Babani *et al.*, 2005; Buschmann y Lichtenthaler, 1998; Lenk y Buschmann, 2006). Dentro del campo del diagnóstico de deficiencias nutricionales de plantas, esta técnica ha demostrado sobradamente su utilidad en la valoración de la nutrición nitrogenada de un cultivo mediante el estudio de cocientes como F440/690 y F440/740 (Langsdorf *et al.*, 2000; Apostol *et al.*, 2003; Corp *et al.*, 2003; Mercure *et al.*, 2004; Lichtenthaler *et al.*, 2005), utilizándose incluso en teledetección (Apostol, 2005). Cadet y Samsom (2011) detectan mediante MCF inducida por UV deficiencias de N, P y K en girasol, Morales *et al.* (1994) deficiencias de Fe mediante cambios en el cociente F460/525 (azul/verde), y Schuerger *et al.* (2003) han estudiado la toxicidad por Zn mediante una combinación de espectroscopía de fluorescencia inducida por láser e imagen hiperespectral. Con respecto al estrés hídrico (Morales *et al.*, 1998; Hideg *et al.*, 2002) y térmico, ambas situaciones inducen variaciones en los cocientes BGF/Chl-F (Lang *et al.*, 1996; Schweiger *et al.*, 1996; Buschmann y Lichtenthaler, 1998). Szigeti (2008) resumió los cambios en los distintos cocientes de fluorescencia multiespectral en distintas situaciones de estrés biótico y abiótico estudiadas (Tabla 3).

**Tabla 3. Cambios en los cocientes de fluorescencia.** F440/690 (azul/rojo), F440/740 (azul/rojo lejano), F690/740 (rojo/rojo lejano), F440/520 (azul/verde) como indicadores de estrés (Szigeti, 2008, ampliado de Buschmann *et al.* 2000).

Factor de estrés	F440/690	F440/740	F690/740	F440/520
Deficiencia de agua	++	++	0	0
Deficiencia de N	++	++	+	0
Luz fuerte	++	++	+	--
Ataque por ácaros	++	++	0	+
Infeción por roya	++	++	++	-
Estrés por calor	--	--	0	-
Estrés por radiación UV-A	--	--	0	+
Fotoinhibición	++	++	--	0
Tratamiento con paraquat	+	+	-	-
Estrés por Cd	+	+	+	-
Tratamiento con diuron	--	--	+	0

++: muy significativo, +: significativo, --: poco significativo, -: no significativo, 0: sin cambios.

### 3.1.3. Aplicaciones de la MCF inducida por luz UV a la detección y seguimiento de patógenos vegetales

Esta técnica ha demostrado ser de gran utilidad en el estudio de la respuesta de plantas frente a patógenos, debido a que la activación su metabolismo secundario ante la invasión conlleva un aumento de compuestos fenólicos implicados en su defensa, bien como antimicrobianos o como precursores de lignina/suberina para el fortalecimiento de la pared vegetal (Nicholson y Hammerschmidt, 1992; Kofalvi y Nassuth, 1995; Dixon y Paiva, 1995; Dixon *et al.*, 2002; Parker *et al.*, 2009). Tal y como hemos detallado anteriormente y se resume en Cerovic *et al.* (1999) y Buschmann y Lichtenthaler (1998), los compuestos fenólicos son los principales emisores de BGF. Se dispone de mayor cantidad de información sobre el efecto de distintos patógenos en los parámetros de fluorescencia roja, pero la información relativa a los cambios en BGF es más escasa (Lenk *et al.*, 2007). Sin embargo, a continuación mencionaremos distintos casos de interacción planta-patógeno en los que se han detectado incrementos en BGF, lo que puede correlacionarse con una activación del metabolismo secundario de la planta hospedadora.

Lüdeker *et al.* (1996) muestran la utilidad de la MCF inducida por láser para la teledetección de enfermedades fúngicas como mildiu y roya en manzanos (*Malus sylvestris*), cebada (*Hordeum vulgare*), pepino (*Cucumis sativa*) y trigo (*Triticum aestivum*), proponiendo la utilización del cociente F440/730 para un diagnóstico temprano. Buschmann y Lichtenthaler (1998) detectaron mediante MCFI las lesiones ocasionadas por moscas blancas en hojas de tabaco, así como los daños ocasionados por ácaros. Estos succionan los cloroplastos del envés de las hojas y provocan un descenso de Chl-F que se visualiza en los cocientes F440/690 y F440/740. En hojas de col china infectadas con el virus del mosaico amarillo del nabo Szigeti *et al.* (2002) registraron aumentos de los cocientes F440/690, F440/740 y F690/740. Más recientemente, Chaerle *et al.* (2007b) mostraron un aumento de la BGF durante la HR provocada por TMV (*xxx mosaic virus*) en plantas de tabaco resistentes y lo correlacionaron con un aumento en la producción de escopoletina. Scharte *et al.* (2005) y Swarbrick *et al.* (2006) observaron mediante un microscopio de fluorescencia con excitación de láser UV una intensa fluorescencia amarilla en hojas de tabaco infectadas con *Phytophthora nicotianae* (interacción incompatible) y en las de plantas de cebada resistentes al hongo *Blumeria graminis*, respectivamente, tras la eliminación de la Chl. Esta autofluorescencia fue atribuida a compuestos fenólicos y/o deposición de calosa durante la respuesta de defensa y muerte celular de la planta inoculada.

Pineda *et al.* (2008) mostraron el aumento de BGF con un patrón foliar característico en hojas asintomáticas de plantas de *Nicotiana benthamiana* infectadas con el virus del moteado suave del pimiento (PMMoV), siendo el ácido clorogénico uno de los principales contribuyentes a esta emisión. Las imágenes de los cocientes entre Chl-FI y BGF (F440/690 y F440/740) fueron excelentes indicadores de la infección (Figura 15). Previamente, Sajjani (2005) había detectado que la BGF se incrementaba de forma más acentuada en el envés foliar en las hojas infectadas con PMMoV, registrando además una acumulación de compuestos que absorben en el UV, principalmente en el haz, antes incluso de la aparición de síntomas.

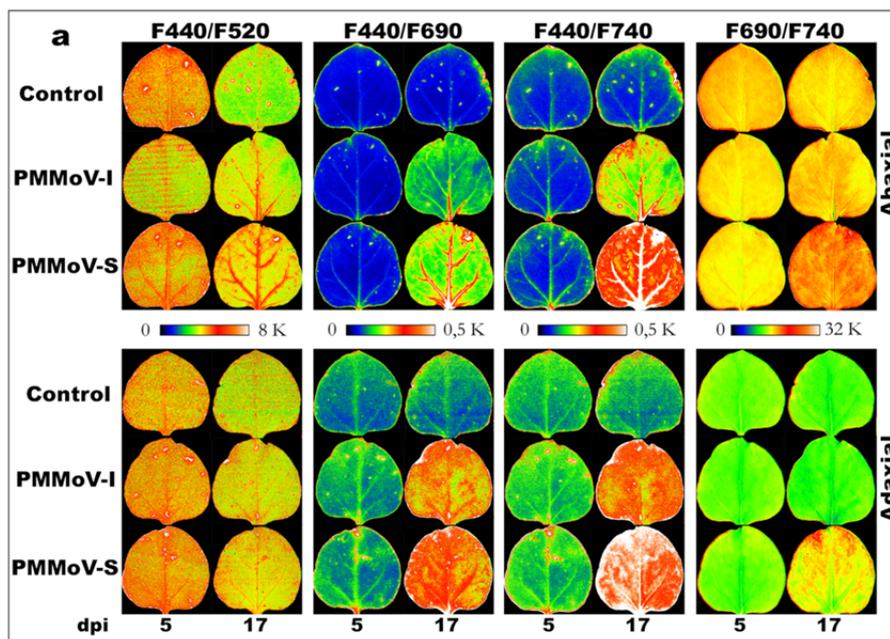


Figura 15. Imágenes de F440/520, F440/690, F440/740 and F690/740 de hojas asintomáticas de *Nicotiana benthamiana* control e infectadas con el PMMoV. Se muestran los patrones de las caras abaxial y adaxial de la hoja a 5 y 17 dpi. La escala de falsos colores aplicada se muestra para cada panel (tomado de Pineda *et al.*, 2008).

Pereira *et al.* (2011) proponen la técnica de MCFI con excitación de láser UV, en especial las imágenes de fluorescencia verde, para la detección presintomática del enverdecimiento de los cítricos (*citrus greening*), causado por la bacteria *Candidatus Liberibacter spp.* Usando espectroscopía de fluorescencia inducida por láser también se ha podido diferenciar una deficiencia de N de una infección con *Puccinia triticina* en trigo (Bürling *et al.*, 2011). Asimismo, se ha utilizado esta técnica para la detección presintomática de oidio y para la diferenciación de variedades resistentes y sensibles en el mismo cereal (Burling *et al.*, 2012). Benediktyová y Nedbal (2009) combinan MCFI inducida por UV con el uso de microscopía de excitación de dos fotones para realizar el seguimiento de infecciones con *Pseudomonas syringae* (marcada con GFP) en *Arabidopsis*, obteniendo imágenes en 3D (Figura 16).

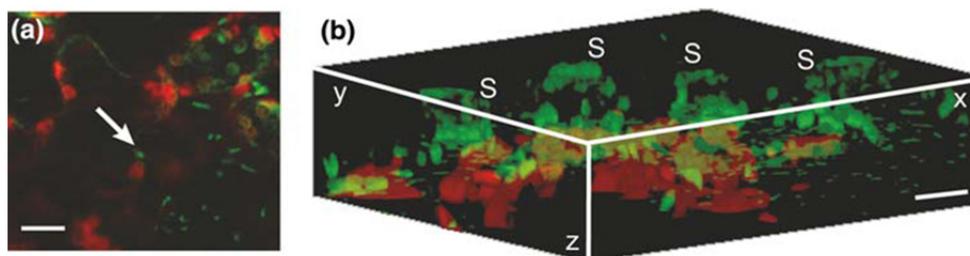


Figura 16. Distribución en una única sección óptica (a) y tridimensional (b) de *P. syringae* obtenida mediante microscopía de excitación de dos fotones en células del mesófilo de una hoja de *Arabidopsis* tras 24 h de infección. La fluorescencia verde es emitida por la bacteria marcada con GFP y la roja proviene de los cloroplastos. La imagen 3D se reconstruye a partir de múltiples secciones ópticas usando el software ImageJ (Benediktyová y Nedbal, 2009).

## OBJETIVOS



El objetivo general de esta tesis doctoral es descifrar si los transportadores de tipo *multidrug resistance* (MDR) de bacterias fitopatógenas pertenecientes al complejo *P. syringae* están implicados en el proceso de infección de plantas, bien porque intervienen en la respuesta a compuestos antimicrobianos producidos por las plantas, o bien porque exportan determinantes de virulencia a los tejidos vegetales. Al mismo tiempo, se ha analizado la forma en que las plantas detectan y responden a una infección bacteriana, prestando especial atención a los flavonoides, unos metabolitos secundarios que juegan un papel muy importante en la resistencia de las plantas frente a patógenos.

Concretamente, se han estudiado 3 transportadores MDR:

1. MexAB-OprM de *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola 1448A, comparándolo con el recientemente estudiado MexAB-OprM de *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000.
2. TpsABC de *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000.
3. MatE de *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000.

Caracterizándolos mediante técnicas moleculares con objeto de determinar su papel fisiológico y su implicación en los procesos infectivos y analizando mediante fluorescencia multicolor la respuesta de la planta frente a la enfermedad desarrollada por la bacteria.



## MATERIALES Y MÉTODOS



## 1. Cepas bacterianas

Las cepas objeto de estudio en este trabajo han sido *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 1448A (Pph 1448A, Taylor *et al.*, 1996; Joardar *et al.*, 2005) y *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (Pto DC3000, Cuppels, 1986). Otras cepas bacterianas utilizadas fueron los mutantes generados en los genes de interés y algunas cepas de *E. coli* que se emplearon como hospedadoras de plásmidos. La lista de estas cepas y sus características más relevantes se muestran en la Tabla 4.

**Tabla 4. Cepas bacterianas**

Cepa	Característica	Referencia
<b><i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i></b>		
1448 <sup>a</sup>	Tipo silvestre, raza 6	Taylor <i>et al.</i> , 1996
1448AΔmex	ΔmexAB- <i>oprM</i>	Stoitsova <i>et al.</i> , 2008
PphA	Km <sup>R</sup> , <i>mexA</i> ::ΩKm	Este trabajo
PphR	Km <sup>R</sup> , <i>pmeR</i> ::ΩKm	Este trabajo
<b><i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i></b>		
DC3000	Rif <sup>R</sup> , cepa parental	Cuppels, 1986
DC3000A	Km <sup>R</sup> , <i>mexA</i> ::ΩKm	Vargas <i>et al.</i> , 2011
DC3000R	Km <sup>R</sup> , <i>pmeR</i> ::ΩKm	Vargas <i>et al.</i> , 2011
Δ <i>hrpL</i>	Km <sup>R</sup> , <i>hrpL</i> ::ΩKm	Aragón <i>et al.</i> , no publicado
Δ <i>iaaL</i>	Km <sup>R</sup> , <i>iaaL</i> ::ΩKm	Aragón <i>et al.</i> , no publicado
Δ <i>matE</i>	Km <sup>R</sup> , <i>matE</i> ::ΩKm	Aragón <i>et al.</i> , no publicado
5191:Tn5	Km <sup>R</sup> , PSPTO_5191::Tn5	Prada <i>et al.</i> , no publicado
Δ5191	Km <sup>R</sup> , PSPTO_5191::ΩKm	Este trabajo
Δ5194	Km <sup>R</sup> , PSPTO_5194::ΩKm	Este trabajo
<b><i>Escherichia coli</i></b>		
DH5α	Nal <sup>R</sup> , <i>recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi-1 ΔlacU169 (Φ80lacZΔM15)</i>	Hanahan, 1983
JM109	Nal <sup>R</sup> , <i>recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi Δ(lac-proAB) F' (traD36 proAB+ lacI<sup>q</sup> lacZΔM15)</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985

## 2. Plásmidos y oligonucleótidos

### 2.1. Plásmidos utilizados en este trabajo

Las principales características de los plásmidos utilizados en este trabajo se recogen en la Tabla 5.

### 2.2. Plásmidos construidos en este trabajo

Las principales características de los plásmidos construidos en este trabajo se recogen en la Tabla 6.

**Tabla 5. Plásmidos y vectores utilizados.**

Plásmido	Características	Referencia
pGEM-T	Ap <sup>R</sup> , vector de clonación para ligar productos de PCR (A-T)	Promega
pHP45ΩKm	Ap <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , plásmido portador del interposón ΩKm de 2.25 kb	Fellay <i>et al.</i> , 1987
pJB3Tc19	Tc <sup>R</sup> Ap <sup>R</sup> , vector de expresión de amplio espectro de huésped	Blatny <i>et al.</i> , 1997
pJBpleD*	Tc <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup> , derivado de pJB3Tc19 que contiene un fragmento EcoRI-XbaI de 1,4 kb con el gen <i>pleD</i> * de <i>C. crescentus</i> , bajo el promotor <i>lac</i>	Pérez-Mendoza <i>et al.</i> , 2014

Tabla 6. Plásmidos construidos en este trabajo.

Plásmido	Características	Referencia
pPGA-Pph	Ap <sup>R</sup> , pGEM-T con un fragmento de 2.630 pb que incluye el gen <i>mexA</i> de Pph 1448A al que se le ha introducido un sitio <i>EcoRI</i>	Este trabajo
pPGA-Pph::ΩKm	Ap <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> , pGEM-T con el gen <i>mexA</i> interrumpido con el interposón ΩKm en el sitio <i>EcoRI</i>	Este trabajo
pPGR-Pph	Ap <sup>R</sup> , pGEM-T con un fragmento de 2.883 pb que contiene el gen <i>pmeR</i> de Pph amplificado por PCR	Este trabajo
pPGR-Pph::ΩKm	Ap <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> , pGEM-T con <i>pmeR</i> interrumpido con el interposón ΩKm( <i>Eco47III</i> ) en el sitio <i>SmaI</i>	Este trabajo
pPG5191	Ap <sup>R</sup> , pGEM-T con un fragmento de 1.229 pb que contiene el gen PSPTO_5191 de Pto DC3000 deletado y con un sitio <i>EcoRI</i> a 61 pb de su ATG	Este trabajo
pPG5191::ΩKm	Ap <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> , pPG5191 con el interposón ΩKm insertado en el sitio <i>EcoRI</i>	Este trabajo
pPG5194	Ap <sup>R</sup> , pGEM-T con un fragmento de 1.414 pb que contiene el gen PSPTO_5194 de Pto DC3000 deletado y con un sitio <i>EcoRI</i> a 39 pb de su ATG	Este trabajo
pPG5194::ΩKm	Ap <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> , pPG5194 con el interposón ΩKm insertado en el sitio <i>EcoRI</i>	Este trabajo

### 2.2.1. pPGA-Pph y pPGA-Pph::ΩKm

pPGA-Pph::ΩKm es un plásmido que porta el gen *mexA* interrumpido con el interposón ΩKm que se utilizó para mutar el gen silvestre mediante reemplazamiento génico en la cepa Pph 1448A. Con el fin de insertar un sitio de corte para *EcoRI* en mitad del gen *mexA* se llevaron a cabo varias reacciones de PCR solapantes. Por una parte, se amplificó una región de 1.130 pb con los cebadores 3F1rR-Pph (5'-TCAGGAAGCCTTGCTG-3') y flrA\_Pph-EcoRI<sub>f</sub> (5'-CAACGGCAgaATTCTCAAACG-3'), que incluye la primera mitad del gen *mexA*, y por otra, se amplificó una región de 1.525 pb que incluye la segunda mitad del gen utilizando los cebadores flrA\_Pph-EcoRI<sub>r</sub> (5'-CGTTTGAGAATtcTGCCGTTG-3') y TtgB-XbaI\_entomophila (5'-NNNNtctagacagatagcgcgc-3'). Los dos productos de amplificación se purificaron y utilizaron como ADN molde para una nueva PCR realizada con el par de cebadores externos (3F1rR-Pph y TtgB-XbaI\_entomophila). Así se obtuvo una región de 2.634 pb que se clonó en el vector pGEM-T dando lugar al plásmido pPGA-Pph, que contiene el gen *mexA* con un sitio de corte para *EcoRI* aproximadamente 217 pb después de su ATG. Tras digerir el plásmido pPGA-Pph con *EcoRI*, se ligó a un fragmento *EcoRI* de 2.250 pb que portaba el interposón ΩKm proveniente del plásmido pHP45ΩKm. El plásmido resultante pPGA-Pph::ΩKm, vector suicida en *Pseudomonas*, porta resistencia a ampicilina y kanamicina y se utilizó para el reemplazamiento génico.

### 2.2.2. pPGR-Pph y pPGR-Pph::ΩKm

pPGR-Pph::ΩKm es un plásmido que porta el gen *pmeR* interrumpido con el interposón ΩKm que se utilizó para mutar el gen silvestre mediante reemplazamiento génico en la cepa Pph 1448A. El gen *pmeR* se amplificó por PCR a partir de ADN cromosómico de Pph 1448A con los cebadores R\_Pph\_F (5'-CGACGCATACGCTTGAACAGC-3') y R\_Pph\_3.2 (5'-GGTTGATCGGCAGGCTGG-3') y el fragmento resultante de 2.883 pb se clonó en el vector pGEM-T, generando el plásmido pPGR-Pph. El plásmido se

digirió con *Sma*I, cuyo sitio de reconocimiento está situado aproximadamente 481 pb después del ATG de *pmeR*, y se ligó al interposón  $\Omega$ Km (con sitios *Eco*47III añadidos en sus extremos), generando el plásmido pPGR-Pph:: $\Omega$ Km. El plásmido pPGR-Pph:: $\Omega$ Km no se replica en *Pseudomonas*, confiere resistencia a ampicilina y kanamicina, y se utilizó para el reemplazamiento génico tras su electroporación.

### 2.2.3. pPG5191 y pPG5191:: $\Omega$ Km

pPG5191:: $\Omega$ Km es un plásmido que porta el gen PSPTO\_5191, que codifica un transportador de tipo RND, interrumpido con el interposón  $\Omega$ Km que se utilizó para reemplazar el gen silvestre en la cepa Pto DC3000. Con el fin de insertar un sitio de corte para *Eco*RI en mitad del marco abierto de lectura de PSPTO\_5191, se llevaron a cabo varias reacciones de PCR solapantes. Por una parte, se amplificó una región de 647 pb con los cebadores 1-5191 (5'-CAGCGAACTACACAGCG-3') y A-mut5191 (5'-GAATTCGACTCACTATAGGGCGA CTGATGCTTGATGGC-3'), que incluye la primera mitad del gen 5191, y por otra, se amplificó una región de 602 pb que incluye la segunda mitad del gen utilizando los cebadores B-mut5191 (5'-CCCTATAGTGAGTCGAATTC~~CCCC~~CACGCTCCGCTTTTG-3') y 2-5191 (5'-GCAGAACTTCCTTGAGC-3'). Los dos productos de amplificación se purificaron y utilizaron como ADN molde para una nueva PCR realizada con el par de cebadores externos (1-5191 y 2-5191). Así se obtuvo un fragmento de 1.229 pb, que se clonó en el vector pGEM-T dando lugar al plásmido pPG5191, que contiene un fragmento del cromosoma de Pto DC3000 en el que PSPTO\_5191 ha sido deletado y posee un sitio de corte para *Eco*RI aproximadamente 61 pb después de su primer ATG.

Tras digerir el plásmido pPG5191 con *Eco*RI, se ligó con un fragmento *Eco*RI de 2.263 pb que portaba el interposón  $\Omega$ Km purificado proveniente del plásmido pHP45 $\Omega$ Km. Los clones obtenidos se verificaron por PCR y por restricción con *Eco*RI y *Sal*I. El plásmido resultante, pPG5191 $\Omega$ Km, es suicida en *Pseudomonas*, porta resistencia a ampicilina y kanamicina y se utilizó para el reemplazamiento génico.

### 2.2.4. pPG5194 y pPG5194:: $\Omega$ Km

pPG5194:: $\Omega$ Km es un plásmido que porta el gen PSPTO\_5194, que codifica una proteína hipotética, interrumpido con el interposón  $\Omega$ Km que se utilizó para reemplazar el gen silvestre en la cepa Pto DC3000. Con el fin de insertar un sitio de corte para *Eco*RI en mitad del gen 5194 se llevaron a cabo varias reacciones de PCR solapantes. Por una parte, se amplificó una región de 578 pb con los cebadores 1-5194 (5'-GACCTACAAGGCGTTCTACG-3') y A-mut5194 (5'-GAATTCGACTCACTATAGGGCGGGTT GCGATAGATGAAC-3'), y por otra, se amplificó una región de 856 pb que incluye la segunda mitad del gen utilizando los cebadores B2-mut5194 (5'-CCCTATAGTGAGTCGAATTC~~CCCT~~TAGACGATGCTTC-3') y new 2-5194 (5'-CCTGAACCACCTGCCGACC-3'). Los dos productos de amplificación, se purificaron y utilizaron como ADN molde para una nueva PCR realizada con el par de cebadores externos (1-5194 y new2-5194). Así se obtuvo una región de 1.414 pb, que se clonó en el vector pGEM-T dando lugar al plásmido pPG5194, que contiene un fragmento del cromosoma de Pto DC3000 en el que PSPTO\_5191 ha sido deletado y posee un sitio de corte para *Eco*RI aproximadamente 39 pb después de su primer ATG.

Tras la digestión del plásmido pPG5194 con *Eco*RI, éste se ligó con un fragmento *Eco*RI de 2.263 pb que portaba el interposón  $\Omega$ Km purificado proveniente del plásmido pHP45- $\Omega$ Km. Los clones obtenidos se

verificaron por PCR y por restricción con EcoRI y Sall. El plásmido resultante, pPG5194ΩKm, es suicida en *Pseudomonas*, porta resistencia a ampicilina y kanamicina y se utilizó para el reemplazamiento génico.

### 2.3. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo

Los oligonucleótidos empleados en este trabajo han sido sintetizados por Sigma, la secuencia y características de los oligonucleótidos utilizados para PCR se especifican en la Tabla 7.

Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo para la amplificación de productos por PCR

Cebadores	Secuencia (5' → 3')	Características
3'F1rR-Pph f1rA_Pph-EcoRI	T̂CAGGAAGCCTTGCTG CAACGGCAgaATTCTCAAACG	Amplifican una región de 1.130 pb que incluye la primera mitad del gen <i>mexA</i> , generando un sitio de corte para <i>EcoRI</i>
f1rA_Pph-EcoRI TtgB-XbaI_entomophila	Cgtttgagaattctgccgttg NNNNtctagacagatgcatggc	Amplifican una región de 1.525 pb que incluye la segunda mitad del gen <i>mexA</i> , generando un sitio de corte para <i>EcoRI</i>
TtgA-BamHI_syringae TtgB-XbaI_entomophila	GGCTCCTGCCCGAGGATCcTC NNNNtctagacagatgcatggc	Cebadores utilizados para verificar por PCR el mutante <i>mexA</i> . Amplifican una región de 1.752 pb en la cepa silvestre de Pph
R_Pph_F R_Pph_3.2	CGACGCATACGCTTGAACAGC GGTTGATCGGCAGGCTGG	Amplifican una región de 2.883 pb que contiene <i>pmeR</i>
1-5191 A-mut5191	CAGCGAACTACACAGCG <u>GAATTC</u> GACTCACTATAGGGCGACTGATGCTTGATGGC	Amplifican una región de 647 pb que incluye la primera mitad del gen PSPTO_5191
B-mut5191 2-5191	CCCTATAGTGAGTC <u>GAATTC</u> CCCCACGCTCCGCTTTTG GCAGAACTTCCTTGAGC	Amplifican una región de 602 pb que incluye la segunda mitad del gen PSPTO_5191
1-5194 A-mut5194	GACCTACAAGGCGTTCTACG <u>GAATTC</u> GACTCACTATAGGGCGGGTTGCGATAGATGAAC	Amplifican una región de 578 pb que incluye la primera mitad del gen PSPTO_5194
B2-mut5194 new 2-5194	CCCTATAGTGAGTC <u>GAATTC</u> CCCTTAGACGATGCTTC CCTGAACCACCTGCCCGACC	Amplifican una región de 856 pb que incluye la segunda mitad del gen PSPTO_5194
U21 (universal) R21 (reverso)	GTA AACGACGGCCAGT CAGGAAACAGCTATGAC	Cebadores utilizados para verificar y secuenciar los fragmentos clonados en los vectores pGEM-T

### 3. Medios y condiciones de cultivo

#### 3.1. Medios

Los medios sólidos y líquidos, así como otras soluciones que se utilizaron durante el desarrollo de este estudio se esterilizaron normalmente por calor húmedo en autoclave a 120°C y una atmósfera de presión durante 20 min. Algunas soluciones se esterilizaron por filtración con filtros de nitrocelulosa estériles con poro de 0,22 µm de diámetro.

##### 3.1.1. Medios ricos

El cultivo habitual de las distintas cepas de Pto y de *E. coli*, se realizó en el medio Luria-Bertani (LB) (Sambrook *et al.*, 1989), mientras que las cepas de Pph 1448A se cultivaron en medio rico King's B (King *et al.*, 1954). Para la preparación de medios sólidos en placas de Petri, se añadió bacto-agar a una concentración final del 1,5% (p/v).

Los ensayos de motilidad bacteriana tipo swimming se llevaron a cabo en medio LB semisólido y los ensayos de movilidad tipo swarming en medio PG-Agar (Matilla *et al.*, 2007). La composición de los medios de cultivo utilizados en este trabajo se detalla en la Tabla 8.

##### 3.1.2. Medios mínimos

En algunos ensayos se utilizó un medio inductor del sistema de secreción tipo 3 denominado MMF que simula la composición del apoplasto vegetal (Huynh *et al.*, 1989) y un medio mínimo para *syringae* (MMS) (Preiter *et al.*, 2005) cuya composición se detalla en la tabla 8. Las soluciones madre empleadas para estos medios se prepararon por separado y se esterilizaron en el autoclave.

#### 3.2. Condiciones de cultivo

Las cepas de Pph 1448A y las de Pto DC3000 se cultivaron en estufas a 28°C para su crecimiento óptimo y las cepas de *E. coli* a 37°C. Los cultivos líquidos se incubaron en agitación constante a 200 rpm en un incubador orbital Kuhner ISF-4-W (Adolf Kühner AG). Para los ensayos de producción de exopolisacáridos y formación de biopelículas, las cepas de Pto se incubaron a 20°C.

#### 3.3. Antibióticos

Los antibióticos se prepararon en soluciones mil veces concentradas en agua destilada (H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>), excepto el cloramfenicol, que se preparó en etanol, y la rifampicina y tetraciclina, que se disolvieron en metanol. Las soluciones preparadas en agua se filtraron para esterilizarlas y se almacenaron en pequeñas alícuotas a -20°C. Los antibióticos se usaron a las concentraciones finales (en µg/ml) indicadas en la Tabla 9.

#### 3.4. Otras soluciones

Cuando fue necesario, se añadieron a los medios de cultivo distintas soluciones:

- 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (X-gal): se preparó una solución stock a 20 mg/ml en dimetilformamida y se utilizó en placa a una concentración final de 20 µg/ml.
- Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG): se preparó una solución stock a 100 mg/ml en agua, se filtró y se utilizó en placa a una concentración final de 100 µg/ml.

**Tabla 8. Composición de medios utilizados en este estudio**

Medio	Composición	
<b>Medios ricos</b>		
LB	Bactotripton	10g
	Extracto de levadura	5 g
	NaCl	5 g
	Agua destilada	hasta 1 l
	Ajustar a pH 7,0	
LB sólido	Medio LB	
	Agar bacteriológico	15 g/l
LB semisólido	Medio LB	
	Agar bacteriológico	3 g/l
Medio PG-Agar	Proteosa-peptona No.3 (Difco 211693)	5 g
	Glucosa	2 g
	Bacto-agar (Difco 214010)	5 g
	Agua destilada	hasta 1 l
<b>Medios mínimos</b>		
MMF	Tampón fosfato potásico, pH 5,7	50 mM
	Fructosa	10 mM
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	7,6 mM
	MgCl <sub>2</sub>	1,7 mM
	NaCl	1,7 mM
MMR	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.31 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.2 mM
	MgSO <sub>4</sub>	0.61 mM
	CaCl <sub>2</sub>	0.34 mM
	FeCl <sub>3</sub>	0.022 mM
	NaCl	0.85 mM
	Glutamato sódico	7 mM
	Manitol	55 mM
MMS	Tampón fosfato potásico, pH 7,0	13 mM
	Citrato de sodio	1,7 mM
	NaCl	17 mM
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	30,3 mM
	MgSO <sub>4</sub>	2,8 mM
	Sacarosa	10 mM

**Tabla 9. Antibióticos utilizados en este estudio**

Antibiótico	Cepas de <i>E. coli</i>	Cepas de Pto/Pph
Ácido nalidíxico (Nal)	10	-
Ampicilina (Ap)	100	250
Cloramfenicol (Cm)	30	30
Espectinomina (Sp)	-	30
Estreptomina (Sm)	-	30
Gentamicina (Gm)	10	10
Kanamicina (Km)	25	50
Rifampicina (Rif)	-	10
Tetraciclina (Tc)	10	10

### 3.5. Conservación de los cultivos bacterianos

La conservación prolongada de los cultivos bacterianos se realizó por congelación. Este método se basa en la paralización del metabolismo celular al disminuir la disponibilidad de agua. Para que la viabilidad celular se mantenga durante el periodo de conservación es necesario adicionar un crioprotector que evita el daño que los cristales de agua ocasionarían en las paredes celulares. En nuestro caso se escogió glicerol, que se utilizó a una concentración de 30% (v/v). Así, a 450 µl de glicerol 60% (v/v) estéril dispuesto en criotubos, se le añadieron 450 µl de cultivo bacteriano crecido hasta fase exponencial tardía. Los viales se congelaron rápidamente y se almacenaron a una temperatura de -80°C.

### 3.6. Transformación bacteriana

#### 3.6.1. Preparación de células competentes de *E. coli*

La preparación de células competentes de *E. coli* para su posterior transformación por choque térmico se realizó con el método de Nishimura *et al.* (1990). A partir de un cultivo fresco en caja de Petri, la cepa correspondiente de *E. coli* se inoculó en 3 ml de LB con los antibióticos adecuados y se incubó a 37°C durante 12-14 h en agitación. Este cultivo se diluyó 100 veces en 50 ml de solución A y se incubó nuevamente a 37°C con agitación hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento ( $DO_{660} = 0,4 - 0,6$ ). A partir de ese momento las células se mantuvieron siempre en frío para obtener la mayor eficiencia de transformación. Las células se mantuvieron durante 10 min en hielo y se recogieron por centrifugación a 10.000 g durante 5 min a 4°C. El sedimento celular se resuspendió cuidadosamente en 0,5 ml de solución A fría (4°C) a la que se añadieron 2,5 ml de solución B fría (4°C). Finalmente, la suspensión bacteriana se repartió en alícuotas de 125 µl que se conservaron a -80°C hasta el momento de su uso.

Solución A: LB suplementado con  $MgSO_4$  10 mM y glucosa 0,2% (p/v).

Solución B: LB suplementado con glicerol 36% (v/v); polietilenglicol-8000, 12% (p/v) y  $MgSO_4$  12 mM.

Ambas soluciones se conservaron a 4°C tras esterilizarlas por filtración.

#### 3.6.2. Transformación de células competentes de *E. coli*

La transformación de células competentes de *E. coli* con ADN plasmídico se realizó utilizando el método descrito por Nishimura *et al.* (1990). Una alícuota de la suspensión celular almacenada a -80°C se descongeló en hielo, se le añadieron entre 10 y 50 ng de ADN plasmídico mezclando suavemente mediante agitación manual y se incubó en hielo durante 30 min. A continuación, se aplicó un choque térmico a 42°C durante 1 min y, a continuación, se incubó en hielo durante 2 min. Posteriormente, se añadió 1 ml de LB y las células se incubaron durante al menos 1 h a 37°C con agitación para permitir la expresión de el(los) gen(es) de resistencia a antibiótico(s) codificado(s) en el plásmido introducido. Las células que habían adquirido el plásmido, y por tanto la resistencia al(los) antibiótico(s), se seleccionaron sembrando entre 100 y 200 µl de la suspensión celular en placas de LB sólido suplementado con el(los) antibiótico(s) adecuado(s). Las placas se incubaron a 37°C durante 16-24 h.

En los casos en que los vectores permitían selección blancas/azules, se añadió también a las placas de LB 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (X-Gal, 20 mg/ml en formamida) a una concentración final de 20 µg/ml, y 1-isopropil-β-D-1-galactopiranosido (IPTG, 100 mM en agua desionizada estéril) a una concentración final de 100 µM.

### 3.6.3. Preparación de células electrocompetentes

La electroporación es el método más utilizado para transferir ADN plasmídico a las cepas de *Pseudomonas*. Para llevarlo a cabo, es necesario que las células sean electrocompetentes y se precisa la eliminación de las sales del medio de cultivo, de manera que no interfieran con la electroporación.

La preparación de células competentes de Pto DC3000 y Pph 1448A para electroporación se realizó mediante el método descrito por Choi *et al.* (2006). A partir de un cultivo de 12-16 h crecido a 28°C en LB líquido suplementado con los antibióticos correspondientes, se recuperaron las células de 4 ml de cultivo por centrifugación a máxima velocidad durante 2 min. El sedimento celular, se lavó dos veces con 1 volumen de sacarosa 300 mM estéril a temperatura ambiente. Tras el último lavado, las células se resuspendieron en un volumen de 100 µl de sacarosa 300 mM y se mantuvieron en hielo hasta el momento del pulso eléctrico.

### 3.6.4. Electrotransformación

A la suspensión celular se le añadió el ADN plasmídico libre de sales (entre 10 y 50 ng de ADN para plásmidos replicativos y entre 300-500 ng de ADN para plásmidos suicidas), se mezcló suavemente y la mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación de 2 mm de anchura previamente enfriada, donde recibieron un pulso eléctrico de 2,5 kV en un electroporador modelo 2510 (Eppendorf). Tras el pulso, las células se recuperaron inmediatamente añadiendo 1 ml de LB a temperatura ambiente y se incubaron durante 2 h a 28°C con agitación. Finalmente, se sembraron entre 100 y 200 µl de la suspensión celular en medio selectivo para los transformantes.

### 3.6.5. Selección de intercambio alélico y cointegración

Los mutantes de pérdida de función de Pto DC3000 y Pph 1448A utilizados en este trabajo se obtuvieron mediante la técnica de reemplazamiento génico, utilizando los plásmidos pPGA-Pph::ΩKm, pPGR-Pph::ΩKm, pPG5191::ΩKm y pPG5194::ΩKm, en los que se clonó el gen a mutar interrumpido por el interposón ΩKm, de manera que hubiese suficiente secuencia de ADN, al menos 1 kb, a cada lado del interposón de kanamicina para permitir la recombinación homóloga. Los plásmidos derivados de pGEM-T usados para la mutagénesis no se replican en *Pseudomonas*.

Los plásmidos pPGA-Pph::ΩKm, pPGR-Pph::ΩKm, pPG5191::ΩKm y pPG5194::ΩKm, con resistencia a ampicilina y kanamicina, se electroporaron en Pph 1448A o en Pto DC3000. Los transformantes se seleccionaron en placas de LB suplementado con kanamicina. Adicionalmente, se comprobó el crecimiento de las colonias Km<sup>R</sup> en placas de LB suplementadas con ampicilina (250 µg/ml) para determinar si cada transformante era el resultado de un único evento de recombinación (integración plasmídica, Amp<sup>R</sup>) o de un doble evento de recombinación (intercambio alélico, Amp<sup>S</sup>). Los mutantes deficientes en los genes de interés se confirmaron mediante PCR y mediante hibridación de ADN (Southern Blot) utilizando como sonda una secuencia complementaria al gen diana.

## **4. Ensayos *in vivo***

### **4.1. Curvas de crecimiento**

Las cepas a estudiar se cultivaron a partir de un cultivo fresco en placa de Petri en 10 ml de LB suplementado con los antibióticos adecuados a 28°C y con agitación continua durante 10-12 h. Los cultivos se diluyeron a una turbidez a 660 nm ( $DO_{660}$ ) de partida comprendida entre 0,05 y 0,08 en el medio de estudio y se incubaron a 28°C con agitación continua. El incremento de la turbidez se determinó midiendo la  $DO_{660}$  aproximadamente cada 2-3 h, hasta que el cultivo alcanzó la fase estacionaria de crecimiento. Las medidas de turbidez de los cultivos bacterianos se realizaron en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800, utilizando cubetas de plástico de 1 ml.

### **4.2. Ensayos de competencia en medio líquido**

Para medir el grado de competitividad de las cepas mutantes, se inoculó una suspensión bacteriana mezcla en proporción 1:1 de la cepa silvestre y la mutante a estudiar en tubos con medio rico LB. El grado de competitividad se calculó como el porcentaje de cada cepa presente en el cultivo tras 24 h. Para ello, las cepas bacterianas empleadas en la infección (silvestre y mutante  $Km^R$ ) se cultivaron durante 48 h a 25°C en placas de LB y LB  $Km$  (50  $\mu\text{g/ml}$ ), respectivamente. Las células se resuspendieron en 10 mM de  $MgCl_2$ , se lavaron 2 veces con  $MgCl_2$  10 mM, ajustándose la densidad celular una  $DO_{660}=0,1$  (correspondiente a  $10^7$  ufc/ml) en 5 ml de KB. Se llevaron a cabo diluciones seriadas para obtener  $10^6$  ufc/ml y  $10^3$  ufc/ml que se utilizaron para realizar el ensayo a alta y a baja densidad, respectivamente. En todos los casos, los títulos de las suspensiones utilizadas se comprobaron sembrando diluciones seriadas en placas de LB (silvestre) y LB  $Km$  (mutante).

A continuación, se mezclaron las suspensiones celulares del silvestre y el mutante en una proporción 1:1 en un volumen final de 5 ml de KB, que se incubaron durante 24 h a 25°C en agitación. El experimento se hizo por triplicado. Tras incubar con agitación durante 24 h a 25°C, se realizaron diluciones seriadas, que se sembraron en LB suplementado con los correspondientes antibióticos para calcular la proporción relativa entre las cepas.

### **4.3. Ensayos de sensibilidad a compuestos antimicrobianos (MIC)**

Los estudios de sensibilidad a antibióticos y otros agentes antibacterianos se llevaron a cabo de forma rutinaria según el método de determinación de la concentración inhibitoria mínima (MIC, *minimum inhibitory concentration*) (Amsterdam, 1991) en placas de microtítulo de 96 pocillos. Los antibióticos se prepararon concentrados cincuenta veces con respecto a la concentración inicial a ensayar. Las soluciones de antibióticos concentrados se diluyeron cincuenta veces en medio LB y 200  $\mu\text{l}$  de las mismas se depositaron en los pocillos de la primera columna de las placas de cultivo. En el resto de los pocillos de la placa se añadieron 100  $\mu\text{l}$  de medio LB. Con ayuda de una pipeta multicanal, se realizaron diluciones seriadas de los antibióticos, mezclando 100  $\mu\text{l}$  de la solución de antibiótico de la primera columna con los 100  $\mu\text{l}$  de LB de la segunda columna, y así sucesivamente. De esta manera, la concentración de antibiótico de cada columna de pocillos se diluye a la mitad con respecto a la anterior. Después de preparar las placas de cultivo con los antibióticos, se añadieron a cada uno de los pocillos 10  $\mu\text{l}$  de un cultivo de Pto DC3000 (o de los mutantes) en fase de crecimiento exponencial ( $DO \approx 0,8$ ) y diluido 1/100,

de modo que en cada pocillo el título fuera de aproximadamente  $10^6$  ufc/ml. Las placas se incubaron a 28°C durante 24 h y se determinó la concentración mínima de antibiótico capaz de inhibir en un 90% el crecimiento bacteriano analizando la turbidez en los pocillos de la placa de cultivo.

#### **4.4. Ensayos de motilidad bacteriana**

##### **4.4.1. Ensayos de *swimming***

A partir de placas de Pto DC3000, Pph 1448A o mutantes crecidos en LB durante 48 h a 28°C, se recogió biomasa resuspendiendo en  $MgCl_2$  10 mM y se ajustó a una  $DO_{660}$  de 2,0. Alícuotas de 2  $\mu$ l de esta suspensión se inocularon pinchando en el centro de placas de Petri preparadas con 25 ml de LB (0,3% agar) y se dejaron secar en la cabina de flujo laminar durante 5 min. Las placas se incubaron boca arriba a 25°C durante 48 h. Se realizaron tres placas por condición y, al menos, 3 experimentos independientes. El diámetro de halo de dispersión se midió cada 24 h y, en algunos casos, hasta las 72 h.

##### **4.4.2. Ensayos de *swarming***

A partir de placas frescas de Pto DC3000, Pph 1448A o mutantes crecidos en LB durante 48 a 28°C, se recogió biomasa resuspendiendo en  $MgCl_2$  10 mM y se ajustó a una  $DO_{660}$  de 2,0. Alícuotas de 2  $\mu$ l de esta suspensión se colocaron en la superficie de placas de Petri preparadas con 25 ml de PG-agar (0,5%) y se secaron en la cabina de flujo laminar durante 5 min. Las placas se incubaron a 25°C y la motilidad en superficie se observó a las 24 h. Se utilizaron tres placas por condición y se realizaron al menos 3 experimentos independientes.

#### **4.5. Fenotipos provocados por altos niveles de c-di-GMP**

Para generar el incremento artificial en los niveles de c-di-GMP se recurrió a una versión mutada de la diguanilato ciclasa PleD de *C. crescentus* (PleD\*, Paul *et al.*, 2004). Así, se electroporó Pto con un plásmido portador del gen *pleD\** bajo el promotor *lac* (pJB<sup>PleD\*</sup>, Pérez-Mendoza *et al.*, 2014) con el fin de elevar de forma estable los niveles intracelulares de c-di-GMP y con el plásmido vacío (pJB3Tc19) para utilizar esa cepa como control.

Con las cepas recombinantes, Pto (pJB3Tc19), Pto (pJB<sup>PleD\*</sup>) y sus mutantes estudiamos los fenotipos provocados por los altos niveles intracelulares de c-di-GMP, tanto en producción de exopolisacáridos como en formación de biopelículas.

##### **4.5.1. Determinación de la producción de exopolisacáridos con CR**

La producción y acumulación de determinados exopolisacáridos, como la celulosa, se encuentran regulados por los niveles intracelulares de c-di-GMP en Pto (Pérez-Mendoza *et al.*, 2014) y el incremento en su producción modifica el aspecto de las colonias en su forma, tamaño, brillo y mucosidad. El CR permite detectar la producción de componentes extracelulares tales como polisacáridos neutros o básicos, unidades de  $\alpha$ -D-glucopiranosidos y algunas proteínas, gracias a su unión a enlaces glucosídicos  $\beta$ 1-4 y  $\beta$ 1-3 principalmente (Teather y Wood, 1982). El CR se preparó a una concentración de 5 mg/ml en agua y se esterilizó por filtración, añadiéndose al medio sólido a una concentración final de 50  $\mu$ g/ml. Aquellas colonias capaces de unir este colorante se tornan de color rojo intenso.

#### 4.5.2. Formación de biopelículas

A partir de placas frescas de Pto y sus mutantes con los plásmidos pJB3Tc19 y pJBpleD\* crecidas en LB durante 48 h a 28°C, se recogió biomasa resuspendiendo en MgCl<sub>2</sub> 10 mM. En placas multipocillo de poliestireno con 2 ml de MMR con Tc (10 µg/ml) se ajustó el inóculo inicial a una DO<sub>660</sub> de 0,01 y se incubó durante 72 h en estático a 20°C, tras lo cual se observó la formación de biopelículas en la interfase líquido-aire en las cepas portadoras de *pleD\**. A continuación, 8 µl del cultivo se dispusieron sobre un portaobjetos, se añadieron 4 µl de KOH 10% y 4 µl de solución de CF-W (Calcofluor White Stain, 18909, Fluka) y a continuación se visualizaron bajo el microscopio de fluorescencia excitando con luz UV.

## 5. Técnicas de manipulación de ADN

### 5.1. Aislamiento de ADN

#### 5.1.1. Aislamiento de ADN total

##### 5.1.1.1. Extracción de ADN total mediante kit comercial

La extracción de ADN genómico de cepas de Pto DC3000 y Pph 1448A se realizó a partir de 3 ml de cultivos celulares incubados a 28°C durante 14-16 h, y usando el kit de purificación de ADN Wizard Genomic (Promega Corp.) siguiendo las instrucciones del fabricante y eluyendo en agua milliQ estéril.

##### 5.1.1.2. Lisados de colonia

Es una estrategia muy rápida para obtener ADN de *P. syringae* con una calidad suficiente para su amplificación por PCR. Para ello se resuspendió una colonia picada de placa en condiciones de esterilidad en 0,1 ml de agua desionizada estéril y se incubó a 100°C durante 2 min. Las células se sedimentaron por centrifugación a 15.000 g durante 2 min y el sobrenadante resultante se utilizó en la PCR.

#### 5.1.2. Extracción de ADN plasmídico

Para la obtención de ADN de alta pureza, necesario en reacciones de secuenciación y/o clonación, se utilizó el sistema comercial *GenElute Plasmid Miniprep kit* (Sigma) siguiendo las instrucciones del fabricante y a partir de 3-5 ml de un cultivo en medio LB de la cepa portadora con los antibióticos necesarios incubado a temperatura óptima y en agitación durante 14-16 h.

### 5.2. Determinación de la concentración de ADN

Se emplearon dos métodos para determinar la concentración de una solución de ADN. En primer lugar, utilizando el Nanodrop ND-1000 (Bio-Rad), un espectrofotómetro UV-visible que permite cuantificar rápidamente ADN, ARN, ácidos nucleicos marcados y proteínas en un limitado volumen de muestra (1-2 µl). Como segunda opción, se ha empleado el método descrito por Sambrook y colaboradores (1989) consistente en la comparación de fluorescencia en gel de agarosa bajo luz UV frente a marcadores de ADN de concentración conocida.

### 5.3. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción

La digestión de ADN con enzimas de restricción se llevó a cabo en las condiciones óptimas para cada enzima siguiendo las indicaciones, en cuanto a temperatura y tampón, del proveedor (Roche y New England Biolabs Inc). Las digestiones con más de una enzima de restricción se realizaron simultáneamente cuando las enzimas requerían el mismo tampón y temperatura; en caso contrario, se digirió primero con la enzima que requería el tampón de menor fuerza iónica, adicionando posteriormente el tampón y la enzima para la segunda digestión. Cuando fue necesario la enzima de restricción se inactivó por calor o por purificación del ADN tras la electroforesis en gel de agarosa.

### 5.4. Reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasa termorresistente (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) consiste en la amplificación de un material de partida en ciclos sucesivos gracias al uso de una pareja de cebadores y a la enzima ADN polimerasa termoestable (Taq polimerasa). Este método se empleó para la amplificación de fragmentos de ADN del cromosoma de Pto DC3000 y Pph 1448A o de plásmidos portadores de genes o regiones de interés, de fragmentos a clonar añadiendo sitios de corte en los extremos para enzimas de restricción, para el análisis rutinario de colonias obtenidas tras la transformación de ligaciones con el fin de detectar de forma rápida el ADN insertado, y para la obtención de sondas marcadas con digoxigenina. La amplificación en cadena de la polimerasa consiste de 3 pasos fundamentales: desnaturalización, anillamiento y extensión.

Las condiciones estándar de la reacción de amplificación fueron las siguientes: un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C durante 3 min; 30 ciclos de tres pasos cada uno: desnaturalización (94°C, 20 segundos), anillamiento del cebador (52-60°C, 20 segundos) y extensión (72°C, 1 min/kb); finalizando con un ciclo de extensión (72°C, 10 min). La temperatura de anillamiento se ajustó en función de los cebadores utilizados.

Según la finalidad, se utilizaron diferentes ADN polimerasas: High Fidelity (Roche) o AccuPrime Taq ADN polimerasa (Invitrogen), si era necesaria una baja tasa de errores en el producto final; mientras que para comprobaciones de rutina se usó Taq ADN-polimerasa de Roche.

En las comprobaciones de rutina, la reacción de amplificación contenía: tampón de reacción (Tris-HCl 10 mM pH 8,3; KCl 50 mM; MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM), dNTPs 0,1 mM, 0,2 µM de cada cebador, 10-50 ng de ADN molde y 0,5 unidades de Taq ADN-polimerasa (Roche) en un volumen final de 25 µl. Para el proceso se utilizó un termociclador Techne® TC-5000 (Bibby Scientific).

#### 5.4.1. PCR de colonias

Es una estrategia rápida para la identificación de un plásmido o colonia recombinante de entre un conjunto de candidatos potenciales a partir de las colonias en placa. Con *E. coli* se reparten los 15-20 µl de la mezcla de reacción de PCR y, en lugar de poner el ADN molde, se pica directamente una colonia de la placa en esterilidad usando un palillo, agitando dentro de la mezcla y sometiendo a continuación a un programa de PCR estándar. Con Pto o Pph se utilizaron 2 µl de lisado de colonia (5.1.1.2) como molde para la PCR.

## 5.5. Clonaje de fragmentos

En este apartado se incluyen distintos protocolos utilizados habitualmente para el clonaje de insertos de interés en vectores.

### 5.5.1. Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa

El aislamiento de fragmentos de restricción y de productos de amplificación obtenidos mediante PCR, separados por electroforesis horizontal en gel de agarosa se realizó con el sistema comercial *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante y tras teñir el gel por inmersión en una solución de GelRed (Biotium, 100 U/L) o en una solución de cristal violeta mediante el sistema comercial S.N.A.P™ UV-Free Gel Purification Kit (Invitrogen, ref. K2000-25).

### 5.5.2. Ligación de fragmentos de restricción en vectores de clonación

La unión covalente de dos moléculas de ADN lineal se lleva a cabo utilizando la enzima T4 ADN ligasa (Roche). La proporción molar más habitual vector:inserto suele ser 1:3, aunque puede variar dependiendo del tamaño de los fragmentos a clonar. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 10-15  $\mu$ l y a 14-16°C durante toda la noche.

### 5.5.3. Secuenciación y análisis de secuencias

La secuenciación de las construcciones presentadas en este trabajo se realizó en el Servicio de Secuenciación de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Granada. Al ADN a secuenciar (0,2-1  $\mu$ g) se le adicionó el cebador específico (6,4 picomoles) y agua milliQ hasta un volumen final de 12  $\mu$ l. Este servicio de secuenciación amplifica las muestras con la polimerasa Amplitaq FS en un termociclador Perkin Elmer 9.600 y las secuencia en un secuenciador ABI 373 XL Stretch (Perkin-Elmer) usando el sistema comercial ABI PRISM Big Dye *Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (Perkin-Elmer).

Las secuencias se visualizaron con el programa Chromas Lite 2.01. Los análisis de las secuencias de ADN y proteínas, búsqueda de sitios de restricción, diseño y análisis de oligonucleótidos, localización de posibles marcos abiertos de lectura (ORFs), etc., se han realizado con el programa informático Clone Manager (Sci Ed Central). La búsqueda de homologías a nivel de ADN y proteína con secuencias conocidas presentes en las bases de datos se realizó con los distintos algoritmos del programa BLAST (Altschul *et al.*, 1998) disponibles en el servidor NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> Blast.cgi). El alineamiento de secuencias se realizó con el paquete informático Clustal X (Thompson *et al.*, 1997), y para su visualización se utilizó el programa BioEdit 7.0.5.3. Los datos sobre el genoma de Pto DC3000, Pph 1448A y de otros genomas se buscaron en el NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) o en la base de datos KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>). También se han consultado la base de datos Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) y la de transportadores bacterianos TCDB (<http://www.tcdb.org/>). También se ha utilizado el programa MEGA 5.1 para hacer árboles filogenéticos.

## 5.6. Electroforesis de ADN

Consiste en la separación de macromoléculas en función de su tamaño y carga. Los ácidos nucleicos, con carga negativa, migran hacia el polo positivo.

### 5.6.1. Electroforesis en geles de agarosa

El análisis de productos de PCR, de ADN total, plasmídico o de fragmentos de ADN originados tras digestión con enzimas de restricción, se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa (Sambrook *et al.*, 1989). Se utilizaron geles de agarosa (D1 Low EEO, Pronadisa™) al 0,8% (p/v) preparados en tampón Tris-Acetato-EDTA [TAE, (Tris-base 40 mM, ácido acético glacial 0,1142% (v/v), EDTA-Na<sub>2</sub> 2 mM)]. Los fragmentos de ADN menores de 500 pb se separaron en geles de agarosa al 2% (p/v). La separación se realizó por electroforesis horizontal con tampón TAE a un voltaje de 10 V/cm. Como tampón de carga se utilizó una solución 6x (1 µl por cada 5 de muestra) de glicerol 30% (v/v), azul de bromofenol, 0,25% (p/v) y xilencianol, 0,25% (p/v) preparado en agua destilada. Para visualizar el ADN los geles se tiñeron por inmersión en una solución de *GelRed* (Biotium, 100U/L) durante 20-30 min y se expusieron a luz ultravioleta en un transiluminador.

Esta técnica también se utilizó para verificar la integridad del ARN total extraído. El procedimiento fue el mismo que el descrito anteriormente para ADN con las variaciones siguientes: todo el material de electroforesis se limpió previamente con un papel empapado en SDS 10% (p/v), y se utilizó nuevo tampón de corrida TAE con SDS 0,01% (p/v) para cada electroforesis. Se utilizaron geles de agarosa al 1,4% (p/v) preparados en TAE. Como tampón de carga se utilizó una solución 6x (1 µl por cada 5 de muestra) de glicerol 30% (v/v); naranja G (Sigma), 0,25% (p/v); preparado en agua libre de RNasas y *GelRed* (Biotium) 0,2 % (v/v). Las muestras se incubaron durante 5 min a 65°C e inmediatamente después se colocaron en hielo durante 1 min antes de cargar el gel.

Para la visualización e impresión de los geles se ha utilizado una videocámara acoplada a un sistema de impresión de imágenes (Gelprinter Vm509) y el programa *Quantity One* de Bio-Rad para grabar y procesar las imágenes.

### 5.6.2. Marcadores de peso molecular

El tamaño de los fragmentos de ADN se estimó por comparación con diferentes marcadores de peso molecular comerciales:

- Marcador II: ADN del fago λ digerido con la enzima *HindIII*. Se compone de 8 fragmentos que abarcan desde los cientos de nucleótidos hasta más de 20 Kb. También se dispone marcado con digoxigenina que marcan el peso molecular en las hibridaciones ADN-ADN.
- Marcador VIII (Roche): ADN del plásmido pUCBM21 digerido con las enzimas de restricción *HpaII* y *DraI* más *HindIII*. Se compone de 18 fragmentos en un rango de 19 a 114 pb.
- Marcador X (Roche): Es una mezcla que contiene un fragmento de 1.018 pb derivado del plásmido 2µ *Saccharomyces cerevisiae*, los multímeros de este fragmento y productos de restricción del plásmido pBR322.

## 5.7. Hibridación ADN-ADN (Southern Blot)

### 5.7.1. Transferencia alcalina por capilaridad

La transferencia de ADN por capilaridad a una membrana de nylon cargada positivamente se realizó siguiendo el protocolo de transferencia alcalina descrito por Sambrook *et al.* (1989) con algunas

modificaciones. Para ello, el ADN previamente digerido se separó por electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (p/v). Una vez fotografiado el gel y establecidas sus dimensiones, el gel se sumergió en una solución de HCl 0,2 N durante 15 min hasta que se produjo el viraje del azul de bromofenol a amarillo. Este tratamiento ácido permite introducir mellas en el ADN y depurarlo, lo que facilita la transferencia. La desnaturalización alcalina del ADN se realizó sumergiendo el gel en una solución de NaCl 1,5 M / NaOH 2 M durante 20 min. Pasado este tiempo se renovó la solución y se dejó durante 15 min más. Posteriormente, el gel se lavó con agua destilada. Para neutralizar el ADN, el gel se sumergió en una solución Tris-HCl 1 M / NaCl 1,5 M (pH 7,4) durante 15 min dos veces. Pasado ese tiempo, se retiró la solución y se lavó el gel con agua destilada. Antes de realizar la transferencia, se humedeció una membrana de nylon cargada positivamente (Roche) durante al menos 5 min en SSC 10x (preparado a partir de una solución de SSC 20x: 175,3 g de NaCl; 88,2 g de citrato sódico; 800 ml de H<sub>2</sub>O; ajustar el pH a 7,0 y completar hasta 1 litro con agua destilada).

Sobre un cristal, se construyó una unidad de transferencia compuesta, de abajo hacia arriba, por: una pieza de papel Whatman 3mm cuyos extremos quedaban sumergidos en la solución de transferencia SSC 10x colocada en el reservorio inferior, seguida por el gel colocado en posición invertida, la membrana de nylon, tres piezas de papel Whatman 3mm y sobre estas, varias capas de papel de filtro que hacen de absorbentes. Se cubrió con otro cristal y por último un peso de aproximadamente 0,5 Kg comprobando que el sistema estuviese perfectamente horizontal, para dejar la transferencia durante toda la noche. De esta forma la solución de transferencia ascendió por capilaridad a través del gel arrastrando el ADN hasta la membrana, donde quedó retenido. Finalizada la transferencia, se lavó la membrana con SSC 2x durante 5 min y se secó a temperatura ambiente sobre papel de filtro durante 10 min.

Por último, el ADN se fijó a la membrana de nylon exponiéndola durante 3 min a una lámpara de luz UV (260 nm). Las membranas se conservaron secas a temperatura ambiente selladas en bolsa de plástico hasta su utilización.

### **5.7.2. Marcaje de la sonda**

En este tipo de experimentos el marcaje se lleva a cabo con digoxigenina acoplada a un dNTP, en este caso dUTP. El marcaje de la sonda con digoxigenina y la detección de los híbridos ADN-ADN se realizó utilizando el sistema comercial *DIG DNA Labelling and Detection Kit* (Roche). Las sondas de ADN se sintetizaron por PCR (ver apartado 5.4) utilizando una mezcla de dNTPs que contiene DIG-11-dUTP (Roche), lo que produce una incorporación múltiple de dUTP marcado, ya que puede ser usado como sustrato por la Taq-polimerasa, reemplazando al dTTP durante la reacción en cadena de la polimerasa. Como ADN molde se utilizó el ADN genómico de la cepa silvestre. La mezcla de reacción era la estándar para una PCR (4.5) en un volumen final de 50 µl con la diferencia de que la mezcla de dNTPs contenía 0,2 mM de dATP, dCTP y dGTP; 0,18 mM de dTTP y 0,02 mM de DIG-dUTP. Para la amplificación se usó el programa descrito en el apartado 5.4 ajustando la temperatura de hibridación según los cebadores utilizados. En paralelo, se realizaron controles utilizando dNTPs sin DIG-dUTP para comprobar el retraso en la migración en gel de agarosa, como consecuencia de la incorporación del nucleótido marcado.

La sonda marcada se diluyó en solución de hibridación [SSC 5x; N-lauril-sarcosina 0,05 mg/ml; SDS 0,02% (p/v); y agente bloqueante (Roche) 0,5% (p/v)], de 5 a 10 ml son suficientes para cubrir

completamente la membrana. Las sondas preparadas en solución de hibridación se conservaron a -20°C, pudiendo ser reutilizadas posteriormente.

### 5.7.3. Hibridación y lavados

El proceso de hibridación utilizando ADN homólogo como sonda se efectuó utilizando un horno de hibridación (Hybridisation oven/shaker SI 20H). La prehibridación de la membrana se realizó durante 1 h a 65°C en 20 ml de solución de hibridación (por 100 cm<sup>2</sup> de membrana). Entretanto, se desnaturalizó la sonda (diluída según el apartado anterior) mediante ebullición durante 10 min y posterior paso a hielo (5-10 min). Transcurrido el tiempo de la prehibridación, se eliminó de la membrana la solución de hibridación y se le añadió la sonda marcada y desnaturalizada, dejando incubar durante toda la noche a 65°C. Tras la hibridación, se recuperó la sonda y se almacenó a -20°C.

El lavado de la membrana se realizó en las siguientes condiciones de fuerza iónica y temperatura: dos lavados de 5 min en SSC 2x; SDS 0,1% (p/v) a temperatura ambiente, seguido de dos lavados de 15 min en SSC 0,1x y SDS 0,1% (p/v) a 65°C. Los lavados permiten retirar la sonda hibridada inespecíficamente.

### 5.7.4. Detección inmunológica

Esta reacción se realizó con el sistema *Detection Kit* (Roche), siguiendo el protocolo detallado por el fabricante con leves modificaciones. La detección de la sonda se basa en el uso de anticuerpos anti-digoxigenina conjugados con la enzima fosfatasa alcalina. Esta enzima provoca la defosforilación del sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (BCIP) para dar lugar a un producto de color azul oscuro. La sal de azul de nitrotetrazolio (NBT) actúa como oxidante y también genera un color azul oscuro, de modo que se intensifica el color al producirse un precipitado azul insoluble, lo que hace que la detección sea más sensible.

La membrana se lavó 1 min con tampón I (Tris-HCl 100 mM, pH 7,0; NaCl 150 mM), y se bloqueó incubando en tampón II [tampón I suplementado con agente bloqueante (Roche) 0,5% (p/v)] durante 30 min para evitar la unión específica de los anticuerpos anti-digoxigenina a la membrana. Pasado este tiempo, la membrana se lavó con tampón I durante un min y se incubó con 20 ml de tampón de anticuerpo (anticuerpos anti-digoxigenina conjugados con fosfatasa alcalina (Roche) diluídos en tampón I a una concentración final de 150 mU/ml) durante 30 min. El exceso de anticuerpo no unido a la sonda se eliminó mediante dos lavados de 15 min con tampón I. A continuación, la membrana se equilibró con 20 ml de tampón III (Tris-HCl 100 mM pH 9,5; NaCl 100 mM; MgCl<sub>2</sub> 50 mM.) durante dos min y finalmente se incubó con 15 ml de tampón de revelado (67,5 µl de solución NBT y 52,5 µl de solución de BCIP disueltos en 15 ml de Tampón III) en una cubeta metálica y protegida de la luz, hasta la aparición de bandas. La reacción se detuvo lavando con agua destilada, la membrana se dejó secar a temperatura ambiente sobre papel de filtro y se guardó protegida de la luz.

## 6. Técnicas de manipulación de ARN

La purificación y manipulación de ARN requiere de material y reactivos libres de ribonucleasas, por lo que en la preparación de los reactivos y soluciones se utilizó siempre H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> tratada con dietilpirocarbonato

(DEPC). Para ello, a 1 litro de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> se añadió 0,1% (v/v) de DEPC y se dejó en agitación durante 1 h. Posteriormente, se esterilizó en autoclave a 120°C y 1 atmósfera de presión durante 20 min.

### 6.1. Aislamiento de ARN

Con objeto de paralizar lo más rápidamente posible el metabolismo bacteriano, las muestras se recogieron y centrifugaron muy rápidamente. A partir de un cultivo crecido en LB o MMF a la densidad óptica y condiciones de interés, se tomaron alícuotas de 10 ml para DO<sub>660</sub> = 0,5 y de 1,5 ml para DO<sub>660</sub> = 1,5 en tubos previamente enfriados en nitrógeno líquido. A continuación, se centrifugaron a 16.000 g durante 3 min a 4°C, se retiró el sobrenadante y el sedimento celular se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido. Las células se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Para el aislamiento de ARN total de Pto DC3000 y sus mutantes se empleó el reactivo TRI Reagent LS (Molecular Research Center, Inc). Las células almacenadas a -80°C se sacaron en hielo, a cada tubo se le añadió 1,5 ml de la solución TRI Reagent precalentada a 70°C, se resuspendieron por pipeteo y los tubos se incubaron durante 10 min a 65°C. Pasado este tiempo se centrifugaron (12.000 g, 10 min, 4°C) y los sobrenadantes se recuperaron en tubos nuevos, a los que se añadieron 0,1 volúmenes de BCP (1-bromo-3-cloropropano) y se mezclaron agitándolos vigorosamente durante 30 segundos. Los tubos se incubaron 5 min a temperatura ambiente para que se separaran las fases. Se centrifugaron nuevamente (16.000 g, 15 min, 4°C), la fase superior acuosa se transfirió a un tubo nuevo y el ARN se precipitó añadiendo un volumen de isopropanol. Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente durante 10 min y se centrifugaron de nuevo (12.000 g, 8 min, 4°C). Tras descartar el sobrenadante, las muestras se lavaron con 1 ml de etanol 70% (v/v) en H<sub>2</sub>O DEPC y se centrifugaron (12.000 g, 5 min, 4°C). Tras eliminar el sobrenadante y dejar los tubos abiertos secando a 30-37°C durante 15 min, el precipitado se resuspendió en 80 µl de H<sub>2</sub>O tratada con DEPC a 50°C durante 5-10 min. Finalmente, el ARN se almacenó directamente a -80°C o se realizó el tratamiento con DNasa I.

### 6.2. Tratamiento con DNasa I

Para eliminar los restos de ADN contaminante en las preparaciones de ARN, las muestras se trataron con DNasa I libre de RNAsas (Qiagen). A 80 µl de ARN se añadieron 14 µl de tampón 10xRDD y 6 µl de DNasa I (1500 Unidades Kunitz) en un volumen final de 140 µl. Se digirió durante 1 h a 28°C (la incubación podría alargarse 30 min más).

Tras el tratamiento con DNasa, las muestras se limpiaron con el sistema comercial *RNeasy Kit* (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. La elución se realizó dos veces, añadiendo 35 µl de H<sub>2</sub>O libre de RNAsas (Qiagen), incubando durante 5 min a temperatura ambiente y centrifugando a velocidad máxima 1 min. Las muestras se cuantificaron y almacenaron a -80°C en caso de no seguir con la síntesis de ADN (ADNc).

### 6.3. Determinación de la integridad y concentración del ARN total

La integridad del ARN total extraído se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,4% (p/v) (apartado 5.6.1). La concentración de ARN y la pureza de la extracción (contaminación de proteínas y/o fenol) se midieron de manera equivalente al ADN (previa dilución en H<sub>2</sub>O DEPC) en el Nanodrop ND-

1000 (Bio-Rad) utilizando el factor para ARN, ya que la concentración se calcula a partir de la DO<sub>260</sub> (1 unidad de DO<sub>260</sub> = 40 µg/ml de ARN). La relación DO<sub>260</sub>/DO<sub>280</sub> se usó como estimador de la pureza de la preparación, considerándose valores por debajo de 1,8 como indicadores de contaminación por proteínas o fenol.

#### 6.4. Reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasa termorresistente acoplada a una reacción de transcripción reversa (RT-PCR)

La transcripción reversa y la posterior reacción de amplificación del ADNc se realizaron utilizando el sistema comercial *Titan One Tube RT-PCR System* (Roche) y siguiendo las instrucciones del fabricante. La transcripción reversa se realizó incubando las muestras a 50°C durante 30 min. Posteriormente, se amplificaron mediante una reacción de PCR en las siguientes condiciones: tras una incubación de 4 min a 95°C, se realizaron 30 ciclos (20 segundos a 95°C, 20 segundos a 57°C, 35 segundos a 68°C), para finalmente extender a 65°C durante 7 min. En todos los ensayos se llevaron a cabo controles negativos para detectar posibles falsos positivos en la reacción de extensión debido a la presencia de ADN en las muestras de ARN. Dicho control negativo consistía en una reacción de amplificación en ausencia de transcriptasa reversa, es decir, únicamente en presencia de Taq polimerasa. Las secuencias de los cebadores utilizados en estos ensayos para el análisis de los genes PSPTO\_5191 al PSPTO\_5194 se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de RT-PCR

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Características
5191 Fa	GTCACGCAGGTAACGAAG (F)	Hibrida 281 nt antes del codón de inicio de PSPTO_5192
5191 Ra	GTGAACCCAGAGCGGTG(R)	Hibrida 131 nt después del codón de inicio de PSPTO_5192
5192 Fa	CGGTGCTTCTTCCTTGCC (F)	Hibrida 48 nt antes del codón de inicio de PSPTO_5193
5192 Ra	CAAGGTCAGCGGCAAGG (R)	Hibrida 391 nt después del codón de inicio de PSPTO_5193
5193 Fa	GTTTCTCCTCGCCACAGC (F)	Hibrida 260 nt antes del codón de inicio de PSPTO_5194
5193 Ra	CTTATTGCCTACCCGACG (R)	Hibrida 144 nt después del codón de inicio de PSPTO_5194

## 7. Análisis de proteínas

### 7.1. Obtención de extractos proteicos

Los extractos proteicos se obtuvieron a partir de 100 ml de cultivos en MMS. Para ello se resuspendieron las diferentes cepas en MgCl<sub>2</sub> 10 mM a partir de placas de LB y se ajustaron a una DO<sub>660</sub> de 0,1. Los cultivos se incubaron en agitación a 28°C durante 12-14 h, hasta alcanzar una DO<sub>660</sub> cercana a 1 y posteriormente se centrifugaron a 4.000 rpm (3.220 g) durante 20 min a 4°C. El sedimento celular de 50 ml de cultivo se resuspendió en 2 ml de agua destilada y el sobrenadante se filtró a través de una membrana de 0,45 µm (Durapore membrane filters, Millipore) y se congeló a -80°C para después secarlo mediante liofilización durante 2 días. La liofilización de las muestras se hizo en un liofilizador Thermo Savant ModulyoD (SNL216V-115). Tras la liofilización, las muestras se resuspendieron en 2 ml de agua destilada y se dializaron en agua destilada durante 15-20 h a 4°C en agitación suave para eliminar las

sales del medio de cultivo utilizando cassettes de diálisis *Sli de-A-Lyzer* 3.5K de 0.5-3 ml de capacidad (Thermo Scientific).

También se obtuvieron extractos proteicos de las cepas bacterianas crecidas en medio MMF. Para ello se pusieron en primer lugar cultivos en LB a 28°C en agitación hasta alcanzar una  $DO_{660}$  de 0.5., tras lo que se lavaron con MMF y se inocularon 100 ml de medio MMF a una  $DO_{660}$  de 0.5. Se incubaron durante 5 h a 28°C en agitación, se midió la  $DO_{660}$  de cada cultivo y se procedió de la misma forma que con las muestras crecidas en MMS.

## **7.2. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE)**

Para la separación electroforética de proteínas se utilizó el equipo de electroforesis vertical *Mini-PROTEAN II* (Bio-Rad) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las electroforesis se realizaron utilizando geles discontinuos de poliacrilamida de 0,75 o 1,0 mm de espesor de acuerdo con el método descrito por Laemmli (1970). Cada gel constó de un segmento superior concentrador [Tris-HCl 125 mM pH 6,8; poliacrilamida 4,5% (p/v); SDS 0,1% (p/v)] y un segmento inferior separador [Tris-HCl 375 mM, pH 8,8; poliacrilamida 10% o 12% (p/v); SDS 0,1% (p/v)]. A 10  $\mu$ l de muestra se añadió un volumen equivalente de tampón de carga para SDS-PAGE [Tris-HCl 100 mM pH 6,8;  $\beta$ -mercaptoetanol 10% (v/v); azul de bromofenol 0,2% (p/v); glicerol 20% (v/v); SDS 4% (p/v)]. Para las muestras de proteínas de sobrenadante obtenidas en el apartado 7.1, a 15-30  $\mu$ l de muestra se añadió tampón de carga SDS 6x [6x: Tris-HCl 350 mM pH 6,8;  $\beta$ -mercaptoetanol 20% (v/v); azul de bromofenol 0,2% (p/v); glicerol 30% (v/v); SDS 6% (p/v)]. En ambos casos las muestras se calentaron a 90-95°C durante 5 min. La electroforesis se llevó a cabo en tampón Laemmli [Tris-HCl 25 mM pH 8,3; glicina 192 mM; SDS 0,1% (p/v)], a 80 V durante 2 h.

## **7.3. Tinción de proteínas**

Las proteínas del sedimento celular se visualizaron mediante tinción con azul de Coomassie y las proteínas de sobrenadante mediante tinción con plata usando un kit comercial.

### **7.3.1. Tinción de proteínas con azul de Coomassie**

Las proteínas se visualizaron directamente en el gel mediante tinción con una solución de azul de Coomassie [0,25% (p/v) de azul de Coomassie en una mezcla de metanol: ácido acético: agua en proporción 45:10:45 (v/v/v)]. En lugar de las 2-4 h necesarias por el método tradicional, la tinción se aceleró calentando en microondas el gel sumergido en la solución anterior justo hasta que comenzó a hervir. Entonces se transfirió a la solución desteñidora (similar a la anterior pero sin azul de Coomassie), que se cambió frecuentemente por solución fresca hasta que las bandas de proteínas se visualizaron con nitidez.

### **7.3.2. Tinción de proteínas con plata**

Las proteínas provenientes del sobrenadante de cultivos se lograron visualizar tras teñir el gel con plata usando el kit comercial *Bio-Rad Silver Stain* (Bio-Rad laboratories) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Esta tinción es 10-50 veces más sensible que la tinción con azul de Coomassie y se basa en el método descrito por Merrill *et al.* (1979).

#### **7.4. Determinación de la concentración de proteínas**

La concentración de proteínas se determinó por espectrofotometría mediante el ensayo de Bradford (1976), utilizando el reactivo de Bradford comercial (Bio-Rad). En cada ensayo se realizó en paralelo una curva patrón con una solución fresca de albumina de suero bovino, siguiendo el protocolo *microassay* descrito en las instrucciones del fabricante.

#### **7.5. Preparación de muestras para identificación de proteínas por MALDI-TOF**

Al someter a electroforesis los extractos proteicos de sobrenadante y teñir con plata, observamos bandas correspondientes a proteínas presentes en la cepa silvestre y que no aparecían o eran muy tenues en las muestras del mutante  $\Delta 5191$ . Se cortaron esas bandas y se enviaron a la Unidad de Proteómica de la Universidad de Córdoba para la identificación de las proteínas por Huella peptídica MALDI-TOF/TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*). Esta fuente de ionización suele asociarse a un analizador de tiempo de vuelo (TOF, Time-Of-Flight) en el que los iones se separan en función de su relación masa-carga tras ser acelerados en un campo eléctrico, o a un analizador TOF/TOF que proporciona un mejor enfoque de los iones y, por tanto, mayor resolución y precisión másicas. En el primer TOF los iones son acelerados a bajo voltaje, favoreciendo la fragmentación metaestable. Mediante un pulsador se selecciona un determinado ión padre y sus iones fragmento, que son acelerados a un potencial mayor y separados en el segundo TOF.

Una vez obtenidos los péptidos resultantes de la digestión de la proteína que son analizados por espectrometría de masas (MALDI/TOF-TOF), se lleva a cabo una búsqueda en una bases de datos (NCBI nr), combinando los resultados de la huella peptídica (MS) con las posteriores fragmentaciones (MSMS) de hasta doce péptidos de cada banda según la calidad del espectro MS, usando MASCOT como motor de búsqueda.

### **8. Ensayos en plantas**

#### **8.1. Cultivo de las plantas objeto de estudio**

Los ensayos con Pto DC3000 y mutantes derivados de esta cepa, se realizaron en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. MoneyMaker) de cuatro a cinco semanas de edad crecidas en macetas con turba. Se cultivaron en una cámara bajo condiciones de luz, humedad y temperatura controladas: fotoperiodo de día largo (16/8 h luz/oscuridad; 24/18°C día/noche) y una humedad relativa del 60%.

Los experimentos con Pph 1448A y sus respectivos mutantes se llevaron a cabo en plantas de judía (*Phaseolus vulgaris* cv. Canadian Wonder) de 2 semanas de edad cultivadas en las mismas condiciones que las plantas de tomate.

#### **8.2. Preparación de los inóculos bacterianos**

Las cepas bacterianas cultivadas durante 48 h a 28°C en placas de LB se resuspendieron en  $MgCl_2$  10 mM y se lavaron dos veces con  $MgCl_2$  10 mM, tras lo cual se ajustó la densidad celular a  $DO_{660} = 0,1$  (correspondiente a  $10^8$  ufc/ml) y se realizaron diluciones seriadas para obtener los inóculos a los títulos

deseados:  $10^4$  ufc/ml para las inoculaciones a baja densidad y  $10^7$  ufc/ml para las inoculaciones a alta densidad. Siempre se confirmó el título de las suspensiones utilizadas realizando diluciones seriadas y sembrando en placas de LB suplementado con el antibiótico correspondiente para la cepa silvestre y en LB suplementado con kanamicina para las mutantes.

### 8.3. Inoculación de las plantas

Se realizaron ensayos de inoculación por infiltración y por spray en plantas de tomate y sólo por el primer método en las de judía. Previamente a los ensayos, las plantas se trataron para favorecer la apertura estomática y, por tanto, la infección bacteriana. Para ello, se regaron aproximadamente 1 h antes y se pulverizaron las hojas con agua 30 min antes de proceder a la inoculación. Se utilizaron suspensiones con densidades bacterianas de  $10^4$  ufc/ml o  $10^7$  ufc/ml

#### 8.3.1. Inoculación por infiltración

La infiltración de la suspensión bacteriana se realizó en el envés de la hoja con una jeringa de 2 ml sin aguja. Las plantas utilizadas como controles negativos se infiltraron con una solución de 10 mM  $MgCl_2$ .

En plantas de judía, las inoculaciones para ensayos de conteo de ufc y fluorescencia multiespectral se llevaron a cabo en sólo una mitad de la hoja, lo que permite la diferenciación por la nervadura central de las dos áreas dentro de la hoja inoculada: área infiltrada (AI) y área no infiltrada (ANI) (Figura 17A). El total de la zona infiltrada abarcaba 8-10 cm<sup>2</sup>. Para realizar los mismos ensayos en plantas de tomate, se infiltraron 3 folíolos de una misma hoja por un procedimiento similar (Figura 17B).

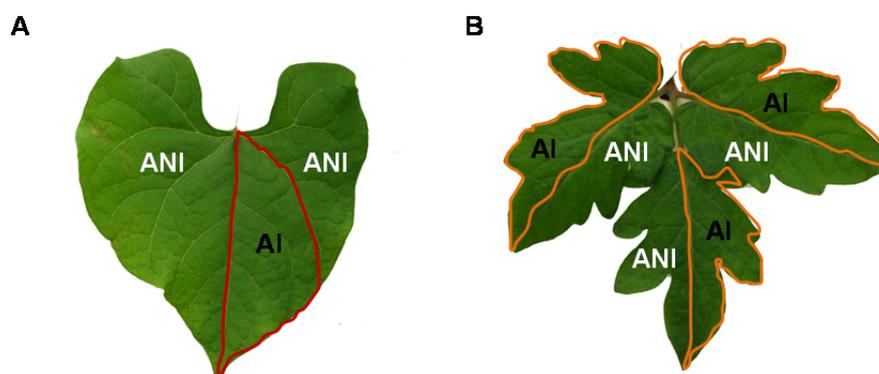


Figura 17. Áreas de la hoja de judía (A) y tomate (B) inoculadas con las suspensiones bacterianas mediante infiltración para sintomatología y experimentos de MCFI. ANI: área no infiltrada; AI: área infiltrada.

#### 8.3.2. Inoculación por rociado

La inoculación por rociado se realizó sólo en plantas de tomate, pulverizando tres folíolos de las hojas primarias con aproximadamente 0.5 ml de la suspensión bacteriana, tres veces por el haz y tres por el envés. Las plantas utilizadas como controles negativos se rociaron con una solución de 10 mM  $MgCl_2$ .

### 8.4. Conteo de unidades formadoras de colonia

Para determinar las poblaciones bacterianas *in planta* se extrajeron muestras de tres áreas de una hoja, cada una con 5 discos de 10 mm de diámetro y se maceraron por percusión mecánica (Agitador RW16 Basic, IKA) en 1 ml de  $MgCl_2$  10 mM. A partir del macerado, se hicieron diluciones seriadas que se

sembraron en medio LB suplementado con el correspondiente antibiótico para determinar el número de unidades formadoras de colonia por unidad de área de hoja (ufc/cm<sup>2</sup>).

El análisis de la evolución de los síntomas y el conteo de ufc/cm<sup>2</sup> se realizaron 3 h después de la inoculación (tiempo 0) y a diferentes días después de la inoculación (dpi, días post-inoculación).

## 8.5. Ensayos de competencia en planta

Para estos ensayos se emplearon plantas de judía de 15 días de edad que se inocularon en las hojas primarias mediante la técnica de infiltración. Las cepas bacterianas empleadas en la infección (silvestre y mutante Km<sup>R</sup>) se cultivaron durante 48 h a 25°C en placas de LB y LB Km (50 µg/ml), respectivamente. Las células se resuspendieron en 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, se centrifugaron y lavaron, ajustándose la densidad celular una DO<sub>660</sub>=0,1 (correspondiente a 10<sup>7</sup> ufc/ml) en 10 mM de MgCl<sub>2</sub>. Se llevaron a cabo diluciones seriadas de las suspensiones utilizadas para obtener 10<sup>4</sup> ufc/ml, que se utilizaron para realizar el ensayo a baja densidad. En todos los casos, los títulos de las suspensiones utilizadas se comprobaron sembrando diluciones seriadas en placas de LB (silvestre) y LB Km (mutante). También se mezclaron las suspensiones celulares del silvestre y el mutante en una proporción 1:1 en 10 mM de MgCl<sub>2</sub> y se sembraron diluciones seriadas del inóculo en placas de LB y LB Km para confirmar la dosis y la proporción relativa entre las cepas.

Con las tres suspensiones celulares (de silvestre, de mutante y de mezcla), se procedió a la inoculación de las plantas de judía por infiltración. Cada experimento se hizo por triplicado (3 plantas para cada condición). El análisis de la evolución de los síntomas y la toma de muestras de las hojas infiltradas se realizó 3 h después de la inoculación (*input*) y varios días después de la inoculación (dpi, días post-inoculación). Se tomaron al menos 5 discos por hoja (3,9 cm<sup>2</sup>) con un sacabocados de 10 mm de diámetro, que se colocaron en 1 ml de MgCl<sub>2</sub> 10 mM y se homogenizaron por percusión mecánica. Se sembraron diluciones seriadas de las suspensiones bacterianas resultantes en placas de LB y LB Km, que se incubaron 48 h a 25°C, tras lo que se llevó a cabo el recuento de colonias (*output*). Los conteos de bacterias en ufc/cm<sup>2</sup> son los recuentos totales obtenidos a partir de 5 discos de hoja.

## 9. Técnicas de imagen

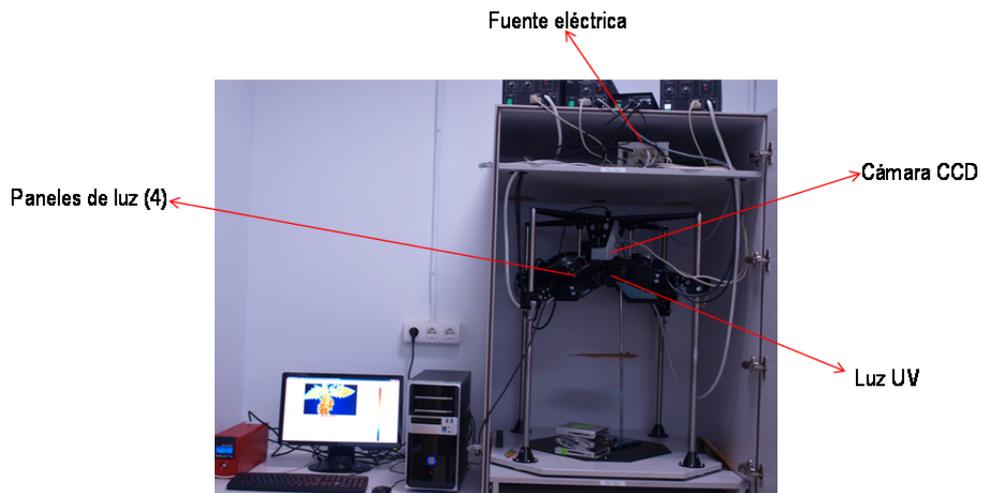
### 9.1. Fluorescencia multicolor (MCFI) inducida por UV

El sistema usado para la captura de imágenes de fluorescencia multiespectral fue el Open FluorCam FC 800-O de PSI (Photon Systems Instruments, Bmo, República Checa, Figura M2), cuyas características pueden verse con detalle en <http://www.psi.cz/products/fluorcams/open-fc-800-o-1010>. Las hojas objeto de estudio son excitadas por luz UV a 360 nm y las imágenes capturadas mediante una cámara CCD (del inglés *charge-coupled device*) LU-160 (Lumenera Corporation, Ottawa, Canada) sincronizada con la lámpara. Las imágenes de fluorescencia azul (F440), verde (F520), roja (F690) y de rojo lejano (F740) son adquiridas secuencialmente para el mismo campo de visión, cada una con el filtro apropiado. Dichos filtros están montados en una ruleta frente a la cámara CCD y se alternan automáticamente, Figura 18. La adquisición de las imágenes de emisión de fluorescencia requirió, en nuestro caso, la acumulación de 9 imágenes tomadas durante 18 s, que a su vez generan una imagen de 740×480 píxeles con una

resolución de 96×96 pixels por pulgada y 12 bits por pixel. La imagen resultante se presenta en escala de grises, pero es posible la aplicación de una escala de falsos colores mediante el programa informático FluorCam version 7.1.0.3, que también permite la obtención de imágenes de los cocientes entre las distintas emisiones de fluorescencia ( $F_{440}/F_{520}$ ,  $F_{440}/F_{690}$ ,  $F_{440}/F_{740}$  y  $F_{690}/F_{740}$ ). Además, es posible obtener datos numéricos promedio de los parámetros analizados de distintas áreas de interés de la hoja analizada.



**Figura 18. Modelo Open FluorCam FC 800-O.** En él que puede apreciarse con detalle el sistema de iluminación, que es similar al de nuestro equipo (<http://www.psi.cz/products/fluorcams/open-fc-800-o-1010>).



**Figura 19. Equipo disponible en nuestro laboratorio.** Posee una caja para la adaptación de las plantas a oscuridad cuando se requiere.



## RESULTADOS



## **Capítulo 1.**

**Obtención y caracterización de mutantes del transportador MexAB-OprM en *Pseudomonas syringae* pvs. phaseolicola 1448A y tomate DC3000**



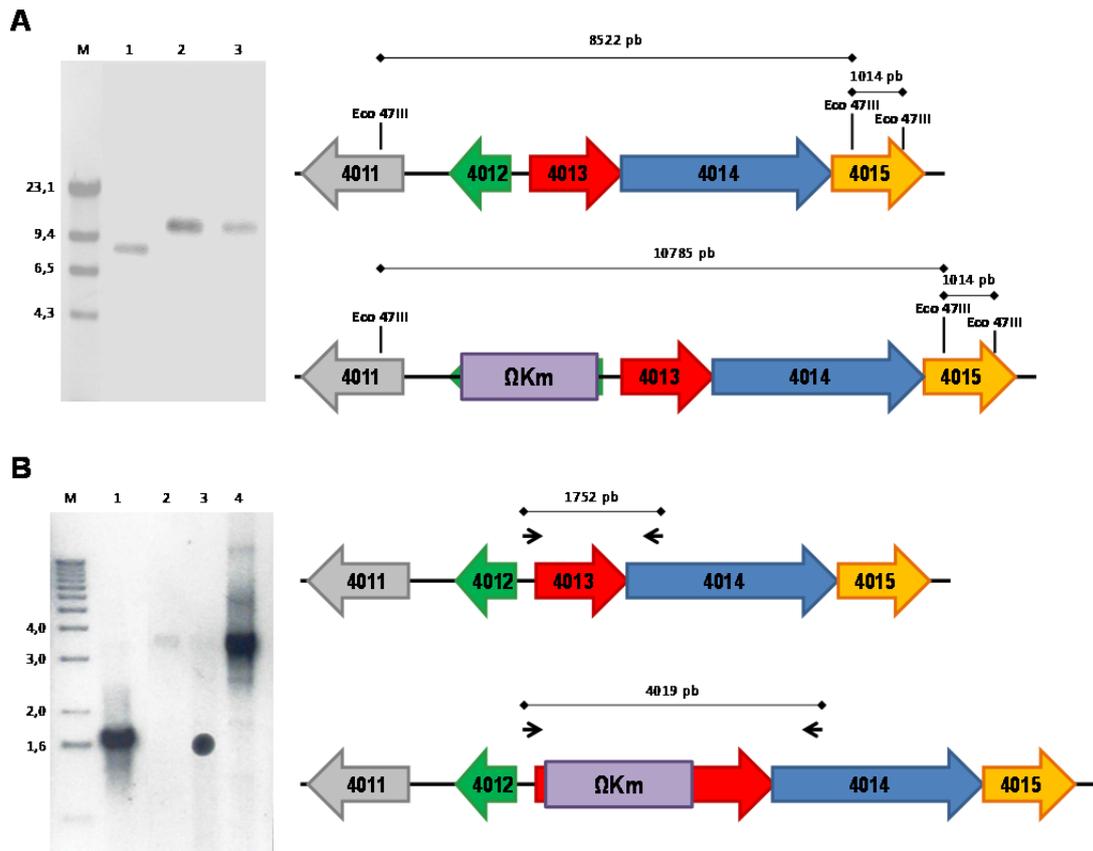
# 1. Caracterización in vivo del sistema PmeR/MexAB-OprM de Pph

## 1.1. Generación de mutantes carentes de la bomba y el regulador

Con el fin de estudiar las funciones del sistema MexAB-OprM y del regulador PmeR en Pph, se construyeron mutantes carentes de estos genes. Para ello y en primer lugar, se diseñaron los diferentes vectores que se utilizaron en las mutagénesis a partir del plásmido pGEM-T, que no replica en *Pseudomonas*. En este plásmido se clonó una región que incluía el gen a mutar y posteriormente se interrumpió mediante la introducción de un interposón  $\Omega$ Km, que impide su expresión. En la sección Materiales y Métodos se describe en detalle cómo se generaron los plásmidos pPGA-Pph:: $\Omega$ Km y pPGR-Pph:: $\Omega$ Km (apartado 2.2) y cómo se llevó a cabo el reemplazamiento génico (apartado 3.6.5). Tras la obtención de posibles clones mutantes deficientes en la bomba o en el regulador, como se especifica en el apartado 3.6.5 de Materiales y Métodos, estos se analizaron mediante PCR e hibridación de ADN *Southern Blot*, con el fin de confirmar la integración del interposón  $\Omega$ Km en el locus genómico de *mexA* o de *pmeR*.

En el ensayo *Southern Blot* se utilizó ADN cromosómico de la cepa silvestre Pph y de los posibles mutantes *pmeR*, que se digirieron con *Eco47III* y se hibridaron con una sonda de 1,18 kb para *pmeR* (Figura 20A). El interposón  $\Omega$ Km utilizado presenta en sus extremos sitios de corte para la enzima *Eco47III* y un sitio único *SmaI* dentro del interposón. Este sitio nos permite determinar el sentido de la inserción del  $\Omega$ Km dentro del gen interrumpido. La inserción del  $\Omega$ Km también se verificó por PCR utilizando cebadores específicos para este (datos no mostrados). En la cepa silvestre se observó la hibridación de la sonda con un fragmento de aproximadamente 8,5 kb, mientras que en los mutantes se observaba una banda de 10,8 kb debido a la inserción del  $\Omega$ Km, de 2,2 kb. Los resultados obtenidos nos permiten confirmar la interrupción del gen *pmeR* con el interposón  $\Omega$ Km en los mutantes deficientes en el posible regulador de la bomba. Se escogió uno de los clones carentes del regulador *pmeR* y se denominó PphR.

También se confirmó la interrupción del gen *mexA* con el interposón  $\Omega$ Km en los mutantes deficientes en la bomba de eflujo (Figura 20B). En este caso, la inserción del  $\Omega$ Km se verificó por PCR utilizando cebadores específicos. En la cepa silvestre se observa la aparición de una banda de 1,7 kb, mientras que en los mutantes se observan bandas de 4,0 kb. La mutación generada es de carácter polar debido a las características del interposón  $\Omega$ Km: está flanqueado por repeticiones invertidas que contienen señales de terminación, tanto de la transcripción como de la traducción (Prentki *et al.*, 1984; Fellay *et al.*, 1987), por lo que el mutante es deficiente en los tres componentes de la bomba. Se escogió uno de los clones y se denominó al mutante carente de la bomba MexAB-OprM como PphA.



**Figura 20. Comprobación de los mutantes *pmeR* y *mexAB-oprM* construidos mediante doble recombinación en Pph 1448A.**

**A.** Hibridación *Southern* utilizando una sonda para *pmeR* en la cepa silvestre Pph 1448A (calle 1) y en dos mutantes deficientes en el posible regulador (calles 2 y 3). A la izquierda se indica el tamaño en kb del marcador de peso molecular (M, ADN del fago  $\lambda$  digerido con HindIII). En los dos casos, el esquema de la derecha indica los sitios de corte y el tamaño esperado de los fragmentos obtenidos con la enzima *Eco* 47III, tanto en la cepa silvestre como en los mutantes *pmeR*.

**B.** PCRs comprobatorias utilizando los cebadores TtgA-BamHI\_syringae y TtgB-XbaI\_entomophila en la cepa silvestre Pph 1448A (calle 1), en dos mutantes deficientes en el gen *mexA* (calles 2 y 3) y en el plásmido control pPGA-Pph:: $\Omega$ Km (calle 4). A la izquierda se indica el tamaño en kb del marcador de peso molecular (M, DNA Molecular Weight Marker X, Roche). En los dos casos, el esquema de la derecha indica la posición de los oligos y el tamaño esperado de los fragmentos obtenidos por PCR, tanto en la cepa silvestre como en los mutantes *mexAB-oprM*.

## 1.2. Determinación del perfil de sustratos de la bomba MexAB-OprM

Los sistemas transportadores homólogos a la bomba de eflujo MexAB-OprM de Pph 1448A están implicados en la tolerancia a múltiples antibióticos y disolventes orgánicos. Con el fin de caracterizar los mutantes obtenidos en el apartado anterior se examinó la susceptibilidad de los mismos comparándolos con la cepa silvestre. Se utilizó el método de diluciones seriadas, descrito en el apartado 4.3 de Materiales y Métodos, para determinar la concentración inhibitoria mínima (MIC) de distintos tipos de antibióticos: ampicilina, carbenicilina, cefotaxima, cloramfenicol, estreptomycin, gentamicina, ácido nalidíxico, piperacilina y tetraciclina. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 11.

**Tabla 11. Susceptibilidad de la cepa Pph y los mutantes PphA y PphR a diferentes compuestos antimicrobianos.**

Compuesto	MIC( $\mu\text{g/ml}$ )		
	Pph	PphA	PphR
Ácido nalidíxico	111,88	8,85	625,00
Ampicilina	35,62	1,37	156,25
Carbenicilina	175,00	2,48	416,67
Cefotaxima	7,81	0,19	23,44
Cloranfenicol	0,53	0,41	0,74
Estreptomicina	0,90	0,17	0,65
Gentamicina	0,62	0,05	0,73
Piperacilina	5,73	0,09	-
Tetraciclina	0,16	0,05	0,41

-, no determinado.

Con este ensayo se pudo observar que el mutante PphA muestra una disminución en los valores de MIC con respecto a los de la cepa silvestre para la mayoría de los antibióticos ensayados; es decir, la pérdida de la bomba MexAB-OprM (mutante PphA) aumenta su sensibilidad a estos compuestos (Tabla 11). En particular, el mutante PphA resultó ser significativamente sensible a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos (ampicilina, carbenicilina y piperacilina), ya que la MIC para estos antibióticos fue 26, 70 y 64 veces menor, respectivamente, a la observada para la cepa silvestre. Sólo en el caso del cloranfenicol el valor de MIC en las cepas silvestre y mutante no varió significativamente, por lo que este antibiótico no parece ser sustrato de este transportador. Curiosamente, los antibióticos de tipo aminoglucósido gentamicina y estreptomicina sí parecen ser sustratos de MexAB-OprM de Pph 1448A, a diferencia de lo que ocurre en el transportador MexAB-OprM de Pto DC3000 (Vargas *et al.*, 2011).

Stoitsova *et al.* (2008) habían demostrado que la delección del transportador MexAB-OprM en tres patovares de *P. syringae* reducía drásticamente la tolerancia a una amplia variedad de agentes antimicrobianos (Tabla 12). Los valores de MIC que obtuvimos para algunos de los compuestos ensayados con la cepa silvestre y el mutante PphA varían notablemente con respecto a los valores obtenidos por Stoitsova y colaboradores (Tabla 12). Esto ocurre para ácido nalidíxico, carbenicilina, cloranfenicol, estreptomicina, gentamicina, piperacilina y tetraciclina. A pesar de esas diferencias, el comportamiento es similar: los mutantes deficientes en el transportador son más sensibles que la cepa silvestre a los mismos compuestos antimicrobianos, demostrando que el sistema MexAB-OprM es capaz de expulsar antibióticos con distinta estructura y actividad. Además, hemos definido un nuevo sustrato para el transportador MexAB-OprM de Pph 1448A: la cefotaxima, ya que Stoitsova *et al.* (2008) no habían ensayado este compuesto.

**Tabla 12. Perfil de susceptibilidad a compuestos antimicrobianos de Pph 1448A y Pph  $\Delta mexAB-oprM$ .** Modificada de Stoitsova *et al.* (2008).

Compuesto	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )	
	Pph	$\Delta mexAB-oprM$
Acriflavina	7,80	0,30
Ácido nalidíxico	>1.000,00	31,00
Ácido fusárico	1.000,00	31,00
Ampicilina	125,00	1,50
Berberina	1.000,00	15,60
Bromuro de etidio	100,00	1,50
Carbenicilina	1.000,00	6,20
Cefoperazona	62,50	1,50
Cloranfenicol	25,00	1,50
Eritromicina	25,00	3,10
Estreptomina	>100,00	>100,00
Floretina	>1.000,00	250,00
Gentamicina	1,20	0,6
Kanamicina	1,20	0,6
Naringenina	>1.000,00	250,00
Nitrofurantoína	500,00	31,00
Norfloxacin	7,80	0,60
Piperacilina	31,00	0,60
Rodamina 6G	125,00	1,50
Tetraciclina	0,50	0,03
Violeta cristal	25,00	0,80

Por otra parte, en la cepa PphR (mutante deficiente en el regulador PmeR) se observó que los valores de MIC para todos los compuestos ensayados excepto para estreptomina y gentamicina, eran superiores a los de la cepa silvestre, lo que sugería que este regulador podía controlar la expresión del operón *mexAB-oprM* reprimiéndolo (Tabla 11).

En resumen, a través del uso de cepas deficientes en *mexAB-oprM* y *pmeR* hemos comprobado que la resistencia a varios flavonoides se ve comprometida en una cepa que carece de MexAB-OprM y aumenta en la cepa deficiente en PmeR (Tabla 11). Por tanto, esta bomba elimina compuestos antimicrobianos de naturaleza y estructura química muy diferente, confiriéndole a Pph 1448A resistencia intrínseca a una amplia gama de antibióticos y otros agentes antimicrobianos de distinto origen.

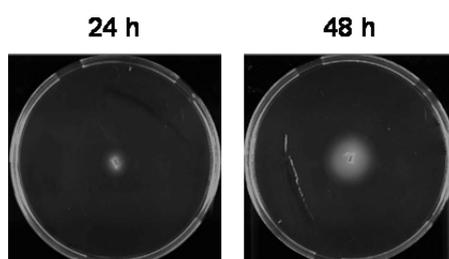
### 1.3. Ensayos de motilidad bacteriana

La motilidad contribuye a la colonización y la diseminación de las bacterias en sus nichos naturales, razón por la cual pensamos comparar los movimientos *swimming* y *swarming* de las cepas silvestre y el mutante PphA. Vargas *et al.* (2013) habían demostrado que en DC3000 algunos antibióticos y flavonoides sustratos de la bomba MexAB-OprM reducen la motilidad tipo *swimming* y *swarming* en la cepa silvestre y este efecto es más drástico en un mutante carente de la bomba. Para estudiar si en Pph ocurría lo mismo, se comparó el comportamiento de la cepa silvestre con el mutante PphA en ausencia y en presencia de dichos compuestos.

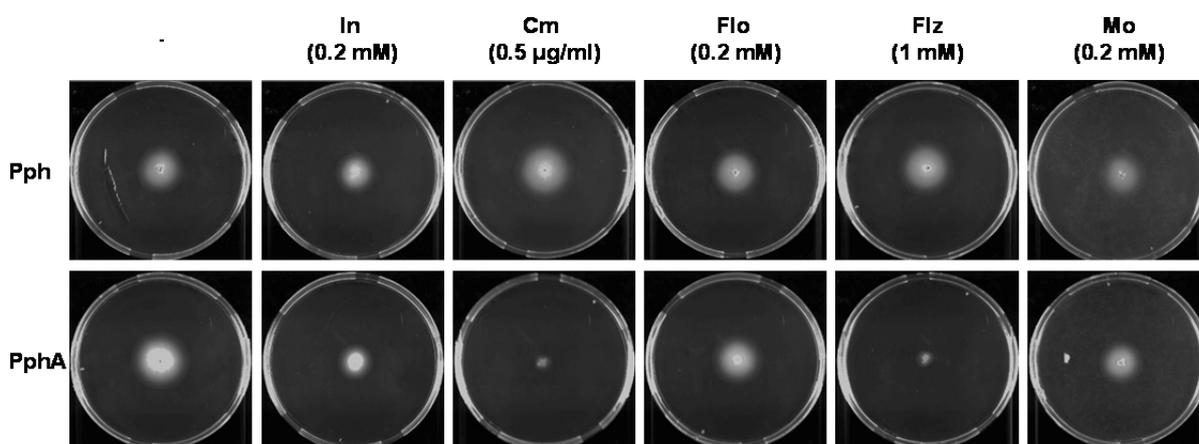
### 1.3.1. Motilidad tipo *swimming*

El movimiento de tipo *swimming* es el desplazamiento individual de bacterias en medios líquidos o viscosos que nadan gracias al movimiento de su(s) flagelo(s) (Kearns, 2010). Numerosas cepas del complejo *P. syringae* se mueven de este modo en medios con baja concentración de agar (Shimizu *et al.*, 2003; Toutain *et al.*, 2005).

En LB (0,3% agar) se observan halos de dispersión de Pph 1448A a partir del punto de inoculación que crecen en tamaño con el tiempo (Figura 21). Al ensayar la motilidad en presencia de diferentes compuestos se observó que el cloranfenicol y la floridzina y en menor medida el indol y la morina, provocaban una reducción de la motilidad en la cepa PphA (Figura 22).



**Figura 21. Motilidad tipo *swimming* de Pph 1448A.**  $4 \times 10^6$  células de Pph se inocularon en placas de LB (0,3% agar) como se describe en la sección 4.4.1 de Materiales y Métodos. Las placas se incubaron a 25°C y las fotografías se tomaron a las 24 y 48 h.



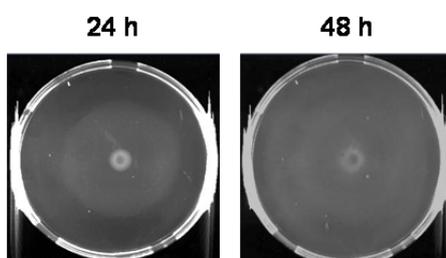
**Figura 22. Motilidad tipo *swimming* de Pph y PphA.** Aproximadamente  $4 \times 10^6$  células se pincharon en el centro de placas de LB (0,3% agar) y se incubaron a 25°C durante 48 h en ausencia (-) y presencia de los compuestos indicados a las concentraciones señaladas. Las fotografías muestran resultados representativos obtenidos a partir de tres experimentos diferentes. In, indol; Cm, cloranfenicol; Flo, floretina; Flz, floridzina; Mo, morina.

### 1.3.2. Motilidad tipo *swarming*

La motilidad tipo *swarming* es un movimiento rápido (2-10  $\mu\text{m/s}$ ) y coordinado de una población bacteriana sobre superficies sólidas o semisólidas. Es un comportamiento multicelular que se ha observado principalmente en condiciones de laboratorio controladas y depende de dos elementos críticos: la composición y la viscosidad del medio de cultivo. Las bacterias que realizan *swarming* sufren una diferenciación morfológica que las distingue de las que se encuentran en estado planctónico: las células

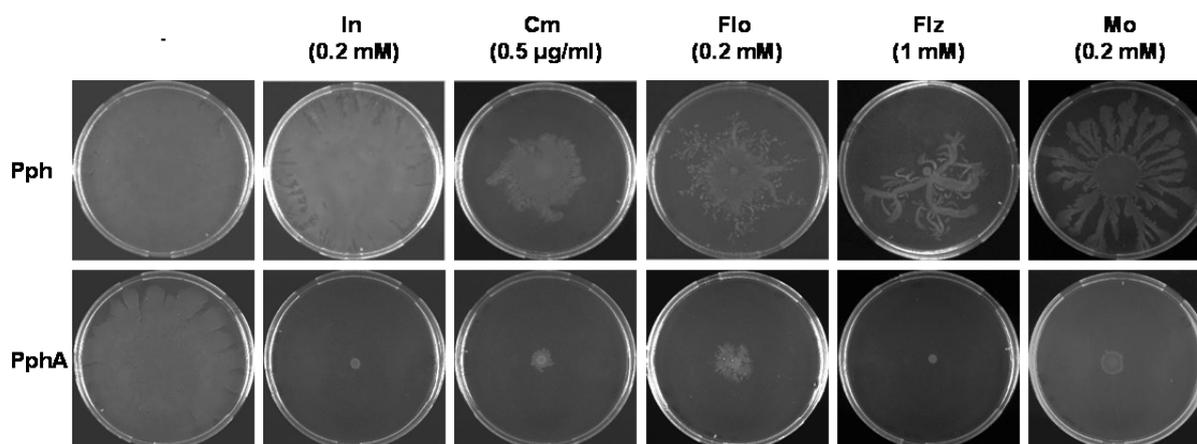
localizadas en el frente de migración suelen estar hiperelongadas, hiperflageladas y se agrupan en estructuras multicelulares formando empalizadas (Kearns, 2010).

Pph presenta un movimiento de tipo *swarming* muy rápido en medios ricos con baja concentración de agar, pero no en medios mínimos, como MMF (no mostrado). En PG-agar (0.5%) se observan halos de dispersión desde el punto de inoculación que crecen en tamaño con el tiempo y alcanzan el borde de las placas de 80 mm de diámetro a las 40-48 h (Figura 23).



**Figura 23. Motilidad tipo *swarming* de Pph 1448A.**  $4 \times 10^6$  células de Pph se inocularon en la superficie de placas de PG-agar como se describe en Materiales y Métodos (sección 4.4.2) y se incubaron a 25°C. Las fotografías se tomaron a las 24 y 48 h.

Al llevar a cabo el mismo ensayo con la cepa silvestre pero en presencia de diferentes compuestos, se observó una marcada disminución de la motilidad tipo *swarming* en presencia de la mayoría de los compuestos ensayados: cloranfenicol (antibiótico), floretina, floridzina o morina (flavonoides) (Figura 24). Es decir, se observa que, al igual que ocurría con la motilidad tipo *swimming*, determinados sustratos de la bomba MexAB-OprM reducen la motilidad *swarming* en Pph. Asimismo, el efecto de los flavonoides resultó más pronunciado en el mutante DC3000A, ya que su motilidad en superficie se redujo fuertemente en presencia de todos los compuestos ensayados; de hecho, no se observó *swarming* en presencia de indol y floridzina (Figura 24).



**Figura 24. Ensayos de motilidad tipo *swarming* con Pph y PphA.** Aproximadamente  $4 \times 10^6$  células se depositaron en el centro de placas de PG-agar (0.5%) y se incubaron a 25°C durante 48 h en ausencia (-) y presencia de los compuestos indicados a las concentraciones señaladas. Las fotografías muestran resultados representativos obtenidos a partir de tres experimentos diferentes. In, indol; Cm, cloranfenicol; Flo, floretina; Flz, floridzina; Mo, morina.

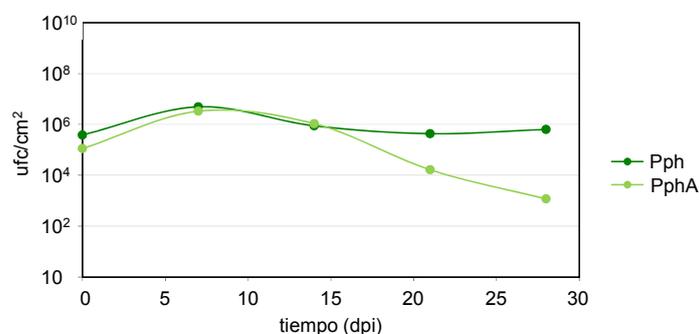
Los resultados mostrados en los apartados 1.3.1 y 1.3.2 indican que la motilidad tipo *swimming* y *swarming* disminuye en presencia de algunos flavonoides como floretina, floridzina y morina, así como en presencia de cloranfenicol e indol. Estos compuestos son sustratos de la bomba MexAB-OprM, lo que resulta interesante, ya que en el mutante carente de la bomba, esta reducción de la motilidad es más evidente.

## 2. Ensayos de infección bacteriana en plantas de judía

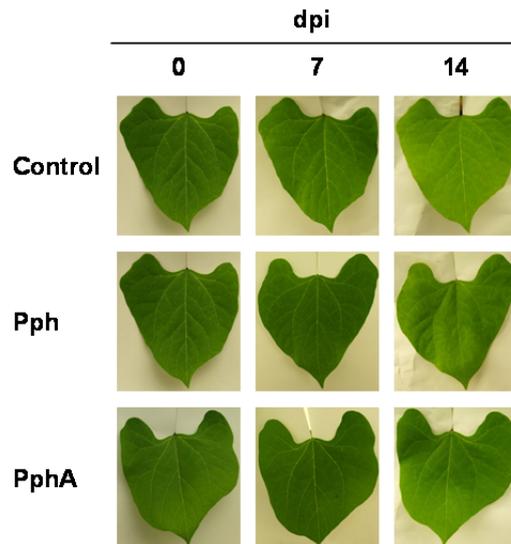
Las bacterias fitopatógenas poseen transportadores implicados en multirresistencia similares a los presentes en bacterias que infectan a humanos y a animales, pero el papel de los mismos es objeto de discusión (Martínez *et al.*, 2009; Piddock, 2006). Se ha propuesto que una posible función de las bombas RND es la eliminación de moléculas estructuralmente diferentes, como subproductos metabólicos indeseables o compuestos tóxicos para los microorganismos, lo que les permite sobrevivir en su nicho ecológico (Piddock, 2006). Así, el sistema MexAB-OprM podría contribuir al proceso patogénico de Pph 1448A y el mutante PphR podría presentar alguna ventaja respecto a la cepa silvestre durante la infección de plantas de judía ya que sobreexpresaría el transportador. Para comprobar estas hipótesis se comparó el comportamiento de la cepa silvestre y los dos mutantes PphA y PphR en hojas de judía, determinando su supervivencia y capacidad para multiplicarse en los tejidos tras su inoculación por dos métodos diferentes de inoculación: infiltración y rociado.

### 2.1. Inoculación por rociado

En este caso, la inoculación de hojas de judía (primordio) se llevó a cabo por rociado con una suspensión bacteriana a alta densidad ( $10^7$  ufc/ml) de las cepas silvestre y mutante PphA. El establecimiento inicial de las tres cepas se determinó a las 3 h post-inoculación, observándose que era similar (entre  $3,8 \times 10^5$  y  $1,12 \times 10^5$  ufc/cm<sup>2</sup>). El tamaño de las poblaciones de Pph y PphA alcanzó un máximo de  $3,3-5,0 \times 10^6$  ufc/cm<sup>2</sup> de hoja de judía y solo a partir de los 20 días fue posible observar diferencias en las tasas de crecimiento de Pph y PphA (Figura 25). Sin embargo, la infección por rociado se caracterizó por la ausencia de síntomas, ya que incluso a 14 dpi no se detectó clorosis, ni formación de lesiones acuosas ni necróticas en las hojas inoculadas (Figura 26).



**Figura 25. Evolución de las poblaciones bacterianas de Pph y PphA en hoja de judía tras su inoculación por rociado.** Unidades formadoras de colonias por cm<sup>2</sup> de hoja (ufc/cm<sup>2</sup>) a 0, 7 y 14 dpi con las cepas Pph (verde oscuro) y PphA (verde claro). Los datos representan la media de tres experimentos diferentes.



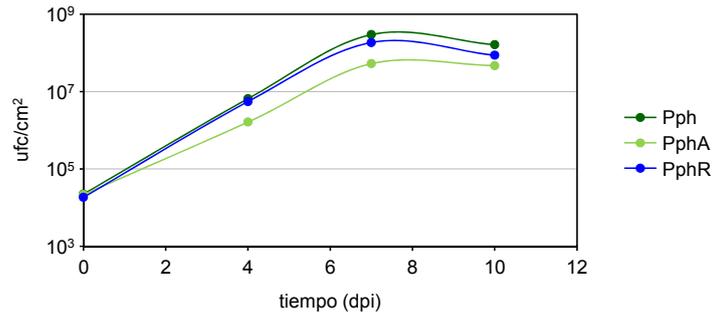
**Figura 26. Desarrollo de síntomas inducidos por Pph y PphA en hoja de judía tras su inoculación por rociado.** Las plantas fueron inoculadas con aproximadamente  $10^7$  ufc/ml de Pph y PphA; las control se rociaron con una solución de  $MgCl_2$  10 mM.

Los resultados obtenidos tras la inoculación de hojas de judía con las cepas Pph y PphA mediante rociado demostraron que este método de inoculación no sirve para provocar la enfermedad, ya que las poblaciones bacterianas no consiguen multiplicarse a niveles suficientes para colonizar el apoplasto y provocar síntomas. Por tanto, este método de inoculación se dejó de utilizar en ensayos posteriores con judía.

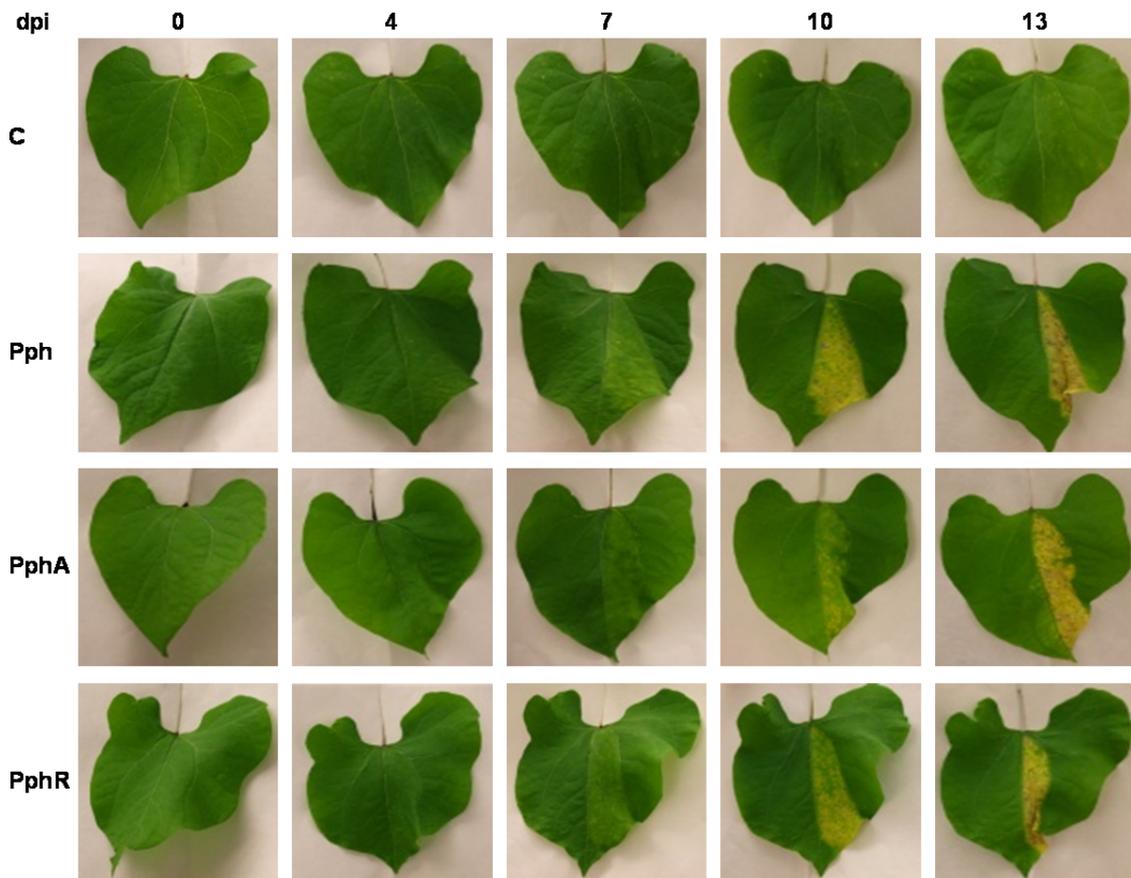
## 2.2. Inoculación por infiltración

En los ensayos de infección mediante infiltración se utilizó un título inicial del inóculo de  $10^7$  ufc/ml (alta densidad) y, en todos los casos, se llevó a cabo en los primordios y en la misma mitad de las hojas, como se explica en el apartado 8.3.1. de Materiales y Métodos. El establecimiento inicial de las tres cepas se determinó a las 3 h post-inoculación, observándose que era similar (alrededor de  $2,0 \times 10^4$  ufc/cm<sup>2</sup>). El tamaño de las poblaciones de Pph y PphR alcanzó un máximo de  $1,9-3,0 \times 10^8$  ufc/cm<sup>2</sup> de hoja de judía, mientras que la población del mutante PphA fue menor ( $5,3 \times 10^7$  ufc/cm<sup>2</sup>). A los 4 dpi ya era posible observar diferencias en las tasas de crecimiento de Pph y PphA, y después de 7 dpi el tamaño de las poblaciones de la cepa silvestre y los mutantes comenzó a disminuir aunque de forma diferente (Figur 27).

Los síntomas de la enfermedad causada por el mutante PphR eran indistinguibles de los causados por la cepa silvestre a 13 dpi y fueron consistentes con el tipo de lesión descrita para Pph (Taylor *et al.*, 1996). En ambos casos y entre 6-7 dpi aparecieron unas manchas acuosas que se tornaron cloróticas y posteriormente se desarrolló la necrosis. La clorosis inicial es menor en el caso de la inoculación con PphR. En el caso de la infección con el mutante PphA y de acuerdo con la disminución observada en los tamaños de las poblaciones, se observa un retraso en la aparición de la clorosis inicial, siendo además menos intensa con respecto a la producida por las otras cepas y no se detecta necrosis a 13 dpi (Fig 28).



**Figura 27. Evolución de las poblaciones bacterianas en hojas de judía tras infiltración con Pph, PphA y PphR.** Se determinó el número de ufc/cm<sup>2</sup> de Pph (verde oscuro), PphA (verde claro) y PphR (azul) en hojas de judía a distintos tiempos post-infección, tras infiltración con las soluciones bacterianas (10<sup>7</sup> ufc/ml). Los datos representan el promedio de cinco experimentos diferentes.



**Figura 28. Sintomatología inducida en hojas de judía por Pph y sus mutantes a distintos tiempos post-infección.** Plantas control infiltradas con MgCl<sub>2</sub> 10 mM (C). La cepa silvestre Pph y los mutantes PphA y PphR fueron inoculadas a aproximadamente 2×10<sup>7</sup> ufc/ml.

Estos resultados indican que la pérdida del sistema MexAB-OprM provoca una disminución en la capacidad de Pph para colonizar las plantas de judía. Sin embargo, la pérdida de PmeR no tuvo ningún efecto detectable en la capacidad de la bacteria para colonizar la planta y provocar síntomas.

### 3. Ensayos de competencia *in vivo*

Se ha demostrado que algunos transportadores juegan un papel clave en la competencia de bacterias fitopatógenas con otras bacterias saprofitas y, por tanto, son importantes en el proceso de colonización de las plantas (Burse *et al.*, 2004b; Llama-Palacios *et al.*, 2002). Para estudiar si este era el caso del transportador MexAB-OprM, se realizaron ensayos de competencia entre la cepa silvestre y el mutante deficiente en la bomba.

#### 3.1. Curvas de crecimiento en medio líquido

En primer lugar y con el fin de descartar que la cepa mutante PphA presentara una deficiencia en su crecimiento, se comparó su crecimiento en medio líquido (KB) con el de la cepa silvestre. Para ello se obtuvieron las correspondientes curvas de crecimiento de Pph y PphA (Figura 29), observándose que no existían diferencias significativas; por tanto, PphA es capaz de multiplicarse en medio líquido de forma similar a la cepa silvestre.

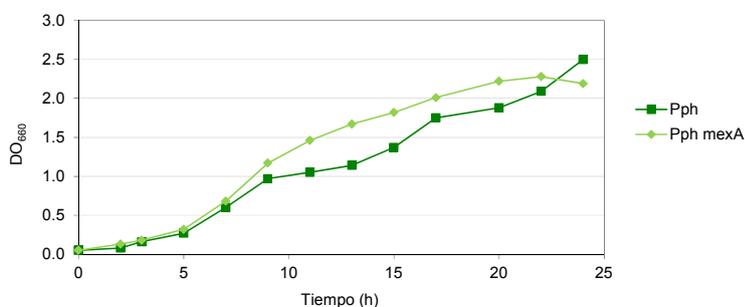
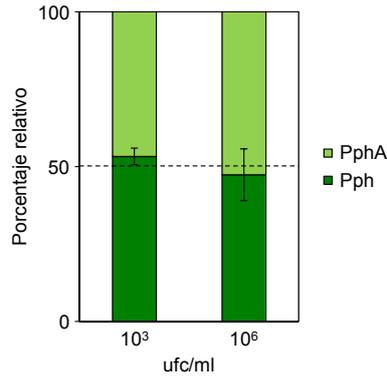


Figura 29. Curvas de crecimiento de las cepas Pph y PphA en medio líquido KB. En la gráfica se representa la absorbancia de los cultivos (DO<sub>660</sub>) frente al tiempo (en horas).

#### 3.2. Competencia en medio de cultivo

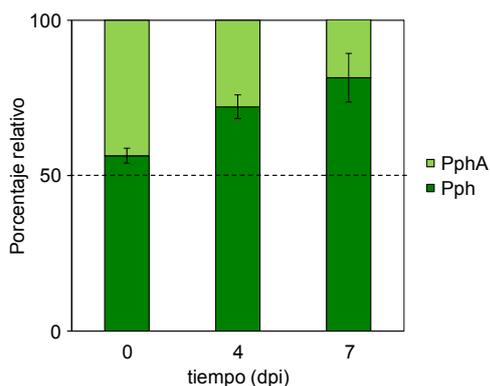
A continuación, se llevaron a cabo ensayos de competencia en medio líquido (KB) entre la cepa silvestre y el mutante PphA inoculados en una proporción 1:1, con objeto de determinar la capacidad del mutante para multiplicarse en medio de cultivo en competencia con la cepa silvestre (Figura 30). Este ensayo se realizó a dos títulos diferentes de inóculo inicial  $10^3$  ufc/ml (dosis baja) y  $10^6$  ufc/ml (dosis alta). Se observó que, después de 24 h, la población del mutante PphA representaba el 53% de la población total cuando las cepas se inocularon a  $10^3$  ufc/ml, y el 47% cuando se inocularon a  $10^6$  ufc/ml. Por tanto, el mutante PphA compite eficientemente con la cepa silvestre, tanto a dosis baja como alta; es decir, PphA es capaz de multiplicarse en medio líquido de forma similar a la cepa silvestre y competir con ella, por lo que se descarta que la pérdida del transportador MexAB-OprM tenga un efecto pleiotrópico en el mutante.



**Figura 30. Ensayos de competencia en medio de laboratorio.** Para evaluar el efecto de la dosis de inoculación sobre el crecimiento bacteriano de Pph frente a PphA, se mezclaron las cepas en proporción 1:1, se añadieron a KB a dosis baja ( $10^3$  ufc/ml) y a dosis alta ( $10^6$  ufc/ml) y se cultivaron durante 24 h a  $28^\circ\text{C}$ . Se realizaron entonces diluciones seriadas y se sembraron en placas de KB suplementadas con los antibióticos correspondientes para calcular la proporción relativa entre las cepas. Los resultados mostrados corresponden a las medias de cuatro experimentos independientes y las barras de error representan la desviación estándar.

### 3.3. Ensayos de competencia en plantas de judía

Posteriormente, se evaluó la contribución del transportador MexAB-OprM a la competencia en plantas de judía con objeto de comprobar si el mutante presentaba alguna deficiencia en supervivencia, establecimiento y/o colonización de la planta. Para ello se infiltraron las hojas con una suspensión mixta con la misma proporción (1:1) de la cepa silvestre y mutante (PphA) utilizando un título de inóculo de  $10^4$  ufc/ml (baja densidad) para permitir que ambas cepas pudieran incrementar su población y competir por la colonización del apoplasto de la hoja de judía. Se tomaron muestras a las 3 h post-inoculación para determinar el establecimiento inicial en el tejido foliar de la planta ( $t=0$ , aproximadamente  $25$  ufc/cm<sup>2</sup>), lo que permitió una cuantificación precisa de la posterior multiplicación de la población bacteriana. Se observó que el mutante de la bomba no presentó ninguna deficiencia significativa en este paso, ya que la proporción de las poblaciones mutante frente al total fue del 43,6%, valores cercanos a la proporción del 50% fijada en el inóculo inicial. A los 4 y 7 dpi se realizaron de nuevo recuentos de las cepas y en estos tiempos si se obtuvieron diferencias claras entre la cepa silvestre y el mutante, ya que la población de PphA resultó ser el 28% de la total a 4 dpi y el 19% a 7 dpi (Figura 31). Por tanto, la pérdida del transportador MexAB-OprM provoca una disminución en la colonización de la judía por Pph, efecto que se magnifica al competir con la cepa silvestre.



**Figura 31. Ensayos de colonización competitiva de Pph y PphA en hojas de judía.** Los primordios de plantas de judía se inocularon artificialmente por infiltración con una suspensión bacteriana ( $\approx 8 \times 10^4$  ufc/ml) que contenía la misma proporción de la cepa silvestre y el mutante (PphA). La proporción inicial (0 dpi) entre las cepas se determinó en muestras tomadas de las hojas 3 h después de la inoculación. Asimismo, se determinaron el número de unidades formadoras de colonia por unidad de área (ufc/cm<sup>2</sup>) a 4 y 7 dpi. En los gráficos se representan las medias de cinco ensayos independientes con al menos tres plantas; las barras de error representan la desviación estándar.

## 4. Estudio de la infección bacteriana con técnicas no invasivas de imagen en plantas de judía y tomate

El uso simultáneo de varias técnicas de imagen (MCFI, Termografía, Chl-FI) para el diagnóstico del estrés vegetal es en la actualidad una potente herramienta en el estudio y la cuantificación de la respuesta de una planta frente a un estrés biótico o abiótico (Chaerle *et al.*, 2004, 2007a). En este trabajo utilizaremos la fluorescencia multiespectral (MCFI) para analizar la virulencia de las cepas silvestre de *P. syringae*, comparándola con la de las respectivas cepas mutantes en dos sistemas planta-patógeno: *Phaseolus vulgaris* cv. Canadian Wonder-*P. syringae* pv. phaseolicola 1448A y *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker-*P. syringae* pv. tomato DC3000. Se utilizaron las cepas bacterianas silvestres y mutantes carentes del sistema MexAB-OprM y del regulador PmeR y se analizó la respuesta de las plantas hospedadoras a la cepa silvestre en comparación con sus mutantes.

### 4.1. Sistema *P. vulgaris* cv. Canadian Wonder-*P. syringae* pv. phaseolicola 1448A

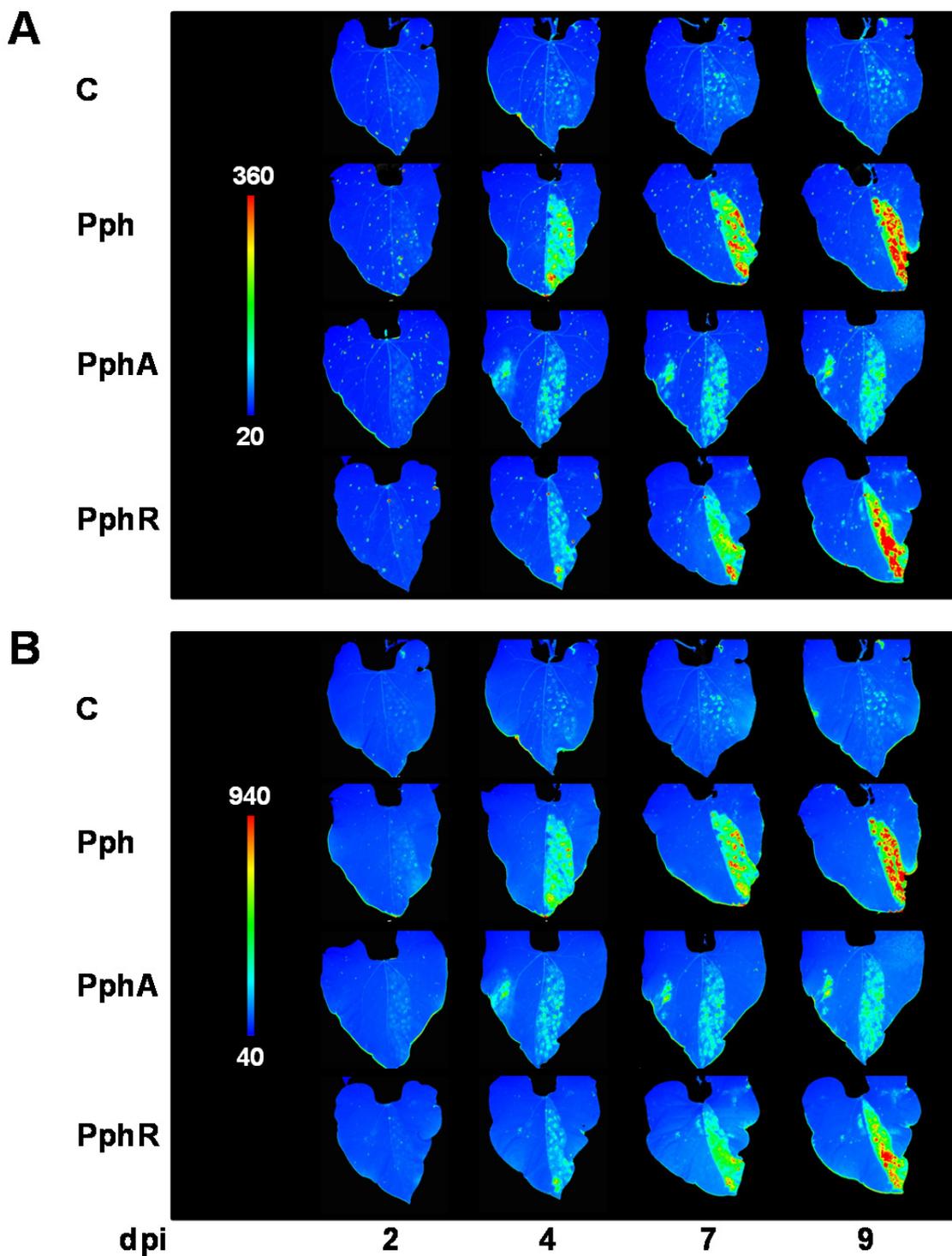
Para llevar a cabo estos experimentos, infiltramos plantas de judía con cada una de las cepas (Pph, PphA y PphR) a  $10^7$  ufc/ml y plantas control con  $MgCl_2$  10 mM. Se realizaron 4 réplicas por experimento, como está descrito en el apartado 8.3.1. de Materiales y Métodos, y se llevó a cabo un seguimiento de la sintomatología (Figura 28) a 2, 4, 7 y 9 días post-inoculación (dpi), comparando finalmente mediante MCFI la respuesta de la planta frente a cada una de las cepas. La captura de imágenes de fluorescencia verde-azul (F520-F440, *BGF imaging*) y fluorescencia roja (F690, F740, *Chl-F imaging*) para todas las medidas se llevó a cabo con el Open FluorCam FC 800-O (Photon Systems Instruments, Brno, Czech Republic), descrito en la sección 9.1. de Materiales y Métodos.

Los patrones foliares de fluorescencia verde-azul (BGF) muestran un aumento significativo de ambas emisiones en la zona infiltrada (Figura 32) con las cepas silvestre y mutantes de Pph, aunque este aumento se diferenciaba en tiempo y magnitud según la cepa. Este efecto es muy evidente a 4 dpi (presintomático), siendo más intenso en la infección con la cepa silvestre. A 9 dpi el incremento en F440 y F520 es similar en las zonas inoculadas con Pph y PphR, siendo mucho menor en las infiltradas con PphA. Las diferencias en estos patrones de fluorescencia foliares son muy evidentes desde los 7 dpi.

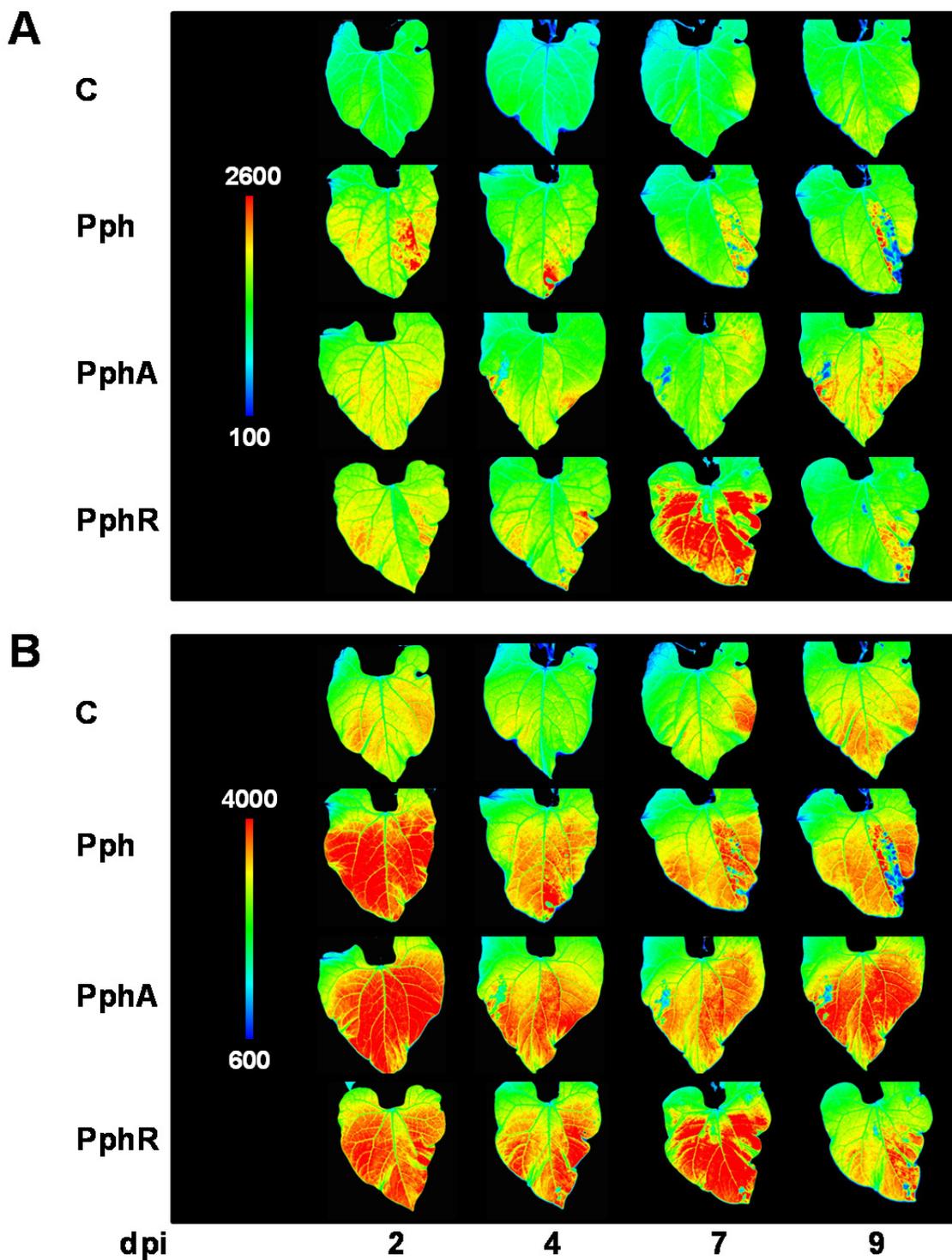
Las emisiones de fluorescencia en el rojo (F690) y en el rojo lejano (F740), que indican las variaciones en el contenido de la clorofila, no mostraron una tendencia clara que nos permitiera identificar algún aspecto significativo y diferenciable entre las plantas infectadas con cada una de las tres cepas (Figura 33).

Los cocientes F440/690, F440/740, F520/690, F520/740 son en algunos casos buenos indicadores de estrés, resultando también de utilidad para el seguimiento de las interacciones planta-patógeno, ya que los patrones foliares de estos parámetros suelen exacerbar las diferencias observadas en los de las emisiones individuales de fluorescencia. Esto sucede con los cocientes F440/690 y F440/740 (Figura 34), en los que se incrementan las diferencias entre la infección con Pph y PphR frente a la infección con PphA, pareciendo la respuesta de la planta frente a la invasión por el patógeno como mayor en el caso de Pph y PphR que en el de PphA.

De los patrones foliares resultado de las medidas de MCFI, es en el de los cocientes F520/690 y F520/740 (Figura 35) donde los cambios en el hospedador son más drásticos. Estos patrones son similares para la infección con Pph y PphR a 9 dpi, mostrando valores más elevados en las zonas inoculadas que en el caso de PphA; diferencia esta que se marca desde los 7dpi. Los cambios a 4 y 7 dpi por PphA son mayores que los mostrados en F520.



**Figura 32. Patrones foliares de fluorescencia verde-azul de plantas de judía.** Se inocularon ( $2 \times 10^7$  ufc/ml) plantas de judía con Pph y los mutantes PphA y PphR; las plantas control (C) se infiltraron con  $MgCl_2$  10 mM. Imágenes de fluorescencia: A. Azul (440 nm) y B. Verde (520 nm).



**Figura 33. Patrones foliares de fluorescencia roja de plantas de judía.** Se inocularon ( $2 \times 10^7$  ufc/ml) plantas de judía con Pph y los mutantes PphA y PphR; las plantas control (C) se infiltraron con  $MgCl_2$  10 mM. Imágenes de fluorescencia: A. Roja (690 nm) y B. Rojo lejano (740 nm).

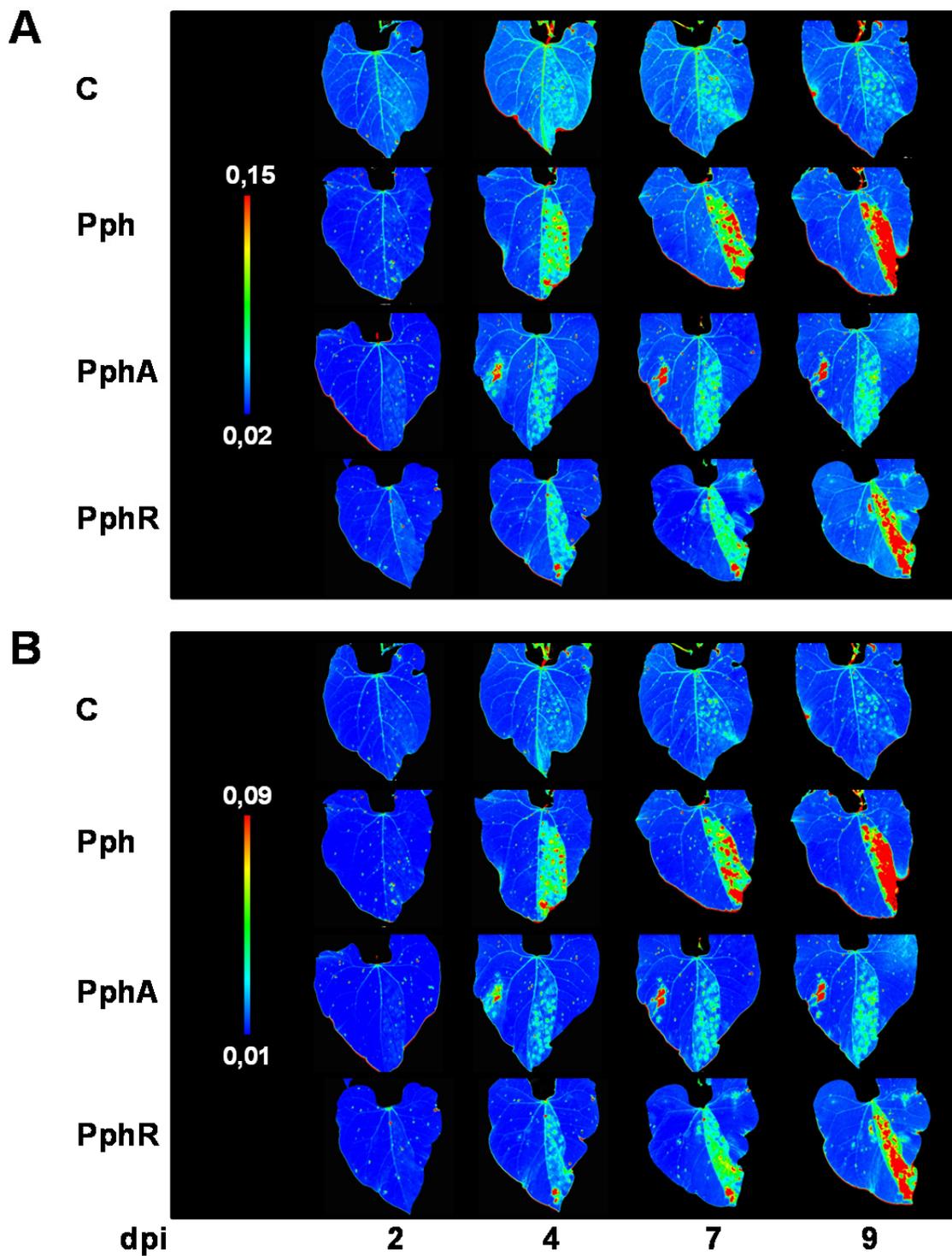


Figura 34. Patrones foliares de cocientes de emisiones de fluorescencia de plantas de judía. Se inocularon ( $2 \times 10^7$  ufc/ml) plantas de judía con Pph y los mutantes PphA y PphR; las plantas control (C) se infiltraron con  $MgCl_2$  10 mM. Imágenes: A. F440/690 y B. F440/740.

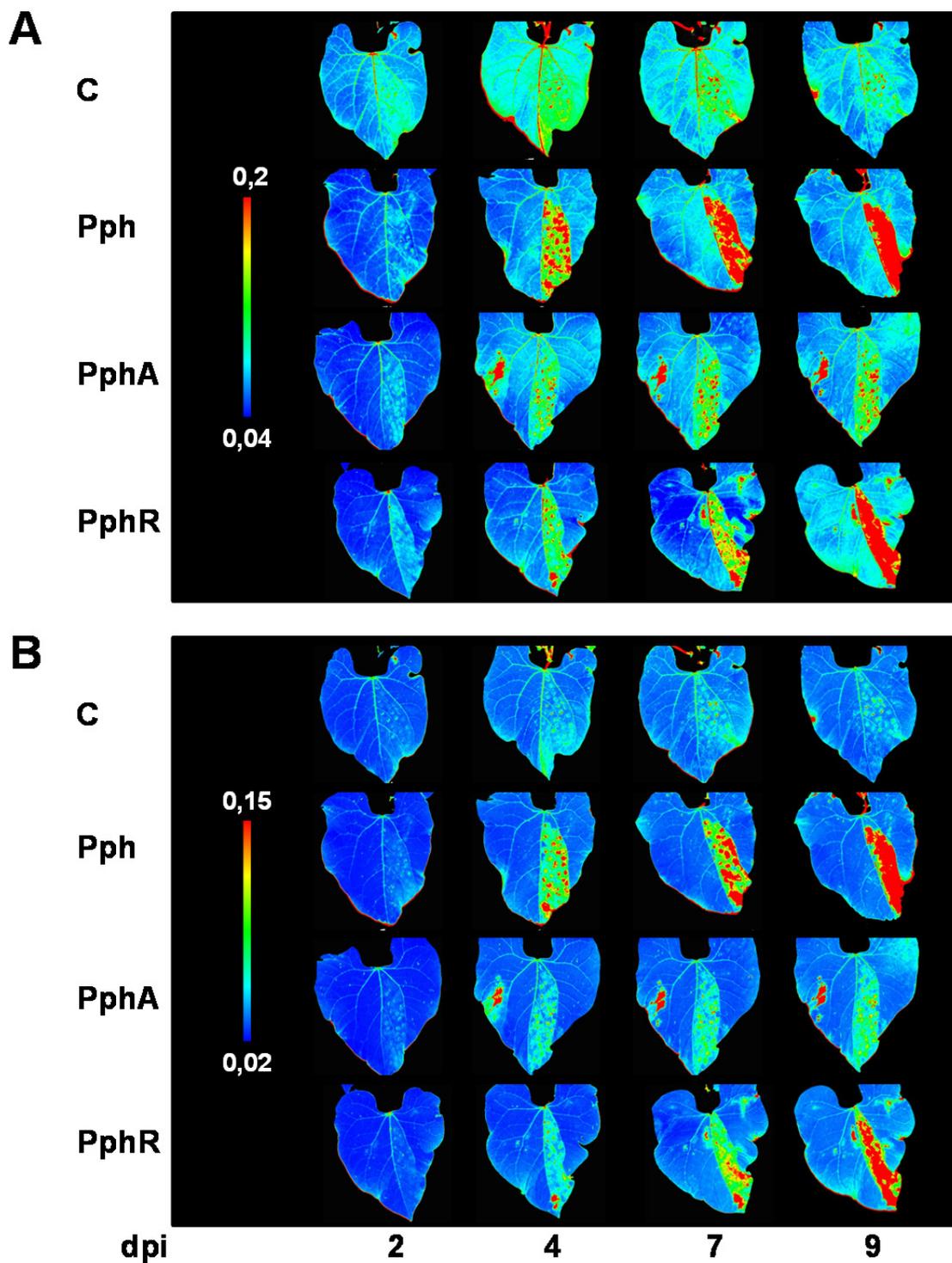
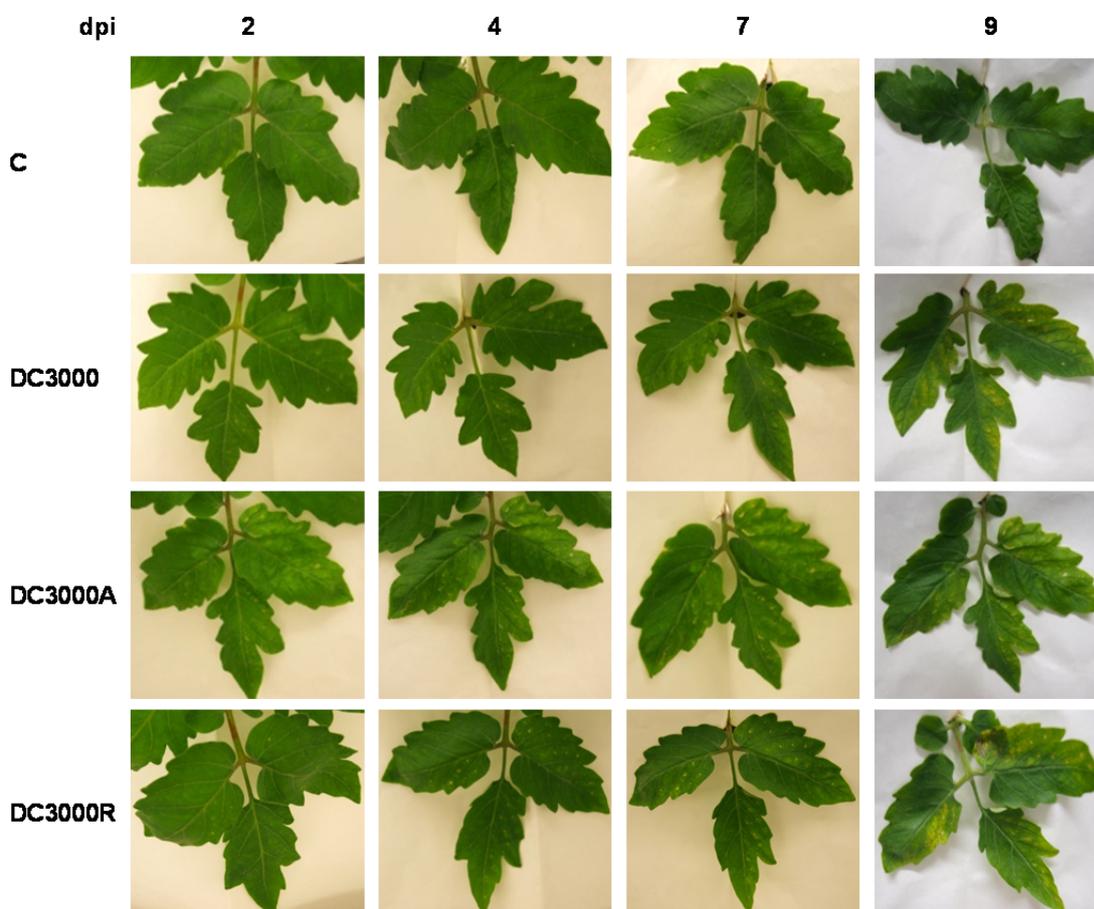


Figura 35. Patrones foliares de cocientes de emisiones de fluorescencia de plantas de judía. Se inocularon ( $2 \times 10^7$  ufc/ml) plantas de judía con Pph y los mutantes PphA y PphR; las plantas control (C) se infiltraron con  $MgCl_2$  10 mM. Imágenes: A. F520/690 y B. F520/740.

#### 4.2. Sistema *S. lycopersicum* variedad MoneyMaker-*P. syringae* pv. tomato DC3000

En este estudio hicimos uso de los mutantes de Pto DC3000 carentes de la bomba MexAB-OprM y de su regulador PmeR obtenidos por Vargas *et al.* (2011), con el objetivo de comparar la implicación de esta bomba en la respuesta de defensa de la planta frente a estos patógenos en dos sistemas planta-patógeno diferentes. Los ensayos de infección se llevaron a cabo en plantas de tomate mediante infiltración a baja densidad ( $10^4$  ufc/ml), como se explica en el apartado 8.3.1. de Materiales y Métodos. Se analizó a distintos dpi la virulencia de la cepa silvestre (DC3000) comparándola con la de los mutantes DC3000A (carente de la bomba) y DC3000R (mutante en el regulador transcripcional) y se hizo la captura de imágenes de fluorescencia a la vez que se realizaba el seguimiento de la sintomatología.

Se pudo observar que la cepa silvestre DC3000 y los mutantes mencionados producen en el huésped una sintomatología característica basada en una clorosis inicial del tejido y una posterior necrosis (Figura 36). La clorosis es evidente a los 4 dpi y la necrosis aparece como pequeños puntos necróticos que se hacen evidentes a los 9 dpi en las plantas infectadas con DC3000 y DC3000R.

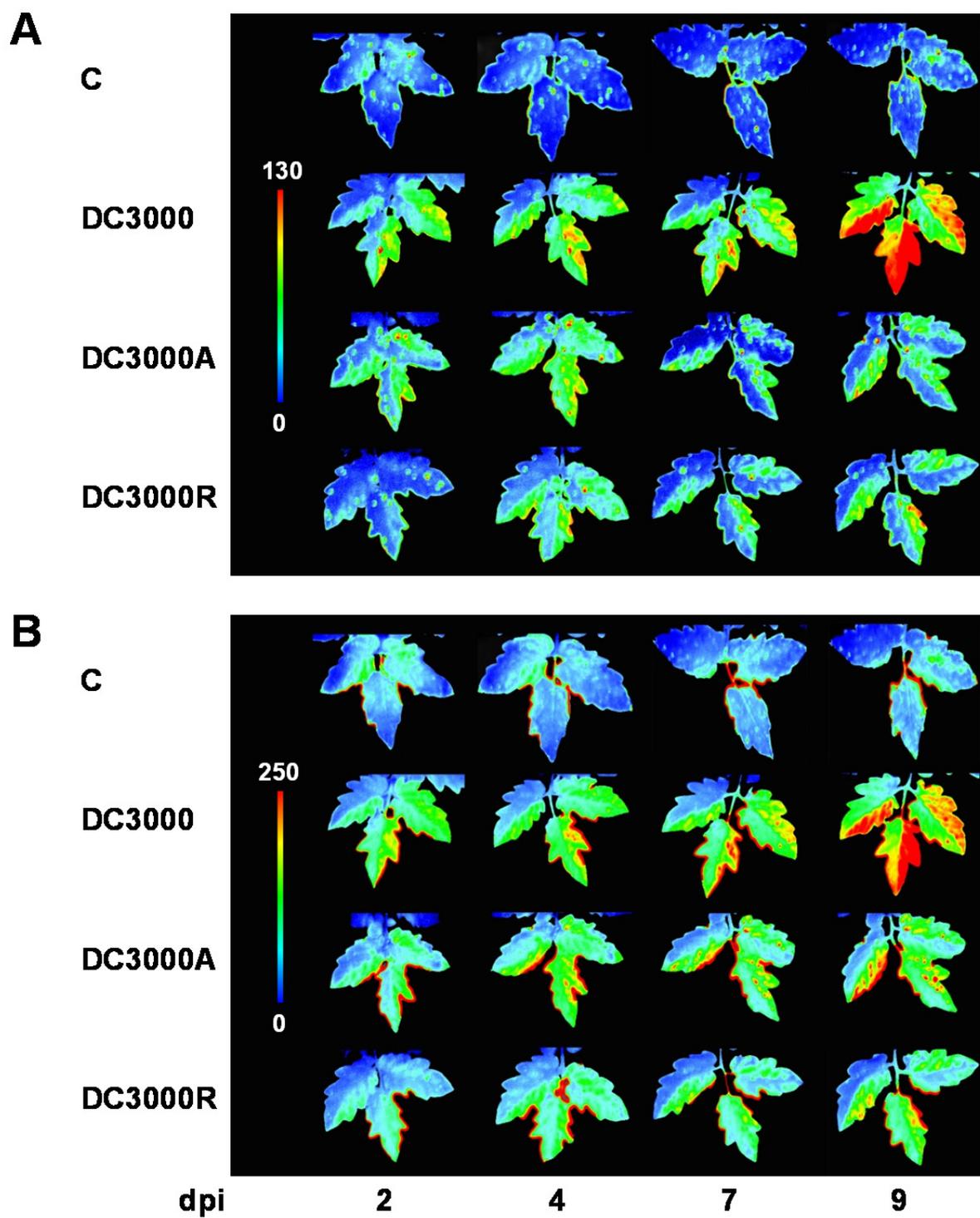


**Figura 36. Sintomatología inducida en hojas de tomate por Pto DC3000 y sus mutantes a distintos tiempos post-infección.** Plantas inoculadas con aproximadamente  $3 \times 10^4$  ufc/ml con DC3000, los mutantes DC3000A (A) y DC3000R (R); las plantas (C) control se infiltraron con  $MgCl_2$  10 mM.

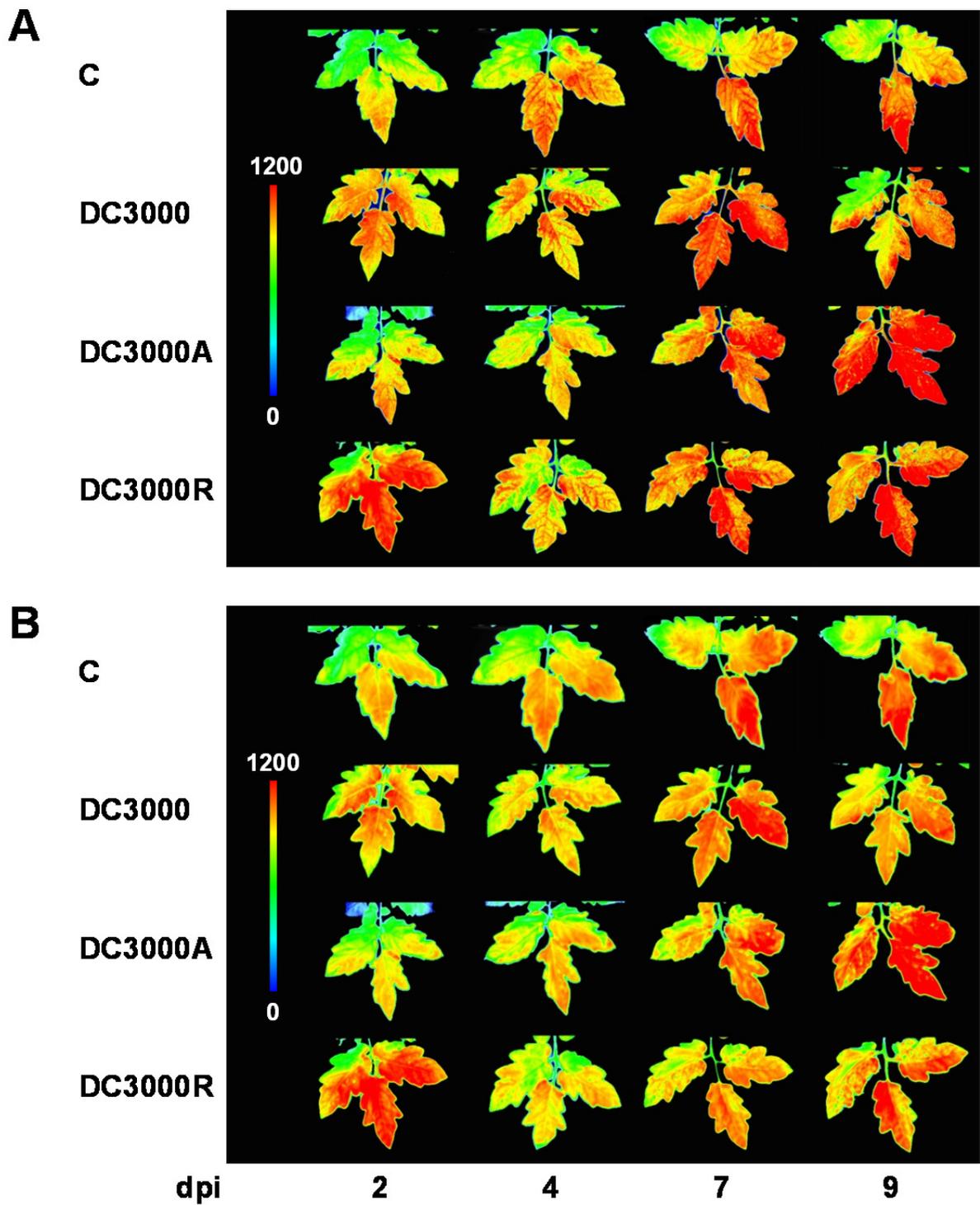
En los patrones foliares de fluorescencia se observó un incremento de las emisiones en el azul (F440) y en el verde (F520), con respecto a las plantas control, en la zona inoculada con cada cepa, desde los 2 dpi. Este incremento se hizo muy evidente en las plantas inoculadas con DC3000 a los 9 dpi (Figura 37),

siendo mucho menor la intensidad en la señal de fluorescencia observada en las plantas infiltradas con DC3000A y DC3000R. Las emisiones de fluorescencia en el rojo (F690) y rojo lejano (F740) no presentaron un patrón diferencial entre las plantas infectadas con cada cepa y las plantas control durante todo el experimento (Figura 38).

Los patrones foliares de los cocientes  $F440/690$  y  $F440/740$  (Figura 39) también muestran un incremento de estos valores, respecto a los controles, en las zonas inoculadas con la cepa silvestre y sus mutantes, evidente desde los 2 dpi (presintomático) para la infección con DC3000 y DC3000A. Entre 4-7 dpi es similar el aumento en estos cocientes inducido por las tres cepas bacterianas, con una tendencia al incremento para la cepa salvaje. A 9 dpi, los elevados valores de  $F440/690$  y  $F440/740$  por la inoculación con DC3000 contrastan con los más bajos inducidos por las cepas mutantes. El incremento de estos cocientes exagera las diferencias observadas en las emisiones verde-azul entre las distintas plantas infiltradas. Los patrones foliares de los cocientes  $F520/690$  y  $F520/740$  (Figura 40), presentan una tendencia similar.



**Figura 37. Patrones foliares de fluorescencia azul y verde de plantas de tomate.** Plantas control (C) e inoculadas ( $3 \times 10^4$  ufc/ml) con la cepa silvestre (DC3000) y los mutantes DC3000A y DC3000R. Imágenes de fluorescencia: A. Azul (440 nm) y B. Verde (520 nm).



**Figura 38. Patrones foliares de fluorescencia de plantas de tomate.** Plantas control (C) e inoculadas ( $3 \times 10^4$  ufc/ml) con la cepa silvestre (DC3000) y los mutantes DC3000A y DC3000R. Imágenes de fluorescencia: A. Roja (690 nm) y B. Rojo lejano (740 nm).

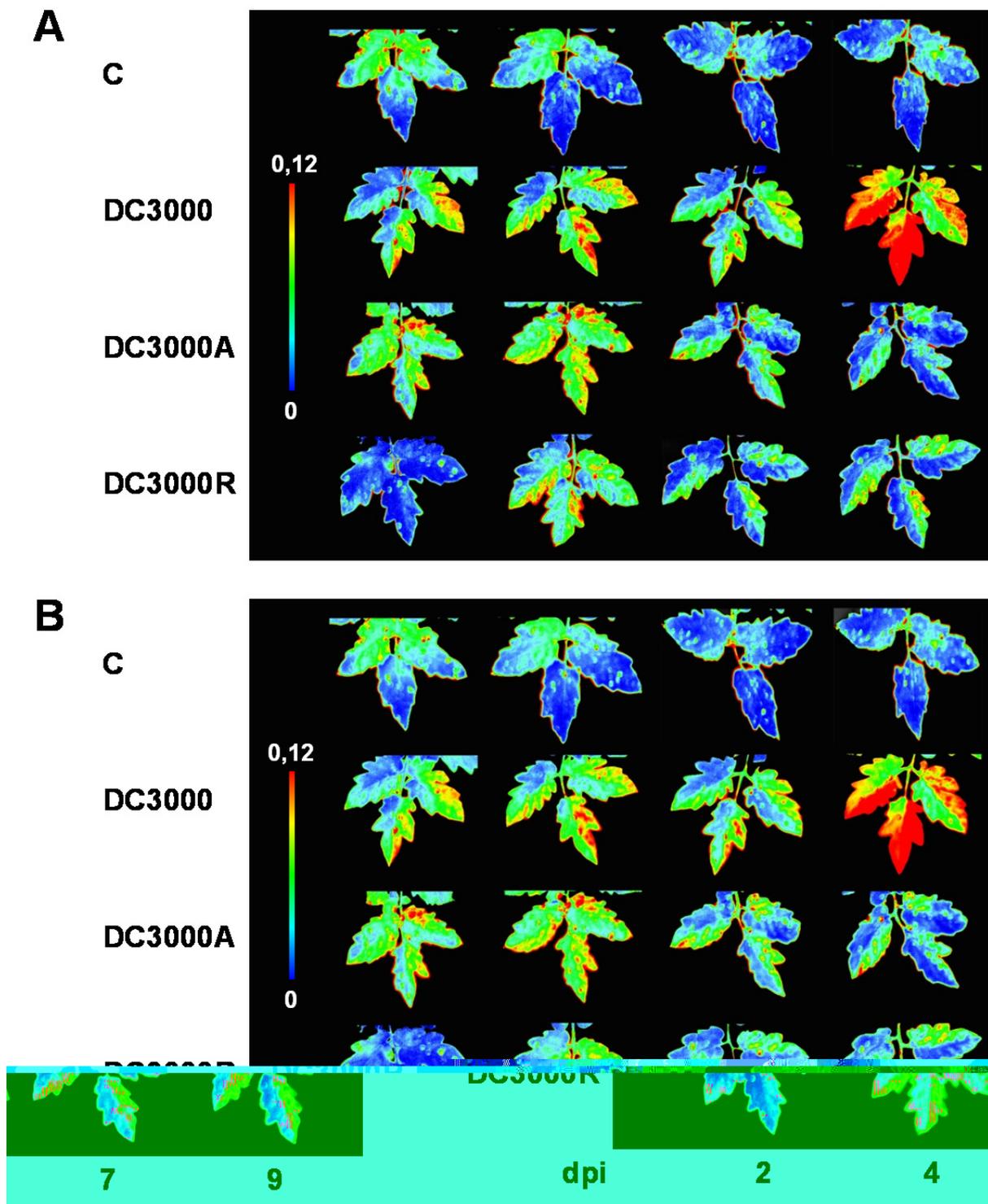


Figura 39. Patrones foliares de los cocientes de fluorescencia de plantas de tomate. Plantas control (C) e inoculadas ( $3 \times 10^4$  ufc/ml) con la cepa silvestre (DC3000) y los mutantes DC3000A y DC3000R. Imágenes: A. F440/690 y B. F440/740.

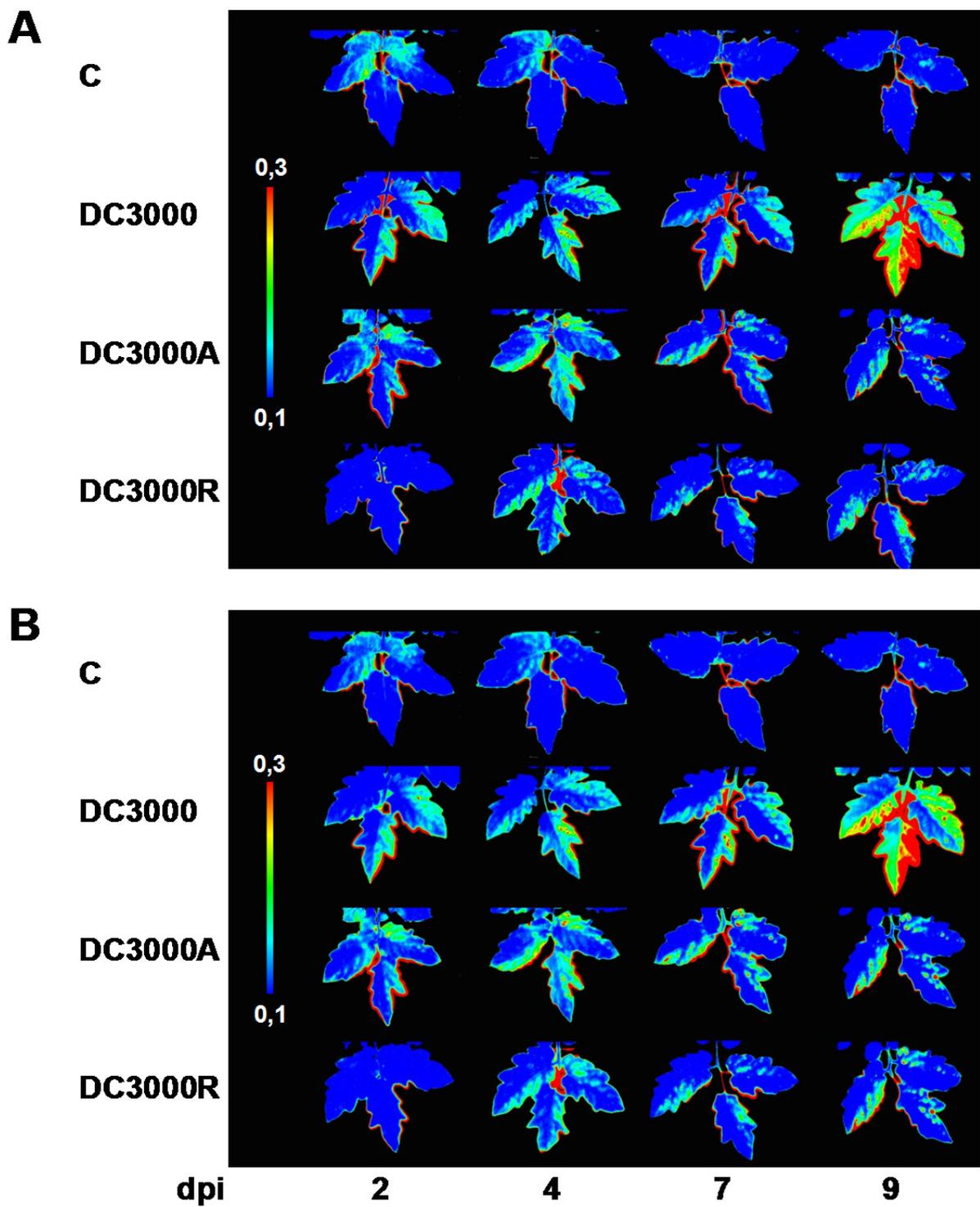


Figura 40. Patrones foliares de cocientes de fluorescencia de plantas de tomate. Plantas control (C) e inoculadas ( $3 \times 10^4$  ufc/ml) con la cepa silvestre (DC3000) y los mutantes DC3000A y DC3000R. Imágenes: A. F520/690 y B. F520/740.



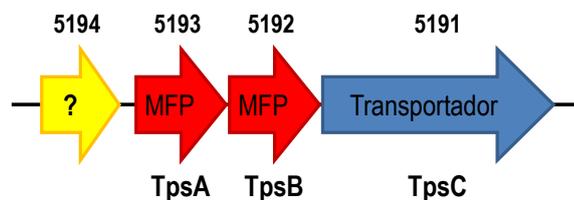
**Capítulo 2. Obtención y caracterización de mutantes del transportador  
TpsABC en *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000**



Mediante mutagénesis generalizada al azar con *Tn5* en Pto DC3000 se obtuvo en nuestro laboratorio un mutante en el ORF PSPTO\_5191 (H. Prada, resultados no publicados). PSPTO\_5191 está anotado como *AcrB/AcrD/AcrF family protein*; es decir, es un putativo transportador que pertenece a la superfamilia de transportadores bacterianos de tipo RND. Estos transportadores normalmente forman parte, junto con una proteína de fusión (MFP, *membrane fusion protein*) y una proteína de membrana externa (OMP, *outer membrane protein*), de un sistema tripartito localizado entre la membrana plasmática y la membrana externa en bacterias Gram-negativas (Eswaran *et al.*, 2004; Murakami *et al.*, 2006). Dado que este transportador no estaba caracterizado, en primer lugar y con el objetivo de obtener información sobre su posible función y la de los genes adyacentes, se llevó a cabo un análisis bioinformático de esas secuencias.

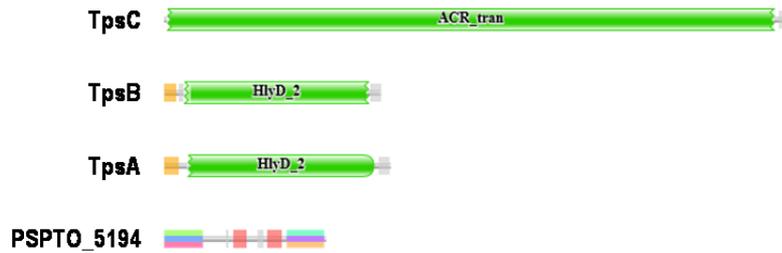
## 1. Caracterización *in silico* del transportador TpsABC

Estudiando la organización génica de PSPTO\_5191 y los marcos de lectura adyacentes, observamos que en 5' aparecen dos ORFs (PSPTO\_5192 y PSPTO\_5193) que codifican para dos proteínas de tipo MFP y, a continuación, una proteína hipotética sin dominios conocidos (PSPTO\_5194), pero no existe ninguna ORF en las cercanías que pudiera actuar como OMP ni ningún regulador transcripcional (Figura 41) Se denominó al sistema transportador compuesto por las ORFs PSPTO\_5191, PSPTO\_5192 y PSPTO\_5193, **TpsABC** (de *transportador de Pseudomonas syringae*, en el que TpsC (PSPTO\_5191) es el componente transportador que llevaría asociadas dos MFPs: TpsA (PSPTO\_5193) y TpsB (PSPTO\_5192).



**Figura 41. Representación de la organización génica de TpsABC en DC3000.** Las flechas anchas muestran la dirección de la transcripción de los distintos marcos abiertos de lectura y dentro de ellas se indica las posibles funciones: proteína de fusión (MFP) y transportador de tipo RND. ? indica función desconocida.

Los dominios funcionales de una proteína determinan su actividad, por lo que procedimos a identificar los posibles dominios presentes en las proteínas TpsA, TpsB y TpsC para intentar determinar su posible implicación en detoxificación, supervivencia o virulencia (Figura 42).



**Figura 42. Organización en dominios de las proteínas TpsABC y PSPTO\_5194 según Pfam.** *Acr\_tran* es un dominio proteico presente en transportadores de membrana interna implicados en la resistencia a diferentes compuestos antimicrobianos que actúan en colaboración con una proteína de fusión y otra de membrana externa (Murakami *et al.*, 2002); *HlyD\_2* es un dominio presente en proteínas periplásmicas que permiten el acoplamiento entre las proteínas de membrana interna y externa para la formación de los sistemas tripartitos de extrusión (Wallace *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2012). En PSPTO\_5194 Pfam solo predice dos segmentos transmembrana (en rojo); los otros dominios (multicolor) no parecen tener ni estructura ni función conocida.

### 1.1. TpsC

El gen *tpsC* codifica una proteína de 1033 aminoácidos que posee, según Pfam, un dominio *Acr\_tran* característico de proteínas de membrana implicadas en resistencia y presente en otros transportadores como AcrB, AcrD o AcrF de *P. aeruginosa* (Nikaido *et al.*, 2001; Murakami *et al.*, 2002; Seeger *et al.*, 2008; Figura 42).

La búsqueda y comparación de la secuencia de TpsC de Pto DC3000 con otras secuencias disponibles en las bases de datos permitió establecer que este transportador era más de un 93% idéntico en secuencia de aminoácidos al de otras cepas del complejo *P. syringae*, como *P. syringae* pvs. *syringae* y *phaseolicola* o *P. cichorii* (Tabla 13). Se encuentran ortólogos de este transportador también en distintas cepas de *Pseudomonas*, como *P. poae*, en varias cepas de *P. fluorescens* (SBW25, A506 o F113), *P. protegens* (CHA0 o Pf-5), *P. brassicacearum*, *P. entomophila* o *P. monteillii* o *P. putida*, todos con más del 80% de identidad. Se debe mencionar que esos transportadores no han sido caracterizados en ninguna de las cepas, por lo que se desconoce su función. Con un porcentaje menor de identidad, TpsC es ortólogo a TriC de *P. aeruginosa* (76% de identidad), que está implicado en la resistencia intrínseca y adquirida frente al biocida triclosan (Mima *et al.*, 2007). TpsC también es similar a otras proteínas anotadas como proteínas de resistencia a acriflavina, transportadores RND o de la familia AcrB/AcrD/AcrF en *Methylobacterium nodulans*, *Mesorhizobium loti*, *Azospirillum brasilense*, *Rhizobium etli* y *leguminosarum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Serratia* sp., *Burkholderia* sp. y *Vibrio cholerae*. De todos ellos, solo se sabe que ZrpB (Ser39006\_1997), de *Serratia* sp., está implicado en la resistencia a carbapenem y prodigiosin (Gristwood *et al.*, 2008) y VexK (VC1673), de *Vibrio cholerae*, proporciona resistencia frente a detergentes y sales biliares, permitiendo la colonización de ciertos nichos (Bina *et al.*, 2008).

**Tabla 13. Proteínas ortólogas a TpsC de Pto DC3000.** Los análisis se llevaron a cabo utilizando Blastn y Blastp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) con la secuencia de nucleótidos y aminoácidos, respectivamente, de *tpsC*. Las proteínas están ordenadas de mayor a menor por porcentaje de identidad.

Cepa	ORF	Descripción	% identidad	%similitud
<i>Pseudomonas syringae</i>				
pv. <i>syringae</i> B728a	Psyr_0346	Proteína de secreción HlyD	98	99
pv. <i>phaseolicola</i> 1448A	PSPPH_0329	Transportador RND	97	99
<i>P. cichorii</i> JBC1	PCH70_03360	Transportador AcrB/AcrD/AcrF	93	96
<i>P. poae</i> RE 1-1-14	H045_22080	Transportador putative	88	93
<i>P. fluorescens</i>				
SBW25	PFLU0234	Lipoproteína	88	94
F113	PSF113_0240	Transportador RND	86	92
<i>P. protegens</i> CHA0	PFLCHA0_c02390	Proteína de multiresistencia MdtB	86	93
<i>P. brassicacearum</i> subsp. <i>brassicacearum</i> NFM421	PSEBR_a239	Proteína de membrana implicada en transporte	85	92
<i>P. entomophila</i> L48	PSEEN5287	Transportador de resistencia múltiple tipo Acr	81	89
<i>P. montellii</i> SB3101	X970_24450	Transportador de la familia Acr	80	89
<i>P. putida</i>				
KT2440	PP_5173	Transportador RND	80	89
F1	Pput_5080	Proteína de resistencia a acriflavina	80	89
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	PA0158	Probable transportador RND, TriC	76	87
<i>Methylobacterium nodulans</i> ORS 2060	Mnod_0734	Proteína de resistencia a acriflavina	64	79
<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099	mll5518	Transportador RND	62	76
<i>Azospirillum brasilense</i> Sp245	AZOBR_40440	Putativo componente de sistema de eflujo	61	77
<i>Rhizobium etli</i> CFN 42	RHE_PF00284	Probable transportador	59	76
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> CB782	RLEG12_03900	Transportador de la familia Acr	59	76
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58	Atu3795	Proteína de la familia AcrB/AcrD/AcrF	59	76
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110	bll7019	Proteína de la familia AcrB/AcrD/AcrF	58	75
<i>Serratia</i> sp. ATCC39006	Ser39006_1997	Proteína de resistencia a acriflavina, ZrpB	55	73
<i>Burkholderia</i> sp. CCGE 1002	BC1002_1706	Proteína de resistencia a acriflavina	46	64
<i>Vibrio cholerae</i> 01 biovar El Tor N16961	VC1673	Transportador AcrB/AcrD/AcrF, VexK	32	54

A continuación se buscaron parálogos en el genoma de Pto DC3000 (Tabla 14), encontrándose uno con unos porcentajes de identidad (69%) y similitud (82%) muy significativos: PSPTO\_3302, que es otra proteína cuya función no ha sido determinada aún. TpsC también presenta similitud, aunque menor pero todavía significativa (40% de identidad, 59% de homología), con PSPTO\_0820, lo que probablemente indica que sus sustratos son distintos.

**Tabla 14. Proteínas parálogas de TpsC en Pto DC3000.** Los análisis se llevaron a cabo utilizando la opción *paralogs* de KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>). Las proteínas están ordenadas de mayor a menor por porcentaje de identidad.

ORF	Descripción	% identidad	% similitud
PSPTO_3302	Proteína de la familia AcrB/D/F	69	82
PSPTO_0820	Proteína de la familia AcrB/D/F	40	59
PSPTO_0375	Transportador de cationes	26	45
PSPTO_2592	Proteína de resistencia a isotiocianato	25	44
PSPTO_4304	Proteína SaxB de resistencia a isotiocianato (MexB)	24	42
PSPTO_1308	Proteína de la familia AcrB/D/F	24	44
PSPTO_2755	Proteína de la familia AcrB/D/F	23	44
PSPTO_3100	Proteína de resistencia a isotiocianato	23	41

## 1.2. TpsB

El gen *tpsB* se sitúa adyacente a *tpsC* y codifica una proteína de fusión de 356 aminoácidos. TpsB posee un dominio *HlyD\_2* según Pfam, característico de proteínas implicadas en la secreción de la citotoxina hemolisina A, que provoca la lisis celular al crear poros en la membrana permitiendo a la bacteria iniciar el proceso de infección (Stanley *et al.*, 1994; Wallace *et al.*, 2000; Figura 42). Muchas de las proteínas con dominios *HlyD* forman parte de los complejos transportadores de tipo RND, se localizan en el espacio periplásmico y actúan de forma similar a AcrA: facilitando la apertura de TolC para la movilización de compuestos desde la membrana al medio externo (Lee *et al.*, 1992). La comparación de TpsB de Pto DC3000 con otras secuencias disponibles en las bases de datos permitió establecer que esta MFP era un 78-90% idéntica a la de otras cepas del complejo *P. syringae*, como *P. syringae* pvs. *syringae* y *phaseolicola* o *P. cichorii* (Tabla 15). Se encuentran ortólogos de esta MFP también en distintas cepas de *Pseudomonas*, como *P. brassicacearum*, *P. poae*, *P. fluorescens* (SBW25, A506 o F113), *P. protegens*, *P. entomophila*, *P. montellii* o *P. putida*, todos con más del 65% de identidad. Con un porcentaje menor (59% de identidad), TpsB se parece a TriB (PA0157) de *P. aeruginosa*, que está implicado, junto con TriA, TriC y OpmH en la eliminación de triclosan (Mima *et al.*, 2007). TpsB también es similar a otras proteínas anotadas como subunidades MFP, proteínas de eflujo, proteínas de secreción HlyD o proteínas periplásmicas de *M. nodulans*, *M. loti*, *A. tumefaciens*, *R. leguminosarum* y *etli*, *B. japonicum*, *A. brasilense*, *Serratia* sp., *Burkholderia* sp. y *V. cholerae* (Tabla 15). Sólo ZrpD (Ser39006\_1996) y VexJ (VC1674), que forman parte de los sistemas ZrpADBC y VexIJK, respectivamente, han sido caracterizados hasta el momento y se sabe que contribuyen a la resistencia frente al antibiótico  $\beta$ -lactámico carbapenem en *Serratia* 39006 y frente a sales biliares y detergentes en *V. cholerae* 01 biovar El Tor (Bina *et al.*, 2008; Gristwood *et al.*, 2008).

**Tabla 15. Proteínas ortólogas a TpsB de Pto DC3000.** Los análisis se llevaron a cabo utilizando Blastn y Blastp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) con la secuencia de nucleótidos y aminoácidos, respectivamente, de *tpsB*. Las proteínas están ordenadas de mayor a menor por porcentaje de identidad.

Cepa	ORF	Descripción	% identidad	%similitud
<i>Pseudomonas syringae</i>				
pv. <i>syringae</i> B728a	Psyr_0345	Proteína de secreción HlyD	90	93
pv. <i>phaseolicola</i> 1448A	PSPPH_0328	Subunidad MFP de transportador RND	86	89
<i>P. cichorii</i> JBC1	PCH70_03350	Subunidad MFP de transportador RND	78	85
<i>P. brassicacearum</i> subsp. <i>brassicacearum</i> NFM421	PSEBR_a238	Putativa lipoproteína	71	85
<i>P. poae</i> RE 1-1-14	H045_22075	Subunidad MFP de transportador RND	70	83
<i>P. fluorescens</i>				
F113	PSF113_0239	Subunidad MFP de transportador RND	70	84
SBW25	PFLU0233	Putativa lipoproteína	69	83
<i>P. protegens</i> CHA0	PFLCHA0_c02380	Subunidad MFP de transportador RND	69	81
<i>P. entomophila</i> L48	PSEEN5288	Subunidad MFP de transportador RND	66	78
<i>P. monteilii</i> SB3101	X970_24455	Transportador RND	65	80
<i>P. putida</i>				
KT2440	PP_5174	Subunidad MFP de transportador RND	65	80
F1	Pput_5081	Subunidad MFP de transportador RND	65	80
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	PA0157	Probable precursor MFP eflujo RND, TriB	59	72
<i>M. nodulans</i> ORS2060	Mnod_0735	Subunidad MFP de transportador RND	47	64
<i>M. loti</i> MAFF303099	mll5519	Subunidad MFP de transportador RND	43	63
<i>A. tumefaciens</i> C58	Atu3796	Proteína de eflujo	40	61
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> CB782	RLEG12_03895	Proteína de secreción hemolisina D	38	58
<i>R. etli</i> CFN 42	RHE_PF00285	Proteína de secreción de la familia HlyD	38	59
<i>B. japonicum</i> USDA 110	bll7020	Proteína de eflujo	37	56
<i>A. brasilense</i> Sp245	AZOBR_40439	Putativo componente de sistema RND	35	50
<i>Serratia</i> sp. ATCC39006	Ser39006_1996	Subunidad MFP de transportador RND, ZrpD	33	53
<i>Burkholderia</i> sp. CCGE 1002	BC1002_1705	Subunidad MFP de transportador RND	29	44
<i>V. cholerae</i> 01 biovar El Tor N16961	VC1674	Proteína periplásmica, VexJ	29	46

Como genes parálogos de *tpsB* se encuentran en el genoma de Pto DC3000, PSPTO\_3301, con unos porcentajes de identidad (40%) y similitud (62%) a nivel de secuencia de aminoácidos importantes, y PSPTO\_5193 (la otra MFP del putativo sistema TpsABC), PSPTO\_0821 o PSPTO\_3300, con unos porcentajes menores pero significativos (Tabla 16). Todos esos genes codifican distintas proteínas de fusión y se encuentran adyacentes a otro gen que codifica un transportador de tipo RND, formando probablemente un operón (ver más adelante).

**Tabla 16. Proteínas parálogas de TpsB en Pto DC3000.** Los análisis se llevaron a cabo utilizando la opción *paralogs* de KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>). Las proteínas están ordenadas de mayor a menor por porcentaje de identidad.

ORF	Descripción	% identidad	% similitud
PSPTO_3301	Subunidad MFP de transportador RND	40	62
PSPTO_5193	Subunidad MFP de transportador RND, TpsA	34	49
PSPTO_0821	Subunidad MFP de transportador RND	30	47
PSPTO_3300	Subunidad MFP de transportador RND	29	46
PSPTO_2831	Proteína de flujo de siringofactina, SyfC	23	39
PSPTO_3099	Subunidad MFP de transportador RND, MexE	22	36
PSPTO_1309	Proteína de secreción de la familia HlyD	20	39
PSPTO_0376	Proteína de flujo de cationes	20	34
PSPTO_2593	Proteína de resistencia múltiple de la familia AcrA/AcrE	19	34
PSPTO_2753	Proteína de secreción de la familia HlyD	17	30

### 1.3. TpsA

El gen *tpsA* se sitúa adyacente a *tpsB* y codifica otra proteína de fusión de 372 aminoácidos. Al igual que TpsB, posee un dominio proteico *HlyD\_2*, según Pfam (Figura 42). La comparación de TpsA de Pto DC3000 con otras secuencias de las bases de datos mostró que esta MFP era un 93-95% idéntica a la de *P. syringae* pvs. *syringae* y *phaseolicola* (Tabla 17). Sin embargo, TpsA y PCH70\_03340 de *P. cichorii*, la otra cepa que pertenece al complejo *P. syringae*, solo presentan un 87% de identidad. También se encuentran ortólogos de esta MFP en otras cepas de *Pseudomonas*, como *P. poae*, *P. fluorescens*, *P. protegens*, *P. brassicacearum*, *P. entomophila*, *P. putida* o *P. monteilii*, todos con más del 63% de identidad. Con un porcentaje menor, TpsA también se parece a TriA (PA0156) de *P. aeruginosa* (56% de identidad), que está implicada, junto con TriB, TriC y OpmH en la resistencia a triclosan (Mima *et al.*, 2007). TpsA también es similar a otras proteínas anotadas como MFPs en *M. loti*, *A. tumefaciens*, *R. etli*, *R. leguminosarum*, *A. brasilense*, *M. nodulans*, *B. japonicum*, *Serratia* sp., *Burkholderia* sp., y *V. cholerae* (Tabla 17). De estas proteínas, se han caracterizado ZrpA (Ser39006\_1995) y VexI (VC1675) que, como se ha comentado anteriormente, forman parte de los sistemas ZrpADBC y VexIJK de *Serratia* 39006 y *V. cholerae* 01 biovar El Tor, respectivamente (Bina *et al.*, 2008; Gristwood *et al.*, 2008).

**Tabla 17. Proteínas ortólogas a TpsA de Pto DC3000.** Los análisis se llevaron a cabo utilizando Blastn y Blastp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) con la secuencia de nucleótidos y aminoácidos, respectivamente, de *tpsA*. Las proteínas están ordenadas de mayor a menor por porcentaje de identidad.

Cepa	ORF	Descripción	%identidad	%similitud
<i>P. syringae</i>				
<i>pv. syringae</i> B728a	Psyr_0344	Proteína de secreción HlyD	95	97
<i>pv. phaseolicola</i> 1448A	PSPPH_0327	Subunidad MFP de transportador RND	93	96
<i>P. cichorii</i> JBC1	PCH70_03340	Subunidad MFP de transportador RND	87	91
<i>P. poae</i> RE 1-1-14	H045_22070	Subunidad MFP de transportador RND	72	79
<i>P. fluorescens</i>				
SBW25	PFLU0232	Putativa lipoproteína	69	77
F113	PSF113_0238	Subunidad MFP de transportador RND	68	79
<i>P. protegens</i> CHA0	PFLCHA0_c02370	Subunidad MFP de transportador RND	69	75
<i>P. brassicacearum</i> subsp. <i>brassicacearum</i> NFM421	PSEBR_a237	Putativa lipoproteína	68	80
<i>P. entomophila</i> L48	PSEEN5289	MFP de transportador RND putativo	66	76
<i>P. putida</i>				
KT2440	PP_5175	Proteína de secreción de la familia HlyD	64	73
F1	Pput_5082	Subunidad MFP de transportador RND	63	73
<i>P. monteilii</i> SB3101	X970_24460	Transportador RND	63	74
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	PA0156	Precursor de MFP de probable RND, TriA	56	69
<i>M. loti</i> MAFF303099	mll5520	MFP de transportador RND	43	61
<i>A. tumefaciens</i> C58	Atu3797	Proteína de secreción de la familia HlyD	42	57
<i>R. etli</i> CFN42	RHE_PFO0286	Proteína de secreción de la familia HlyD	41	57
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> CB782	RLEG12_03890	Proteína de resistencia a acriflavina	41	57
<i>A. brasilense</i> Sp245	AZOBR_40438	Putativo componente de sistema RND	39	53
<i>M. nodulans</i> ORS2060	Mnod_0736	Subunidad MFP de transportador RND	38	54
<i>B. japonicum</i> USDA 110	blj7021	Proteína de secreción de la familia HlyD	38	54
<i>Serratia</i> sp. ATCC39006	Ser39006_1995	Subunidad MFP de transportador RND, ZrpA	36	53
<i>Burkholderia</i> sp. CCGE 1002	BC1002_1705	Subunidad MFP de transportador RND	32	45
<i>V. cholerae</i> 01 biovar El Tor N16961	VC1675	Proteína de resistencia múltiple, Vexl	25	42

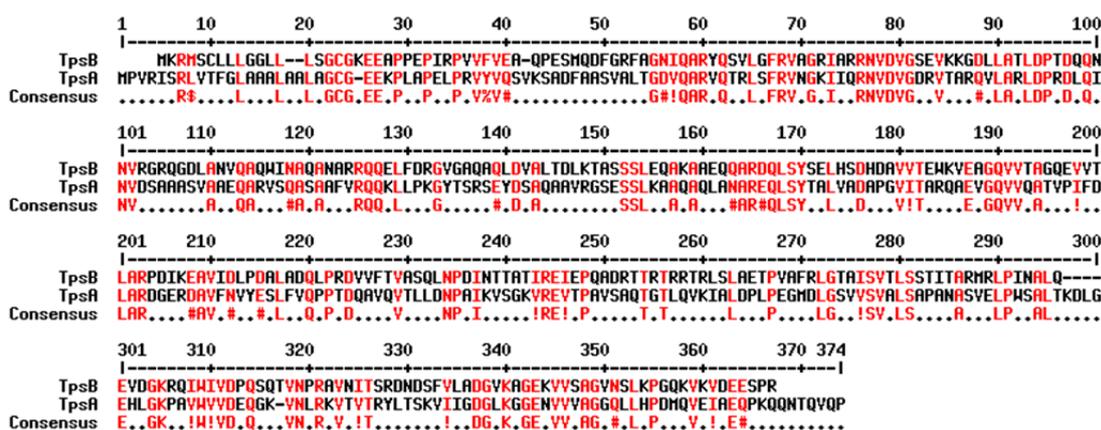
Como genes parálogos de *tpsA* se encuentran en el genoma de Pto PSPTO\_3300, PSPTO\_5192, PSPTO\_3301 o PSPTO\_0821, que codifican distintas proteínas de fusión (Tabla 18). PSPTO\_5192 es la otra MFP del putativo sistema TpsABC, mientras que, tanto PSPTO\_3300 como PSPTO\_3301 o PSPTO\_0821, se encuentran cercanos a un transportador de tipo RND, formando posiblemente un operón (ver más adelante).

**Tabla 18. Proteínas parálogas de TpsA en Pto DC3000.** Los análisis se llevaron a cabo utilizando la opción *paralogs* de KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>). Las proteínas están ordenadas de mayor a menor por porcentaje de identidad.

ORF Pto	Descripción	% identidad	% similitud
PSPTO_3300	Subunidad MFP de transportador RND	44	58
PSPTO_5192	Subunidad MFP de transportador RND, TpsB	34	49
PSPTO_0821	Subunidad MFP de transportador RND	31	47
PSPTO_3301	Subunidad MFP de transportador RND	30	45
PSPTO_4303	Subunidad MFP de transportador RND	29	48
PSPTO_2831	Proteína de flujo de siringofactina, SyfC	25	40
PSPTO_2593	Proteína de resistencia múltiple de la familia AcrA/AcrE	23	39
PSPTO_1309	Proteína de secreción de la familia HlyD	23	41
PSPTO_3099	Subunidad MFP de transportador RND, MexE	22	35

#### 1.4. Relación entre TpsA y TpsB

A continuación, se compararon entre sí las dos proteínas de fusión del sistema TpsABC para analizar sus diferencias, intentar averiguar por qué son necesarias dos MFP en el transportador TpsABC y su sentido evolutivo. En primer lugar se alinearon ambas secuencias, observándose que presentaban un 34% de identidad y un 50% de similitud a nivel de su secuencia de aminoácidos (Figura 43).



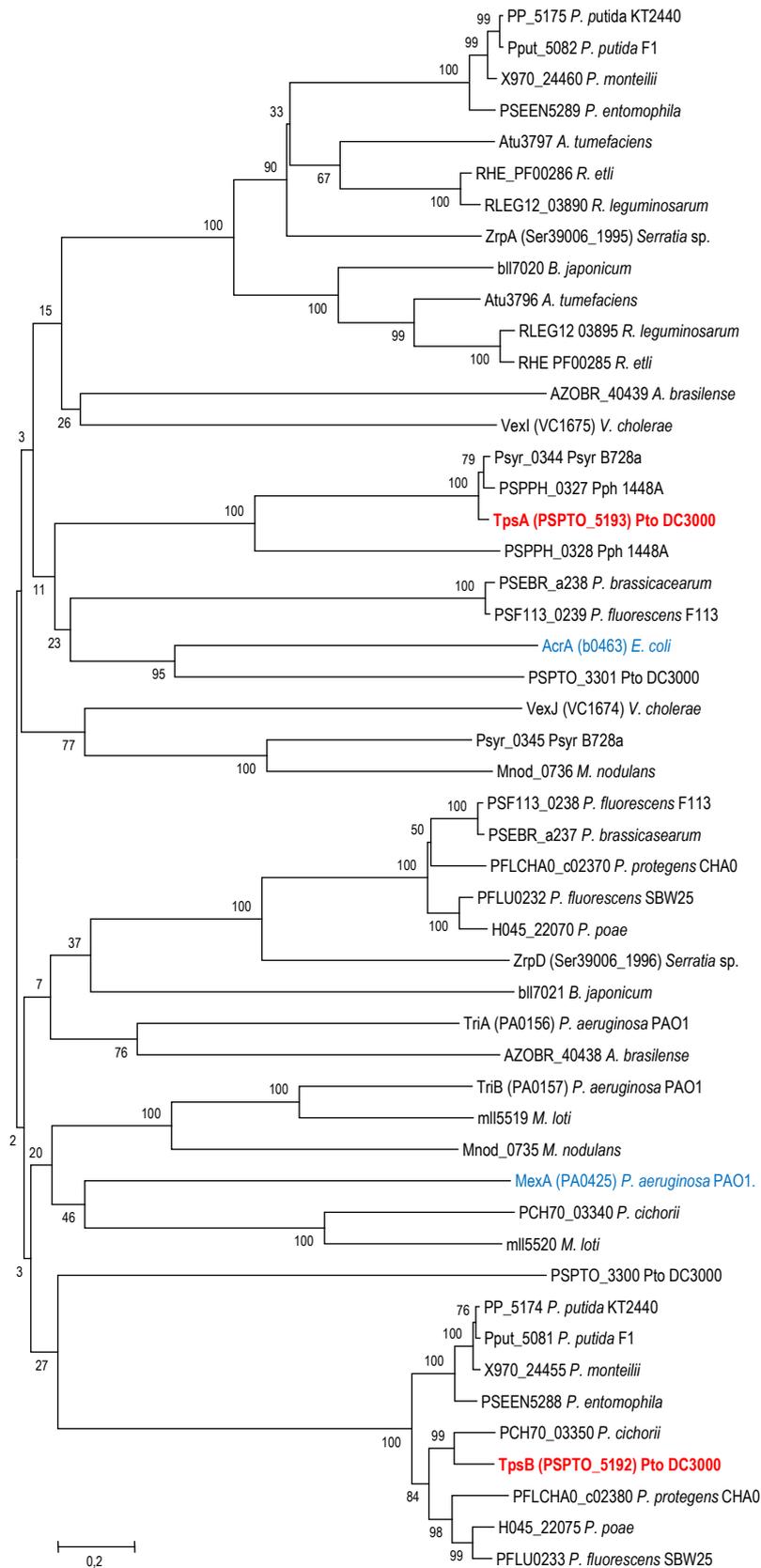
**Figura 43. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de TpsA y TpsB.** Las secuencias se alinearon utilizando el programa MultAlin versión 5.4.1. (Corpet 1988). La tercera línea marca el consenso entre las dos secuencias, donde los residuos en rojo son los aminoácidos idénticos y los distintos símbolos, los aminoácidos conservados.

Para completar el estudio comparativo de las dos MFPs, se llevó a cabo un análisis filogenético con el programa MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*, Tamura *et al.*, 2007) con el fin de calcular su distancia y relación evolutiva (Figura 44). El árbol filogenético indica que TpsA y TpsB pertenecen a un mismo *cluster* pero a ramas distintas, por lo que son proteínas de fusión evolutivamente cercanas pero de subtipos diferentes. Esta situación también se observa para algunos de los ortólogos de estas proteínas. Así, en la rama de TpsA se encuentran PP\_5175 de *P. putida* KT2440, Pput\_5082 de *P. putida* F1, X970\_24460 de *P. monteilii*, PSEEN5289 de *P. entomophila*, ZrpA de *Serratia*, bli7020 de *B. japonicum*, AZOBR\_40439 de *A. brasilense*, PSPTO\_3301 de Pto DC3000 y Mnod\_0736 de *M. nodulans*, mientras que en la rama de TpsB se encuentran PP\_5174 de *P. putida* KT2440, Pput\_5081 de *P. putida* F1, X970\_24455 de *P. monteilii*, PSEEN5288 de *P. entomophila*, ZrpD de *Serratia*, bli7021 de *B. japonicum*, AZOBR\_40438 de *A. brasilense*, PSPTO\_3300 de Pto DC3000 y Mnod\_0735 de *M. nodulans*.

De todas esas MFPs, las únicas que forman parte de un transportador caracterizado son ZrpA y ZrpD (Gristwood *et al.*, 2008). Son dos proteínas de 355 y 363 aminoácidos, respectivamente, que presentan un 32% de identidad y un 50% de similitud entre ellas a nivel de secuencia. Se ha observado que solo ZrpD, y no ZrpA, parece ser esencial para el funcionamiento de la bomba ZrpADBC, al menos en las condiciones de cultivo utilizadas por Gristwood *et al.* (2008). Los mismos autores consideran que es muy poco probable que una segunda MFP represente una duplicación no funcional y proponen que una de las MFPs (ZrpD, en su caso) podría estar actuando como el componente MFP estándar estabilizando el complejo de la bomba, mientras que la segunda MFP (ZrpA) podría llevar a cabo otra función distinta y, por ejemplo, tener un papel en la selección de sustrato. En el caso del transportador TpsABC y basándonos en los porcentajes de identidad y similitud de TpsA y TpsB con otras proteínas y en su análisis filogenético, proponemos que ambas son funcionales y que, aparte de intervenir en el ensamblaje de la bomba, desarrollan labores distintas. Así, es probable que una MFP sea funcional en presencia de determinados sustratos, mientras que la otra MFP no sea necesaria, o que una de ellas participe en la expulsión del sustrato y la otra tenga un mero papel estructural en la formación del canal hacia el medio externo.

### 1.5. TpsABC

De acuerdo con los análisis realizados, el transportador TpsABC es uno de los sistemas RND de Pto DC3000. Está codificado por un putativo operón que comprende los marcos abiertos de lectura PSPTO\_5193 (TpsA), PSPTO\_5192 (TpsB) y PSPTO\_5191 (TpsC), en el que TpsC es el componente transportador que posiblemente funciona con dos proteínas de fusión, TpsA y TpsB. Al no haber encontrado en los alrededores ningún gen que codifique para el componente de membrana externa, suponemos que utilizará alguna OMP codificada en alguna otra parte del genoma, de forma similar a como lo hace AcrAB de *E. coli* con TolC, o MexXY de *P. aeruginosa* con OprM (Masuda *et al.*, 2000; Zgurskaya y Nikaido, 2000).



**Figura 44. Árbol filogenético de las proteínas de fusión TpsA y TpsB.** Las distancias evolutivas se obtuvieron usando el método de corrección Poisson y una escala de 0.2 en el programa MEGA 6.06. Las secuencias alineadas corresponden a las que aparecen en tablas 15 y 17. En azul se señalan dos de las MFPs más estudiadas hasta el momento (*AcrA* de *E. coli* y *MexA* de *P. aeruginosa*), que se han utilizado como patrón.

El análisis comparativo del sistema *tpsABC* de Pto DC3000 con las secuencias disponibles en las bases de datos permitió establecer que transportadores de tipo RND con una organización génica similar se encuentran presentes en bacterias Gram-negativas que interactúan con plantas y, más abundantemente, en cepas pertenecientes a los órdenes Pseudomonadales y Rhizobiales, tanto simbiotes como patógenas (Tablas 19 y 20). Es más, se observa una importante conservación de secuencia a nivel de nucleótidos (Tabla 19), que es más significativa a nivel de aminoácidos (Tabla 20). Esto indica que las bombas RND de cuatro componentes no parecen ser tan infrecuentes como en un principio se pensaba (Mima *et al.*, 2007) y que probablemente estos genes se hayan adquirido por transferencia horizontal en el entorno de la planta. En apoyo de esta idea podemos observar que el contexto génico de estas bombas varía incluso dentro de las cepas que pertenecen al complejo *P. syringae* (Figura 45). Dado el papel de este tipo de bombas en otras bacterias, es posible que *TpsABC* y sus ortólogos estén implicados en la interacción bacteria-planta y, más concretamente, en la adaptación y/o supervivencia en el hospedador al eliminar compuestos tóxicos producidos por la planta u otras bacterias de su entorno o en la colonización del hospedador y desarrollo de la enfermedad, al exportar factores de virulencia (Piddock, 2006).

**Tabla 19. Bombas homólogas a *TpsABC*.** Los análisis se llevaron a cabo utilizando Blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) con la secuencia de nucleótidos de *tpsABC*.

Cepa	ORFs MFP-MFP-Transportador	%identidad
<i>P. syringae</i>		
pv. <i>syringae</i> B728a	Psyr_0344-0345-0346	90
pv. <i>phaseolicola</i> 1448A	PSPPH_0327-0328-0329	88
<i>P. cichorii</i> JBC1	PCH70_03340-03350-03360	83
<i>P. protegens</i> CHA0	PFLCHA0_02370-02380-02390	77
<i>P. poae</i>	H045_22070-22075-22080	77
<i>P. fluorescens</i>		
SBW25	PFLU0232-0233-0234	76
F113	PSF113_0238-0239-0240	76
<i>P. brassicacearum</i> subsp. <i>brassicacearum</i> NFM421	PSEBR_a237-a238-a239	76
<i>P. monteilii</i> SB3101	X970_24460-24455-24450	46
<i>P. putida</i>		
KT2440	PP_5175-5174-5173	58
F1	Pput_5082-5081-5080	58
<i>P. entomophila</i> L48	PSEEN5289-5288-5287	57
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	PA0156-0157-0158	46
<i>M. loti</i> MAFF303099	mll5520-5519-5518	22
<i>A. brasilense</i> Sp245	AZOBR_40438-40439-40440	38
<i>R. etli</i> CFN42	RHE_PF00286-PF00285-PF00284	38
<i>A. tumefaciens</i> C58	Atu3797-3796-3795	38
<i>B. japonicum</i> USDA 110	bll7021-7020-7019	39
<i>M. nodulans</i> ORS 2060	Mnod_0736-0735-0734	13
<i>Serratia</i> sp. ATCC39006	Ser39006_1995-1996-1997	7
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> CB782	RLEG12_03890-03895-03900	7
<i>Burkholderia</i> sp. CCGE 1002	*BC1002_1705-1706	5
<i>V. cholerae</i> 01 biovar El Tor N16961	VC1675-1674-1673	0.8

\*Este transportador solo posee una MFP.

**Tabla 20. Proteínas homólogas a los componentes de la bomba TpsABC de Pto DC3000.**

Organismo	MFP	MFP	Transportador	OMP	Referencia
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000	PSPTO_5193 <b>TpsA</b>	PSPTO_5192 <b>TpsB</b>	PSPTO_5191 <b>TpsC</b>	-	-
pv. <i>syringae</i> B728a	PSYR_0344 (95%)	PSYR_0345 (90%)	PSYR_0346 (98%)	-	-
pv. <i>phaseolicola</i> 1448A	PSPPH_0327 (93%)	PSPPH_0328 (86%)	PSPPH_0329 (97%)	-	-
<i>P. cichorii</i> JBC1	PCH70_03340 (87%)	PCH70_03350 (78%)	PCH70_03360 (93%)	-	-
<i>P. protegens</i> CHAO	PFLCHAO_02370 (69%)	PFLCHAO_02380 (69%)	PFLCHAO_02390 (86%)	-	-
<i>P. poae</i> RE 1-1-14	H045_22070 (72%)	H045_22075 (70%)	H045_22080 (88%)	-	-
<i>P. fluorescens</i> SBW25	PFLU0232 (69%)	PFLU0233 (69%)	PFLU0234 (88%)	-	-
F113	PSF113_0238 (68%)	PSF113_0239 (70%)	PSF113_0240 (86%)	-	-
<i>P. brassicacearum</i> sub. <i>brassicacearum</i> NFM421	PSEBR_a237 (68%)	PSEBR_a238 (71%)	PSEBR_a239 (85%)	-	-
<i>P. monteilii</i> SB3101	X970_24460 (63%)	X970_24455 (65%)	X970_24450 (80%)	-	-
<i>P. entomophila</i> str. L48	PSEEN5289 (66%)	PSEEN5288 (66%)	PSEEN5287 (81%)	-	-
<i>P. putida</i> KT2440	PP_5175 (64%)	PP_5174 (65%)	PP_5173 (80%)	-	-
F1	Pput_5082 (63%)	Pput_5081 (65%)	Pput_5080 (80%)	-	-
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	PA0156 (56%)	PA0157 (59%)	PA0158 (76%)	-	Mima <i>et al.</i> , 2007
<i>M. nodulans</i> ORS 2060	Mnod_0736 (38%)	Mnod_0735 (47%)	Mnod_0734 (64%)	-	-
<i>M. loti</i> MAFF303099	mll5520 (43%)	mll5519 (43%)	mll5518 (62%)	-	-
<i>A. brasilense</i> Sp245	AZOBR_40438 (39%)	AZOBR_40439 (35%)	AZOBR_40440 (61%)	-	-
<i>R. etli</i> CFN42	RHE_PF00286 (41%)	RHE_PF00285 (38%)	RHE_PF00284 (59%)	-	-
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> CB782	RLEG12_03890 (41%)	RLEG12_03895 (38%)	RLEG12_03900 (59%)	-	-
<i>A. tumefaciens</i> str. C58	Atu3797 (42%)	Atu3796 (40%)	Atu3795 (59%)	-	-
<i>B. japonicum</i> USDA 110	bll7021 (38%)	bll7020 (37%)	bll7019 (58%)	-	-
<i>Serratia</i> sp. ATCC 39006	Ser39006_1995 (36%)	Ser39006_1996 (33%)	Ser39006_1997 (55%)	Ser39006_1998	Gristwood <i>et al.</i> , 2008
<i>Burkholderia</i> sp. CCGE 1002	*BC1002_1705 (32%)	*BC1002_1705 (29%)	BC1002_1706 (46%)	BC1002_1707	-
<i>V. cholerae</i> 01 biovar EITor N16961	VC1675 (25%)	VC1674 (29%)	VC1673 (32%)	-	Bina <i>et al.</i> , 2008

MFP (*membrane fusion protein*), proteína de fusión periplásmica; OMP (*outer membrane protein*), proteína de membrana externa. Entre paréntesis, se indica el porcentaje de identidad en la secuencia de aminoácidos para cada proteína respecto a cada componente (TpsA, TpsB y TpsC) de Pto DC3000.

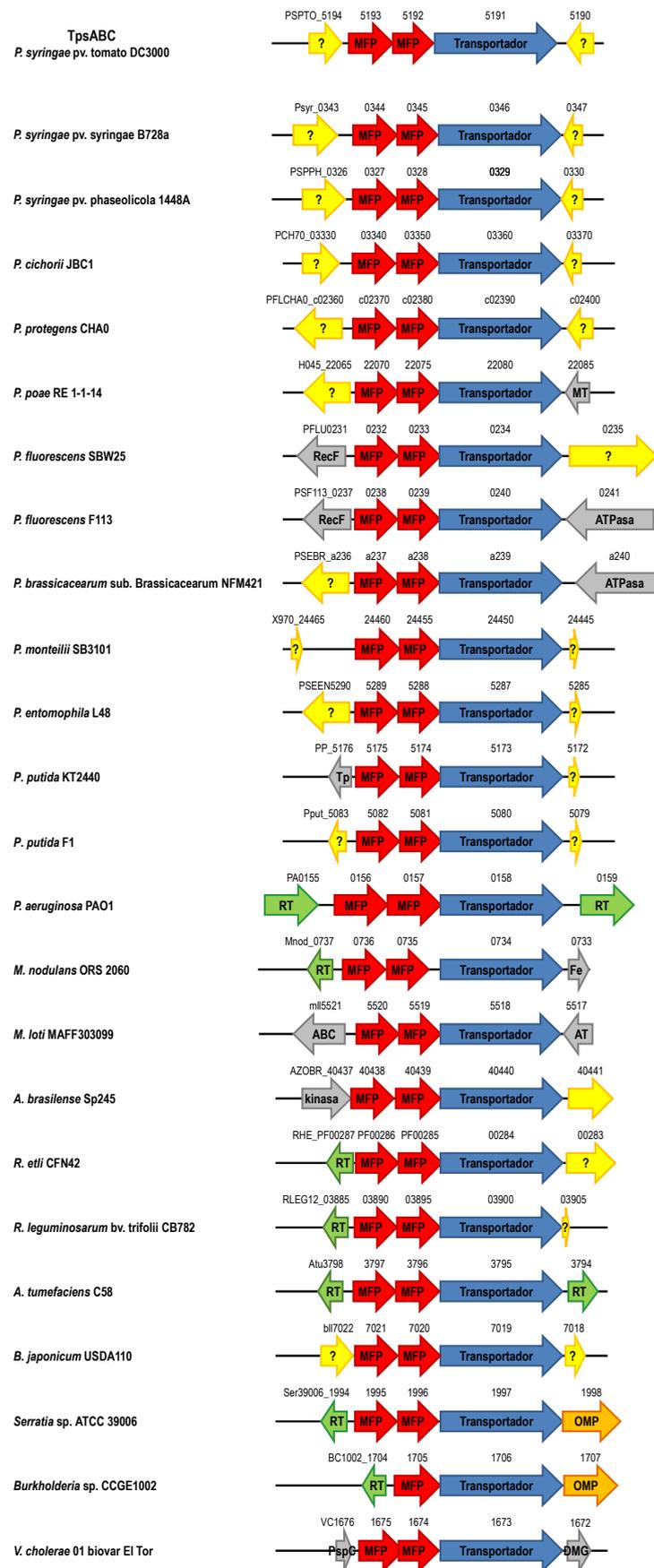
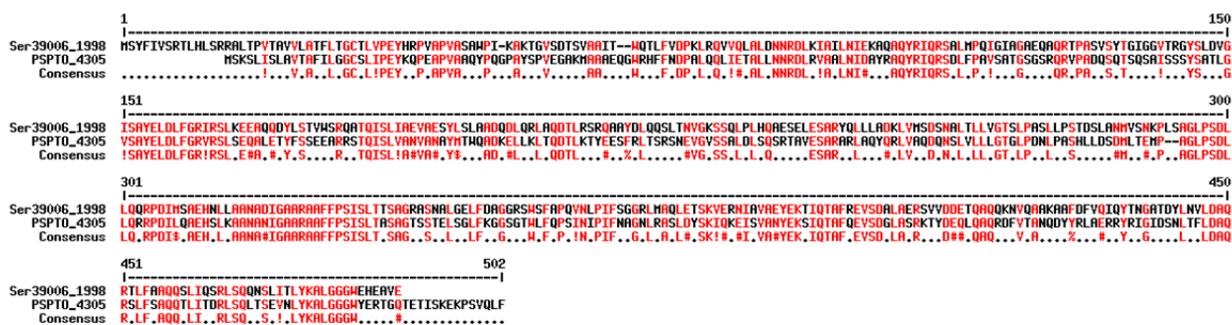


Figura 45. Organización génica de *tpsABC* y otros sistemas homólogos de distintas bacterias. ?, proteína de función desconocida; ABC, transportador de tipo ABC; AT, aminotransferasa; DMG, DNA-3-metiladenina glucosidasa; Fe, bacterioferritina; MFP, proteína de fusión (*membrane fusion protein*); MT, metiltransferasa; OMP, proteína de membrana externa (*outer membrane protein*); RT, regulador transcripcional; Tp, transposasa.

Dado que la única bomba homóloga a *tpsABC* que posee una OMP adyacente al gen del transportador es *zrpADBC* de *Serratia* 39006 (Tabla 2.8 y Figura 2.8), hicimos un blast con la secuencia del gen que codifica esa OMP (*zrpC*) contra el genoma de Pto DC3000 con el fin de averiguar si existía un homólogo. ZrpC (Ser39006\_1998) tiene un ortólogo en Pto DC3000: PSPTO\_4305, con un 47% de identidad y un 64% de similitud en su secuencia de aminoácidos (Figura 2.6). PSPTO\_4305 (también denominado *oprM*) codifica una OMP y forma un operón con PSPTO\_4303 (*mexA*, que codifica una MFP) y PSPTO\_4304 (*mexB* o *saxB*, que codifica un transportador RND). El transportador MexAB-OprM está implicado en resistencia a isotiocianatos y flavonoides y es importante para la supervivencia y colonización de plantas de tomate y *Arabidopsis* (Stoitsova *et al.*, 2008; Fan *et al.*, 2011; Vargas *et al.*, 2011). Por tanto y dada la similitud de secuencia entre Ser39006\_1998 y PSPTO\_4305, proponemos que esta sea la OMP con la que funcione TpsABC; es decir, el complejo funcional sería TpsABC-OprM. En el futuro nos planteamos construir un mutante en planta de PSPTO\_4305 para comparar su comportamiento, tanto en condiciones de laboratorio como en planta, con el del mutante en la bomba TpsABC.



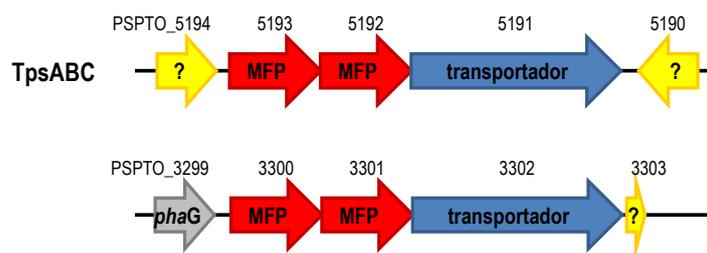
**Figura 46. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de Ser39006\_1998 de *Serratia* 39006 y OprM de Pto DC3000.** Las secuencias se alinearon utilizando el programa MultAlin versión 5.4.1. (Corpet 1988). La tercera línea marca el consenso entre las dos secuencias, donde los residuos en rojo son los aminoácidos idénticos y los distintos símbolos, los aminoácidos conservados.

Por otro lado, se buscaron en el genoma de Pto DC3000 otros transportadores de tipo RND que portaran más de una MFP y solo apareció uno: PSPTO\_3300-3301-3302, donde PSPTO\_3300 y PSPTO\_3301 son MFPs y PSPTO\_3302, el componente transportador (Figura 47).

PSPTO\_3302, con un 69% de identidad y un 82% de similitud con TpsC, posee 1011 aminoácidos y un solo dominio *Acr\_tran* propio de las proteínas transportadoras de esta familia. PSPTO\_3301, de 366 aminoácidos y con un dominio *HlyD\_2* propio de las MFPs, muestra un 40% de identidad y un 62% de similitud con su parálogo TpsB. La otra MFP, PSPTO\_3300, posee 395 aminoácidos, un dominio *HlyD\_2* y un 44% y un 58% de identidad y similitud, respectivamente, con TpsA (Tablas 14, 16 y 18). En su contexto génico no hay ningún gen que presente similitud con los que están adyacentes a *tpsABC*, ya que, en 5' aparece PSPTO\_3299 (*phaG-1*), que codifica una 3-hidroxiacil-CoA-acil transferasa de 258 aminoácidos y en 3' aparece PSPTO\_3303, que codifica una proteína de función desconocida con 62 aminoácidos que no tiene dominios proteicos descritos (Figura 47).

Por tanto, las únicas bombas de tipo RND con 2 MFPs en el genoma de Pto DC3000 son TpsABC y PSPTO\_3300-3301-3302 y, aunque sus funciones y los sustratos que expulsan no han sido determinados

hasta el momento, su estudio podría aclarar la implicación de 2 MFPs en la actividad de este tipo de transportadores.



**Figura 47. Diagrama de la organización génica de los transportadores RND con 2 MFPs encontrados en el genoma de Pto DC3000.** El color de las flechas indican un componente del sistema de la bomba Azul: transportador, rojo: proteínas de fusión, amarillo: proteínas hipotéticas y gris: otros genes.

## 1.6. PSPTO\_5194

Para finalizar este estudio *in silico* también se analizó la proteína codificada por PSPTO\_5194. En las bases de datos aparece como una proteína hipotética de función desconocida de 265 aminoácidos y sin dominios proteicos descritos en Pfam, aunque NCBI indica que posee un dominio *RHS repeat-associated core domain*. Este dominio está presente en un gran número de proteínas, tanto de bacterias como de eucariotas, que suelen ser de dos clases; una agrupa proteínas largas con repeticiones FG-GAP, RHS o YD propias de toxinas con efecto insecticida y proteínas de señalización intracelular como las teneurinas de animales, y la otra clase incluye proteínas cortas no caracterizadas de menos de 400 aminoácidos, en las que este dominio lo conforman aproximadamente 75 aminoácidos del extremo N-terminal. En *P. putida* se han descrito cerca de 20 proteínas de esta clase (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPR022385?q=Rhs>).

La comparación de PSPTO\_5194 con otras secuencias presentes en las bases de datos mostró que es un 27-96% idéntica en su secuencia de aminoácidos a proteínas presentes en otras *Pseudomonas* (Tabla 21). Como genes parálogos de PSPTO\_5194 se encuentran en el genoma de Pto DC3000 proteínas de función desconocida con una identidad inferior al 20%, como PSPTO\_0454 o PSPTO\_5312. Por tanto, esta proteína parece estar particularmente bien conservada y restringida a las cepas del complejo *P. syringae*, lo que sugiere que podría tener un papel en virulencia. De hecho, las proteínas con dominios *RHS repeat* suelen ser hidrófilas y algunas tienen características de bacteriocinas o de transportadores de polisacáridos capsulares; además, las proteínas RHS con repeticiones YD (tirosina-aspartato) muestran similitud de secuencia con toxinas con actividad insecticida, lo que indica que son proteínas de superficie expuestas o secretadas (Waterfield *et al.*, 2001; McNulty *et al.*, 2006, Roh *et al.*, 2008; Sisto *et al.*, 2012). PSPTO\_5194, con 265 aminoácidos y aproximadamente 28 KDa, estaría dentro del grupo de proteínas RHS cortas no caracterizadas que presentan en su dominio N-terminal repeticiones YD pero no los 75 aminoácidos conservados en tándem que presentan las proteínas de *P. putida*. Como hipótesis de trabajo, proponemos que PSPTO\_5194 podría ser sustrato del transportador TpsABC y funcionar como toxina.

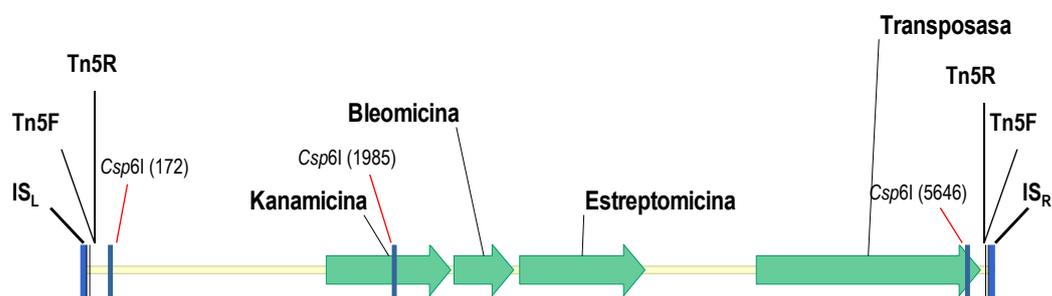
**Tabla 21. Proteínas ortólogas a PSPTO\_5194 de Pto DC3000.** Los análisis se llevaron a cabo utilizando Blastn y Blastp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) con la secuencia de nucleótidos y aminoácidos, respectivamente, de PSPTO\_5194. Las proteínas están ordenadas de mayor a menor por porcentaje de identidad. Todas aparecen anotadas en las bases de datos como proteínas hipotéticas.

Cepa	ORF	% identidad	% similitud
<i>P. syringae</i>			
pv. lachrymans M302278	PLA106_08845	96	97
pv. actinidiae ICMP 19073	A262_20099	93	95
pv. tomato T1	PSPTOT1_2655	92	93
<i>P. avellanae</i> BPIC 631	Pav631_4738	87	87
<i>P. syringae</i>			
pv. maculicola ES4326	PMA4326_26232	69	78
BRIP39023	A988_07329	53	57
Cit 7	PSYCIT7_07549	53	56
pv. syringae B728a	Psyr_0342	34	43
pv. phaseolicola 1448A	PSPPH_0325	32	42
<i>P. cichorii</i> JBC1	PCH70_03330	27	36
<i>P. putida</i> S16	PPS_3689	20	21
<i>P. fluorescens</i> F113	PSF113_5422	17	18
<i>P. putida</i> KT2440	PP_3160	17	20

## 2. Obtención de mutantes en el transportador TpsABC y en PSPTO\_5194

### 2.1. Mutagénesis al azar con *Tn5*

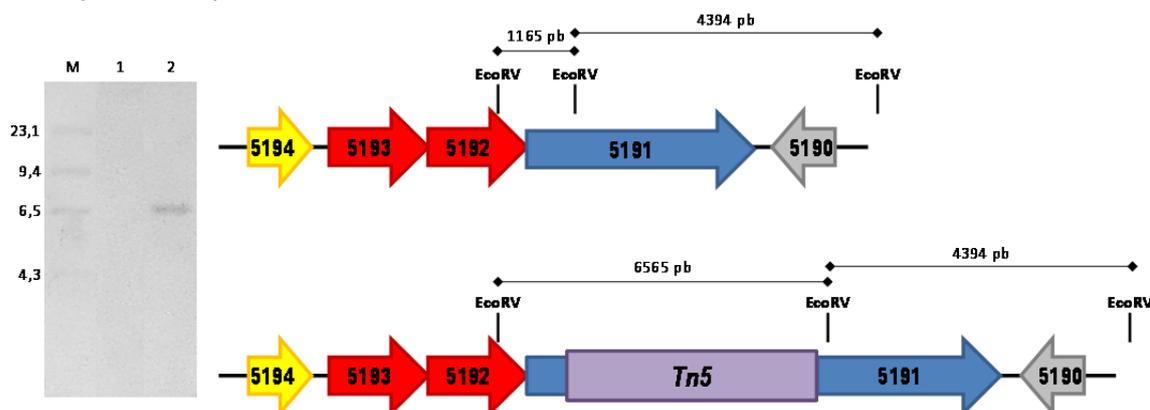
Para llevar a cabo la mutagénesis Harold Prada utilizó como cepa donadora *E. coli*  $\beta$ 2163 (pSUP2021) y como cepa receptora la cepa silvestre Pto DC3000. La cepa de *E. coli*  $\beta$ 2163 es auxótrofa para el ácido diaminopimélico (DAPA), por lo que es necesario añadir al medio de cultivo 0,3 mM de DAPA para su crecimiento, tanto en líquido como en placa. Esta característica resulta muy útil para la selección tras la conjugación porque, al emplear placas de LB sin DAPA, en las que no crece la cepa donadora, se seleccionan solo los transconjugantes. El plásmido pSUP2021 (Simon *et al.*, 1983) porta el transposón *Tn5* utilizado (Figura 48).



**Figura 48. Esquema del transposón *Tn5*.** Se muestran los sitios de restricción de la enzima Csp6I, los sitios de reconocimiento de los oligos Tn5F y Tn5R y las secuencias invertidas repetidas (ISs). El transposón tiene un tamaño de 5.818 pb y porta los genes de resistencia a kanamicina, bleomicina y estreptomycin y el gen que codifica la transposasa.

Para el mapeo de los mutantes, se extrajo su ADN genómico y se digirió con la enzima Csp6I, que tiene un sitio de corte en ambos extremos del transposón *Tn5* (Figura 48). El ADN se ligó en condiciones de religación intermolecular y para determinar el sitio de inserción del *Tn5*, se realizó una PCR inversa con dos oligos, Tn5F y Tn5R, que hibridaban en los extremos del transposón (Figura 48). Los productos de PCR obtenidos se purificaron y se secuenciaron, determinándose que el punto de inserción del *Tn5* estaba a 1382 pb del codón de inicio del ORF PSPTO\_5191 (H. Prada, resultados no publicados).

Con el fin de confirmar la integración del *Tn5* en el locus genómico de PSPTO\_5191 se analizó el mutante obtenido mediante hibridación de ADN *Southern Blot* como se especifica en el apartado 5.7 de Materiales y Métodos. En este ensayo se utilizó ADN cromosómico de la cepa silvestre DC3000 y del posible mutante, que se digirieron con *EcoRV* y se hibridaron con una sonda de 5,4 kb (fragmento *HpaI* de pSUP2021 que contiene el *Tn5*). Con esta hibridación se pudo comprobar que el nuevo mutante contenía una única inserción del *Tn5*, localizada en un fragmento *EcoRV* de aproximadamente 6,6 kb, que corresponde al fragmento esperado tras su inserción PSPTO\_5191. En la cepa silvestre no se observó hibridación alguna, ya que carece del *Tn5* (Figura 49). Entonces, el clon con la ORF PSPTO\_5191 inactivada por el transposón se denominó 5191:*Tn5*.



**Figura 49. Comprobación del mutante PSPTO\_5191 obtenido mediante mutagénesis al azar en Pto DC3000.** Hibridación *Southern* utilizando una sonda con un fragmento *HpaI* que contiene el *Tn5* en la cepa silvestre Pto DC3000 (calle 1) y en un mutante PSPTO\_5191 (calle 2). A la izquierda se indica el tamaño en kb del marcador de peso molecular (M, ADN del fago  $\lambda$  digerido con *HindIII*). El esquema de la derecha indica los sitios de corte y el tamaño esperado de los fragmentos obtenidos con el enzima *EcoRV*, tanto en la cepa silvestre como en el mutante 5191:*Tn5*.

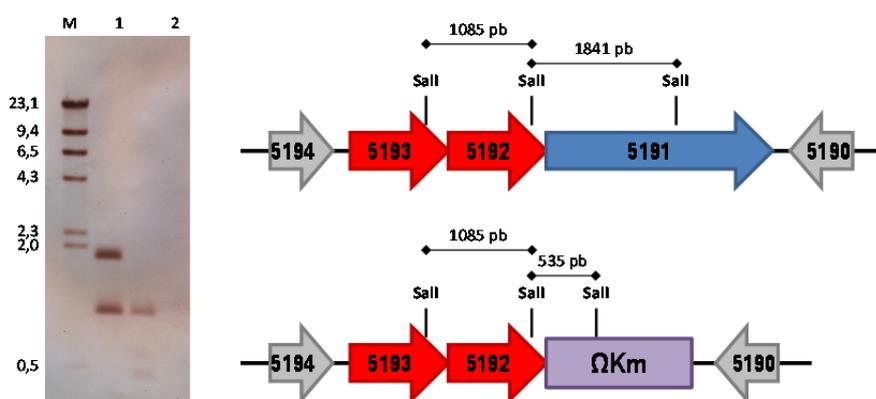
## 2.2. Mutagénesis dirigida

### 2.2.1. Generación de un mutante carente de PSPTO\_5191

Con el fin de estudiar la función de PSPTO\_5191, se construyó un mutante carente de este gen y, para ello, se diseñó en primer lugar el vector a utilizar en la mutagénesis, derivado del plásmido pGEM-T que no replica en *Pseudomonas*. En este plásmido se clonó una región que incluía las secuencias por encima y por debajo de PSPTO\_5191 y, posteriormente, se insertó un interposón  $\Omega$ Km en lugar del mencionado gen. En la sección Materiales y Métodos se describe con detalle cómo se generó el plásmido pPG5191 $\Omega$ Km (apartado 2.2) y cómo se llevó a cabo el reemplazamiento génico en la cepa Pto DC3000 (apartado 3.6.5). Tras la obtención de posibles clones mutantes deficientes en PSPTO\_5191, estos se

analizaron mediante PCR e hibridación de ADN *Southern Blot*, con el fin de confirmar la integración del interposón  $\Omega$ Km.

En el ensayo *Southern Blot* se utilizó ADN cromosómico de la cepa silvestre Pto y de los posibles mutantes, que se digirieron con *Sall* y se hibridaron con una sonda de 882 pb que comprendía parte de los genes PSPTO\_5191 y PSPTO\_5192 (Figura 50). El interposón  $\Omega$ Km utilizado presenta sitios de corte para la enzima *Sall*, lo que nos permite determinar el sentido de la inserción del  $\Omega$ Km dentro del gen interrumpido. La inserción del  $\Omega$ Km también se verificó por PCR utilizando cebadores específicos para este (datos no mostrados). En la cepa silvestre se observó la hibridación de la sonda con dos fragmentos de 1,8 y 1,0 kb, mientras que en el mutante se observaban dos bandas de 1,0 kb y 531 pb. Los resultados obtenidos nos permiten confirmar la delección del gen PSPTO\_5191 y su sustitución por el interposón  $\Omega$ Km. Se escogió uno de los clones y se denominó al mutante dirigido carente de PSPTO\_5191 como  $\Delta$ 5191.



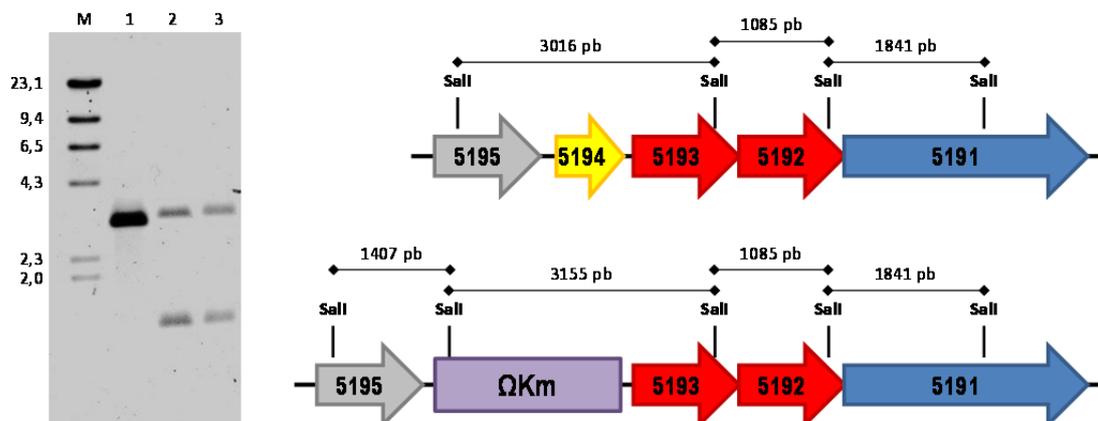
**Figura 50. Comprobación del mutante PSPTO\_5191 construido mediante doble recombinación en Pto DC3000.** Hibridación *Southern* utilizando una sonda para PSPTO\_5191 en la cepa silvestre Pto DC3000 (calle 1) y en un mutante deficiente en la posible proteína de fusión (calle 2). A la izquierda se indica el tamaño en kb del marcador de peso molecular (M, ADN del fago  $\lambda$  digerido con *Hind*III). El esquema de la derecha indica los sitios de corte y el tamaño esperado de los fragmentos obtenidos con la enzima *Sall*, tanto en la cepa silvestre como en el mutante  $\Delta$ 5191.

### 2.2.2. Generación de un mutante carente de PSPTO\_5194

Por otro, lado también se construyó un mutante en carente de PSPTO\_5194, la ORF localizada en 5' del operón *tpsABC*; que se expresa independientemente del mismo (ver 3.1) y codifica una proteína de función desconocida. Con el fin de determinar si esa proteína estaba implicada en virulencia, ejercía algún efecto tóxico o era sustrato de la bomba TpsABC, PSPTO\_5194 se inactivó utilizando el mismo procedimiento que para la construcción del mutante carente de *tpsC* (apartado 2.2 de Materiales y Métodos).

Tras la obtención de posibles clones mutantes deficientes en PSPTO\_5194, como se especifica en el apartado 3.6.5 de Materiales y Métodos, estos se analizaron mediante PCR e hibridación de ADN *Southern Blot*, con el fin de confirmar la integración del interposón  $\Omega$ Km. En este caso, se utilizó ADN cromosómico de la cepa silvestre y de los posibles mutantes, que se digirieron con *Sall* y se hibridaron con una sonda de 1,6 kb (Figura 51). Los resultados obtenidos nos permitieron confirmar la delección del gen, observando en la cepa silvestre la hibridación de la sonda con un fragmento de aproximadamente 3,0 kb,

mientras que en los mutantes se observaron dos bandas de cerca de 3,2 kb y 1,4 kb. De los dos posibles clones comprobados por *Southern blot* se escogió uno, que se denominó  $\Delta$ 5194.

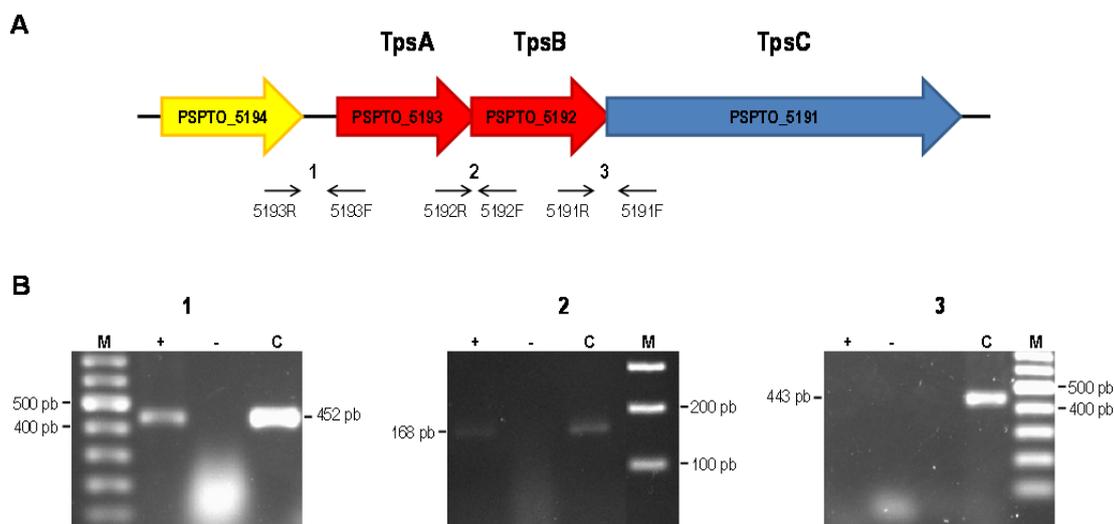


**Figura 51. Hibridaciones ADN-ADN para la comprobación de mutantes construidos mediante delección de PSPTO\_5194 en Pto DC3000.** Hibridación *Southern* utilizando la sonda para PSPTO\_5194 de la cepa silvestre (calle 1) y dos mutantes deficientes en el gen PSPTO\_5194 (calles 2 y 3). A la izquierda se indica el tamaño en kb del marcador de peso molecular (ADN del fago  $\lambda$  digerido con HindIII). El esquema de la derecha indica los sitios de corte y el tamaño esperado de los fragmentos obtenidos con la enzima Sall, en la cepa silvestre y en los mutantes.

### 3. Caracterización *in vivo* del transportador TpsABC

#### 3.1. Análisis de la organización transcripcional de los genes *tpsABC*

Dada la alta homología de secuencia de *tpsABC* con otros transportadores de tipo RND en diferentes cepas de *Pseudomonas* y su similitud en organización génica, cabía esperar que estos tres genes se expresaran como un operón. Además, el codón de terminación de *tpsA* solapa con el codón de inicio de *tpsB* y el codón de terminación de *tpsB* solapa con el codón de inicio de *tpsC*. Con el fin de analizar si *tpsABC* se transcribía como una unidad transcripcional y comprobar si PSPTO\_5194 pertenecía también a dicha unidad, se llevaron a cabo ensayos de transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) a partir de ARN total aislado de células de DC3000 en fase exponencial cultivadas en medio rico LB (apartado 6.4 de Materiales y Métodos). Los cebadores utilizados (Tabla 7) eran complementarios a las regiones correspondientes al final y al inicio de los genes consecutivos: PSPTO\_5194-*tpsA*, *tpsA-tpsB*, *tpsB-tpsC* (Figura. 52A). Los productos de RT-PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa, obteniéndose fragmentos del tamaño esperado para cada pareja de cebadores: un producto de 452 pb para el par *tpsB/tpsC* y un producto de 168 pb para el par *tpsA/tpsB*. Sin embargo, para el par PSPTO\_5194/*tpsA* no se observó amplificado. Tampoco se observó amplificación en los controles negativos, en los que no se añadió enzima reverso transcriptasa, indicando la ausencia de ADN contaminante en la reacción (Figura 52B). La amplificación obtenida entre la región final de un gen y la región inicial del siguiente, nos permite afirmar que los genes *tpsABC* forman parte de la misma unidad transcripcional y constituyen un operón mientras que PSPTO\_5194 parece expresarse independientemente.



**Figura 52. Análisis de la organización transcripcional de los genes *tpsABC* y PSPTO\_5194 de Pto DC3000.**

**A.** Representación esquemática de la organización de los genes PSPTO\_5191-5194 de Pto DC3000 en la que las flechas anchas indican la dirección de la transcripción de los distintos marcos abiertos de lectura. Las flechas negras convergentes y los números del 1 al 3 muestran las regiones amplificadas por RT-PCR empleando los oligonucleótidos que se indican.

**B.** Electroforesis en geles de agarosa de los productos obtenidos mediante RT-PCR de ARN total obtenido de Pto DC3000 crecida hasta una  $DO_{660}$  de 1,5 (+). Como control negativo de la RT-PCR se dispusieron las mismas reacciones pero omitiendo la reverso transcriptasa (-). Los controles (C) se realizaron empleando ADN cromosómico de Pto DC3000 como molde. La calle M representa el marcador 100 pb (Fermentas).

### 3.2. Determinación del perfil de sustratos del transportador TpsABC

#### 3.2.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC)

Los sistemas transportadores de tipo RND están frecuentemente implicados en la resistencia a múltiples antibióticos y disolventes orgánicos. Con el fin de determinar el perfil de sustratos de la bomba TpsABC de Pto DC3000, se examinó la susceptibilidad de la cepa silvestre y de los mutantes TpsC:Tn5 y  $\Delta$ TpsC a distintos tipos de antibióticos (ácido nalidixico, ampicilina, carbenicilina, cefotaxima, cloranfenicol, espectinomicina, estreptomina, gentamicina, norfloxacin, piperacilina y tetraciclina), agentes biocidas o mutagénicos (bromuro de etidio, butilparaben, metilparaben, indol y triclosan) y compuestos de origen vegetal con capacidad antimicrobiana (floretilina y floridzina). Se utilizó el método de diluciones seriadas para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) de cada compuesto (Tabla 22).

Con este ensayo se pudo apreciar que los valores de MIC de los mutantes  $\Delta$ TpsC y TpsC:Tn5 fueron similares a los de la cepa silvestre, excepto para floretina y estreptomina: el mutante carente del transportador resultó ser más sensible a este flavonoide y el mutante TpsC::Tn5 resultó ser más resistente a estreptomina, pero no a espectinomicina. Este incremento en la resistencia a estreptomina es consecuencia de la inserción del Tn5, ya que porta un gen de resistencia a este antibiótico (Figura 48; Putnoky *et al.*, 1983), y no de la pérdida de TpsC, ya que la MIC del mutante  $\Delta$ TpsC resultó ser similar a la de la cepa silvestre.

La mayor susceptibilidad de las cepas mutantes a floretina indica que este flavonoide parece ser un sustrato de la bomba TpsABC. Otro posible sustrato de este transportador, aunque con menor afinidad, podría ser triclosan. En cualquier caso, parece que la eliminación de estos compuestos por TpsABC no

resulta determinante para la tolerancia de Pto, ya que la susceptibilidad a estos compuestos es mayor en una cepa carente del transportador MexAB-OprM, por lo que parece que esta bomba tiene un papel más importante en esos casos (Vargas *et al.*, 2011).

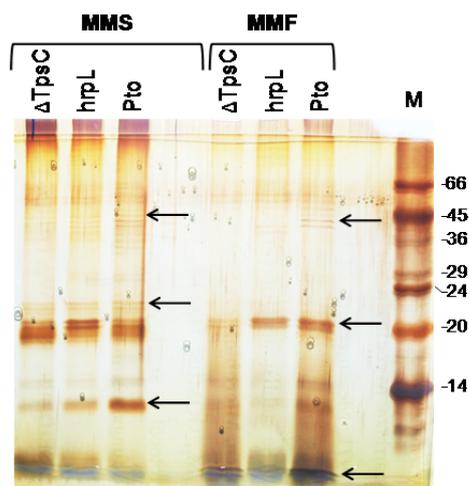
**Tabla 22. Perfil de susceptibilidad de la cepa silvestre y los mutantes  $\Delta$ TpsC y TpsC:Tn5.**  
Determinación de la concentración mínima inhibitoria ( $\mu$ g/ml) de distintos compuestos con actividad antibacteriana para DC3000.

Tipo de compuesto	Compuesto	MIC ( $\mu$ g/ml)		
		DC3000	$\Delta$ TpsC	TpsC:Tn5
Antibióticos	Ácido nalidíxico	8,53	9,7	8,84
	Ampicilina	46,87	31,25	46,87
	Carbenicilina	142,13	156,25	142,13
	Cefotaxima	7,81	7,81	7,81
	Cloranfenicol	3,03	3,91	3,52
	Espectinomicina	1,95	2,05	1,95
	Estreptomina	0,90	0,90	9,82
	Gentamicina	1,28	1,95	1,18
	Norfloxacin	0,10	-	0,10
	Piperacilina	2,19	3,91	3,03
	Tetraciclina	0,42	0,24	0,27
Flavonoides	Floretina	>8.571,00	-	4.285,00
	Floridzina	29.528,00	-	29.528,00
Biocidas	Bromuro de etidio	78,10	-	78,10
	Butilparaben	>12.138,00	-	>12.138,00
	Metilparaben	594,00	-	594,00
	Indol	183,00	-	183,00
	Triclosan	0,98	-	0,37

-, no determinado

### 3.2.2. Determinación de posibles sustratos mediante proteómica

Algunas cepas exportan determinantes de virulencia, como adhesinas, toxinas u otras proteínas importantes para la colonización y la infección de células humanas y animales a través de transportadores de tipo RND (Piddock, 2006; Poole, 2004). Con el objetivo de determinar si ese era el caso del transportador TpsABC, obtuvimos extractos del sobrenadante de cultivos de DC3000 y del mutante  $\Delta$ TpsC en distintas condiciones, los liofilizamos para concentrarlos y llevamos a cabo una electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (sección 7.2. de los Materiales y Métodos). De esta manera, comparamos las proteínas presentes en la cepa silvestre y en los mutantes seleccionando las bandas que no aparecían en las muestras del mutante o eran más tenues que en la cepa silvestre (Figura 53). Utilizamos también un mutante *hrpL* para comprobar que las proteínas de interés no eran exportadas por el T3SS sino específicamente por la bomba TpsABC. Cortamos las bandas del gel y las enviamos a identificar por huella peptídica MALDI-TOF/TOF a la Unidad de Proteómica de la Universidad de Córdoba. Los resultados obtenidos están resumidos en la Tabla 23, donde se muestran las proteínas identificadas que sí aparecían en los sobrenadantes de la cepa silvestre pero no en el mutante  $\Delta$ TpsC.



**Figura 53. Perfiles de proteínas obtenidos del sobrenadante de cultivos de distintas cepas de Pto DC3000.** Análisis mediante electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida al 15% (p/v) de los extractos proteicos obtenidos de cultivos en MMS y MMF de Pto y de los mutantes *hrpL* y  $\Delta$ TpsC. En el margen derecho se indica en kDa los tamaños correspondientes al marcador de peso molecular (M). Las flechas indican algunas de las bandas cortadas y enviadas a analizar.

**Tabla 23. Proteínas identificadas en los sobrenadantes de cultivos de DC3000 que no estaban presentes en los del mutante  $\Delta$ TpsC.**

Proteína	ORF
Subunidad $\alpha$ de la fenilalanil-ARN <sub>t</sub> sintetasa, PheS	PSPTO_2382
Proteína F de la ruta general de secreción, GspF	PSPTO_3316
Proteína para la biosíntesis de exopolisacáridos, PslE	PSPTO_3532
Proteína de unión a penicilina	PSPTO_4847
Proteína secretada por el T6SS, Hcp2	PSPTO_5435
Putativa proteína no caracterizada	PSPTOA0031

PheS (PSPTO\_2382) forma, junto con PheT, la fenilalanil-ARN<sub>t</sub> sintetasa. Posee 338 aminoácidos y es una proteína citoplasmática.

GspF (PSPTO\_3316) es una proteína de membrana interna de 400 aminoácidos que forma parte del T2SS, conocido también como la ruta general de secreción (GSP, *General Secretion Pathway*), que transporta en bacterias patógenas factores de virulencia, toxinas de distintos tipos y enzimas degradadoras de la pared celular asociadas a virulencia (Py *et al.*, 2001).

PslE (PSPTO\_3532) es una proteína de membrana de 663 aminoácidos que está codificada en el operón *pslACDEFGHIJKL* implicado en la biosíntesis del polisacárido Psl (Byrd *et al.*, 2009). Psl es un polisacárido rico en manosa, implicado en la adhesión de *P. aeruginosa* a superficies bióticas y abióticas y en la formación de biopelículas junto con el alginato y el Pel (Ryder *et al.*, 2007; Byrd *et al.*, 2010).

PSPTO\_4847 es una proteína de 782 aminoácidos que pertenece al grupo de proteínas de unión a penicilina (*penicillin binding protein*, PBP), que catalizan la polimerización de las cadenas de glucano (transglicosilación) y las interacciones entre ellas (transpeptidación) (Di Guilmi *et al.*, 2003; Sauvage *et al.*,

2008). Las PBPs están presentes en casi todas las bacterias, son proteínas de membrana que varían en número, tamaño, forma y afinidad por la penicilina y otros antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Las PBPs esenciales poseen un alto peso molecular (60-120 KDa) y están implicadas en crecimiento y división celular (Georgopapadakou y Liu, 1980; Georgopapadakou *et al.*, 1993).

Hcp2 (PSPTO\_5435) es una proteína de 172 aminoácidos que es secretada a través del T6SS y aparece en el medio de cultivo en forma dimérica. De hecho, Pto DC3000 posee dos copias de este gen en su genoma: *hcp1* (PSPTO\_2539) y *hcp2*. La expresión de *hcp2* no se induce *in planta* y no contribuye a la virulencia o a la colonización de plantas de tomate o de *Arabidopsis*. En lugar de ello, Hcp2 es necesaria para la supervivencia de Pto en competencia con otros microorganismos, ya que es esencial para la supresión del crecimiento de enterobacterias y levaduras (Haapalainen *et al.*, 2012).

PSPTOA0031 es una proteína hipotética de 393 aminoácidos con un dominio DUF187 con posible función glucosil hidrolasa. En su contexto génico está flanqueada por una levansucrasa y una glicosil hidrolasa, por lo que es probable que intervenga en la síntesis o modificación de algún polisacárido.

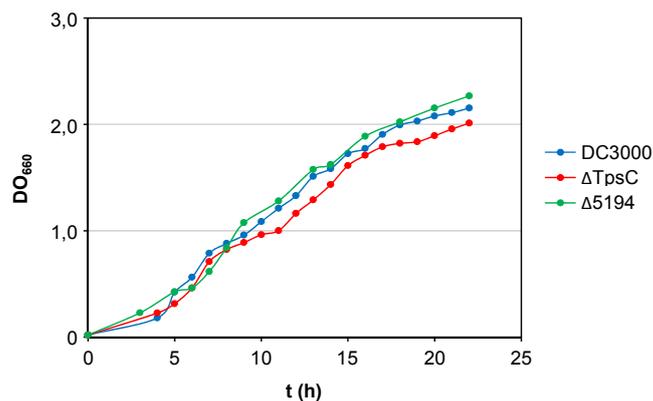
En resumen, no parece que la presencia de las proteínas descritas anteriormente en los sobrenadantes de cultivos de la cepa silvestre pero no en los de la cepa carente del transportador TpsABC tenga relación directa con la pérdida del mismo. La localización de esas proteínas (PSPTO\_2382 es citoplasmática y PSPTO\_3316, PSPTO\_3532 y PSPTO\_4847 son de membrana) y su actividad (son enzimas o forman parte de diferentes sistemas de secreción, pero no parecen estar implicadas en virulencia), indica más bien que su detección es consecuencia de la contaminación de los sobrenadantes por lisis celular durante la preparación de los extractos. Se debe mencionar que en ningún caso detectamos la proteína PSPTO\_5194 en los sobrenadantes de los cultivos.

## 4. Caracterización fenotípica del mutante $\Delta$ TpsC y $\Delta$ 5194

### 4.1. Curvas de crecimiento en medio líquido

Se ha demostrado que algunos transportadores juegan un papel clave en la supervivencia y capacidad para multiplicarse de las bacterias y, por tanto, son importantes en el proceso de colonización (Pidcock, 2006; Maggionari-Valecillos *et al.*, 2006). Para comprobar si la pérdida del transportador TpsABC tenía algún efecto sobre el crecimiento de Pto, se compararon las curvas de crecimiento de la cepa silvestre con la del mutante  $\Delta$ TpsC y se observó que eran similares (Figura 54). También se hizo conteo de unidades formadoras de colonias en dos puntos distintos de la curva, observándose que a una densidad óptica de 1 el título fue de  $6,8 \times 10^8$  ufc/ml para DC3000 y de  $8,2 \times 10^8$  ufc/ml para  $\Delta$ TpsC, mientras que a una densidad óptica cercana a 2, el título resultó ser de  $2,1 \times 10^9$  ufc/ml para DC3000 y de  $2,5 \times 10^9$  ufc/ml para el mutante. Por tanto, el crecimiento de la cepa mutante no se ve afectado por la pérdida del transportador.

En el caso del mutante carente de PSPTO\_5194 tampoco se observaron diferencias significativas con la cepa silvestre, ni a distintos tiempos en la curva de crecimiento ni en los conteos de unidades formadoras de colonias, ya que a una densidad óptica de 1 el título fue de  $9,4 \times 10^8$  ufc/ml para  $\Delta$ 5194, mientras que a una densidad óptica de 2, el título resultó ser de  $2,3 \times 10^9$  ufc/ml para  $\Delta$ 5194. Por tanto, la pérdida de PSPTO\_5194 tampoco afecta al crecimiento de Pto.



**Figura 54. Curvas de crecimiento de la cepa silvestre y de los mutantes  $\Delta$ TpsC y  $\Delta$ 5194.** Las cepas de Pto se inocularon en medio líquido LB y se realizó el seguimiento de su crecimiento a 28°C midiendo la absorbancia del cultivo a 660 nm a lo largo del tiempo. Los resultados mostrados corresponden a los datos de cuatro experimentos.

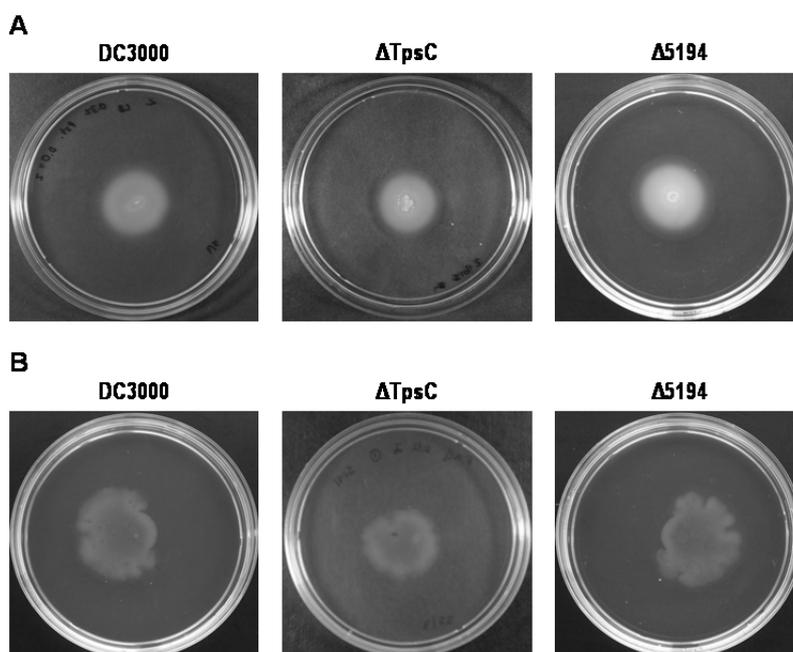
#### 4.2. Ensayos de motilidad bacteriana tipo *swimming* y *swarming*

Prosiguiendo con la caracterización de los mutantes, se llevaron a cabo ensayos de motilidad tipo *swimming* y *swarming* en comparación con la cepa silvestre. La motilidad y la quimiotaxis juegan un papel muy importante en la ecología microbiana, ya que gracias a ellas las células son capaces de dirigir sus movimientos en respuesta a la presencia de determinadas sustancias químicas en el medio que las rodea, incrementan su capacidad para adquirir nutrientes y dispersarse por el medio ambiente, pueden huir de sustancias tóxicas y colonizar al hospedador (Henrichsen, 1972; Kearns, 2010).

El movimiento de tipo *swimming* es el desplazamiento individual de bacterias en medios líquidos o viscosos que nadan gracias al movimiento de su(s) flagelo(s) (Kearns, 2010). Numerosas cepas de *P. syringae* se mueven de este modo en medios con baja concentración de agar (Shimizu *et al.*, 2003; Toutain *et al.*, 2005). En LB (0.3% agar) se observan halos de dispersión de Pto DC3000 a partir del punto de inoculación que crecen en tamaño con el tiempo. Al ensayar la motilidad de los mutantes  $\Delta$ TpsC y  $\Delta$ 5194 no se apreciaron diferencias significativas con la cepa silvestre (Figura 55A).

La motilidad tipo *swarming* es un movimiento rápido (2-10  $\mu$ m/s) y coordinado de una población bacteriana sobre superficies sólidas o semisólidas. Es un comportamiento multicelular que se ha observado principalmente en condiciones de laboratorio controladas y depende de dos elementos críticos: la composición y la viscosidad del medio de cultivo. Las bacterias que realizan *swarming* sufren una diferenciación morfológica que las distingue de las que se encuentran en estado planctónico: las células localizadas en el frente de migración suelen estar hiperelongadas, hiperflageladas y se agrupan en estructuras multicelulares formando empalizadas (Kearns, 2010). Pto DC3000 presenta un movimiento de tipo *swarming* muy rápido en medios ricos con baja concentración de agar, pero no en medios mínimos, como MMF (no mostrado). En PG-agar (0.5%) se observan halos de dispersión desde el punto de inoculación que crecen en tamaño con el tiempo y alcanzan el borde de las placas de 80 mm de diámetro a las 40-48 horas. Al llevar a cabo el mismo ensayo con las cepas mutantes  $\Delta$ TpsC y  $\Delta$ 5194 se observó un comportamiento similar (Figura 55B). Por tanto, ni el transportador TpsABC ni la proteína PSPTO\_5194

estarían proporcionando ventaja alguna a Pto en cuanto a su motilidad, tanto tipo *swimming* como *swarming*.



**Figura 55. Ensayos de *swimming* y *swarming* con Pto DC3000 y los mutantes  $\Delta$ TpsC y  $\Delta$ 5194.**

**A. Ensayo de *swimming*.** Aproximadamente  $4 \times 10^6$  ufc/ml se inocularon en el centro de placas de LB (0,3% de agar) y se incubaron a 25°C durante 48 h.

**B. Ensayo de *swarming*.** Aproximadamente  $4 \times 10^6$  ufc/ml se colocaron sobre la superficie de placas de PG-agar (0,5% de agar) y se incubaron 24 h a 25°C.

Las fotografías son representativas de los resultados obtenidos en tres experimentos diferentes.

#### 4.3. Fenotipos provocados por altos niveles intracelulares de c-di-GMP

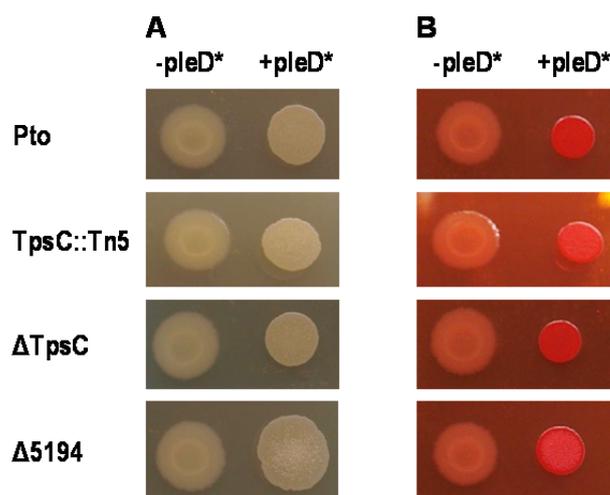
La sobreexpresión de una diguanilato ciclasa heteróloga que provoca un incremento generalizado de los niveles intracelulares de c-di-GMP, nos ha permitido estudiar el papel de este segundo mensajero en Pto (Pérez-Mendoza *et al.*, 2014). Para ello utilizamos una versión mutada de la diguanilato ciclasa PleD de *Caulobacter crescentus* que es activa constitutivamente (PleD\*, Paul *et al.*, 2004).

En primer lugar se obtuvieron las cepas recombinantes tras electroporar Pto y sus mutantes con un plásmido portador del gen *pleD\** bajo el promotor *lac* (pJBPléD\*, Pérez-Mendoza *et al.*, 2014). A continuación, estudiamos los fenotipos provocados por los altos niveles intracelulares de c-di-GMP, tanto en producción de exopolisacáridos como en formación de biopelículas.

##### 4.3.1. Producción de exopolisacáridos

La producción y acumulación de exopolisacáridos son esenciales para la adhesión de la bacteria a su hospedador y, por tanto, cruciales en las etapas iniciales de la interacción bacteria-planta. Ambos procesos se encuentran regulados por c-di-GMP en diversas especies bacterianas, tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional, observándose que el incremento en la producción de compuestos extracelulares dependiente de altos niveles de c-di-GMP modifica el aspecto de las colonias y, más concretamente su forma, tamaño, brillo y mucosidad (Lee *et al.*, 2007; Tagliabue *et al.*, 2010; Pérez-Mendoza *et al.* 2011b; Mann y Wozniak, 2012; Steiner *et al.*, 2012).

El incremento en los niveles de c-di-GMP en Pto DC3000 tiene un claro impacto en la morfología y color de las colonias crecidas en placas con Congo Red (CR) similar al *rdar* (*red, dry and rough*) de *Salmonella* o al *WS* (*wrinkly spreader*) o *RSCV* (*rugose small-colony variants*) de *Pseudomonas* (Friedman y Kolter, 2004; Römling, 2005; Starkey *et al.*, 2009; Figura 56). Concretamente en CR, la sobreexpresión de *pleD\** en Pto DC3000 generó colonias rojas y rugosas, a diferencia de la cepa control que formaba colonias ligeramente rosadas y mucosas. El CR es un colorante que, añadido a las placas de medio sólido, permite detectar la producción de componentes extracelulares tales como polisacáridos neutros o básicos y algunas proteínas. En el caso de Pto DC3000, el fenotipo CR<sup>+</sup> es debido a que Pto (pJBpleD<sup>\*</sup>) produce celulosa en respuesta a niveles elevados de c-di-GMP (Pérez-Mendoza *et al.*, 2014).



**Figura 56. Apariencia de las colonias de Pto en presencia de altos niveles de c-di-GMP.** Morfología de colonia (A) y crecimiento en presencia de CR (B) de Pto y los mutantes indicados en presencia de *pleD\** (+*pleD\**) comparados con la cepa control con el plásmido vacío (-*pleD\**). Las cepas se crecieron durante 3 días a 20°C en placas de LB suplementadas con tetraciclina (10 µg/ml) y CR (50 µg/ml)

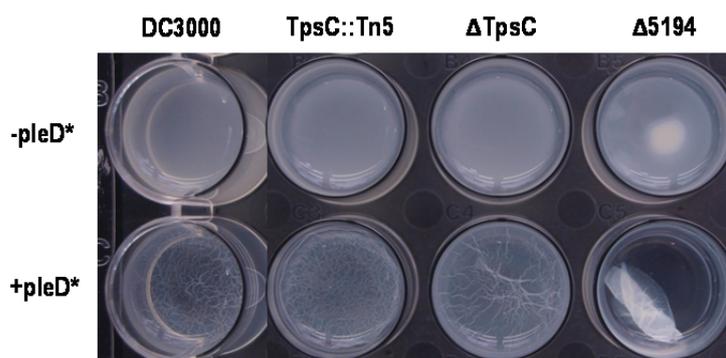
La apariencia de las colonias de los mutantes ensayados resultó ser similar a la de la cepa silvestre, tanto en ausencia como en presencia de PleD<sup>\*</sup>, por lo que podemos concluir que ni la bomba TpsABC ni la proteína PSPTO\_5194 parecen estar implicadas en la producción de exopolisacáridos en Pto DC3000.

#### 4.3.2. Formación de biopelículas

Las biopelículas son agregados bacterianos que funcionan como un consorcio cooperativo ayudando a la colonización de superficies sólidas y proporcionando protección frente a distintos estreses ambientales (Donlan *et al.*, 2002; Ramey *et al.*, 2004). En la biopelícula madura las células están encerradas en una matriz extracelular compuesta de diversos biopolímeros como proteínas, exopolisacáridos y ADN extracelular. Dicha matriz proporciona estabilidad mecánica a la biopelícula, facilita la adhesión a la superficie de toda la comunidad celular; así como favorece la captación de nutrientes y de otras moléculas biológicamente activas como las señales de comunicación célula-célula. Además, esta matriz funciona como un escudo protegiendo a la comunidad bacteriana frente a predadores, como protozoos y fagos líticos, la desecación, los rayos UV y distintos agentes antimicrobianos e, incluso, la respuesta inmune de hospedadores eucariotas (Hall-Stoodley *et al.*, 2004; Flemming y Wingender, 2010). De forma más

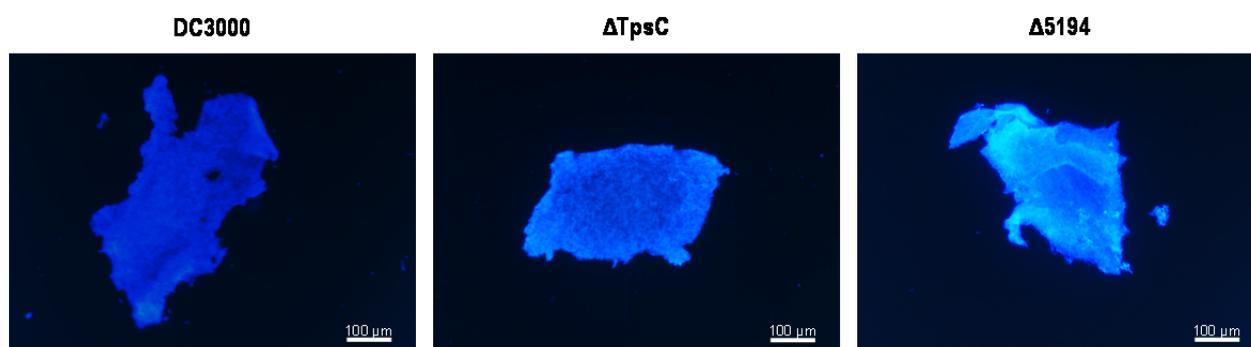
específica, la formación de agregados o microcolonias de bacterias que interactúan con plantas en las hojas de sus hospedadores permite a las bacterias adaptarse a su entorno, mejorando sus posibilidades de supervivencia en la filosfera (Monier y Lindow, 2004).

El incremento artificial de los niveles de c-di-GMP mediante la sobreexpresión de *pleD\**, provoca un aumento en la formación de biopelículas de Pto en la interfase líquido-aire, tanto en tubos de borosilicato como en placas multipocillo de poliestireno (Pérez-Mendoza *et al.*, 2014 y Figura 57). Estas biopelículas precipitan fácilmente, lo que sugiere una fuerte adhesión entre las células pero una unión débil a las superficies abióticas ensayadas (Robertson *et al.*, 2012).



**Figura 57. Formación de biopelículas de Pto y sus mutantes en la interfase líquido-aire en ausencia y presencia de PleD\*.** Pto DC3000, TpsC::Tn5,  $\Delta$ TpsC,  $\Delta$ 5194 con pJB3Tc19 (-pleD\*) o pJBpleD\* (+pleD\*) se cultivaron en MMR con Tc (10  $\mu$ g/ml) durante 72 h a 20°C en placas multipocillo de poliestireno en condiciones estáticas.

Para comprobar que la naturaleza de las biopelículas producidas por las cepas mutantes era similar a la generada por la cepa silvestre, se tiñeron las mismas con calcoflúor white (CF-W) y se observaron al microscopio de fluorescencia bajo luz UV (Figura 58). En presencia de PleD\*, todas las biopelículas son compactas y su matriz, pero no las células, se tiñe con CF-W, lo que indica la presencia de celulosa (Pérez-Mendoza *et al.*, 2014). En ausencia de PleD\*, no se detecta fluorescencia en ninguna de las preparaciones.



**Figura 58. Tinción con calcoflúor white de las biopelículas formadas en la interfase líquido-aire por Pto DC3000 y sus mutantes en ausencia y presencia de PleD\*.** Pto DC3000,  $\Delta$ TpsC y  $\Delta$ 5194 con pJBpleD\* se cultivaron en MMR con Tc (10  $\mu$ g/ml) durante 72 h a 20°C en placas multipocillo de poliestireno en condiciones estáticas. Pasado ese tiempo, 8  $\mu$ l del cultivo se dispusieron sobre un portaobjetos, se añadieron 4  $\mu$ l de KOH 10% y 4  $\mu$ l de solución de CF-W (Calcofluor White Stain, 18909, Fluka) y a continuación se visualizaron bajo el microscopio de fluorescencia excitando con luz UV.

En resumen, las biopelículas producidas por los mutantes  $\Delta TpsC$  y  $\Delta 5194$  resultaron indistinguibles de las generadas por la cepa silvestre, lo que sugiere que la proteínas TpsC (y probablemente el transportador TpsABC en su conjunto) no interviene en la formación de biopelículas ni agregados en Pto DC3000, como tampoco lo hace la proteína PSPTO\_5194.

## 5. Ensayos de infección en plantas de tomate

Los transportadores MDR de las bacterias fitopatógenas son similares a los presentes en bacterias que infectan a humanos y a animales, pero el papel de estos sistemas de transporte es tema de discusión (Martínez *et al.*, 2009; Piddock, 2006). Por ello, pensamos que el sistema TpsABC podía contribuir al proceso patógeno de Pto DC3000 y el mutante  $\Delta TpsC$  presentar dificultades durante la infección de plantas de tomate. Para comprobar estas hipótesis se comparó el comportamiento de la cepa silvestre y el mutante  $\Delta TpsC$  en hojas de tomate, determinando la supervivencia y capacidad para multiplicarse en los tejidos tras la inoculación mediante dos métodos: infiltración y rociado.

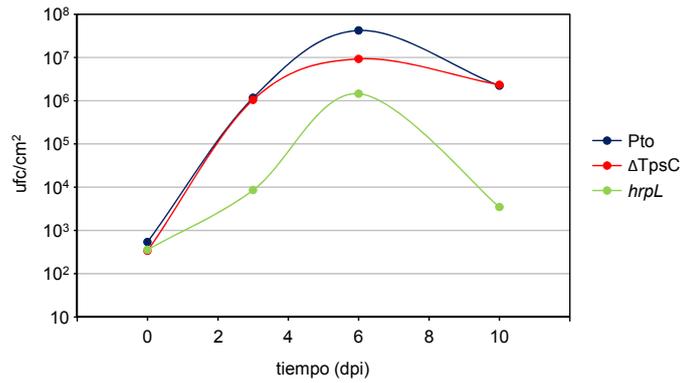
### 5.1. Mutante $\Delta TpsC$

#### 5.1.1. Inoculación por infiltración

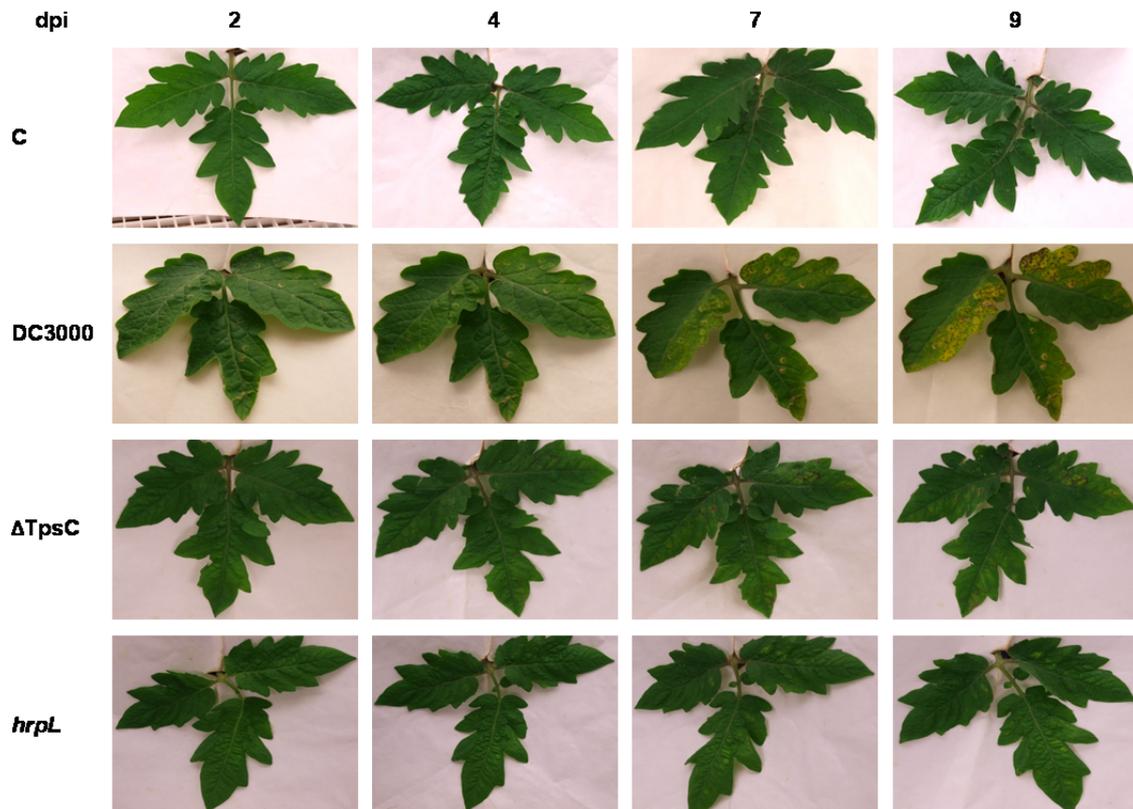
En primer lugar, se determinó la supervivencia y progresión de las poblaciones bacterianas de Pto DC3000 y el mutante  $\Delta TpsC$  en los tejidos de tomate tras su inoculación por infiltración con una solución bacteriana que contenía aproximadamente  $10^4$  ufc/ml.

El establecimiento inicial de las dos cepas se determinó a las 3 horas post-inoculación, observándose que era similar (entre  $6,33 \times 10^2$  y  $3,36 \times 10^2$  ufc/cm<sup>2</sup>). El tamaño de las poblaciones de Pto DC3000 y  $\Delta TpsC$  alcanzó un máximo de  $4,25 \times 10^7$  y  $9,24 \times 10^6$  ufc/cm<sup>2</sup> para DC3000 y el mutante, respectivamente, a los 6 dpi, cuando son visibles los primeros síntomas en las plantas infectadas con DC3000. A los 6 dpi, la población bacteriana en las plantas inoculadas con ambas cepas empieza a descender, llegando a  $7,76 \times 10^5$  ufc/cm<sup>2</sup> en las plantas inoculadas con DC3000 y a  $1,28 \times 10^6$  ufc/cm<sup>2</sup> en las inoculadas con el mutante a los 12 dpi (Figura 59). En el mismo ensayo se observó que el mutante *hrpL* es capaz de colonizar la planta pero no de multiplicarse y sobrevivir en ella a la misma tasa que la cepa silvestre o el mutante  $\Delta TpsC$ .

Los síntomas de la enfermedad causada por el mutante deficiente en *tpsC* resultaron ser diferentes a los causados por la cepa silvestre. Con Pto DC3000, en primer lugar, aparecieron unas pequeñas lesiones acuosas que posteriormente, a los 3 dpi, se rodearon de un halo de clorosis; estas lesiones pronto se convirtieron en puntos necróticos de color marrón, rodeados por un halo clorótico. En las plantas inoculadas con la cepa mutante la clorosis es menor y la necrosis se intuye a los 6 dpi pero no prospera, siendo poco evidente a los 10 dpi (Figura 60). La sintomatología del mutante  $\Delta TpsC$  también se comparó con la de un mutante *hrpL*, que no expresa el T3SS (Aragón *et al.*, no publicado). Este mutante, no produjo síntomas a lo largo de todo el experimento, siendo el aspecto de las plantas muy similar a las control infiltradas con MgCl<sub>2</sub> (Figura 60).



**Figura 59. Evolución de las poblaciones bacterianas de DC3000 y del mutante  $\Delta$ TpsC en hoja de tomate tras infiltración.** Las plantas se infiltraron con aproximadamente  $4 \times 10^4$  ufc/ml de DC3000 (azul),  $\Delta$ TpsC (rojo) y *hrpL* (verde) y se determinó en hoja el número de ufc/cm<sup>2</sup> a distintos tiempos post-infección. Los datos representan la media de tres experimentos diferentes con sus respectivas desviaciones estándar.



**Figura 60. Sintomatología inducida en hojas de tomate por DC3000 y el mutante  $\Delta$ TpsC a distintos tiempos post-infección tras inoculación por infiltración.** Las hojas de tomate se infiltraron con MgCl<sub>2</sub> 10 mM (C) o con soluciones de la cepa silvestre DC3000 y los mutantes  $\Delta$ TpsC y *hrpL* a  $4 \times 10^4$  ufc/ml.

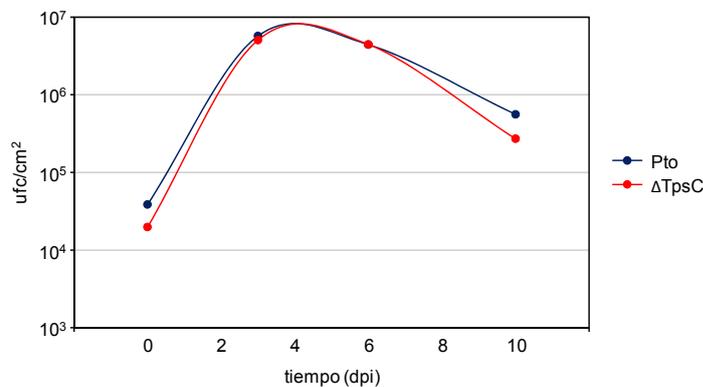
Estos experimentos se llevaron a cabo también con el mutante *TpsC::Tn5* obteniéndose resultados similares, lo que indica que la pérdida del sistema TpsABC no provoca una disminución en la capacidad de Pto para colonizar las plantas de tomate, pero si en su capacidad para provocar los síntomas de la enfermedad.

### 5.1.2. Inoculación por rociado

Como en el ensayo anterior, en el que se inocularon las plantas por infiltración no se observaron cambios en las poblaciones bacterianas (Figura 59); se hicieron ensayos inoculando las plantas por rociado con una suspensión bacteriana, de modo que al ser este método más natural se pudiera determinar si el mutante  $\Delta TpsC$  estaba afectado en invasión y colonización.

A continuación, se comparó el comportamiento en hojas de tomate, determinó la supervivencia y capacidad para multiplicarse en los tejidos de tomate de la cepa silvestre y el mutante  $\Delta TpsC$  tras su inoculación por rociado con una solución bacteriana que contenía aproximadamente  $10^8$  ufc/ml.

El establecimiento inicial de las dos cepas se determinó a las 3 horas post-inoculación, observándose que era similar (entre  $2,0 \times 10^4$  y  $3,38 \times 10^4$  ufc/cm<sup>2</sup>). El tamaño de las poblaciones de Pto DC3000 y  $\Delta TpsC$  alcanzó un máximo de  $1,31 \times 10^7$  y  $1,25 \times 10^7$  ufc/cm<sup>2</sup> para DC3000 y el mutante, respectivamente, a los 3 dpi. A los 6 dpi, la población bacteriana en las plantas inoculadas con ambas cepas empieza a descender, llegando a  $1,12 \times 10^6$  ufc/cm<sup>2</sup> en las plantas inoculadas con DC3000 y a  $1,41 \times 10^6$  ufc/cm<sup>2</sup> en las inoculadas con el mutante (Figura 61).



**Figura 61. Evolución de las poblaciones bacterianas de Pto DC3000 y  $\Delta TpsC$  en hoja de tomate tras inoculación por rociado.** Las plantas se rociaron con aproximadamente  $7 \times 10^7$  ufc/ml de DC3000 (azul) y  $\Delta TpsC$  (rojo) y se determinó en hoja el número de ufc/cm<sup>2</sup> a distintos tiempos post-infección. Los datos representan la media de tres experimentos diferentes con sus respectivas desviaciones estándar.

Los síntomas de la enfermedad causada por el mutante deficiente en *tpsC* resultaron ser diferentes a los causados por la cepa silvestre. En primer lugar, aparecieron unas pequeñas lesiones acuosas que posteriormente, a los 3 dpi, se rodearon de un halo de clorosis. Estas lesiones pronto se convirtieron en puntos necróticos de color marrón, rodeados por un halo clorótico en la cepa silvestre. En las plantas inoculadas con la cepa mutante esta necrosis empieza a aparecer a los 6 dpi pero no prospera, siendo poco evidente a los 10 dpi (Figura 62).

Todos estos resultados indican que la pérdida del transportador TpsABC no afecta al crecimiento de Pto ni en medios de laboratorio (apartado 4.1) ni en plantas de tomate, y tampoco parece tener un papel determinante ni en la supervivencia en hoja ni en la colonización de plantas de tomate. Sin embargo, está severamente afectado en virulencia.

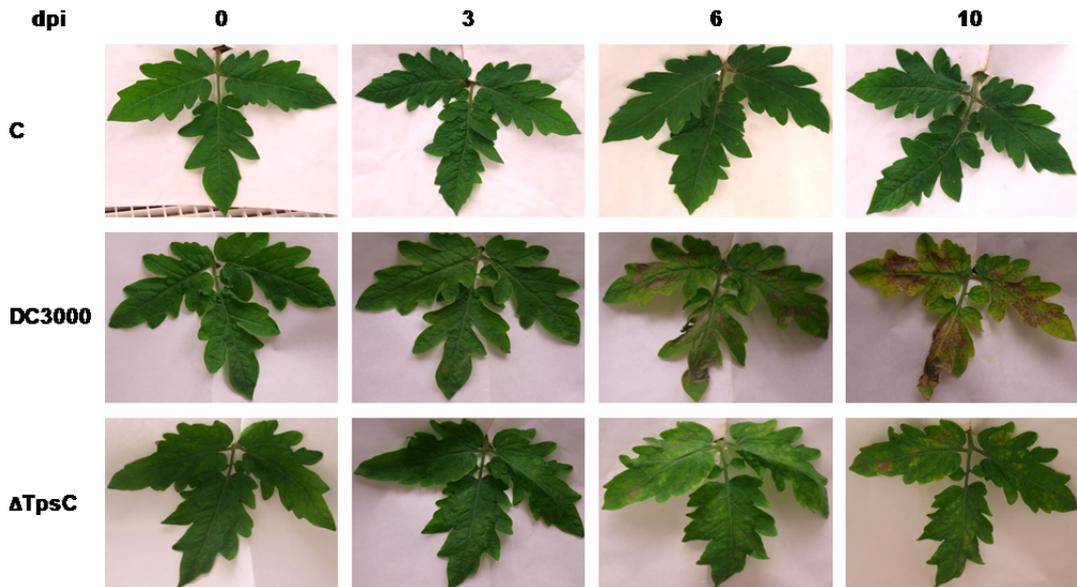


Figura 62. Sintomatología inducida en hojas de tomate por Pto DC3000 y el mutante  $\Delta$ TpsC a distintos tiempos post-infección tras inoculación por rociado. Las hojas de tomate se rociaron con  $MgCl_2$  10 mM (C) o con soluciones de la cepa silvestre DC3000 o el mutante  $\Delta$ TpsC a aproximadamente  $7 \times 10^7$  ufc/ml.

## 5.2. Mutante $\Delta$ 5194

El estudio de la infección en tomate con el mutante  $\Delta$ 5194 solo se llevó a cabo por el método de infiltración, comparándose con los síntomas provocados por Pto DC3000 y el mutante  $\Delta$ 5194 en los tejidos de tomate tras inocularlos a aproximadamente  $10^4$  ufc/ml. Se observaron los mismos síntomas con las dos cepas; es decir, pequeñas lesiones acuosas que, a los 3 dpi, se rodearon de un halo clorótico y después se necrosaron (Figura 63).

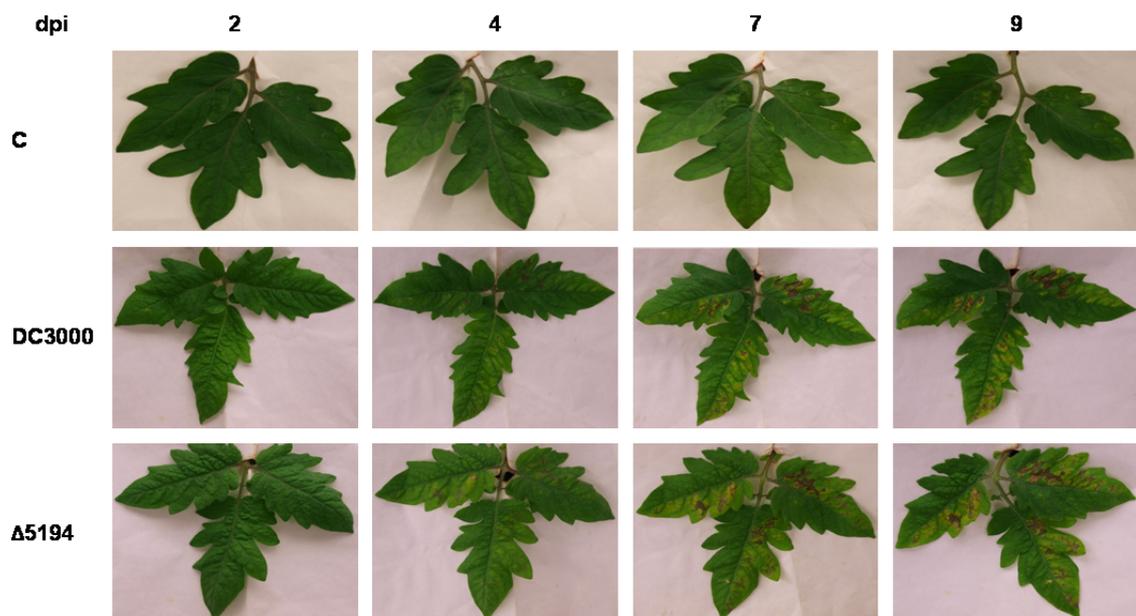


Figura 63. Sintomatología inducida en hojas de tomate por Pto DC3000 y el mutante  $\Delta$ 5194 a distintos tiempos post-infección tras inoculación por infiltración. Las hojas de tomate se infiltraron con  $MgCl_2$  10 mM (C) o con soluciones de la cepa silvestre o el mutante  $\Delta$ 5194 a aproximadamente  $5 \times 10^4$  ufc/ml.

En resumen, no se apreciaron diferencias significativas entre los síntomas provocados por las dos cepas, lo que sugiere que PSPTO\_5194 no es una toxina ni parece estar implicada en virulencia, al menos en las condiciones ensayadas. Asimismo, la menor virulencia del mutante  $\Delta$ TpsC en planta no parece deberse a que PSPTO\_5194 no se exporte fuera de la célula; es decir, no parece ser sustrato del transportador TpsABC. Por todo ello, no proseguimos con la caracterización de este mutante ni de la proteína.

### 5.3. Estudio de la infección con técnicas no invasivas de imagen

En este caso, analizamos la virulencia de la cepa silvestre comparándola con la de las cepas mutantes en la bomba TpsABC y el mutante *hrpL*, estudiando la respuesta del hospedador mediante la técnica de fluorescencia multiespectral (MCFI).

En estos ensayos se observó un notable incremento en la fluorescencia azul y verde (F440 y F520) en las zonas foliares inoculadas con la cepa silvestre. Los primeros cambios registrados son pre-sintomáticos, apareciendo a 2 dpi y aumentando ambas emisiones a lo largo de todo el experimento con una tendencia similar en F440 y F520. Los patrones foliares de fluorescencia en plantas infiltradas con el mutante *hrpL* se asemejan a los de plantas control. En las plantas inoculadas con el mutante  $\Delta$ TpsC se observa un leve incremento en fluorescencia verde y azul en las zonas inoculadas que resulta más intenso a 4 dpi (Figura 64). Las diferencias en sintomatología entre las cepas bacterianas anteriormente descritas (apartado 5.2.) se corresponden en gran parte, con las detectadas en los patrones foliares de fluorescencia, aunque estas últimas aparecen antes.

En los patrones foliares de fluorescencia correspondientes al rojo y rojo lejano (F690 y F740) no se observan grandes diferencias entre las plantas control y las infectadas con las cepas mutantes, registrando valores de fluorescencia moderadamente altos, más elevados en el caso de F740, sin grandes cambios a lo largo de la infección. En las plantas infectadas con la cepa silvestre, ambas emisiones son más bajas, sin apenas variaciones entre 2 y 7 dpi e incrementando a 9 dpi (Figura 65).

Los cocientes de las emisiones de fluorescencia F440/690 y F440/740 mostraron un incremento de la señal en las plantas inoculadas con DC3000 a partir de los 2 dpi (Figura 66), siendo este incremento significativo pero más leve que el observado en las emisiones de F440 y F520. Las plantas infiltradas con el mutante *hrpL* no muestran variaciones en estos cocientes, siendo sus patrones foliares muy similares a los observados en las plantas control. En las plantas inoculadas con el mutante  $\Delta$ TpsC sólo se observan leves incrementos de los cocientes en la zona inoculada (Figura 66).

También se analizaron los patrones de fluorescencia F520/690 y F520/740 en los que se observó un comportamiento similar a los de los cocientes anteriores (Figura 67). Los patrones foliares correspondientes a los cocientes F440/520 y F690/740 también se analizaron en este estudio pero no demostraron ser de gran utilidad para determinar diferencias entre las cepas bacterianas durante la infección, por lo que las figuras correspondientes no se muestran.

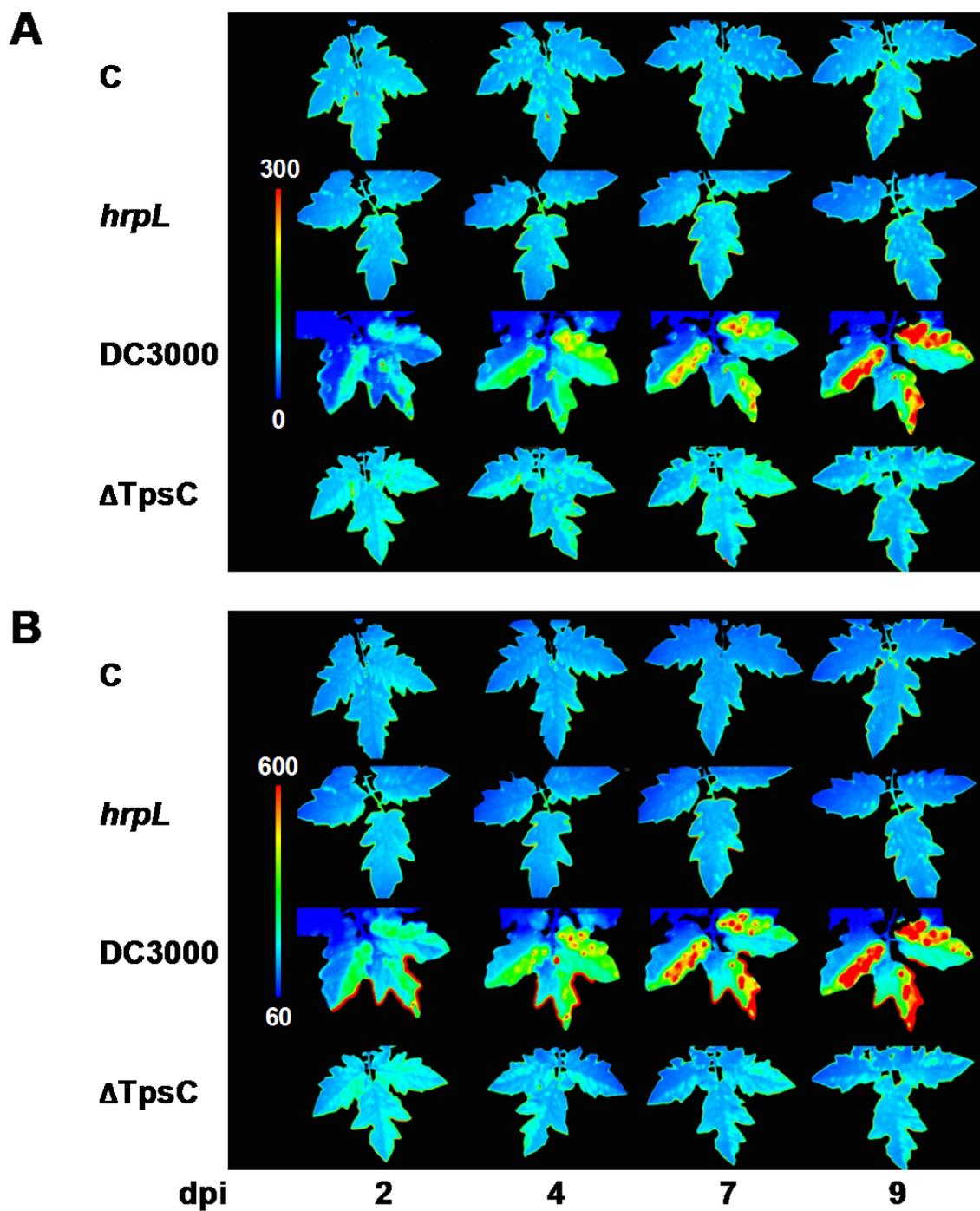


Figura 64. Patrones foliares de fluorescencia verde-azul de plantas de tomate. Se inocularon plantas con aproximadamente  $4 \times 10^4$  ufc/ml de DC3000,  $\Delta$ TpsC y *hrpL*; las plantas control con  $MgCl_2$  10 mM. Imágenes de fluorescencia: A. Azul (440 nm) y B. Verde (520 nm).

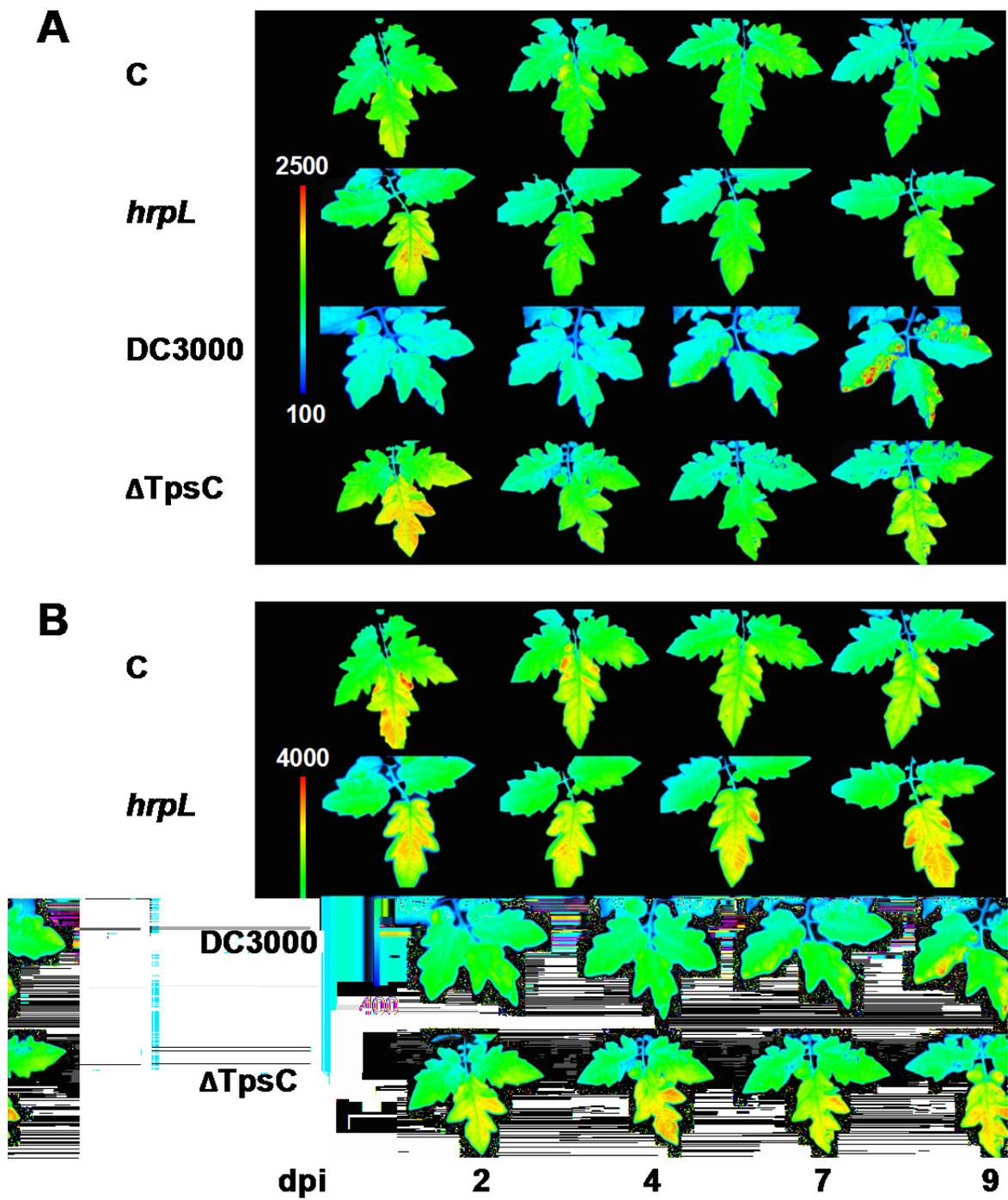


Figura 65. Patrones foliares foliares de fluorescencia roja de plantas de tomate. Se inocularon plantas con aproximadamente  $4 \times 10^4$  ufc/ml de DC3000,  $\Delta$ TpsC y *hrpL*; las plantas control con  $MgCl_2$  10 mM. Imágenes de fluorescencia: A. Rojo (690 nm) y B. Rojo lejano (740 nm).

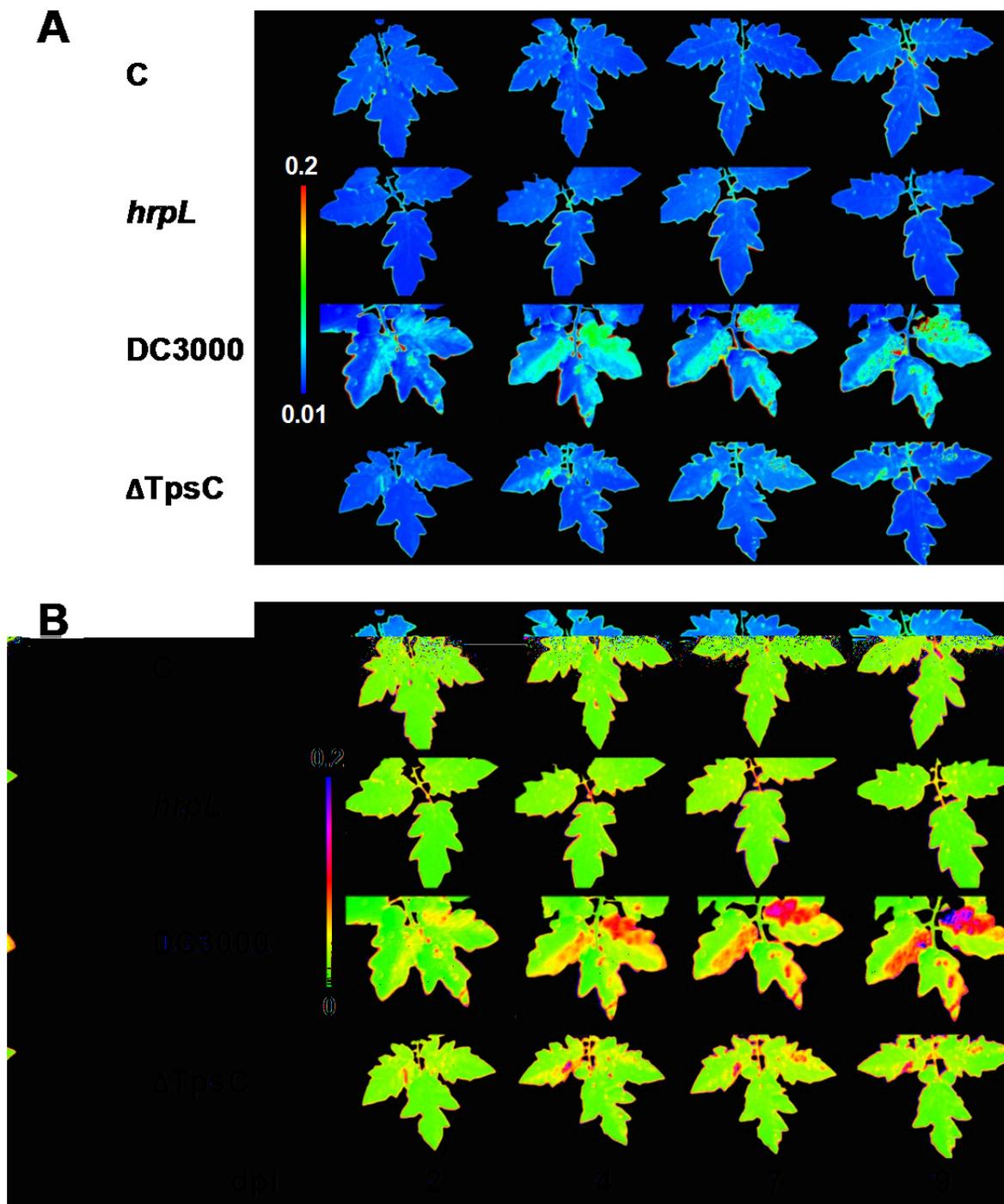


Figura 66. Patrones foliares de cocientes de emisiones de fluorescencia de plantas de tomate. Se inocularon plantas con aproximadamente  $4 \times 10^4$  ufc/ml de DC3000,  $\Delta$ TpsC y *hrpL*; las plantas control con  $MgCl_2$  10 mM. Imágenes: A. F440/690 y B. F440/740.

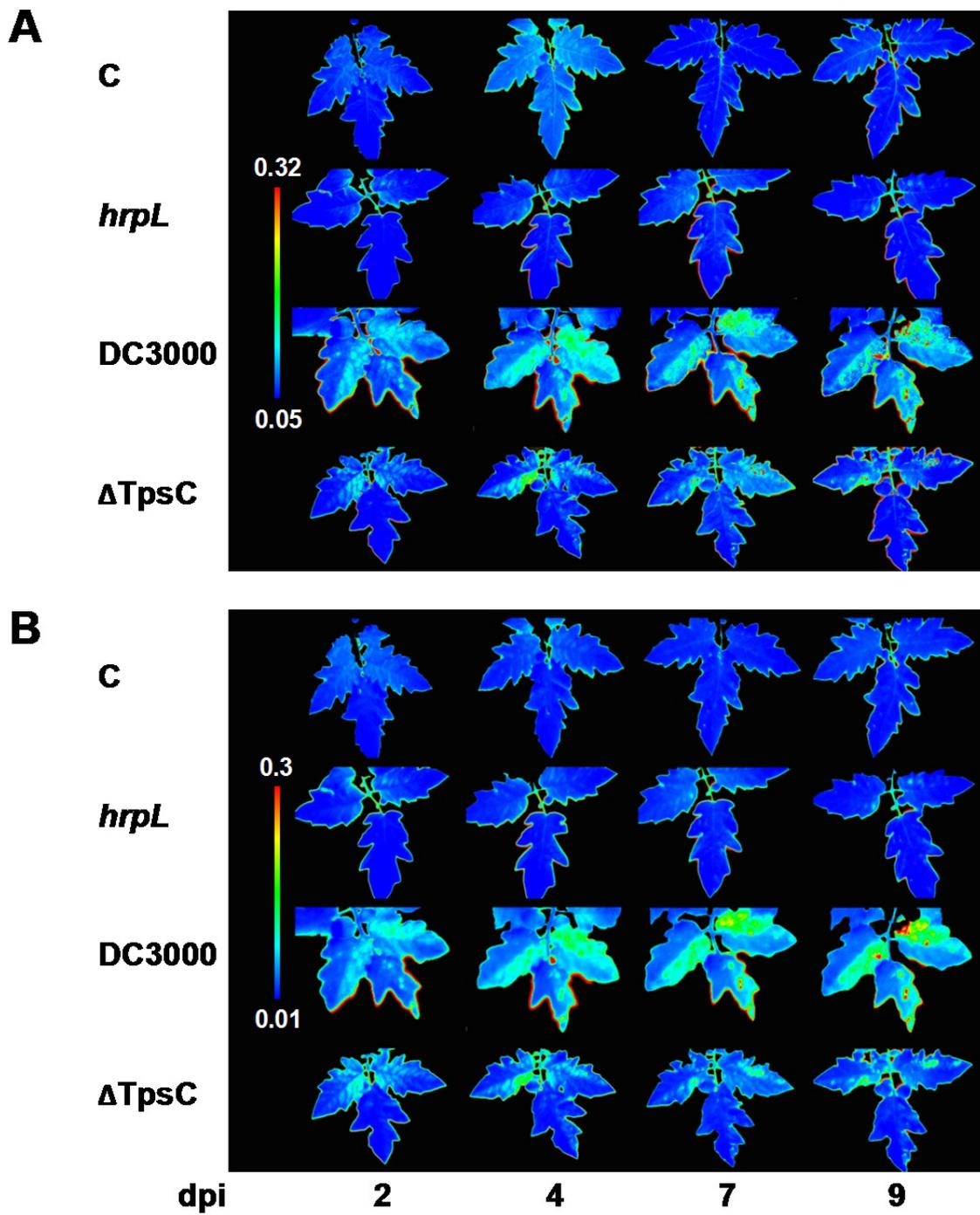


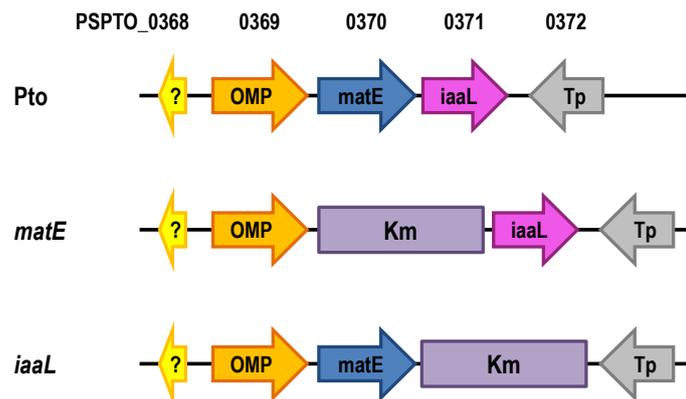
Figura 67. Patrones foliares de cocientes de emisiones de fluorescencia de plantas de tomate. Se inocularon plantas con aproximadamente  $4 \times 10^4$  ufc/ml de DC3000,  $\Delta$ TpsC y *hrpL*; las plantas control con  $MgCl_2$  10 mM. Imágenes: A. F520/F690 y B. F520/740.

**Capítulo 3. Caracterización con MCFI de mutantes de un transportador de la familia MATE de *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000**



## 1. Mutantes objeto de estudio

En este caso trabajamos con dos mutantes obtenidos por Isabel Aragón en el laboratorio del Dr. Cayo Ramos de la Universidad de Málaga. Estos mutantes son el *matE*, afectado en el ORF PSPTO\_0370, que codifica un putativo transportador de la familia MATE y el mutante *iaaL*, carente del ORF PSPTO\_0371, que parece formar parte del mismo operón (Figura 68). Las plantas de tomate infectadas con estos mutantes mostraban menos síntomas que las inoculadas con la cepa silvestre, por lo que nos propusimos caracterizar la respuesta de la planta frente a los mismos.



**Figura 68. Mutantes *iaaL* y *matE* construidos mediante doble recombinación en Pto DC3000.** PSPTO\_0370 y PSPTO\_0371 fueron deletados y se insertó en su lugar un cassette con resistencia a Km (Castillo-Lizardo *et al.*, no publicado). OMP: *outer membrane protein*, Tp: transposasa, ?: proteína de función desconocida.

La capacidad de Pto DC3000 para infectar sus plantas hospedadoras depende de genes activados por el factor sigma alternativo HrpL. El regulón HrpL incluye los genes que codifican el T3SS y un repertorio de proteínas efectoras que son secretadas por él, así como otros genes no relacionados con el T3SS, como los genes *cor* o *iaaL* (Fouts *et al.*, 2002; Ferreira *et al.*, 2006; Cunnac *et al.*, 2011). Sin embargo, la importancia de la activación de *iaaL* por HrpL y su implicación en la virulencia de Pto no están claras. *iaaL* cataliza la conversión del IAA en el conjugado IAA-lisina (Hutzinger y Kosuge, 1968; Glass y Kosuge, 1986). En primer lugar, en el genoma de Pto DC3000 aparecen dos ORFs cuyos productos muestran una identidad muy baja con los de *iaaM* e *iaaH* de *P. savastanoi* y cuyos papeles en la biosíntesis de IAA no se han demostrado (Buell *et al.*, 2003; Baltrus *et al.*, 2011; Ramos *et al.*, 2012). En segundo lugar, el gen *iaaL* se expresa diferencialmente en respuesta a la sobreexpresión de *hrpL* (Ferreira *et al.*, 2006).

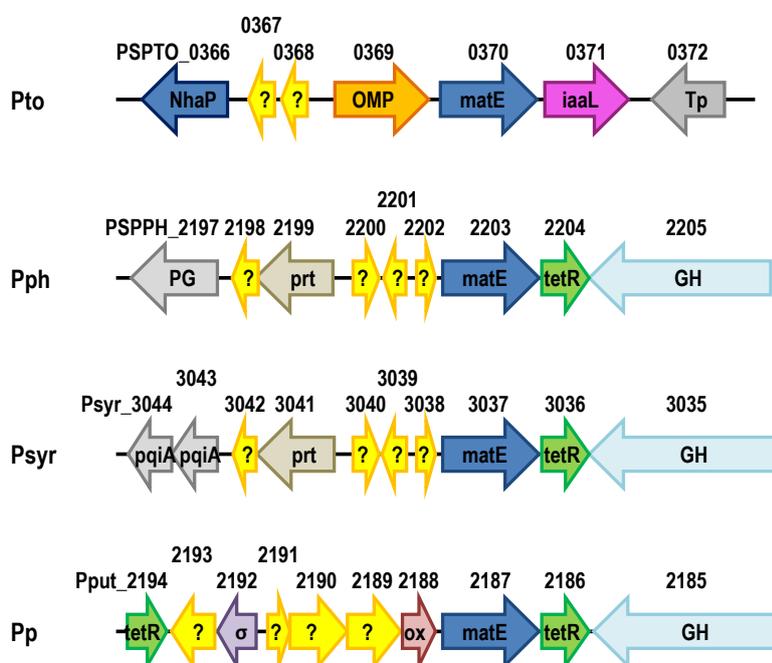
En 5' con respecto a *iaaL* se encuentra PSPTO\_0370, que codifica un transportador de la familia MATE. Este tipo de transportadores están asociados con la resistencia a múltiples fármacos y contribuyen a la supervivencia bacteriana en los tejidos de las plantas mediante la eliminación de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana, como los flavonoides, isoprenoides o alcaloides, presentes en los tejidos de plantas sanas o sintetizados *de novo* en respuesta al ataque de patógenos (Dixon, 2001; Osbourn, 1996). Se ha demostrado que otros transportadores MDR contribuyen a la colonización de plantas por bacterias fitopatógenas, incluyendo varias cepas de *P. syringae* (Stoitsova *et al.*, 2008; Fan *et*

al., 2011; Vargas *et al.*, 2011); sin embargo, hasta ahora no ha sido demostrado que los transportadores MATE contribuyan a la virulencia.

El objetivo de este estudio es analizar el papel de estos genes en la virulencia de DC3000 en plantas de tomate antes del desarrollo de síntomas mediante la utilización de imágenes de fluorescencia multicolor.

## 2. Caracterización *in silico* del transportador *matE* y del gen *iaaL*

El análisis del contexto genómico de los genes *matE* e *iaaL* en distintas cepas del género *Pseudomonas* muestra que estos dos genes no están siempre juntos (Figura 69). Sólo en cepas filogenéticamente cercanas a Pto DC3000 (Pto T1, *P. lachrymans*, *P. morsprunorum* o *P. actinidiae*) la organización génica es similar por encima de los loci *matE-iaaL*. Sin embargo, en Pph, Psyr o *P. putida* W619, el contexto genómico es muy diferente (Figura 69).



**Figura 69. Organización génica del transportador MATE y otros sistemas homólogos de distintas bacterias del género *Pseudomonas*.** ?, proteína de función desconocida; NhaP, antiporter Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>; OMP, proteína de membrana externa (*outer membrane protein*); Tp, transposasa; PG, pseudogen; prt, metaloproteasa; TetR, regulador transcripcional de la familia TetR; GH, β-glucosidasa; pqIA, proteína A inducible por paraquat; σ, factor sigma ECF de la ARN-polimerasa; ox, putativa oxidorreductasa de la familia DoxX.

PSPTO\_0371 (*iaaL*) codifica una proteína de 395 aminoácidos con actividad indolacético-lisina sintetasa, es decir, que cataliza la conversión del ácido indol-3-acético (IAA) en el aminoácido conjugado indol-acetil-ε-L-lisina (IAA-Lys). En este sentido, *iaaL* posee un dominio de unión a AMP característico de enzimas que intervienen en la síntesis de ácidos grasos celulares y en reacciones de adenilación usando ATP (Conti *et al.*, 1996; Jogl *et al.*, 2004; Figura 70).

El IAA es una fitohormona que también producen determinadas bacterias asociadas a plantas y que puede provocar o no hiperplasia de los tejidos. Bacterias patógenas y no patógenas de plantas sintetizan una variedad de conjugados de IAA, cuyo papel es desconocido aún (Costacurta y Vanderleyden, 1995). Las plantas, por su parte, sintetizan en sus tejidos y secretan IAA-Lys y otros conjugados de IAA en lo que parece ser una forma para el almacenamiento, transporte y/o protección de la degradación del IAA (Spaepen *et al.*, 2007). Lo que sí parece claro es que el compuesto IAA-Lys es menos activo que la fitohormona (Hutzinger y Kosuge, 1968; Thimann, 1963; Romano *et al.*, 1991).

*iaaL* de *P. savastanoi* es el único gen bacteriano caracterizado hasta el momento implicado en la conjugación del IAA. Se cree que el IAA se libera tras la hidrólisis de este compuesto en el interior de los tejidos de la planta por acción de enzimas vegetales. La incapacidad para sintetizar IAA-Lys en cepas mutantes afecta a la virulencia de esta bacteria, ya que disminuye su capacidad para producir agallas en plantas de olivo, pero no afecta a su capacidad para multiplicarse en los tejidos de la planta, lo que pone de manifiesto que el IAA no es necesario para el crecimiento en los tejidos pero sí para el desarrollo de los síntomas en olivo (Glass y Kosuge, 1986; Spaepen *et al.*, 2007).

El gen *iaaL* está ampliamente distribuido en patovares de *P. syringae*, pero no se encuentra en otras bacterias patógenas de plantas, como *A. tumefaciens* o *X. campestris* (Glickmann *et al.*, 1998). Aunque su función es desconocida en Pto DC3000, la presencia de un promotor dependiente de HrpL delante de este gen, sugiere que está implicado en virulencia y, de hecho, se sabe desde hace tiempo que Pto DC3000 altera el mecanismo de señalización por auxinas de la planta, lo que la hace a su vez más susceptible a la enfermedad provocada por esta bacteria (Fouts *et al.*, 2002; O'Donnell *et al.*, 2003; Thilmony *et al.*, 2006). Lo que sí está claro es que la delección de *iaaL* no afecta al crecimiento de esta bacteria ni *in vitro* ni en planta (Bao *et al.*, 2014).

Al comparar la secuencia de *iaaL* con otras proteínas presentes en las bases de datos se observa que es un 96-99% idéntica a proteínas anotadas como *preprotein translocase subunit Tim44* o como indolacético-lisina sintetasas en numerosas cepas de *P. syringae*. También aparecen ortólogos de esta proteína en bacterias asociadas a plantas como *Erwinia mallotivora* (86% de identidad) o *Burkholderia cenocepacia* (27% de identidad) e incluso en bacterias asociadas a insectos, como *Arsenophonus nasoniae* (40% de identidad) (Goto, 1976; Balandreau *et al.*, 2001; Wilkes *et al.*, 2010).

PSPTO\_0370 (*matE*) codifica un transportador de 458 aminoácidos que posee dos dominios MatE característicos de esta familia de transportadores (Figura 70). Como se ha mencionado en la introducción, los transportadores tipo MatE están presentes en bacterias, arqueobacterias y eucariotas y están implicados en la resistencia a múltiples antibióticos, entre los que destacan fluoroquinolonas y aminoglucósidos, y a otros compuestos tóxicos (Brown *et al.*, 1999; Kuroda y Tsuchiya, 2009). PSPTO\_0370 forma parte de la familia de transportadores MATE junto con NorM de *Neisseria gonorrhoeae* o YdhE de *E. coli* que se caracterizan por presentar secuencias muy similares, tamaños comprendidos entre 450 y 550 aminoácidos y funcionar mediante un mecanismo antiporter Na<sup>+</sup> o H<sup>+</sup>:droga (Brown *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2006; Long *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2013).

NorM es un transportador antiporter Na<sup>+</sup>:droga bien estudiado que media la resistencia a bromuro de etidio, fluoroquinolonas (norfloxaxina o ciprofloxacina), acriflavina, berberina o colorantes catiónicos (Long

*et al.*, 2008). Con 12 dominios transmembrana, su estructura ha sido resuelta y su modo de acción desvelado: la unión de Na<sup>+</sup> desencadena la extrusión de múltiples compuestos al provocar cambios conformacionales en el transportador (Lu *et al.*, 2013; Tanaka *et al.*, 2013).



**Figura 70. Organización en dominios de las proteínas IaaL y MatE según Pfam.** *MatE* es un dominio proteico presente en transportadores de membrana interna implicados en la resistencia a diferentes compuestos antimicrobianos (Kuroda y Tsuchiya, 2009). AMP es un dominio proteico característico de proteínas que usan ATP en reacciones de adenilación (Conti *et al.*, 1996).

Al comparar la secuencia de aminoácidos de este transportador con otras proteínas presentes en las bases de datos se observa que es un 37-42% idéntico a otros transportadores MATE de *P. putida* W619, un 42% idéntico a la proteína hipotética Psyr\_3037 de *P. syringae* B728a, y presenta tan solo un 10% de identidad con la proteína NorM de *Vibrio parahaemolyticus*. Entre los transportadores MatE de bacterias que interaccionan con plantas caracterizados funcionalmente hasta el momento, se encuentra NorM de *Erwinia amylovora*, cuyos sustratos son ciprofloxacina, norfloxacina, kanamicina, ampicilina, bromuro de etidio, floretina o cristal violeta. Se ha demostrado que es indispensable para la competencia con otras bacterias de su hábitat ya que contribuye a la resistencia intrínseca de *E. amylovora* frente a compuestos producidos por otras bacterias epifitas (Burse *et al.*, 2004b; Kuroda y Tsuchiya, 2009). DinF de *Ralstonia solanacearum* expulsa compuestos como acriflavina, bromuro de etidio, fitoalexinas o detergentes y su mutación disminuye la producción de síntomas en plantas de tomate (Brown *et al.*, 2007; Kuroda y Tsuchiya, 2009)

### 3. Estudio de la infección con técnicas no invasivas de imagen

#### 3.1. Sintomatología provocada por los mutantes

Los ensayos de infección se realizaron como se describe en el apartado 9.1 de Materiales y Métodos infiltrando las plantas con un inóculo con aproximadamente  $3 \times 10^4$  ufc/ml.

El seguimiento de la sintomatología generada en las plantas de tomate por la cepa silvestre y los mutantes *iaaL* y *matE* a distintos tiempos post-infección mostró la aparición de clorosis y unas pequeñas lesiones necróticas después de los 3 dpi y 4 dpi en el área inoculada de las hojas infiltradas con DC3000. Estos síntomas se intensificaron con el tiempo y a los 9 dpi abarcaban toda la zona infiltrada. En las plantas infiltradas con el mutante *matE*, se observa una clorosis restringida al área infiltrada después de los 7 dpi, con unas manchas necróticas muy pequeñas que, comparadas con las observadas en las plantas infiltradas con la cepa silvestre, son muy escasas. Por el contrario, en las plantas inoculadas con el mutante *iaaL*, se observa una escasa clorosis y una necrosis similar a la causada por el mutante *matE* (Figura 71).

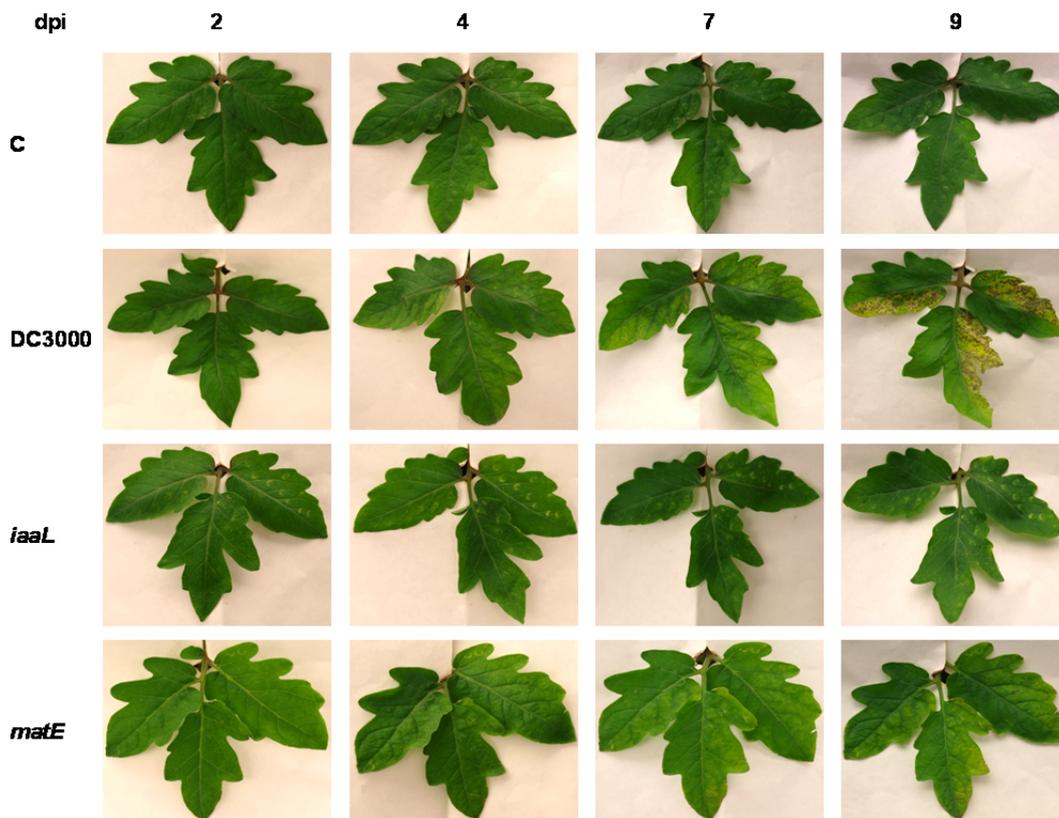


Figura 71. Sintomatología inducida en hojas de tomate por DC3000 y mutantes *iaaL* y *matE* a distintos tiempos post-infección. Las plantas control se infiltraron con MgCl<sub>2</sub> 10 mM (C); las demás se inocularon con aproximadamente 3×10<sup>4</sup> ufc/ml de la cepa silvestre DC3000 y los mutantes *iaaL* y *matE*.

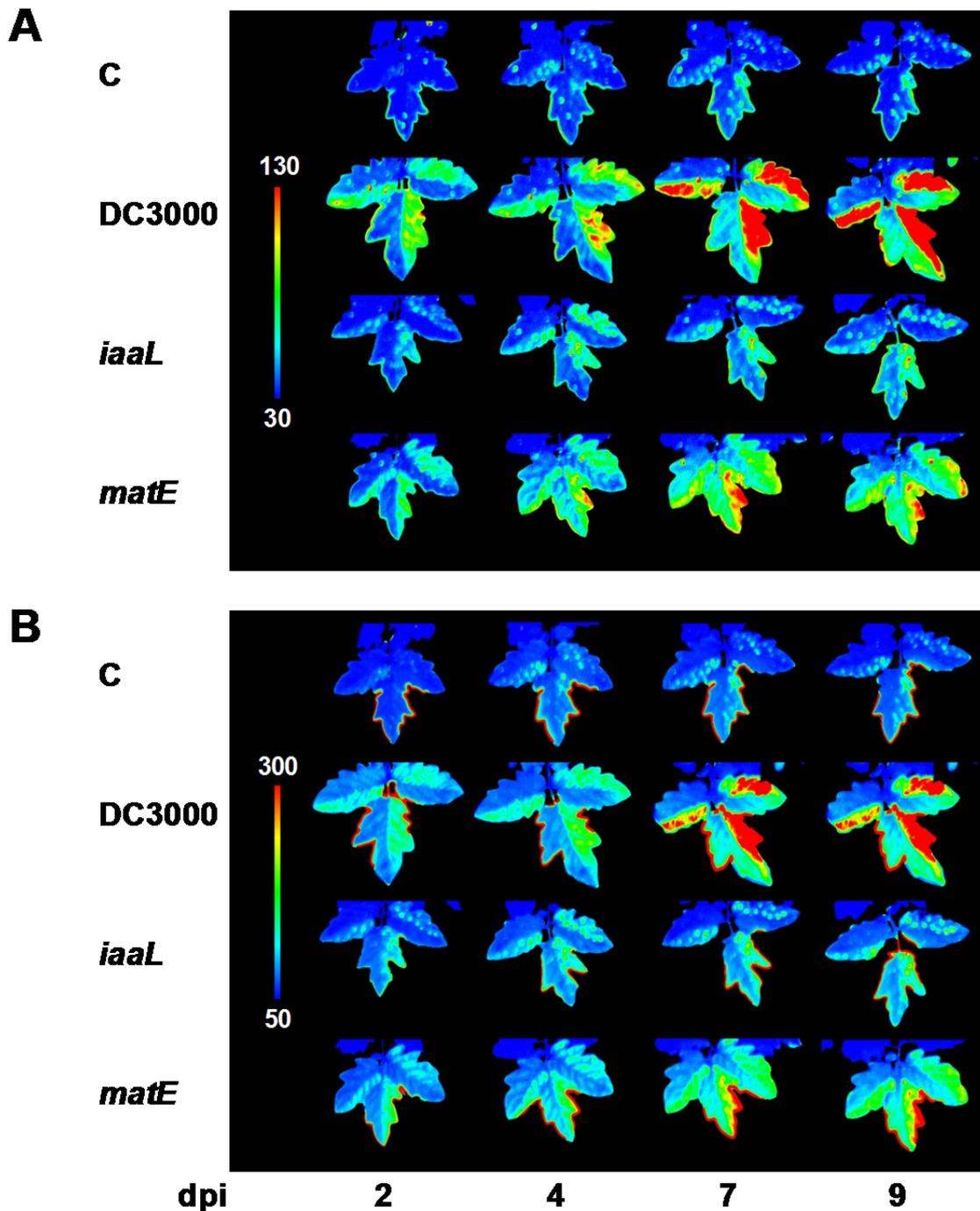
### 3.2. Análisis de imágenes de fluorescencia multiespectral (MCFI)

Continuando con el uso de las técnicas de imagen como herramienta para caracterizar la infección de plantas de tomate con mutantes de DC3000 obtuvimos imágenes de fluorescencia multiespectral de plantas de tomate infectadas con la cepa silvestre y también con los mutantes *iaaL* y *matE* descritos anteriormente.

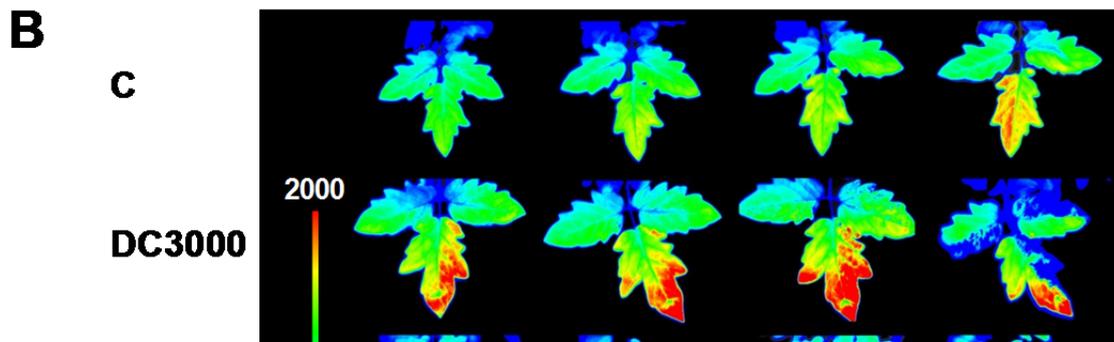
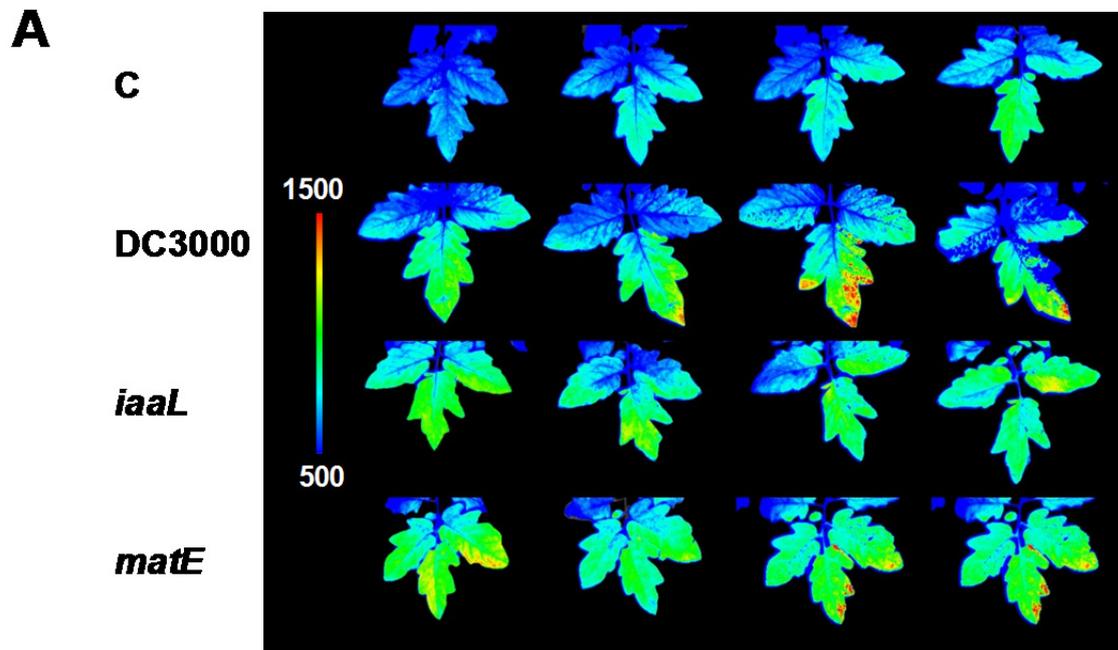
Los cambios en F440 y F520 en todas las plantas infectadas a lo largo del experimento muestran un patrón similar en ambos casos, incrementándose ambas señales a partir de 2 dpi (pre-sintomático), siendo más intensas en las plantas infiltradas con DC3000. A 7 y 9 dpi la diferencia entre la infección con la cepa silvestre y las mutantes es muy evidente. También se observó que las plantas infiltradas con *matE* presentan valores de fluorescencia más altos, a lo largo del experimento, que las infectadas con *iaaL* (Figura 72).

En F690 y F740 no existe una tendencia clara en los patrones de fluorescencia que nos permita distinguir entre la infección con la cepa silvestre y las mutantes (Figura 73). Esta situación mejora si analizamos los cocientes F440/690 y F440/740, que exageran las diferencias encontradas en las imágenes de F440 y F520 y muestran una tendencia similar. Los cambios son más notables en F440/690 que en F440/740 (Figura 74).

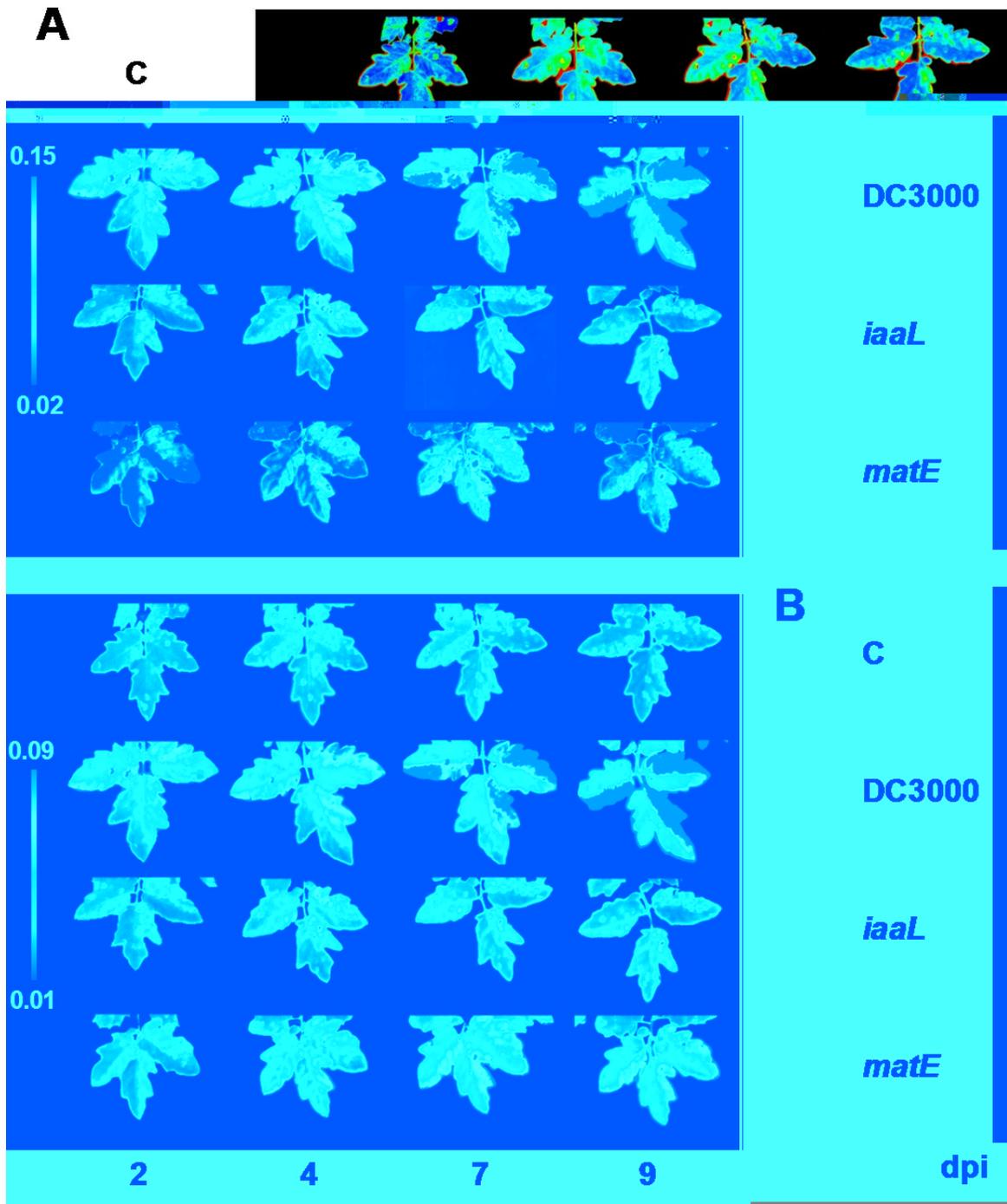
En las imágenes de los cocientes F520/690 y F520/740 se atenúan las diferencias respecto a lo observado en las de F440, F520, F440/690 y F440/740, especialmente a los 2 dpi. (Figura 75). En general, la señal observada en F520/740 en todas las plantas infiltradas con DC3000 y los mutantes es más intensa que la observada en F520/690.



**Figura 72. Patrones foliares de fluorescencia verde-azul de plantas de tomate.** Se inocularon plantas con aproximadamente  $3 \times 10^4$  ufc/ml de DC3000, *iaaL* y *matE*; las plantas control (C) con  $MgCl_2$  10 mM. Imágenes de fluorescencia: A. Azul (440 nm) y B. Verde (520 nm).



**Figura 73. Patrones foliares de fluorescencia roja de plantas de tomate.** Se inocularon plantas con aproximadamente  $3 \times 10^4$  ufc/ml de DC3000, *iaaL* y *matE*; las plantas control (C) con  $MgCl_2$  10 mM. Imágenes de fluorescencia: **A.** Roja (690 nm) y **B.** Rojo lejano (740 nm).



**Figura 74. Patrones foliares de cocientes de emisiones de fluorescencia de plantas de tomate.** Se inocularon plantas con aproximadamente  $3 \times 10^4$  ufc/ml de DC3000, *iaaL* y *matE*; las plantas control (C) con  $MgCl_2$  10 mM. Imágenes: A. F440/690 y B. F440/740.

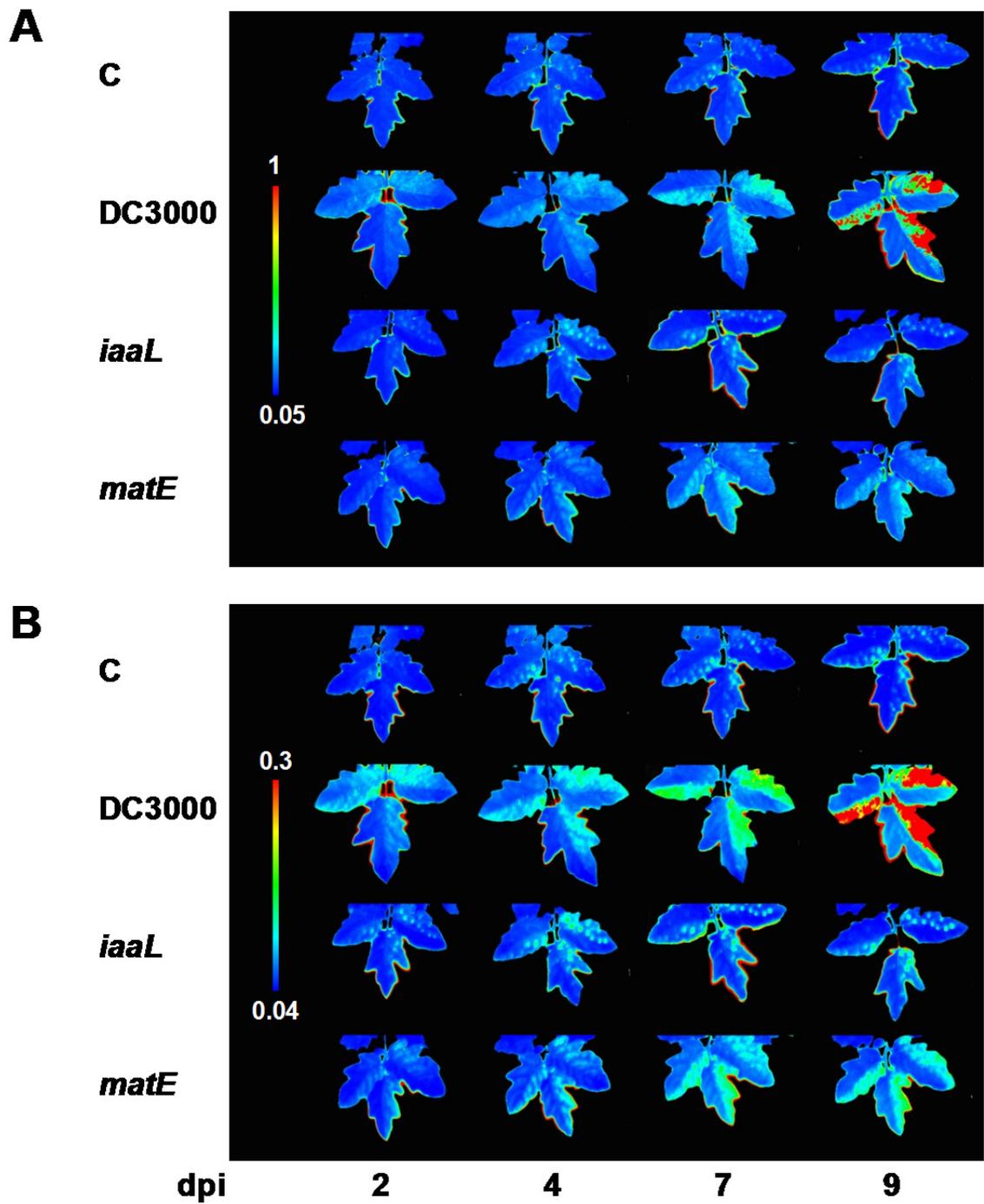


Figura 75. Patrones foliares de cocientes de emisiones de fluorescencia de plantas de tomate. Se inocularon plantas con aproximadamente  $3 \times 10^4$  ufc/ml de DC3000, *iaaL* y *matE*; las plantas control (C) con  $MgCl_2$  10 mM. Imágenes: A. F520/690 y B. F520/740.



## DISCUSIÓN



El establecimiento de una población inicial del patógeno y la posterior colonización de los tejidos del hospedador son cruciales para el desarrollo de la enfermedad. Algunas bacterias fitopatógenas y, más concretamente *P. syringae*, son capaces de colonizar la filosfera gracias a su adaptación a este hábitat donde se enfrentan a diferentes condiciones de estrés, tanto abiótico como biótico. Su supervivencia en ese ambiente está favorecida por su capacidad para eliminar a otros organismos competidores y por su habilidad para resistir los efectos de los compuestos tóxicos producidos por ellos y por el hospedador (Thomashow y Weller, 1996). En este sentido, la síntesis de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana es una de las respuestas de las plantas frente al ataque de patógenos (Dixon, 2001). Sin embargo, las bacterias han desarrollado mecanismos de resistencia a esos compuestos, como los sistemas MDR, que constituyen uno de los mecanismos más importantes de detoxificación celular y que, en algunos casos, resultan esenciales para el desarrollo de la enfermedad (Paulsen, 2003; Piddock, 2006; Martínez *et al.*, 2009). Los resultados del presente trabajo de tesis indican que los transportadores de tipo RND MexAB-OprM de Pph y TpsABC de Pto y el transportador de tipo MATE MatE de Pto, están implicados en la supervivencia bacteriana, la colonización y/o el desarrollo de la enfermedad en plantas.

## 1. Transportador MexAB-OprM

Se ha propuesto que las bombas RND podrían desempeñar un papel activo en el metabolismo celular o simplemente eliminar subproductos no deseados, por lo que su expresión debe estar controlada por señales fisiológicas específicas relacionadas con la función del transportador en el metabolismo celular. Alternativamente, podrían estar implicadas en la resistencia a compuestos tóxicos producidos por los hospedadores o por otros microorganismos presentes habitualmente en el medio ambiente de la bacteria (Piddock, 2006). Los estudios llevados a cabo con el sistema MexAB-OprM de Pto DC3000 (Stoitsova *et al.*, 2008; Fan *et al.*, 2011; Vargas *et al.*, 2011) y de Pph 1448A (Stoitsova *et al.*, 2008; este trabajo) demuestran que es un mecanismo de resistencia bacteriana que facilita la supervivencia y la colonización en planta.

La inserción de un interposón en *mexA* de Pph interrumpe la expresión del operón *mexAB-oprM*, por lo que la cepa PphA carece del transportador MexAB-OprM. Se debe hacer notar que esa mutación no afecta ni al crecimiento ni a la competencia de PphA en medios de cultivo (Figuras 29 y 30), pero la comparación de la susceptibilidad a diferentes antibióticos entre la cepa silvestre y el mutante PphA permitió identificar los sustratos de la bomba MexAB-OprM (Tablas 11 y 12). En la cepa carente de *pmeR*, PphR, la resistencia a la mayoría de los compuestos ensayados (Tabla 11) es mayor que la de la cepa silvestre, lo que sugiere que este regulador estaría reprimiendo la expresión del operón *mexAB-oprM*, como sucede en Pto DC3000 (Vargas *et al.*, 2011).

Los resultados de Stoitsova *et al.* (2008) y de este trabajo indican que el transportador MexAB-OprM de Pph 1448A posee un amplio rango de sustratos y confiere resistencia a múltiples antibióticos ( $\beta$ -lactámicos, cefalosporinas, quinolonas, tetraciclina, cloranfenicol, etc.), biocidas (acriflavina, benzalconio, bromuro de etidio, tetrafenilfosfonio, trimetoprim), quimioterápicos (daunorubicina, mitomicina C), colorantes (naranja de acridina, rodamina 6G, violeta cristal) y metabolitos secundarios de plantas

(berberina, naringenina y floretina). Esta resistencia cruzada a compuestos de distinta naturaleza y estructura se había observado también en MexAB-OprM de Pto DC3000 y Psyr B728a (Stoitsova *et al.*, 2008; Vargas *et al.*, 2011) y en transportadores RND de otras bacterias, como TtgABC de *P. putida* DOT-T1E y MepABC de *P. putida* KT2442, que expulsan múltiples disolventes orgánicos y antibióticos (Fukumori *et al.*, 1998; Ramos *et al.*, 1998) o en el transportador AcrAB de los patógenos de plantas *D. dadantii* y *E. amylovora*, que confiere resistencia a antibióticos, colorantes y compuestos derivados de plantas, como floretina y naringenina (Burse *et al.*, 2004a; Maggiorani-Valecillos *et al.*, 2006).

Actualmente, numerosos estudios avalan la función fisiológica de estos sistemas de transporte en bacterias y su importancia en colonización y patogenicidad. Así, se ha demostrado que eliminan agentes antimicrobianos presentes en el intestino del hospedador, como sales biliares, ácidos grasos o indol (Ma *et al.*, 1995; Lacroix *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 2003; Hirakawa *et al.*, 2005; Nikaido *et al.*, 2008), también exportan hormonas esteroideas (Elkins y Mullis, 2006), determinantes de virulencia como adhesinas y toxinas (Kim *et al.*, 2004; Kang y Gross, 2005; Buckley *et al.*, 2006), moléculas señal involucradas en *quorum sensing* (Evans *et al.*, 1998; Rahmati *et al.*, 2002; Chan *et al.*, 2007), compuestos tóxicos derivados del metabolismo (Van Dyk *et al.*, 2004) y metabolitos secundarios de plantas (Palumbo *et al.*, 1998; González-Pasayo y Martínez-Romero, 2000; Barabote *et al.*, 2003; Burse *et al.*, 2004a; Maggiorani-Valecillos *et al.*, 2006). El transportador MexAB-OprM de Pph 1448A confiere resistencia a multitud de compuestos antimicrobianos y, entre ellos, algunos de origen vegetal, principalmente flavonoides (Stoitsova *et al.*, 2008). Además, los resultados presentados en esta tesis muestran que Pph 1448A detecta y responde a diferentes flavonoides (morina y floretina) y otros compuestos como cloranfenicol o indol, pero no floridzina (floretina-2'- $\beta$  D-glucósido), disminuyendo su motilidad tipo *swimming* y *swarming* (Figuras 22 y 24). Se debe resaltar que los flavonoides no afectaron el crecimiento de las cepas porque se utilizaron a concentraciones muy por debajo de su MIC, tanto para la cepa silvestre como para el mutante PphA; por tanto, las diferencias observadas en los fenotipos no se deben a los posibles efectos tóxicos de esos compuestos. En Pto DC3000 flavonoides como floretina inhiben la expresión de *fliC* y la síntesis de los flagelos (Vargas *et al.*, 2013), por lo que probablemente ocurra lo mismo en Pph. De hecho, está ampliamente documentado que extractos de plantas y otros compuestos con actividad antimicrobiana pueden regular negativamente la motilidad bacteriana. Así, varios macrólidos inhiben la motilidad en *Proteus mirabilis* y *P. aeruginosa*: concentraciones subinhibitorias de eritromicina, claritromicina o azitromicina suprimen la expresión de flagelina (Kawamura-Sato *et al.*, 2000). Los extractos de arándano inhiben la expresión de *fliC* y la motilidad en *E. coli* UPEC (Hidalgo *et al.*, 2011) y, específicamente, la naringenina también atenúa la motilidad de *Salmonella enterica* al inhibir la expresión del regulador maestro FlhDC y de los genes flagelares necesarios para la invasión de las células no fagocíticas del intestino (Vikram *et al.*, 2011). Es importante mencionar que el efecto de los flavonoides habría pasado desapercibido si no se hubiera utilizado el mutante PphA, que carece de la bomba MexAB-OprM. La acumulación de flavonoides en PphA, dado que no son expulsados de la célula por la bomba, provoca una inhibición clara de la motilidad tipo *swimming* y *swarming*, probablemente debido a la disminución del número de flagelos. De forma similar, la interrupción del transportador MDR AcrAB-TolC de *S. enterica*, que desempeña un papel esencial en la resistencia a colorantes básicos, detergentes y antibióticos (Baucheron *et al.*, 2004), reduce la expresión de genes de motilidad y quimiotaxis (Webber *et al.*, 2009).

Aunque la inoculación de judía por el método de rociado no permitió observar síntomas, ya que las poblaciones bacterianas no se multiplicaron a niveles suficientes para colonizar el apoplasto a diferencia de lo que sucede en plantas de tomate inoculadas por Pto DC3000 (Vargas *et al.*, 2011), la inoculación por infiltración, tanto de la cepa silvestre como de los mutantes PphA y PphR, sí provocó los síntomas característicos de la enfermedad en judía (Taylor *et al.*, 1996; Stoitsova *et al.*, 2008; Vargas *et al.*, 2011). Sin embargo, la menor intensidad de los síntomas observados en las plantas infiltradas con PphA, probablemente se deba a que su población en hoja resultó ser 10 veces menor que la de la cepa silvestre o el mutante PphR. Por consiguiente, la pérdida de MexAB-OprM provoca una disminución en la colonización de la planta hospedadora por Pph, efecto que se magnifica al competir con la cepa silvestre (Figura 31). La cepa carente de PmeR, sin embargo, se comportó de forma similar a la silvestre. Resultados similares se obtuvieron con un mutante de Pto DC300 carente del transportador MexAB-OprM en plantas de tomate (Vargas *et al.*, 2011; 2013). Por tanto, la pérdida de MexAB-OprM, tanto en Pto DC3000 como en Pph 1448A, disminuye la capacidad de estas cepas para sobrevivir y/o multiplicarse y colonizar las hojas de sus correspondientes plantas hospedadoras.

Todo lo observado en los experimentos anteriores, se correlaciona con el análisis mediante MCFI de plantas de judía inoculadas con Pph y sus mutantes PphA y PphR, así como de plantas de tomate infectadas con Pto DC3000 y los mutantes DC3000A y DC3000R. Las emisiones de fluorescencia en las que se observan los mayores cambios en los dos sistemas planta-patógeno analizados son F440 y F520. Los patrones foliares, tanto de plantas de judía infectadas con Pph y sus mutantes como de las de tomate infectadas con Pto DC3000 y mutantes, muestran un aumento de ambas emisiones de fluorescencia en las áreas inoculadas cuya intensidad y desarrollo temporal depende la cepa bacteriana utilizada (Figuras 32 y 37). Ello nos indica que se produce una activación del metabolismo secundario de la planta ante la invasión del patógeno, aumentando la producción de fenoles, polifenoles y fenilpropanoides, muchos de los cuales han sido descritos como emisores de fluorescencia verde y azul (Stober y Lichtenthaler, 1993b; Cerovic *et al.*, 1999) para prevenir la proliferación de la bacteria en el apoplasto. La activación del metabolismo secundario detectada mediante MCFI fue menor en las plantas infiltradas con DC3000A y PphA que en las inoculadas con las cepas silvestres o el mutante PphR. Esto se debe probablemente a que las poblaciones bacterianas de DC3000A y PphA fueron menores, lo que se corresponde con la atenuación de los síntomas. Sin embargo, la respuesta del tomate frente al mutante DC3000R es similar a la obtenida con el mutante DC3000A, pero la población bacteriana de DC3000R es similar a la de la cepa silvestre. Esto sugiere que, la mayor actividad de la bomba en la eliminación de flavonoides tóxicos para la bacteria en DC3000R puede ejercer un efecto regulador sobre el metabolismo secundario del tomate.

Tanto en reacciones compatibles como incompatibles entre plantas y microorganismos patógenos, uno de los mecanismos de defensa vegetal es la acumulación de distintos compuestos de las rutas del shikimato y de los fenilpropanoides (Truman *et al.*, 2006). *Solanum lycopersicum* inoculada con Pto acumula fenilpropanoides y flavonoides, algunos de los cuales exhiben actividad antimicrobiana (Poiatti *et al.*, 2009; López-Gresa *et al.*, 2010; Vargas *et al.*, 2011). También se ha descrito la síntesis de fenilpropanoides como respuesta inicial a la infección, seguida de una rápida polimerización y deposición de lignina (Nicholson y Hammerschmidt, 1992). López-Gresa *et al.* (2011) han identificado la naturaleza química de diversos fenilpropanoides que aparecen como metabolitos de defensa tras la infección de *S.*

*lycopersicum* por Pto DC3000: amidas de diversos ácidos hidroxicinámicos como el ferúlico, clorogénico o cumárico y el flavonoide rutina. Los ácidos hidroxicinámicos son bien conocidos como emisores de BGF y la rutina también aparece como emisora de fluorescencia verde (Morales *et al.*, 1994; 1996; Lichtenthaler y Schweigeron, 1998; Cerovic *et al.*, 1999; Meyer *et al.*, 2003; Sudo *et al.*, 2009). Por lo tanto, todos estos compuestos podrían ser responsables del aumento en BGF observado en el presente estudio, aunque serán necesarios algunos análisis metabolómicos para confirmar esta hipótesis.

En este estudio por MCFI hemos obtenido también imágenes de cocientes entre emisiones de fluorescencia verde-azul y roja. Las fluorescencias BGF y la Chl-F poseen distintos orígenes y están afectadas de forma independiente por factores fisiológicos y ambientales y los cocientes F440/690, F440/740, F520/690 y F520/740 son valiosos indicadores de estrés vegetal (Schweiger *et al.*, 1996; Buschmann y Lichtenthaler, 1998; Buschmann *et al.*, 2000). Los patrones foliares de los cocientes siguen una tendencia similar a la mostrada por F440 y F520 y exacerban las diferencias entre el impacto de las cepas silvestres y mutantes en plantas de judía y tomate. Hay que destacar que todos los patrones foliares de BGF o BGF/Chl-F analizados, tanto en la infección de plantas de judía como de tomate, aportan una detección presintomática de la infección, siendo la más temprana en tomate. Los patrones de fluorescencia roja, F690 y F740, ligados a la concentración de clorofila (Cerovic *et al.*, 1999), no han demostrado ser de gran utilidad en estos análisis, debido a que los cambios en la concentración de este pigmento son pequeños y sólo pueden apreciarse como una leve heterogeneidad en las zonas inoculadas por las distintas cepas de *P. syringae*.

En resumen, la bomba MexAB-OprM de Pto DC3000 media la resistencia a compuestos antimicrobianos producidos por las plantas en respuesta a la infección confiriendo protección a la bacteria, facilitando su supervivencia inicial en su nicho ecológico (la superficie de las hojas), la posterior colonización de la planta hospedadora y el desarrollo de la enfermedad. Además, MexAB-OprM es capaz de eliminar otros agentes antimicrobianos, como por ejemplo antibióticos, lo que permite, tanto a Pph1448A como a Pto DC3000, competir eficientemente con otras bacterias epifitas presentes en las hojas.

Los resultados obtenidos en esta tesis indican que Pph 1448A, al igual que Pto DC3000, posee un mecanismo para combatir las defensas del hospedador, ya que detecta y responde a los flavonoides modificando su patrón de motilidad, induciendo al mismo tiempo la expresión del sistema MexAB-OprM. El apoplasto vegetal es un espacio en el que tiene lugar una carrera de armamento entre plantas y bacterias. Las plantas reconocen y contrarrestan la actividad de los patógenos y utilizan para su defensa diferentes compuestos antimicrobianos que incorporan a sus estructuras celulares o secretan al apoplasto. Los flavonoides constituyen una primera línea de defensa de las plantas frente al ataque de patógenos, de modo que su efecto inhibitor sobre la motilidad bacteriana y la secreción de factores de virulencia podría prevenir o retrasar la infección. Sin embargo, las bacterias han evolucionado desarrollando mecanismos para evitar la acumulación intracelular de flavonoides. Pph 1448A y Pto DC3000 poseen una gran resistencia intrínseca a diferentes compuestos antimicrobianos gracias a bombas como MexAB-OprM, por lo que son capaces de sobrevivir en el entorno de la planta e iniciar la infección. Esto les permite, en una segunda etapa, translocar los efectores a las células vegetales mediante el T3SS, bloqueando así la producción de nuevos compuestos con actividad antibacteriana. Se ha demostrado que el T3SS y quizá

otros factores de virulencia bajo el control de HrpL (pero no la coronatina) son necesarios para el bloqueo de la síntesis o exudación de algunos compuestos antimicrobianos (Bais *et al.*, 2005). Recientemente también se ha demostrado que el efector HopZ1 favorece la multiplicación de *P. syringae* en soja actuando a nivel de la enzima 2-hidroxi-isoflavona deshidratasa (GmHID1), implicada en la biosíntesis de isoflavonoides (Zhou *et al.*, 2011).

## 2. Transportador TpsABC

En esta tesis se ha identificado un transportador de tipo RND en Pto DC3000, que denominamos TpsABC. El gen que codifica el transportador (*tpsC*, PSPTO\_5191) forma un operón con otros dos genes más (*tpsA*, PSPTO\_5193 y *tpsB*, PSPTO\_5192) que codifican 2 MFPs. Esta organización génica no es común entre los transportadores RND, ya que la mayoría se organizan como sistemas tripartitos conformados por una MFP, un transportador y una porina codificados en un operón (Eswaran *et al.*, 2004; Murakami *et al.*, 2006; Poole, 2008). Sin embargo, parece que los transportadores RND asociados a 2 MFPs son particularmente abundantes en bacterias pertenecientes a los órdenes Rhizobiales y Pseudomonadales (Altschul *et al.*, 1997; Gristwood *et al.*, 2008).

Aunque lo hemos intentado, no hemos podido determinar ni cuáles son los sustratos que expulsa este transportador ni cuál es su papel en la fisiología de Pto DC3000. La mayor susceptibilidad de las cepas carentes de TpsABC a floretina y triclosan indica que podrían ser sustratos, pero la eliminación de estos compuestos por TpsABC no resulta determinante para la tolerancia de Pto, ya que la susceptibilidad a estos compuestos es mucho mayor en una cepa carente del transportador MexAB-OprM (Vargas *et al.*, 2011). Por tanto, la acción de TpsABC podría verse enmascarada por la acción de otras bombas presentes en Pto DC3000, como MexAB-OprM. Esto es lo que ocurre con los transportadores TriABC-OpmH de *P. aeruginosa* y VexIJK de *V. cholerae*, que también poseen dos MFPs. La acción de TriABC-OpmH para la eliminación de triclosan solo se puede detectar al sobreexpresarlo en una cepa carente de los transportadores MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexJK y MexXY (Mima *et al.*, 2007). En *V. cholerae*, VexAB es la bomba RND principal, responsable de la resistencia a múltiples compuestos antimicrobianos *in vitro*. VexIJK posee baja actividad expulsando específicamente sales biliares, por lo que su perfil de sustratos solapa con el de VexAB (Bina *et al.*, 2008).

También hemos establecido que TpsABC no parece proporcionar a la bacteria ninguna ventaja en motilidad, producción de exopolisacáridos o formación de biopelículas. Este transportador tampoco está implicado en el crecimiento de Pto DC3000, la colonización o la competencia con otras cepas ni en medios de laboratorio ni en plantas de tomate, pero sí en su capacidad para provocar los síntomas de la enfermedad.

Algunas cepas exportan determinantes de virulencia, como adhesinas, toxinas u otras proteínas importantes para la colonización y la infección de células humanas y animales a través de transportadores de tipo RND (Pidcock, 2006; Poole, 2004). Para determinar si ese era el caso del transportador TpsABC, comparamos los secretomas de la cepa silvestre y el mutante  $\Delta$ TpsC, pero ninguna de las proteínas detectadas parece estar implicada en virulencia. También pensamos que PSPTO\_5194 podría ser ese determinante de virulencia, ya que está conservada en diferentes cepas del complejo *P. syringae*, pero

esta proteína no se detectó en los sobrenadantes de los cultivos. Además, construimos el mutante  $\Delta 5194$ , pero no estaba afectado en virulencia, al menos en las condiciones ensayadas. Dada la amplia distribución de proteínas hipotéticas similares a esta en los genomas bacterianos y que sus genes se sitúan adyacentes a otros que codifican transportadores de tipo RND (en Pph 1448A, Psyr B728a, *P. cichorii* JBC1, *P. protegens*, *P. entomophila* o *P. putida* F1), sería interesante profundizar en su estudio para conocer su función y actividad.

Los ensayos de MCFI concuerdan con la menor virulencia del mutante  $\Delta TpsC$  y la respuesta de la planta (tomate) resulta más cercana a la obtenida con el mutante *hrpL*. Este mutante no expresa el T3SS y no produce síntomas a lo largo de todo el experimento, siendo el aspecto de las plantas inoculadas muy similar a las control infiltradas con  $MgCl_2$  (Figura 60). Los patrones foliares de F440, F520 y de los cocientes F440/690 F440/740, F520/690 y F520/740 detectan el impacto de *P. syringae* en el hospedador antes de la aparición de los síntomas y es mayor en el caso de Pto DC3000 y muy leve en el de  $\Delta TpsC$ . Ello confirma la utilidad de esta técnica de imagen en la detección de una respuesta temprana al ataque de patógenos vegetales (Bodria *et al.*, 2002; Bravo *et al.*, 2003; Lindenthal *et al.*, 2005).

A semejanza de los ensayos realizados para el sistema MexAB-OprM, F440 y F520 registraron los mayores cambios con respecto a los otros parámetros de fluorescencia en las plantas inoculadas, pero solo en el caso de la infección con Pto DC3000 se aprecia un notable incremento de sus valores, lo que corresponde a una activación del metabolismo secundario por el estrés inducido por el patógeno. La menor virulencia del mutante  $\Delta TpsC$  queda reflejada en los leves incrementos en BGF, consecuencia de su menor impacto sobre el hospedador y de una menor producción de determinados metabolitos de defensa. Por tanto, el transportador TpsABC es uno de los sistemas RND de Pto DC3000 implicados en virulencia, pero su modo de acción aún es desconocido.

El análisis comparativo del sistema *tpsABC* de Pto DC3000 con las secuencias disponibles en las bases de datos permitió establecer que transportadores de tipo RND con una organización génica similar son particularmente abundantes en bacterias Gram-negativas que interaccionan con plantas, tanto simbiotes como patógenas, de los órdenes Pseudomonadales y Rhizobiales (Tablas 19 y 20; Gristwood *et al.*, 2008). Sin embargo, el papel de las MFPs en las bombas RND sigue siendo poco claro. Hay datos bioquímicos y genéticos que indican que las MFPs pueden interactuar, tanto con el transportador de RND como con el canal de la membrana externa, y se ha propuesto que el papel de la MFP es estabilizar las interacciones entre estos dos componentes de la bomba (Tikhonova y Zgurskaya, 2004; Touze *et al.*, 2004). Mima *et al.* (2007) demostraron que se requieren ambas MFPs para la función de la bomba TriABC-OpmH de *P. aeruginosa*; en contraste, sólo ZrpD, y no ZrpA, parece ser esencial para la función de la bomba ZrpADBC de *Serratia* 39006, al menos en las condiciones ensayadas (Gristwood *et al.*, 2008). Los análisis bioinformáticos llevados a cabo por Gristwood *et al.* (2008) y en esta tesis (apartados 1.2, 1.3 y 1.4 del capítulo 2) indican que cada MFP del par pertenece a un subtipo distinto en una amplia gama de especies bacterianas. Al igual que Gristwood *et al.* (2008), consideramos que es muy poco probable que la segunda MFP simplemente represente una duplicación no funcional; más bien, una de las MFPs podría estar actuando como el componente "MFP estándar" y estabilizar el complejo de la bomba, mientras que la segunda MFP podría llevar a cabo una función distinta y tener un papel determinante en la selección del sustrato. Sin embargo, al no haber definido el "verdadero" sustrato (o sustratos) fisiológico de la bomba

TpsABC, aún no es posible conocer el efecto de una delección en *tpsA* o *tpsB* en la eliminación del mismo. Esta es una de las líneas de investigación a seguir en el futuro.

### 3. Transportador MatE

Los transportadores de la familia MATE, como los RND, juegan un papel importante en la resistencia a múltiples compuestos con actividad antimicrobiana, contribuyendo a la supervivencia bacteriana en sus hábitats. Sin embargo, su papel fisiológico no está claro, como tampoco si constituyen un determinante de virulencia en bacterias patógenas (Koruda y Tsuchiya, 2009).

En este trabajo de tesis hemos determinado el papel de un transportador de la familia MATE, MatE de Pto DC3000, en la virulencia de esta bacteria en plantas de tomate mediante la utilización de imágenes de fluorescencia multicolor. Como el locus génico *matE* estaba ligado a *iaaL* y se disponía de ambos mutantes, se estudió el comportamiento de ambos. Las plantas de tomate infectadas con los mutantes *iaaL* y *matE*, obtenidos por Isabel Aragón en el laboratorio del Dr. Cayo Ramos de la Universidad de Málaga, mostraron menos síntomas que las inoculadas con la cepa silvestre. Asimismo, el análisis por MCFI del impacto de estas cepas bacterianas frente al causado por Pto DC3000, muestra que inducen una menor activación del metabolismo secundario ligado a compuestos de defensa del hospedador, correspondiente a un menor estrés vegetal y a una sintomatología más atenuada. Aunque se deberán llevar a cabo más ensayos para confirmar este hecho, el mutante *matE* parece causar un efecto más drástico que *iaaL*. También en este caso, se detecta la respuesta defensiva mediante las imágenes de fluorescencia de forma presintomática.

En bacterias fitopatógenas, los transportadores MATE caracterizados hasta ahora (DinF de *Ralstonia solanacearum* y NorM de *Erwinia amylovora*) expulsan multitud de antibióticos, compuestos vegetales (flavonoides) y compuestos producidos por otras bacterias epifitas, lo que contribuye a la capacidad de estas bacterias para competir con otras que ocupan el mismo nicho (Burse *et al.*, 2004b; Brown *et al.*, 2007; Kuroda y Tsuchiya, 2009). En el caso del transportador MatE de Pto, no ha sido posible determinar ningún sustrato (I. Aragón y C. Ramos, comunicación personal), por lo que, probablemente, no interviene en la protección de la bacteria frente a los efectos tóxicos de los compuestos antimicrobianos producidos por el hospedador o por otras bacterias epifitas. Lo que sí está claro es que el mutante carente de este transportador disminuye la producción de síntomas en plantas de tomate. Este efecto también se observó al mutar *dinF* de *Ralstonia solanacearum* que, curiosamente, posee también una secuencia *hrp-box* en su región promotora (Cunnac *et al.*, 2004; Brown *et al.*, 2007).

Actualmente los transportadores MDR bacterianos constituyen un tema de gran interés entre los investigadores que desean elucidar los mecanismos y la regulación de la resistencia intrínseca de bacterias de importancia clínica y aquellas patógenas de plantas. Se ha sugerido que los transportadores MDR de bacterias fitopatógenas están implicados tanto en la supervivencia y colonización de plantas, como en su virulencia (Burse *et al.*, 2004a; b; Brown *et al.*, 2007; Stoitsova *et al.*, 2008; Fan *et al.*, 2011; Vargas *et al.*, 2011). Los resultados de esta tesis demuestran que los transportadores MexAB-OprM de Pph 1448A y Pto DC3000 están implicados en la supervivencia y colonización de plantas de judía y

tomate, respectivamente y que los transportadores TpsABC y MatE de Pto DC3000 tienen un papel en virulencia aún por determinar. Asimismo, los análisis de MCFI con judía infectada con Pph, PphA y PphR o tomate infectado con Pto DC3000, DC3000A, DC3000R,  $\Delta$ TpsC, *hrpL*, *iaaL* o *matE* muestran que los patrones foliares de fluorescencia verde F520 son especialmente útiles para el seguimiento de la infección, ya que al ser la fluorescencia verde absorbida menos eficazmente por la clorofila del envés de la hoja (Lichtenthaler *et al.*, 1996) que la fluorescencia azul F440, sus valores son en todos los casos más elevados, lo que favorece el diagnóstico presintomático y la valoración de la virulencia de los mutantes.

Aun así, quedan preguntas sin responder que se aclararán con futuros estudios, como el/los sustratos de la bomba TpsABC, su mecanismo de acción y su papel en virulencia; los posibles sustratos del transportador MatE y su implicación en virulencia; la identificación de los compuestos detectados por MCFI, así como la caracterización de estas infecciones mediante otras técnicas de imagen como la cinética de la clorofila roja y la termografía.

## CONCLUSIONES



Los resultados obtenidos y expuestos en esta memoria han permitido establecer las siguientes conclusiones:

1. La bomba MexAB-OprM de *P. syringae* pv. phaseolicola 1448A está implicada en su resistencia intrínseca a múltiples antibióticos, biocidas, quimioterápicos, colorantes, agentes mutagénicos y, en especial, a varios flavonoides (Stoitsova *et al.*, 2008; este trabajo). En este trabajo se han determinado nuevos sustratos de este transportador: cefotaxima, gentamicina y estreptomina.
2. El transportador MexAB-OprM contribuye a la colonización de las hojas de judía por Pph 1448A y le permite competir eficientemente en su nicho ecológico.
3. Los flavonoides floretina, floridzina y morina provocan una reducción de la motilidad tipo *swarming* en Pph 1448A. Su efecto es más acusado en el mutante carente del transportador MexAB-OprM donde también disminuyen la motilidad tipo *swimming*.
4. La pérdida del sistema TpsABC no provoca una disminución en la capacidad de Pto DC3000 para colonizar ni invadir las plantas de tomate, pero sí en su capacidad para provocar los síntomas de la enfermedad, indicando que podría tener un papel en la virulencia de Pto DC3000. Aún se desconocen los sustratos y el modo de acción de este transportador.
5. Los genes estructurales *tpsABC* en Pto DC3000 forman una unidad transcripcional.
6. La proteína PSPTO\_5194 no forma parte de la misma unidad transcripcional que *tpsABC*, no es el sustrato de esta bomba y no tiene efecto en virulencia, al menos en las condiciones ensayadas.
7. Los mutantes *iaaL* y *matE* de Pto DC3000 inducen en tomate una menor activación del metabolismo secundario ligado a compuestos de defensa del hospedador que la cepa silvestre, lo que se corresponde con un menor estrés vegetal y una sintomatología más atenuada.
8. Los patrones foliares de fluorescencia multiespectral inducida por iluminación UV muestran un notable incremento en F440 y F520 durante la infección de judía por Pph 1448A y de tomate por Pto DC3000, asociado a la activación del metabolismo secundario del huésped para la producción de compuestos fenólicos implicados en la defensa vegetal. Los cambios en los patrones foliares de F440 y 520 de los mutantes en los transportadores reflejan los cambios en virulencia de estos y ofrecen la posibilidad de un diagnóstico presintomático de la infección, resultando ser F520 un parámetro especialmente sensible.



## BIBLIOGRAFÍA



- Abramovitch, R.B. y Martin, G.B. 2004. Strategies used by bacterial pathogens to suppress plant defenses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7: 356-364.
- Adebusuyi, A. y Foght, J. 2013. The EmhABC efflux pump in *Pseudomonas fluorescens* LP6a is involved in naphthalene tolerance but not efflux. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97(6):2587-2596.
- Agati, G., Galardi, C., Gravano, E., Romani, A. y Tattini, M. 2002. Flavonoid distribution in tissues of *Phillyrea latifolia* L. leaves as estimated by microspectrofluorometry and multispectral fluorescence microimaging. *Photochem. Photobiol.* 76: 350-360.
- Aguilera, S., Lopez-Lopez, K., Nieto, Y., Garciduenas-Pina, R., Hernandez-Guzman, G., Hernandez-Flores, J., Murillo, J. y Alvarez-Morales, A. 2007. Functional characterization of the gene cluster from *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola NPS3121 involved in synthesis of phaseolotoxin. *J. Bacteriol.* 189: 2834-2843.
- Akama, H., Kanemaki, M., Yoshimura, M., Tsukihara, T., Kashiwagi, T., Yoneyama, H., Narita, S., Nakagawa, A. y Nakae, T. 2004a. Crystal structure of the drug discharge outer membrane protein, OprM, of *Pseudomonas aeruginosa*: dual modes of membrane anchoring and occluded cavity end. *J. Biol. Chem.* 279: 52816-52819.
- Akama, H., Matsuura, T., Kashiwagi, S., Yoneyama, H., Narita, S., Tsukihara, T., Nakagawa, A. y Nakae, T. 2004b. Crystal structure of the membrane fusion protein, MexA, of the multidrug transporter in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 279: 25939-25942.
- Alarcon-Chaidez, F., Keith, L., Zhao, Y. y Bender, C. 2003. RpoN ( $\sigma^{54}$ ) is required for plasmid-encoded coronatine biosynthesis in *Pseudomonas syringae*. *Plasmid* 49: 106-117.
- Alfano, J. y Collmer, A. 1997. The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins, and death. *J. Bacteriol.* 179: 5655-5662.
- Alfano, J.R. y Collmer, A. 2004. Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42: 385-414.
- Alfano, J.R., Charkowski, A.O., Deng, W.L., Badel, J.L., Petnicki-Ocwieja, T., van Dijk, K. y Collmer, A. 2000. The *Pseudomonas syringae* Hrp pathogenicity island has a tripartite mosaic structure composed of a cluster of type III secretion genes bounded by exchangeable effector and conserved effector loci that contribute to parasitic fitness and pathogenicity in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 4856-4861.
- Alguel, Y., Meng, C., Teran, W., Krell, T., Ramos, J.L., Gallegos, M.T. y Zhang, X. 2007. Crystal structures of multidrug binding protein TtgR in complex with antibiotics and plant antimicrobials. *J. Mol. Biol.* 369: 829-840.
- Alonso, A., Morales, G., Escalante, R., Campanario, E., Sastre, L. y Martinez, J.L. 2004. Overexpression of the multidrug efflux pump SmeDEF impairs *Stenotrophomonas maltophilia* physiology. *J. Antimicrob. Chemother.* 53: 432-434.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. y Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Amsterdam, D., 1991. Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media, in: *Antibiotics in laboratory medicine*. Lorian, V. (ed.), Baltimore, pp. 53-105.
- Anzai, Y., Kim, H., Park, J., Wakabayashi, H. y Oyaizu, H. 2000. Phylogenetic affiliation of the *Pseudomonads* based on 16S rRNA sequence. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 4: 1563-1589.
- Apostol, S. 2005. Leaf fluorescence as diagnostic tool for monitoring vegetation, in: *From cells to proteins: Imaging nature across dimensions*. Springer (ed.), Netherlands, pp. 423-430.

Apostol, S., Viau, A.A., Tremblay, N., Briantais, J.M., Prasher, S., Parent, L.E. y Moya, I. 2003. Laser-induced fluorescence signatures as a tool for remote monitoring of water and nitrogen stresses in plants. *Can. J. of Remote Sens.* 29: 57-65.

Aramaki, H., Yagi, N. y Suzuki, M. 1995. Residues important for the function of a multihelical DNA binding domain in the new transcription factor family of Cam and Tet repressors. *Protein Eng.* 8: 1259-1266.

Ariana, D., Guyer, D.E. y Shrestha, B. 2006. Integrating multispectral reflectance and fluorescence imaging for defect detection on apples. *Comput. Electron. Agric.* 50: 148-161.

Arnold, D.L., Lovell, H.C., Jackson, R.W. y Mansfield, J.W. 2011. *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola: from 'has bean' to supermodel. *Mol. Plant. Pathol.* 12: 617-627.

Arrebola, E., Cazorla, F.M., Codina, J.C., Gutierrez-Barranquero, J.A., Perez-Garcia, A. y de Vicente, A. 2009. Contribution of mangotoxin to the virulence and epiphytic fitness of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Int. Microbiol.* 12: 87-95.

Babani, F., Langsdorf, G., Knapp, M., Buschmann, C. y Lichtenthaler, H. 2005. UV-A induced fluorescence images in sun and shade leaves. *BMC Plant Biol.* 5: 1-4.

Babani, F. y Lichtenthaler, H.K. 1996. Light-induced and age-dependent development of chloroplasts in etiolated barley leaves as visualized by determination of photosynthetic pigments, CO<sub>2</sub> assimilation rates and different kinds of chlorophyll fluorescence ratios. *J. Plant Physiol.* 148: 555-566.

Babani, F., Lichtenthaler, H.K. y Richter, P. 1996. Changes of chlorophyll fluorescence signatures during greening of etiolated barley seedlings as measured with the CCD-OMA fluorometer. *J. Plant Physiol.* 148: 471-477.

Bais, H.P., Prithiviraj, B., Jha, A.K., Ausubel, F.M. y Vivanco, J.M. 2005. Mediation of pathogen resistance by exudation of antimicrobials from roots. *Nature* 434: 217-221.

Balandreau, J., Viillard, V., Courmoyer, B., Coenye, T., Laevens, S. y Vandamme, P. 2001. *Burkholderia cepacia* genomovar III is a common plant-associated bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 982-985.

Baltrus, D.A., Nishimura, M.T., Romanchuk, A., Chang, J.H., Mukhtar, M.S., Cherkis, K., Roach, J., Grant, S.R., Jones, C.D. y Dangl, J.L. 2011. Dynamic evolution of pathogenicity revealed by sequencing and comparative genomics of 19 *Pseudomonas syringae* isolates. *PLoS Pathog.* 7: 1-22 .

Bao, Z., Stodghill, P.V., Myers, C.R., Lam, H., Wei, H.-L., Chakravarthy, S., Kvitko, B.H., Collmer, A., Cartinhour, S.W. y Schweitzer, P. 2014. Genomic Plasticity Enables Phenotypic Variation of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *PLoS One* 9: 1-14.

Barabote, R., Johnson, O., Zetina, E., San, F.S., Fralick, J. y San, F.M. 2003. *Erwinia chrysanthemi* tolC is involved in resistance to antimicrobial plant chemicals and is essential for phytopathogenesis. *J. Bacteriol.* 185: 5772-5778.

Barón, M., Flexas, J. y DeLucia, E., 2012. Photosynthesis responses to biotic stress, in: *Terrestrial photosynthesis in a changing environment. A molecular physiological and ecological approach.* Flexas, J., Loreto, F., Medrano, H.(ed.), Cambridge Press, pp. 331-350.

Baucheron, S., Tyler, S., Boyd, D., Mulvey, M., Chaslus-Dancla, E. y Cloeckaert, A. 2004. AcrAB-TolC directs efflux-mediated multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT104. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 3729-3735.

Bednarek, P. y Osbourn, A. 2009. Plant-microbe interactions: chemical diversity in plant defense. *Science.* 324: 746-748.

- Bender, C.L., Alarcon-Chaidez, F. y Gross, D.C. 1999. *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 266-292.
- Benediktyova, Z. y Nedbal, L. 2009. Imaging of multi-color fluorescence emission from leaf tissues. *Photosynth. Res.* 102:169-175.
- Berti, A.D., Greve, N.J., Christensen, Q.H. y Thomas, M.G. 2007. Identification of a biosynthetic gene cluster and the six associated lipopeptides involved in swarming motility of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *J. Bacteriol.* 189: 6312-6323.
- Bina, X.R., Provenzano, D., Nguyen, N. y Bina, J.E. 2008. *Vibrio cholerae* RND family efflux systems are required for antimicrobial resistance, optimal virulence factor production, and colonization of the infant mouse small intestine. *Infect. Immun.* 76: 3595-3605.
- Bodria L, F.M., Oberti R, Naldi E. 2002. Chlorophyll fluorescence sensing for early detection of crop's diseases symptoms, Proc. ASAE Annu. Internat. Meeting and CIGR XVth World Congress. American Society of Agricultural and Biological Engineers, St. Joseph, Michigan, pp. 1-15.
- Bongi, G., Palliotti, A., Rocchi, P., Moya, I. y Goulas, Y. 1994. Spectral characteristics and a possible topological assignment of blue green fluorescence excited by UV laser on leaves of unrelated species. *Remote Sens. Environ.* 47: 55-64.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Bravo, C., Moshou, D., West, J., McCartney, A. y Ramon, H. 2003. Early disease detection in wheat fields using spectral reflectance. *Biosyst. Eng.* 84: 137-145.
- Bretz, J., Losada, L., Lisboa, K. y Hutcheson, S. 2002. Lon protease functions as a negative regulator of type III protein secretion in *Pseudomonas syringae*. *Mol. Microbiol.* 45: 397-409.
- Brooks, D.M., Hernandez-Guzman, G., Kloek, A.P., Alarcon-Chaidez, F., Sreedharan, A., Rangaswamy, V., Penaloza-Vazquez, A., Bender, C.L. y Kunkel, B.N. 2004. Identification and characterization of a well-defined series of coronatine biosynthetic mutants of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Mol. Plant Microbe Interact.* 17: 162-174.
- Brown, D.G., Swanson, J.K. y Allen, C. 2007. Two host-induced *Ralstonia solanacearum* genes, *acrA* and *dinF*, encode multidrug efflux pumps and contribute to bacterial wilt virulence. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 2777-2786.
- Brown, M.H., Paulsen, I.T. y Skurray, R.A. 1999. The multidrug efflux protein NorM is a prototype of a new family of transporters. *Mol. Microbiol.* 31: 394-395.
- Buckley, A., Webber, M., Cooles, S., Randall, L., La, R.R., Woodward, M. y Piddock, L. 2006. The AcrAB-TolC efflux system of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium plays a role in pathogenesis. *Cell Microbiol.* 8: 847-856.
- Buell, C.R., Joardar, V., Lindeberg, M., Selengut, J., Paulsen, I.T., Gwinn, M.L., Dodson, R.J., Deboy, R.T., Durkin, A.S., Kolonay, J.F., Madupu, R., Daugherty, S., Brinkac, L., Beanan, M.J., Haft, D.H., Nelson, W.C., Davidsen, T., Zafar, N., Zhou, L., Liu, J., Yuan, Q., Khouri, H., Fedorova, N., Tran, B., Russell, D., Berry, K., Utterback, T., Van Aken, S.E., Feldblyum, T.V., D'Ascenzo, M., Deng, W.L., Ramos, A.R., Alfano, J.R., Cartinhour, S., Chatterjee, A.K., Delaney, T.P., Lazarowitz, S.G., Martin, G.B., Schneider, D.J., Tang, X., Bender, C.L., White, O., Fraser, C.M. y Collmer, A. 2003. The complete genome sequence of the *Arabidopsis* and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 10181-10186.
- Burch, A., Shimada, B., Mullin, S., Dunlap, C., Bowman, M. y Lindow, S. 2012. *Pseudomonas syringae* coordinates production of a motility-enabling surfactant with flagellar assembly. *J. Bacteriol.* 194:1287-98.

- Bürling, K., Hunsche, M. y Noga, G. 2011. Use of blue-green and chlorophyll fluorescence measurements for differentiation between nitrogen deficiency and pathogen infection in winter wheat. *J. Plant Physiol.* 168: 1641-1648.
- Burling, K., Hunsche, M. y Noga, G. 2012. Presymptomatic detection of powdery mildew infection in winter wheat cultivars by laser-induced fluorescence. *Appl. Spectrosc.* 66: 1411-1419.
- Burse, A., Weingart, H. y Ullrich, M.S. 2004a. The phytoalexin-inducible multidrug efflux pump AcrAB contributes to virulence in the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 17: 43-54.
- Burse, A., Weingart, H. y Ullrich, M.S. 2004b. NorM, an *Erwinia amylovora* multidrug efflux pump involved in *in vitro* competition with other epiphytic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 693-703.
- Buschmann, C., Langsdorf, G. y Lichtenthaler, H.K. 2000. Imaging of the blue, green, and red fluorescence emission of plants: An overview. *Photosynthetica.* 38: 483-491.
- Buschmann, C. y Lichtenthaler, H.K. 1998. Principles and characteristics of multi-colour fluorescence imaging of plants. *J. Plant Physiol.* 152: 297-314.
- Buttner, D. y He, S. 2009. Type III protein secretion in plant pathogenic bacteria. *Plant Physiol.* 150:1656-1664.
- Byrd, M.S., Pang, B., Mishra, M., Swords, W.E. y Wozniak, D.J. 2010. The *Pseudomonas aeruginosa* exopolysaccharide Psl facilitates surface adherence and NF- $\kappa$ B activation in A549 cells. *mBio* 1:1-4.
- Byrd, M.S., Sadovskaya, I., Vinogradov, E., Lu, H., Sprinkle, A.B., Richardson, S.H., Ma, L., Ralston, B., Parsek, M.R., Anderson, E.M., Lam, J.S. y Wozniak, D.J. 2009. Genetic and biochemical analyses of the *Pseudomonas aeruginosa* Psl exopolysaccharide reveal overlapping roles for polysaccharide synthesis enzymes in Psl and LPS production. *Mol. Microbiol.* 73: 622-638.
- Cadet, É. y Samson, G. 2011. Detection and discrimination of nutrient deficiencies in sunflower by blue-green and chlorophyll-a fluorescence imaging. *J. Plant Nutrition* 34: 2114-2126.
- Cai, R., Yan, S., Liu, H., Leman, S. y Vinatzer, B.A. 2011. Reconstructing host range evolution of bacterial plant pathogens using *Pseudomonas syringae* pv. tomato and its close relatives as a model. *Infect. Genet. Evol.* 11: 1738-1751.
- Castillo-Lizardo, M.G., Aragón, I.M., Carvajal, V., Matas, I.M., Gallegos, M.T., Barón, M. y Ramos, C. 2012. La virulencia de *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 es dependiente de la expresión de los genes *iaaL* y *matE*, XVI Congreso Nacional Sociedad Española de Fitopatología. Málaga, España.
- Cerovic, Z.G., Bergher, M., Goulas, Y., Tosti, S. y Moya, I. 1993. Simultaneous measurement of changes in red and blue fluorescence in illuminated isolated chloroplasts and leaf pieces: the contribution of NADPH to the blue fluorescence signal. *Photosynth. Res.* 36: 193-204.
- Cerovic, Z.G., Samson, G., Morales, F., Tremblay, N. y Moya, I. 1999. Ultraviolet-induced fluorescence for plant monitoring: present state and prospects. *Agronomie* 19: 543-578.
- Conti, E., Franks, N. y Brick, P. 1996. Crystal structure of firefly luciferase throws light on a superfamily of adenylate-forming enzymes. *Structure* 4: 287-298.
- Corp, L.A., McMurtrey, J.E., Middleton, E.M., Mulchi, C.L., Chappelle, E.W. y Daughtry, C.S.T. 2003. Fluorescence sensing systems: *In vivo* detection of biophysical variations in field corn due to nitrogen supply. *Remote Sens. Environ.* 86: 470-479.
- Corpet, F. 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.* 16: 10881-10890.

- Costacurta, A. y Vanderleyden, J. 1995. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* 21: 1-18.
- Crow, M.A., 2001. The genetic regulation of pigment and antibiotic biosynthesis in *Serratia* sp, PhD Thesis. Biochemistry Department. The University of Cambridge, Cambridge.
- Cunnac, S., Boucher, C. y Genin, S. 2004. Characterization of the cis-acting regulatory element controlling HrpB-mediated activation of the type III secretion system and effector genes in *Ralstonia solanacearum*. *J. Bacteriol.* 186: 2309-2318.
- Cunnac, S., Chakravarthy, S., Kvitko, B.H., Russell, A.B., Martin, G.B. y Collmer, A. 2011. Genetic disassembly and combinatorial reassembly identify a minimal functional repertoire of type III effectors in *Pseudomonas syringae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108: 2975-2980.
- Cuppels, D. y Ainsworth, T. 1995. Molecular and physiological characterization of *Pseudomonas syringae* pv. tomato and *Pseudomonas syringae* pv. maculicola strains that produce the phytotoxin coronatine. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3530-3536.
- Cuppels, D.A. 1986. Generation and characterization of Tn5 insertion mutations in *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 323-327.
- Chaerle, L., Hagenbeek, D., De Bruyne, E., Valcke, R. y Van Der Straeten, D. 2004. Thermal and chlorophyll-fluorescence imaging distinguish plant-pathogen interactions at an early stage. *Plant Cell Physiol.* 45: 887-896.
- Chaerle, L., Leinonen, I., Jones, H.G. y Van Der Straeten, D. 2007a. Monitoring and screening plant populations with combined thermal and chlorophyll fluorescence imaging. *J. Exp. Bot.* 58: 773-784.
- Chaerle, L., Lenk, S., Hagenbeek, D., Buschmann, C. y Van Der Straeten, D. 2007b. Multicolour fluorescence imaging for early detection of the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus. *J. Plant Physiol.* 164: 253-262.
- Chaerle, L. y Van der Straeten, D. 2000. Imaging techniques and the early detection of plant stress. *Trends Plant Sci.* 5: 495-501.
- Chaerle, L. y Van der Straeten, D. 2001. Seeing is believing: imaging techniques to monitor plant health. *Biochim. Biophys. Acta* 1519: 153-166.
- Chan, K.-G., Tiew, S.-Z. y Ng, C.-C. 2007. Rapid isolation method of soil bacilli and screening of their quorum quenching activity. *As. Pac. J. Mol. Biol. Biotech.* 15: 153-156.
- Chappelle, E., Wood, F., Jr., Newcomb, W. y McMurtrey, J., 3<sup>rd</sup>. 1985. Laser-induced fluorescence of green plants. 3: LIF spectral signatures of five major plant types. *Appl. Opt.* 24: 74-80.
- Chatterjee, A., Cui, Y., Yang, H., Collmer, A., Alfano, J.R. y Chatterjee, A.K. 2003. GacA, the response regulator of a two-component system, acts as a master regulator in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 by controlling regulatory RNA, transcriptional activators, and alternate sigma factors. *Mol. Plant Microbe Interact.* 16: 1106-1117.
- Chen, J., Morita, Y., Huda, M.N., Kuroda, T., Mizushima, T. y Tsuchiya, T. 2002. VmrA, a member of a novel class of Na<sup>+</sup>-coupled multidrug efflux pumps from *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Bacteriol.* 184: 572-576.
- Choi, K.H., Kumar, A. y Schweizer, H.P. 2006. A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation. *J. Microbiol. Methods* 64: 391-397.
- De la Fuente-Martinez, J., Mosqueda-Cano, G., Alvarez-Morales, A. y Herrera-Estrella, L. 1992. Expression of a bacterial phaseolotoxin-resistant ornithyl transcarbamylase in transgenic tobacco confers resistance to *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. *Biotechnol.* 10: 905-909.

- Di Guilmi, A.M., Dessen, A., Dideberg, O. y Vernet, T. 2003. The glycosyltransferase domain of penicillin-binding protein 2a from *Streptococcus pneumoniae* catalyzes the polymerization of murein glycan chains. *J. Bacteriol.* 185: 4418-4423.
- Dixon, R.A. 2001. Natural products and plant disease resistance. *Nature* 411: 843-847.
- Dixon, R.A., Achnine, L., Kota, P., Liu, C.J., Srinivasa Reddy, M.S. y Wang, L. 2002. The phenylpropanoid pathway and plant defence a genomics perspective. *Molec. Plant Pathol.* 3: 371-390.
- Dixon, R.A. y Paiva, N.L. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7: 1085-1097.
- Dowson, W.I. 1943. On the generic names *Pseudomonas*, *Xanthomonas* and *Bacterium* for certain bacterial plant pathogens. *Trans. Br. Mycol.* 6: 4-14.
- Dulla, G., Marco, M., Quinones, B. y Lindow, S. 2005. A Closer Look at *Pseudomonas syringae* as a Leaf Colonist - The pathogen *P. syringae* thrives on healthy plants by employing quorum sensing, virulence factors, and other traits. *ASM News* 71: 469-475.
- Eswaran, J., Koronakis, E., Higgins, M.K., Hughes, C. y Koronakis, V. 2004. Three's company: component structures bring a closer view of tripartite drug efflux pumps. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14: 741-747.
- Evans, K., Passador, L., Srikumar, R., Tsang, E., Nezezon, J. y Poole, K. 1998. Influence of the MexAB-OprM multidrug efflux system on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 180: 5443-5447.
- Evans, K. y Poole, K. 1999. The MexA-MexB-OprM multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa* is growth-phase regulated. *FEMS Microbiol. Lett.* 173: 35-39.
- Fan, J., Crooks, C., Creissen, G., Hill, L., Fairhurst, S., Doerner, P. y Lamb, C. 2011. *Pseudomonas sax* genes overcome aliphatic isothiocyanate-mediated non-host resistance in *Arabidopsis*. *Science* 331: 1185-1188.
- Feil, H., Feil, W.S., Chain, P., Larimer, F., DiBartolo, G., Copeland, A., Lykidis, A., Trong, S., Nolan, M., Goltzman, E., Thiel, J., Malfatti, S., Loper, J.E., Lapidus, A., Detter, J.C., Land, M., Richardson, P.M., Kyrpides, N.C., Ivanova, N. y Lindow, S.E. 2005. Comparison of the complete genome sequences of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a and pv. *tomato* DC3000. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 11064-11069.
- Feldman, M. y Cornelis, G. 2003. The multitasking type III chaperones: all you can do with 15 kDa. *FEMS Microbiol. Lett.* 219: 151-158.
- Fellay, R., Frey, J. y Krisch, H. 1987. Interposon mutagenesis of soil and water bacteria: a family of DNA fragments designed for in vitro insertional mutagenesis of gram-negative bacteria. *Gene* 52: 147-154.
- Fernandez-Recio, J., Walas, F., Federici, L., Venkatesh, P.J., Bavro, V., Miguel, R., Mizuguchi, K. y Luisi, B. 2004. A model of a transmembrane drug-efflux pump from Gram-negative bacteria. *FEBS Lett.* 578: 5-9.
- Ferreira, A.O., Myers, C.R., Gordon, J.S., Martin, G.B., Vencato, M., Collmer, A., Wehling, M.D., Alfano, J.R., Moreno-Hagelsieb, G., Lamboy, W.F., DeClerck, G., Schneider, D.J. y Cartinhour, S.W. 2006. Whole-genome expression profiling defines the HrpL regulon of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, allows de novo reconstruction of the Hrp cis element, and identifies novel coregulated genes. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19: 1167-1179.
- Flemming, H.C. y Wingender, J. 2010. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* 8: 623-633.
- Fouts, D.E., Abramovitch, R.B., Alfano, J.R., Baldo, A.M., Buell, C.R., Cartinhour, S., Chatterjee, A.K., D'Ascenzo, M., Gwinn, M.L., Lazarowitz, S.G., Lin, N.-C., Martin, G.B., Rehm, A.H., Schneider, D.J., van Dijk, K., Tang, X. y Collmer, A. 2002. Genomewide identification of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 promoters controlled by the HrpL alternative sigma factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 2275-2280.

Fouts, D.E., Badel, J.L., Ramos, A.R., Rapp, R.A. y Collmer, A. 2003. A *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 Hrp (Type III secretion) deletion mutant expressing the Hrp system of bean pathogen *P. syringae* pv. *syringae* 61 retains normal host specificity for tomato. *Mol. Plant Microbe Interact.* 16: 43-52.

Fralick, J.A. 1996. Evidence that TolC is required for functioning of the Mar/AcrAB efflux pump of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 178: 5803-5805.

Friedman, L. y Kolter, R. 2004. Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. *Mol. Microbiol.* 51: 675-690.

Fukumori, F., Hirayama, H., Takami, H., Inoue, A. y Horikoshi, K. 1998. Isolation and transposon mutagenesis of a *Pseudomonas putida* KT2442 toluene-resistant variant: involvement of an efflux system in solvent resistance. *Extremophiles* 2: 395-400.

Gal, M., Preston, G., Massey, R., Spiers, A. y Rainey, P. 2003. Genes encoding a cellulosic polymer contribute toward the ecological success of *Pseudomonas fluorescens* SBW25 on plant surfaces. *Mol. Ecol.* 12: 3109-3121.

Galan, J.E. y Collmer, A. 1999. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* 284: 1322-1328.

Gardan, L., David, C., Morel, M., Glickmann, E., Abu-Ghorrah, M., Petit, A. y Dessaux, Y. 1992. Evidence for a correlation between auxin production and host plant species among strains of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1780-1783.

Gardan, L., Shafik, H., Belouin, S., Broch, R., Grimont, F. y Grimont, P.A. 1999. DNA relatedness among the pathovars of *Pseudomonas syringae* and description of *Pseudomonas tremae* sp. nov. and *Pseudomonas cannabina* sp. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 469-478.

Genka, H., Baba, T., Tsuda, M., Kanaya, S., Mori, H., Yoshida, T., Noguchi, M., Tsuchiya, K. y Sawada, H. 2006. Comparative analysis of *argK-tox* clusters and their flanking regions in phaseolotoxin-producing *Pseudomonas syringae* pathovars. *J. Mol. Evol.* 63: 401-414.

Georgopapadakou, N.H. 1993. Penicillin-binding proteins and bacterial resistance to beta-lactams. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 2045-2053.

Georgopapadakou, N.H. y Liu, F.Y. 1980. Penicillin-binding proteins in bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 18: 148-157.

Gitelson, A.A., Buschmann, C. y Lichtenthaler, H.K. 1998. Leaf chlorophyll fluorescence corrected for re-absorption by means of absorption and reflectance measurements. *J. Plant Physiol.* 152: 283-296.

Glass, N.L. y Kosuge, T. 1986. Cloning of the gene for indoleacetic acid-lysine synthetase from *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi*. *J. Bacteriol.* 166: 598-603.

Glickmann, E., Gardan, L., Jacquet, S., Hussain, S., Elasmri, M., Petit, A. y Dessaux, Y. 1998. Auxin production is a common feature of most pathovars of *Pseudomonas syringae*. *Molec. Plant Microbe Interact.* 11: 156-162.

Gonzalez-Pasayo, R. y Martinez-Romero, E. 2000. Multiresistance genes of *Rhizobium etli* CFN42. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13: 572-577.

Goodner, B., Hinkle, G., Gattung, S., Miller, N., Blanchard, M., Quorollo, B., Goldman, B., Cao, Y., Askenazi, M., Halling, C., Mullin, L., Houmiel, K., Gordon, J., Vaudin, M., Iartchouk, O., Epp, A., Liu, F., Wollam, C., Allinger, M., Doughty, D., Scott, C., Lappas, C., Markelz, B., Flanagan, C., Crowell, C., Gurson, J., Lomo, C., Sear, C., Strub, G., Cielo, C. y Slater, S. 2001. Genome sequence of the plant pathogen and biotechnology agent *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science* 294: 2323-2328.

- Goto, M. 1976. *Erwinia mallotivora* sp. nov., the Causal Organism of Bacterial Leaf Spot of *Mallotus japonicus* Muell. Arg. Int. J. Syst. Bacteriol. 26: 467-473.
- Grimm, C., Aufsatz, W. y Panopoulos, N. 1995. The hrpRS locus of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola constitutes a complex regulatory unit. Mol. Microbiol. 15: 155-165.
- Gristwood, T., Fineran, P.C., Everson, L. y Salmond, G.P. 2008. PigZ, a TetR/AcrR family repressor, modulates secondary metabolism via the expression of a putative four-component resistance-nodulation-cell-division efflux pump, ZrpADBC, in *Serratia* sp. ATCC 39006. Mol. Microbiol. 69: 418-435.
- Grkovic, S., Brown, M.H., Roberts, N.J., Paulsen, I.T. y Skurray, R.A. 1998. QacR is a repressor protein that regulates expression of the *Staphylococcus aureus* multidrug efflux pump QacA. J. Biol. Chem. 273: 18665-18673.
- Grkovic, S., Brown, M.H., Schumacher, M.A., Brennan, R.G. y Skurray, R.A. 2001a. The staphylococcal QacR multidrug regulator binds a correctly spaced operator as a pair of dimers. J. Bacteriol. 183: 7102-7109.
- Grkovic, S., Brown, M.H. y Skurray, R.A. 2001b. Transcriptional regulation of multidrug efflux pumps in bacteria. Semin. Cell Dev. Biol. 12: 225-237.
- Gunasekera, T. y Sundin, G. 2006. Role of nucleotide excision repair and photoreactivation in the solar UVB radiation survival of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a. J. Appl. Microbiol. 100: 1073-1083.
- Haapalainen, M., Mosorin, H., Dorati, F., Wu, R.F., Roine, E., Taira, S., Nissinen, R., Mattinen, L., Jackson, R., Pirhonen, M. y Lin, N.C. 2012. Hcp2, a secreted protein of the phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, is required for fitness for competition against bacteria and yeasts. J. Bacteriol. 194: 4810-4822.
- Haefele, D.M. y Lindow, S.E. 1987. Flagellar motility confers epiphytic fitness advantages upon *Pseudomonas syringae*. Appl. Environ. Microbiol. 53: 2528-2533.
- Hagemeyer, J., Schneider, B., Oldham, N.J. y Hahlbrock, K. 2001. Accumulation of soluble and wall-bound indolic metabolites in *Arabidopsis thaliana* leaves infected with virulent or avirulent *Pseudomonas syringae* pathovar tomato strains. Proc. Nat. Academy Sc. 98: 753-758.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W. y Stoodley, P. 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. Nat. Rev. Microbiol. 2: 95-108.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166: 557-580.
- Harris, P. y Hartley, R. 1976. Detection of bound ferulic acid in cell walls of the *Gramineae* by ultraviolet fluorescence microscopy. Nature 259: 508-510.
- Hartley, R. 1973. Carbohydrate esters of ferulic acid as components of cell-walls of *Lolium multiflorum*. Phytochemistry. 12: 661-665.
- Hattermann, D. y Ries, S. 1989. Motility of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* and its role in infection. Phytopathology 79: 284-289.
- He, G., Kuroda, T., Mima, T., Morita, Y., Mizushima, T. y Tsuchiya, T. 2004. An H<sup>+</sup>-coupled multidrug efflux pump, PmpM, a member of the MATE family of transporters, from *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 186: 262-265.
- Hendrickson, E., Guevera, P. y Ausubel, F. 2000a. The alternative sigma factor RpoN is required for hrp activity in *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* and acts at the level of hrpL transcription. J. Bacteriol. 182: 3508-3516.
- Hendrickson, E., Guevera, P., Penaloza-Vazquez, A., Shao, J., Bender, C. y Ausubel, F. 2000b. Virulence of the phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* is rpoN dependent. J. Bacteriol. 182: 3498-3507.

- Henrichsen, J. 1972. Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriol. Rev.* 36: 478-503.
- Hernández-Morales, A., De la Torre-Zavala, S., Ibarra-Laclette, E., Hernández-Flores, J., Jofre-Garfias, A., Martínez-Antonio, A. y Álvarez-Morales, A. 2009. Transcriptional profile of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola NPS3121 in response to tissue extracts from a susceptible *Phaseolus vulgaris* L. cultivar. *BMC Microbiol.* 9: 1-16.
- Hidalgo, G., Chan, M. y Tufenkji, N. 2011. Inhibition of *Escherichia coli* CFT073 fliC expression and motility by cranberry materials. *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 6852-6857.
- Hideg, E., Juhasz, M., Bornman, J.F. y Asada, K. 2002. The distribution and possible origin of blue-green fluorescence in control and stressed barley leaves. *Photochem. Photobiol. Sci* 1: 934-941.
- Higgins, M.K., Bokma, E., Koronakis, E., Hughes, C. y Koronakis, V. 2004. Structure of the periplasmic component of a bacterial drug efflux pump. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 9994-9999.
- Hillen, W. y Berens, C. 1994. Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance. *Annu. Rev. Microbiol.* 48: 345-369.
- Hinchliffe, P., Symmons, M.F., Hughes, C. y Koronakis, V. 2013. Structure and operation of bacterial tripartite pumps. *Annu. Rev. Microbiol.* 67: 221-242.
- Hirakata, Y., Srikumar, R., Poole, K., Gotoh, N., Suematsu, T., Kohno, S., Kamihira, S., Hancock, R.E. y Speert, D.P. 2002. Multidrug efflux systems play an important role in the invasiveness of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Exp. Med.* 196: 109-118.
- Hirakawa, H., Inazumi, Y., Masaki, T., Hirata, T. y Yamaguchi, A. 2005. Indole induces the expression of multidrug exporter genes in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 55: 1113-1126.
- Hirano, S.S. y Upper, C.D. 2000. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*-a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 624-53.
- Huda, M., Chen, J., Morita, Y., Kuroda, T., Mizushima, T. y Tsuchiya, T. 2003. Gene cloning and characterization of VcrM, a Na<sup>+</sup>-coupled multidrug efflux pump, from *Vibrio cholerae* non-O1. *Microbiol. Immunol.* 47: 419-427.
- Huda, M.N., Morita, Y., Kuroda, T., Mizushima, T. y Tsuchiya, T. 2001. Na<sup>+</sup>-driven multidrug efflux pump VcmA from *Vibrio cholerae* non-O1, a non-halophilic bacterium. *FEMS Microbiol. Lett.* 203: 235-239.
- Hueck, C.J. 1998. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 379-433.
- Hutcheson, S.W., Bretz, J., Sussan, T., Jin, S. y Pak, K. 2001. Enhancer-binding proteins HrpR and HrpS interact to regulate *hrp*-encoded type III protein secretion in *Pseudomonas syringae* strains. *J. Bacteriol.* 183: 5589-5598.
- Hutchison, M. y Gross, D. 1997. Lipopeptide phytotoxins produced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*: comparison of the biosurfactant and ion channel-forming activities of syringopeptin and syringomycin. *Mol. Plant Microbe Interact.* 10: 347-354.
- Hutzinger, O. y Kosuge, T. 1968. Microbial synthesis and degradation of indole-3-acetic acid. 3. The isolation and characterization of indole-3-acetyl-epsilon-L-lysine. *Biochemistry* 7: 601-605.
- Hutzler, P., Fischbach, R., Heller, W., Jungblut, T.P., Reuber, S., Schmitz, R., Veit, M., Weissenböck, G. y Schnitzler, J.P. 1998. Tissue localization of phenolic compounds in plants by confocal laser scanning microscopy. *J. Exp. Bot.* 49: 953-965.

- Huynh, T.V., Dahlbeck, D. y Staskawicz, B.J. 1989. Bacterial blight of soybean: regulation of a pathogen gene determining host cultivar specificity. *Science* 245: 1374-1377.
- Hvorup, R., Winnen, B., Chang, A., Jiang, Y., Zhou, X. y Saier, M., Jr. 2003. The multidrug/oligosaccharidylipid/polysaccharide (MOP) exporter superfamily. *Eur. J. Biochem.* 270: 799-813.
- Ichinose, Y., Shimizu, R., Ikeda, Y., Taguchi, F., Marutani, M., Mukaihara, T., Inagaki, Y., Toyoda, K. y Shiraishi, T. 2003. Need for flagella for complete virulence of *Pseudomonas syringae* pv. tabaci: genetic analysis with flagella-defective mutants  $\Delta$ fliC and  $\Delta$ fliD in host tobacco plants. *J. Gen. Plant Pathol.* 69: 244-249.
- Jackson, R.W., Athanassopoulos, E., Tsiamis, G., Mansfield, J.W., Sesma, A., Arnold, D.L., Gibbon, M.J., Murillo, J., Taylor, J.D. y Vivian, A. 1999. Identification of a pathogenicity island, which contains genes for virulence and avirulence, on a large native plasmid in the bean pathogen *Pseudomonas syringae* pathovar phaseolicola. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 10875-10880.
- Jin, Q. y He, S.Y. 2001. Role of the Hrp pilus in type III protein secretion in *Pseudomonas syringae*. *Science* 294: 2556-2558.
- Jin, Q., Hu, W., Brown, I., McGhee, G., Hart, P., Jones, A.L. y He, S.Y. 2001. Visualization of secreted Hrp and Avr proteins along the Hrp pilus during type III secretion in *Erwinia amylovora* and *Pseudomonas syringae*. *Mol. Microbiol.* 40: 1129-1139.
- Joardar, V., Lindeberg, M., Jackson, R.W., Selengut, J., Dodson, R., Brinkac, L.M., Daugherty, S.C., Deboy, R., Durkin, A.S., Giglio, M.G., Madupu, R., Nelson, W.C., Rosovitz, M.J., Sullivan, S., Crabtree, J., Creasy, T., Davidsen, T., Haft, D.H., Zafar, N., Zhou, L., Halpin, R., Holley, T., Khouri, H., Feldblyum, T., White, O., Fraser, C.M., Chatterjee, A.K., Cartinhour, S., Schneider, D.J., Mansfield, J., Collmer, A. y Buell, C.R. 2005. Whole-genome sequence analysis of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola 1448A reveals divergence among pathovars in genes involved in virulence and transposition. *J. Bacteriol.* 187: 6488-6498.
- Jogl, G. y Tong, L. 2004. Crystal structure of yeast acetyl-coenzyme A synthetase in complex with AMP. *Biochemistry* 43: 1425-1431.
- Johanesen, P.A., Lyras, D., Bannam, T.L. y Rood, J.I. 2001. Transcriptional analysis of the tet(P) operon from *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol.* 183: 7110-7119.
- Jones, J. y Dangl, J. 2006. The plant immune system. *Nature* 444: 323-329.
- Jovanovic, M., James, E., Burrows, P., Rego, F., Buck, M. y Schumacher, J. 2011. Regulation of the co-evolved HrpR and HrpS AAA<sup>+</sup> proteins required for *Pseudomonas syringae* pathogenicity. *Nat. Commun.* 2: 1-9.
- Kang, H. y Gross, D.C. 2005. Characterization of a resistance-nodulation-cell division transporter system associated with the syr-syp genomic island of *Pseudomonas syringae* pv. syringae. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 5056-5065.
- Kao, F.-J., Wang, Y.-M., Chen, J.-C., Cheng, P.-C., Chen, R.-W. y Lin, B.-L. 2002. Micro-spectroscopy of chloroplasts in protoplasts from *Arabidopsis thaliana* under single-and multi-photon excitations. *J. Lumines.* 98: 107-114.
- Kawakita, Y., Taguchi, F., Inagaki, Y., Toyoda, K., Shiraishi, T. y Ichinose, Y. 2012. Characterization of each *aefR* and *mexT* mutant in *Pseudomonas syringae* pv. tabaci 6605. *Mol. Genet. Genomics* 287: 473-484.
- Kawamura-Sato, K., Iinuma, Y., Hasegawa, T., Horii, T., Yamashino, T. y Ohta, M. 2000. Effect of subinhibitory concentrations of macrolides on expression of flagellin in *Pseudomonas aeruginosa* and *Proteus mirabilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 2869-2872.
- Kearns, D.B. 2010. A field guide to bacterial swarming motility. *Nat. Rev. Microbiol.* 8: 634-644.

- Keith, R.C., Keith, L.M., Hernandez-Guzman, G., Uppalapati, S.R. y Bender, C.L. 2003. Alginate gene expression by *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 in host and non-host plants. *Microbiology* 149: 1127-1138.
- Kieboom, J. y de Bont, J. 2001. Identification and molecular characterization of an efflux system involved in *Pseudomonas putida* S12 multidrug resistance. *Microbiology* 147: 43-51.
- Kieboom, J., Dennis, J.J., De Bont, J.A. y Zylstra, G.J. 1998a. Identification and molecular characterization of an efflux pump involved in *Pseudomonas putida* S12 solvent tolerance. *J. Biol. Chem.* 273: 85-91.
- Kieboom, J., Dennis, J.J., Zylstra, G.J. y De Bont, J.A. 1998b. Active efflux of organic solvents by *Pseudomonas putida* S12 is induced by solvents. *J. Bacteriol.* 180: 6769-6772.
- Kim, J., Kim, J.G., Kang, Y., Jang, J.Y., Jog, G.J., Lim, J.Y., Kim, S., Suga, H., Nagamatsu, T. y Hwang, I. 2004. Quorum sensing and the LysR-type transcriptional activator ToxR regulate toxoflavin biosynthesis and transport in *Burkholderia glumae*. *Mol. Microbiol.* 54: 921-934.
- Kim, J.J. y Sundin, G.W. 2000. Regulation of the *ruAB* mutagenic DNA repair operon of *Pseudomonas syringae* by UV-B (290 to 320 nanometers) radiation and analysis of *ruAB*-mediated mutability *in vitro* and *in planta*. *J. Bacteriol.* 182: 6137-6144.
- Kim, M.S., Lee, E.H., Mulchi, C.L., McMurtrey III, J.E., Chappelle, E.W. y Rowland, R.A., 1998. Fluorescence imaging of soybean flavonol isolines. In: *Aerospace/Defense Sensing and Controls. Int. Soc. Opt. Photonics*, pp. 170-178.
- King, E.O., Ward, M.K. y Raney, D.E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J. Lab. Clin. Med.* 44: 301-307.
- Kloek, A., Verbsky, M., Sharma, S., Schoelz, J., Vogel, J., Klessig, D. y Kunkel, B. 2001. Resistance to *Pseudomonas syringae* conferred by an *Arabidopsis thaliana* coronatine-insensitive (*coi1*) mutation occurs through two distinct mechanisms. *Plant J.* 26: 509-522.
- Kofalvi, S. y Nassuth, A. 1995. Influence of wheat streak mosaic virus infection on phenylpropanoid metabolism and the accumulation of phenolics and lignin in wheat. *Physiol. Molec. Plant Pathol.* 47: 365-377.
- Kong, H., Roberts, D., Patterson, C., Kuehne, S., Heeb, S., Lakshman, D. y Lydon, J. 2012. Effect of overexpressing *rsmA* from *Pseudomonas aeruginosa* on virulence of select phytotoxin-producing strains of *P. syringae*. *Phytopathology* 102: 575-587.
- Koronakis, V., Sharff, A., Koronakis, E., Luisi, B. y Hughes, C. 2000. Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature* 405: 914-919.
- Kubori, T., Matsushima, Y., Nakamura, D., Uralil, J., Lara-Tejero, M., Sukhan, A., Galán, J.E. y Aizawa, S.-I. 1998. Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science* 280: 602-605.
- Kuroda, T. y Tsuchiya, T. 2009. Multidrug efflux transporters in the MATE family. *Biochim. Biophys. Acta* 1794: 763-768.
- Lacroix, F.J.C., Cloeckaert, A., Grépinet, O., Pinault, C., Popoff, M.Y., Waxin, H. y Pardon, P. 1996. *Salmonella typhimurium* *acrB*-like gene: identification and role in resistance to biliary salts and detergents and in murine infection. *FEMS Microbiol. Lett.* 135: 161-167.
- Lan, L., Deng, X., Xiao, Y., Zhou, J. y Tang, X. 2007. Mutation of Lon protease differentially affects the expression of *Pseudomonas syringae* type III secretion system genes in rich and minimal media and reduces pathogenicity. *Mol. Plant Microbe Interact.* 20: 682-696.

- Lang, M., Lichtenthaler, H.K., Sowinska, M., Heisel, F. y Miede, J.A. 1996. Fluorescence imaging of water and temperature stress in plant leaves. *J. Plant Physiol.* 148: 613-621.
- Lang, M., Stober, F. y Lichtenthaler, H.K. 1991. Fluorescence emission spectra of plant leaves and plant constituents. *Radiat. Environ. Biophys.* 30: 333-347.
- Langsdorf, G., Buschmann, C., Sowinska, M., Babani, F., Mokry, M., Timmermann, F. y Lichtenthaler, H.K. 2000. Multicolour fluorescence imaging of sugar beet leaves with different nitrogen status by flash lamp UV-excitation. *Photosynthetica* 38: 539-551.
- Leach, J.E. y White, F.F. 1996. Bacterial avirulence genes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34: 153-179.
- Lee, M., Jun, S.Y., Yoon, B.Y., Song, S., Lee, K. y Ha, N.C. 2012. Membrane fusion proteins of type I secretion system and tripartite efflux pumps share a binding motif for TolC in Gram-negative bacteria. *PLoS One* 7: 1-7.
- Lee, S.W. y Edlin, G. 1985. Expression of tetracycline resistance in pBR322 derivatives reduces the reproductive fitness of plasmid-containing *Escherichia coli*. *Gene* 39: 173-180.
- Lee, V., Matewish, J., Kessler, J., Hyodo, M., Hayakawa, Y. y Lory, S. 2007. A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production. *Mol. Microbiol.* 65: 1474-1484.
- Lenk, S. y Buschmann, C. 2006a. Distribution of UV-shielding of the epidermis of sun and shade leaves of the beech (*Fagus sylvatica L.*) as monitored by multi-colour fluorescence imaging. *J. Plant Physiol.* 163: 1273-1283.
- Lenk, S., Chaerle, L., Pfundel, E.E., Langsdorf, G., Hagenbeek, D., Lichtenthaler, H.K., Van der Straeten, D. y Buschmann, C. 2007. Multispectral fluorescence and reflectance imaging at the leaf level and its possible applications. *J. Experim. Bot.* 58: 807-814.
- Levy, S. y Marshall, B. 2004. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat. Med.* 10: 122-129.
- Li, W., Rokni-Zadeh, H., De, V.M., Ghequire, M., Sinnaeve, D., Xie, G., Rozenski, J., Madder, A., Martins, J. y De, M.R. 2013. The antimicrobial compound xantholysin defines a new group of *Pseudomonas* cyclic lipopeptides. *PLoS One* 8: 1-16.
- Li, X. y Nikaido, H. 2004. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs* 64: 159-204.
- Li, X. y Nikaido, H. 2009. Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. *Drugs* 69: 1555-1623.
- Lichtenthaler, H.K. 1998. The stress concept in plants: an introduction. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 851: 187-198.
- Lichtenthaler, H.K. y Babani, F. 2000. Detection of photosynthetic activity and water stress by imaging the red chlorophyll fluorescence. *Plant Physiol. Biochem.* 38: 889-895.
- Lichtenthaler, H.K., Buschmann, C., Rinderle, U. y Schmuck, G. 1986. Application of chlorophyll fluorescence in ecophysiology. *Radiat. Environ. Biophys.* 25: 297-308.
- Lichtenthaler, H.K., Lang, M., Sowinska, M., Heisel, F. y Miede, J.A. 1996. Detection of vegetation stress via a new high resolution fluorescence imaging system. *J. Plant Physiol.* 148: 599-612.
- Lichtenthaler, H.K., Langsdorf, G., Lenk, S. y Buschmann, C. 2005. Chlorophyll fluorescence imaging of photosynthetic activity with the flash-lamp fluorescence imaging system. *Photosynthetica* 43: 355-369.
- Lichtenthaler, H.K. y Miede, J.A. 1997. Fluorescence imaging as a diagnostic tool for plant stress. *Trends Plant Sci.* 2: 316-320.

- Lichtenthaler, H.K. y Schweiger, J. 1998. Cell wall bound ferulic acid, the major substance of the blue-green fluorescence emission of plants. *J. Plant Physiol.* 152: 272-282.
- Lin, J., Sahin, O., Michel, L.O. y Zhang, Q. 2003. Critical role of multidrug efflux pump CmeABC in bile resistance and in vivo colonization of *Campylobacter jejuni*. *Infect. Immun.* 71: 4250-4259.
- Lindeberg, M., Cartinhour, S., Myers, C.R., Schechter, L.M., Schneider, D.J. y Collmer, A. 2006. Closing the circle on the discovery of genes encoding Hrp regulon members and type III secretion system effectors in the genomes of three model *Pseudomonas syringae* strains. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19: 1151-1158.
- Lindeberg, M., Myers, C.R., Collmer, A. y Schneider, D.J. 2008. Roadmap to new virulence determinants in *Pseudomonas syringae*: insights from comparative genomics and genome organization. *Mol. Plant Microbe Interact.* 21: 685-700.
- Lindemann, A., Koch, M., Pessi, G., Muller, A., Balsiger, S., Hennecke, H. y Fischer, H. 2010. Host-specific symbiotic requirement of BdeAB, a RegR-controlled RND-type efflux system in *Bradyrhizobium japonicum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 312:184-191.
- Lindenthal, M., Steiner, U., Dehne, H. y Oerke, E. 2005. Effect of downy mildew development on transpiration of cucumber leaves visualized by digital infrared thermography. *Phytopathology* 95: 233-240.
- Lindgren, P.B., Peet, R.C. y Panopoulos, N.J. 1986. Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. "phaseolicola" controls pathogenicity of bean plants and hypersensitivity of nonhost plants. *J. Bacteriol.* 168: 512-522.
- Lindow, S.E. y Brandl, M.T. 2003. Microbiology of the phyllosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1875-1883.
- Lindow, S.E., Lahue, E., Govindarajan, A.G., Panopoulos, N.J. y Gies, D. 1989. Localization of ice nucleation activity and the iceC gene product in *Pseudomonas syringae* and *Escherichia coli*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2: 262-272.
- Lomovskaya, O., Lewis, K. y Matin, A. 1995. EmrR is a negative regulator of the *Escherichia coli* multidrug resistance pump EmrAB. *J. Bacteriol.* 177: 2328-2334.
- Long, F., Rouquette-Loughlin, C., Shafer, W. y Yu, E. 2008. Functional cloning and characterization of the multidrug efflux pumps NorM from *Neisseria gonorrhoeae* and YdhE from *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52:3052-3060.
- López-Gresa, M.P., Maltese, F., Belles, J., Conejero, V., Kim, H., Choi, Y. y Verpoorte, R. 2010. Metabolic response of tomato leaves upon different plant-pathogen interactions. *Phytochem. Anal.* 21: 89-94.
- López-Gresa, M.P., Torres, C., Campos, L., Lisón, P., Rodrigo, I., Bellés, J.M. y Conejero, V. 2011. Identification of defence metabolites in tomato plants infected by the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Environ. Exp. Bot.* 74: 216-228.
- Losada, L. y Hutcheson, S. 2005. Type III secretion chaperones of *Pseudomonas syringae* protect effectors from Lon-associated degradation. *Mol. Microbiol.* 55: 941-53.
- Lu, M., Symersky, J., Radchenko, M., Koide, A., Guo, Y., Nie, R. y Koide, S. 2013. Structures of a Na<sup>+</sup>-coupled, substrate-bound MATE multidrug transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110:2099-2104.
- Lüdeker, W., Dahn, H.G. y Günther, K.P. 1996. Detection of fungal infection of plants by laser-induced fluorescence: An attempt to use remote sensing. *J. Plant Physiol.* 148: 579-585.
- Luedeker, W., Guenther, K.P. y Dahn, H.G. 1997. Laser-induced leaf fluorescence: a tool for vegetation status and stress monitoring and optical-aided agriculture, in: *Advances in laser remote sensing for terrestrial and oceanographic applications*. Narayana, R.M., Kalshoven, J.E. (ed.), Germany, pp. 63-75.

Llama-Palacios, A., López-Solanilla, E. y Rodríguez-Palenzuela, P. 2002. The *ybiT* gene of *Erwinia chrysanthemi* codes for a putative ABC transporter and is involved in competitiveness against endophytic bacteria during infection. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 1624-1630.

Ma, D., Alberti, M., Lynch, C., Nikaido, H. y Hearst, J.E. 1996. The local repressor AcrR plays a modulating role in the regulation of *acrAB* genes of *Escherichia coli* by global stress signals. *Mol. Microbiol.* 19: 101-112.

Maggiorani Valecillos, A., Rodríguez-Palenzuela, P. y López-Solanilla, E. 2006. The role of several multidrug resistance systems in *Erwinia chrysanthemi* pathogenesis. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19: 607-613.

Mann, E. y Wozniak, D. 2012. *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. *FEMS Microbiol. Rev.* 36: 893-916.

Mansfield, J., Jenner, C., Hockenhull, R., Bennett, M.A. y Stewart, R. 1994. Characterization of *avrPphE*, a gene for cultivar-specific avirulence from *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola which is physically linked to *hrpY*, a new *hrp* gene identified in the halo-blight bacterium. *Mol. Plant Microbe Interact.* 7: 726-739.

Mantha, S.V., Johnson, G.A. y Day, T.A. 2001. Evidence from action and fluorescence spectra that UV-induced violet-blue-green fluorescence enhances leaf photosynthesis. *Photochem. Photobiol.* 73: 249-256.

Marcelis, L.F.M., Dieleman, J.A., Boulard, T., Garate, A., Kittas, C., Buschmann, C., Brajeul, E., Wieringa, G., De Groot, F., Van Loon, A. y Kocsanyi, L., 2006. CLOSYS: Closed system for water and nutrient management in horticulture, in: *Acta Horticulturae* 178: Proc. IIIrd Intern. Symposium on Models for Plant Growth, Environ. Control and Farm. Manag. in Protected Cultivation. Marcelis, V.G., Stanghellini, C., Heuvelink, E. (ed.), Wageningen, pp. 375-382.

Marco, M.L., Legac, J. y Lindow, S.E. 2005. *Pseudomonas syringae* genes induced during colonization of leaf surfaces. *Environ. Microbiol.* 7: 1379-1391.

Martínez, J.L., Sánchez, M.B., Martínez-Solano, L., Hernández, A., Garmendia, L., Fajardo, A. y Álvarez-Ortega, C. 2009. Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. *FEMS Microbiol. Rev.* 33: 430-449.

Masuda, N., Sakagawa, E., Ohya, S., Gotoh, N., Tsujimoto, H. y Nishino, T. 2000. Contribution of the MexX-MexY-OprM efflux system to intrinsic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 2242-2246.

Matilla, M.A., Ramos, J.L., Duque, E., Alché, J., Espinosa-Urgel, M. y Ramos-González, M.I. 2007. Temperature and pyoverdine mediated iron acquisition control surface motility of *Pseudomonas putida*. *Environ. Microbiol.* 9: 1842-1850.

Matsumoto, T., Kanamoto, T., Otsuka, M., Omote, H. y Moriyama, Y. 2008. Role of glutamate residues in substrate recognition by human MATE1 polyspecific H<sup>+</sup>/organic cation exporter. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 294: 1074-1078.

Mazzola, M. y White, F.F. 1994. A mutation in the indole-3-acetic acid biosynthesis pathway of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* affects growth in *Phaseolus vulgaris* and syringomycin production. *J. Bacteriol.* 176: 1374-1382.

McAleese, F., Petersen, P., Ruzin, A., Dunman, P.M., Murphy, E., Projan, S.J. y Bradford, P.A. 2005. A novel MATE family efflux pump contributes to the reduced susceptibility of laboratory-derived *Staphylococcus aureus* Mutants to Tigecycline. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 1865-1871.

McClendon, J.H. y Fukshansky, L. 1990. On the interpretation of absorption spectra of leaves-I. Introduction and the correction of leaf spectra for surface reflection. *Photochem. Photobiol.* 51: 203-210.

McNulty, C., Thompson, J., Barrett, B., Lord, L., Andersen, C. y Roberts, I.S. 2006. The cell surface expression of group 2 capsular polysaccharides in *Escherichia coli*: the role of KpsD, RhsA and a multi-protein complex at the pole of the cell. *Mol. Microbiol.* 59: 907-922.

Melotto, M., Underwood, W. y He, S.Y. 2008. Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* 46: 101-122.

Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K. y He, S.Y. 2006. Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* 126: 969-980.

Mercure, S.A., Daoust, B. y Samson, G. 2004. Causal relationship between growth inhibition, accumulation of phenolic metabolites, and changes of UV-induced fluorescences in nitrogen-deficient barley plants. *Can. J. Bot.-Rev. Can. Bot.* 82: 815-821.

Merril, C.R., Switzer, R.C. y Van Keuren, M.L. 1979. Trace polypeptides in cellular extracts and human body fluids detected by two-dimensional electrophoresis and a highly sensitive silver stain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4335-4339.

Meyer, S., Cartelat, A., Moya, I. y Cerovic, Z.G. 2003. UV-induced blue-green and far-red fluorescence along wheat leaves: a potential signature of leaf ageing. *J. Experim. Bot.* 54: 757-769.

Mikolosko, J., Bobyk, K., Zgurskaya, H. y Ghosh, P. 2006. Conformational flexibility in the multidrug efflux system protein AcrA. *Structure* 14: 577-87.

Mima, T., Joshi, S., Gomez-Escalada, M. y Schweizer, H.P. 2007. Identification and characterization of TriABC-OpmH, a triclosan efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* requiring two membrane fusion proteins. *J. Bacteriol.* 189: 7600-7609.

Mitchell, R.E. 1978. Halo blight of beans: toxin production by several *Pseudomonas phaseolicola* isolates. *Physiol. Plant Pathol.* 13: 37-49.

Monier, J.M. y Lindow, S.E. 2003. Differential survival of solitary and aggregated bacterial cells promotes aggregate formation on leaf surfaces. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 15977-15982.

Monier, J. y Lindow, S. 2004. Frequency, size, and localization of bacterial aggregates on bean leaf surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 346-355.

Moore, R.E., Niemczura, W.P., Kwok, O.C. y Patil, S.S. 1984. Inhibitors of ornithine carbamoyltransferase from *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. Revised structure of phaseolotoxin. *Tetrahedron Lett.* 25: 3931-3934.

Morales, F., Cerovic, Z.G. y Moya, I. 1994. Characterization of blue-green fluorescence in the mesophyll of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves affected by iron deficiency. *Plant Physiol.* 106: 127-133.

Morales, F., Cerovic, Z.G. y Moya, I. 1996. Time-resolved blue-green fluorescence of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves. Spectroscopic evidence for the presence of ferulic acid as the main fluorophore of the epidermis. *Biochim. Biophys. Acta* 1273: 251-262.

Morales, F., Cerovic, Z.G. y Moya, I. 1998. Time-resolved blue-green fluorescence of *Sugar beet* leaves. Temperature-induced changes and consequences for the potential use of blue-green fluorescence as a signature for remote sensing of plants. *Funct. Plant Biol.* 25: 325-334.

Morita, Y., Kataoka, A., Shiota, S., Mizushima, T. y Tsuchiya, T. 2000. NorM of *Vibrio parahaemolyticus* is an Na<sup>+</sup>-driven multidrug efflux pump. *J. Bacteriol.* 182: 6694-6697.

Mortier-Barriere, I., de, S.A., Claverys, J. y Martin, B. 1998. Competence-specific induction of recA is required for full recombination proficiency during transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 27: 159-170.

- Mosqueda, G., Van, d.B.G., Saucedo, O., Bailey, A., Álvarez-Morales, A. y Herrera-Estrella, L. 1990. Isolation and characterization of the gene from *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola encoding the phaseolotoxin-insensitive ornithine carbamoyltransferase. *Mol. Gen. Genet.* 222: 461-466.
- Moya, I., Cartelat, A., Cerovic, Z.G., Ducruet, J.M., Evain, S., Flexas, J., Goulas, Y., Louis, J., Meyer, S., Moise, N. y Ounis, A., 2003. Possible approaches to remote sensing of photosynthetic activity, in: *Geosci. Remote Sens. Symposium. IEEE int. (ed.)*, Toulouse, pp. 588-590.
- Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E., Matsumoto, T. y Yamaguchi, A. 2006. Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism. *Nature* 443: 173-179.
- Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E. y Yamaguchi, A. 2002. Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature* 419: 587-593.
- Murillo, J., Bardaji, L., y Fuhrer, E. 2010. La grasa de las judías causada por la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. *Phytoma* 224: 27-32.
- Murray, D., Schumacher, M. y Brennan, R. 2004. Crystal structures of QacR-diamidine complexes reveal additional multidrug-binding modes and a novel mechanism of drug charge neutralization. *J. Biol. Chem.* 279: 14365-14371.
- Mutikainen, P., Walls, M., Ovaska, J., Keinänen, M., Julkunen-Tiitto, R. y Vapaavuori, E. 2000. Herbivore resistance in *Betula pendula*: effect of fertilization, defoliation, and plant genotype. *Ecology* 81: 49-65.
- Nedbal, L. y Whitmarsh, J., 2004. Chlorophyll fluorescence imaging of leaves and fruits, in: *Chlorophyll fluorescence: A signature of photosynthesis*. Papageorgiou, C.G. y Govindjee (ed.), Netherlands, pp. 389-407.
- Nelson, K.E., Weinel, C., Paulsen, I.T., Dodson, R.J., Hilbert, H., Martins dos Santos, V.A., Fouts, D.E., Gill, S.R., Pop, M., Holmes, M., Brinkac, L., Beanan, M., DeBoy, R.T., Daugherty, S., Kolonay, J., Madupu, R., Nelson, W., White, O., Peterson, J., Khouri, H., Hance, I., Chris Lee, P., Holtzapple, E., Scanlan, D., Tran, K., Moazzez, A., Utterback, T., Rizzo, M., Lee, K., Kosack, D., Moestl, D., Wedler, H., Lauber, J., Stjepandic, D., Hoheisel, J., Straetz, M., Heim, S., Kiewitz, C., Eisen, J.A., Timmis, K.N., Dusterhoft, A., Tumbler, B. y Fraser, C.M. 2002. Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* 4: 799-808.
- Nguyen, L.C., Taguchi, F., Tran, Q.M., Naito, K., Yamamoto, M., Ohnishi-Kameyama, M., Ono, H., Yoshida, M., Chiku, K., Ishii, T., Inagaki, Y., Toyoda, K., Shiraishi, T. y Ichinose, Y. 2012. Type IV pilin is glycosylated in *Pseudomonas syringae* pv. tabaci 6605 and is required for surface motility and virulence. *Mol. Plant Pathol.* 13: 764-774.
- Nguyen, T.N., Phan, Q.G., Duong, L.P., Bertrand, K.P. y Lenski, R.E. 1989. Effects of carriage and expression of the Tn10 tetracycline-resistance operon on the fitness of *Escherichia coli* K12. *Mol. Biol. Evol.* 6: 213-225.
- Nicholson, R.L. y Hammerschmidt, R. 1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30: 369-389.
- Niepold, F., Anderson, D. y Mills, D. 1985. Cloning determinants of pathogenesis from *Pseudomonas syringae* pathovar syringae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 406-410.
- Nies, D.H. 2003. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* 27: 313-339.
- Nikaido, E., Yamaguchi, A. y Nishino, K. 2008. AcrAB Multidrug Efflux Pump Regulation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by RamA in Response to Environmental Signals. *J. Biol. Chem.* 283: 24245-24253.
- Nikaido, H. 2009. Multidrug resistance in bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* 78: 119-146.

- Nikaido, H. y Zgurskaya, H.I. 2001. AcrAB and related multidrug efflux pumps of *Escherichia coli*. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 3: 215-218.
- Nilsson, H.E. 1995. Remote sensing and image analysis in plant pathology. Annu. Rev. Phytopathol. 15: 489-527.
- Nishimura, A., Morita, M., Nishimura, Y. y Sugino, Y. 1990. A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. Nucleic Acids Res. 18: 6169.
- Nomura, K., Melotto, M. y He, S.Y. 2005. Suppression of host defense in compatible plant-*Pseudomonas syringae* interactions. Curr. Opin. Plant Biol. 8: 361-368.
- Nuske, J. y Fritsche, W. 1989. Phaseolotoxin production by *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola: the influence of temperature. J. Basic Microbiol. 29: 441-447.
- O'Donnell, P.J., Schmelz, E.A., Moussatche, P., Lund, S.T., Jones, J.B. y Klee, H.J. 2003. Susceptible to intolerance – a range of hormonal actions in a susceptible *Arabidopsis* pathogen response. Plant J. 33: 245-257.
- Oguiza, J. y Asensio, A. 2005. The VirPphA/AvrPtoB family of type III effectors in *Pseudomonas syringae*. Res. Microbiol. 156: 298-303.
- Oguiza, J.A., Rico, A., Rivas, L.A., Sutra, L., Vivian, A. y Murillo, J. 2004. *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola can be separated into two genetic lineages distinguished by the possession of the phaseolotoxin biosynthetic cluster. Microbiology 150: 473-482.
- Omote, H., Hiasa, M., Matsumoto, T., Otsuka, M. y Moriyama, Y. 2006. The MATE proteins as fundamental transporters of metabolic and xenobiotic organic cations. Trends Pharmacol. Sci. 27: 587-593.
- Ortiz-Martin, I., Thwaites, R., Macho, A., Mansfield, J. y Beuzon, C. 2010a. Positive regulation of the Hrp type III secretion system in *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. Mol. Plant Microbe Interact. 23: 665-681.
- Ortiz-Martin, I., Thwaites, R., Mansfield, J. y Beuzon, C. 2010b. Negative regulation of the Hrp type III secretion system in *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. Mol. Plant Microbe Interact. 23: 682-701.
- Osborn, A.E. 1996. Preformed Antimicrobial Compounds and Plant Defense against Fungal Attack. Plant Cell 8: 1821-1831.
- Otsuka, M., Matsumoto, T., Morimoto, R., Arioka, S., Omote, H. y Moriyama, Y. 2005. A human transporter protein that mediates the final excretion step for toxic organic cations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 17923-17928.
- Ottemann, K.M. y Miller, J.F. 1997. Roles for motility in bacterial-host interactions. Mol. Microbiol. 24: 1109-1117.
- Pages, J.M., Masi, M. y Barbe, J. 2005. Inhibitors of efflux pumps in Gram-negative bacteria. Trends Mol. Med. 11: 382-389.
- Palumbo, J.D., Kado, C.I. y Phillips, D.A. 1998. An isoflavonoid-inducible efflux pump in *Agrobacterium tumefaciens* is involved in competitive colonization of roots. J. Bacteriol. 180: 3107-3113.
- Palleroni, N.J., 1984. *Pseudomonas*, in: Bergey's Manual of Systematic Bacteriol., vol. 1. Krieg, N.R. y Holt, J.G. (ed.), Baltimore, pp. 141-199.
- Pao, S.S., Paulsen, I.T. y Saier, M.H., Jr. 1998. Major facilitator superfamily. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62: 1-34.

Parker, D., Beckmann, M., Zubair, H., Enot, D.P., Caracuel-Rios, Z., Overy, D.P., Snowdon, S., Talbot, N.J. y Draper, J. 2009. Metabolomic analysis reveals a common pattern of metabolic re-programming during invasion of three host plant species by *Magnaporthe oryzae*. *Plant J.* 59: 723-737.

Parker, W.L., Rathnum, M.L., Wells, J.S., Jr., Trejo, W.H., Principe, P.A. y Sykes, R.B. 1982. SQ 27,860, a simple carbapenem produced by species of *Serratia* and *Erwinia*. *J. Antibiot. (Tokyo)* 35: 653-660.

Patil, S.S. 1974. Toxins produced by phytopathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 12: 259-279.

Paul, R., Abel, S., Wassmann, P., Beck, A., Heerklotz, H. y Jenal, U. 2007. Activation of the diguanylate cyclase PleD by phosphorylation-mediated dimerization. *J. Biol. Chem.* 282: 29170-29177.

Paul, R., Weiser, S., Amiot, N.C., Chan, C., Schirmer, T., Giese, B. y Jenal, U. 2004. Cell cycle-dependent dynamic localization of a bacterial response regulator with a novel di-guanylate cyclase output domain. *Genes Dev.* 18: 715-727.

Paulsen, I.T. 2003. Multidrug efflux pumps and resistance: regulation and evolution. *Curr. Opin. Microbiol.* 6: 446-451.

Paulsen, I.T., Skurray, R.A., Tam, R., Saier, M.H., Jr., Turner, R.J., Weiner, J.H., Goldberg, E.B. y Grinius, L.L. 1996. The SMR family: a novel family of multidrug efflux proteins involved with the efflux of lipophilic drugs. *Mol. Microbiol.* 19: 1167-1175.

Peet, R., Lindgren, P., Willis, D. y Panopoulos, N. 1986. Identification and cloning of genes involved in phaseolotoxin production by *Pseudomonas syringae* pv. "phaseolicola". *J. Bacteriol.* 166: 1096-1105.

Peng, W.T. y Nester, E.W. 2001. Characterization of a putative RND-type efflux system in *Agrobacterium tumefaciens*. *Gene* 270: 245-252.

Pereira, F.M.V., Milori, D.M.B.P., Pereira-Filho, E.R., Venâncio, A.L., Russo, M.d.S.T., Cardinali, M.C.d.B., Martins, P.K. y Freitas-Astúa, J. 2011. Laser-induced fluorescence imaging method to monitor citrus greening disease. *Comput. Electron. Agric.* 79: 90-93.

Pérez-Mendoza, D., Aragón, I.M., Prada-Ramírez, H.A., Romero-Jiménez, L., Ramos, C., Gallegos, M.T. y Sanjuán, J. 2014. Responses to Elevated c-di-GMP Levels in Mutualistic and Pathogenic Plant-Interacting Bacteria. *PLoS One* 9: 1-13 .

Pérez-Mendoza, D., Coulthurst, S., Sanjuan, J. y Salmond, G. 2011. N-Acetylglucosamine-dependent biofilm formation in *Pectobacterium atrosepticum* is cryptic and activated by elevated c-di-GMP levels. *Microbiology* 157: 3340-3348.

Petnicki-Ocwieja, T., Schneider, D.J., Tam, V.C., Chancey, S.T., Shan, L., Jamir, Y., Schechter, L.M., Janes, M.D., Buell, C.R., Tang, X., Collmer, A. y Alfano, J.R. 2002. Genomewide identification of proteins secreted by the Hrp type III protein secretion system of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 7652-7657.

Pfündel, E. 1998. Estimating the contribution of photosystem I to total leaf chlorophyll fluorescence. *Photosynth. Res.* 56: 185-195.

Piddock, L.J. 2006. Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 4: 629-636.

Pineda, M., 2007. Técnicas de imagen y proteómicas aplicadas al seguimiento de la interacción virus-planta-huésped. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. Granada, España..

Pineda, M., Gaspar, L., Morales, F., Szigeti, Z. y Baron, M. 2008. Multicolor fluorescence imaging of leaves--a useful tool for visualizing systemic viral infections in plants. *Photochem. Photobiol.* 84: 1048-1060.

- Poiatti, V.A., Dalmas, F.R. y Astarita, L.V. 2009. Defense mechanisms of *Solanum tuberosum* L. in response to attack by plant-pathogenic bacteria. *Biol. Res.* 42: 205-215.
- Poole, K. 2001. Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3: 255-264.
- Poole, K. 2003. Overcoming multidrug resistance in gram-negative bacteria. *Curr. Opin. Investig. Drugs.* 4: 128-139.
- Poole, K. 2004. Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin. Microbiol. Infect.* 10: 12-26.
- Poole, K. 2007. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Ann. Med.* 39: 162-176.
- Poole, K. 2008. Bacterial multidrug efflux pumps serve other functions. *Microbe.* 3: 179-185.
- Poole, K., Krebs, K., McNally, C. y Neshat, S. 1993. Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. *J. Bacteriol.* 175: 7363-7372.
- Poole, K. y Srikumar, R. 2001. Multidrug efflux in *Pseudomonas aeruginosa*: components, mechanisms and clinical significance. *Curr. Top. Med. Chem.* 1: 59-71.
- Poole, K., Tetro, K., Zhao, Q., Neshat, S., Heinrichs, D.E. y Bianco, N. 1996. Expression of the multidrug resistance operon *mexA-mexB-oprM* in *Pseudomonas aeruginosa*: *mexR* encodes a regulator of operon expression. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 2021-2028.
- Preiter, K., Brooks, D.M., Peñaloza-Vázquez, A., Sreedharan, A., Bender, C.L. y Kunkel, B.N. 2005. Novel virulence gene of *Pseudomonas syringae* pv. tomato strain DC3000. *J. Bacteriol.* 187: 7805-7814.
- Prentki, P. y Krisch, H.M. 1984. In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene* 29: 303-313.
- Preston, G., Deng, W., Huang, H. y Collmer, A. 1998. Negative regulation of *hrp* genes in *Pseudomonas syringae* by HrpV. *J. Bacteriol.* 180: 4532-4537.
- Preston, G.M. 2000. *Pseudomonas syringae* pv. tomato: the right pathogen, of the right plant, at the right time. *Mol. Plant Pathol.* 1: 263-275.
- Putman, M., van, V.H. y Konings, W. 2000. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 672-693.
- Putnoky, P., Kiss, G.B., Ott, I. y Kondorosi, A. 1983. *Tn5* carries a streptomycin resistance determinant downstream from the kanamycin resistance gene. *Mol. Gen. Genet.* 191: 288-294.
- Py, B., Loiseau, L. y Barras, F. 2001. An inner membrane platform in the type II secretion machinery of Gram-negative bacteria. *EMBO Rep.* 2: 244-248.
- Quiñones, B., Dulla, G. y Lindow, S.E. 2005. Quorum sensing regulates exopolysaccharide production, motility, and virulence in *Pseudomonas syringae*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 18: 682-693.
- Rahme, L., Mindrinos, M. y Panopoulos, N. 1992. Plant and environmental sensory signals control the expression of *hrp* genes in *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. *J. Bacteriol.* 174: 3499-3507.
- Ramos, A.R., Morello, J.E., Ravindran, S., Deng, W.-L., Huang, H.-C. y Collmer, A. 2007. Identification of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 type III secretion system Hrp proteins that can travel the type III pathway and contribute to the translocation of effector proteins into plant cells. *J. Bacteriol.* 189: 5773-5778.

- Ramos, C., Matas, I.M., Bardaji, L., Aragón, I.M. y Murillo, J. 2012. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*: some like it knot. *Mol. Plant Pathol.* 13: 998-1009.
- Ramos, J.L., Duque, E., Godoy, P. y Segura, A. 1998. Efflux pumps involved in toluene tolerance in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *J. Bacteriol.* 180: 3323-3329.
- Ramos, J.L., Duque, E., Gallegos, M.T., Godoy, P., Ramos-González, M.I., Rojas, A., Terán, W. y Segura, A. 2002. Mechanisms of solvent tolerance in gram-negative bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 56: 743-768.
- Ramos, J.L., Martínez-Bueno, M., Molina-Henares, A.J., Terán, W., Watanabe, K., Zhang, X., Gallegos, M.T., Brennan, R. y Tobes, R. 2005. The TetR family of transcriptional repressors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69: 326-356.
- Ravirala, R.S., Barabote, R.D., Wheeler, D.M., Reverchon, S., Tatum, O., Malouf, J., Liu, H., Pritchard, L., Hedley, P.E., Birch, P.R., Toth, I.K., Payton, P. y San Francisco, M.J. 2007. Efflux pump gene expression in *Erwinia chrysanthemi* is induced by exposure to phenolic acids. *Mol. Plant Microbe Interact.* 20: 313-320.
- Ren, Q., Kang, K. y Paulsen, I. 2004. TransportDB: a relational database of cellular membrane transport systems. *Nucleic Acids Res.* 32: 284-288.
- Rico, A., López, R., Asensio, C., Aizpun, M.T, Asencio, M.C. y Murillo, J. 2003. Non-toxicogenic strains of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* are a main cause of halo blight of beans in Spain and escape current detection methods. *Phytopathology* 93: 1553-1559.
- Rico, A. y Preston, G.M. 2008. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 uses constitutive and apoplast-induced nutrient assimilation pathways to catabolize nutrients that are abundant in the tomato apoplast. *Mol. Plant Microbe Interact.* 21: 269-282.
- Robertson, E.J., Wolf, J.M. y Casadevall, A. 2012. EDTA inhibits biofilm formation, extracellular vesicular secretion, and shedding of the capsular polysaccharide glucuronoxylomannan by *Cryptococcus neoformans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78: 7977-7984.
- Rodríguez-Moreno, L., Pineda, M., Soukupova, J., Macho, A.P., Beuzón, C.R., Barón, M. y Ramos, C. 2008. Early detection of bean infection by *Pseudomonas syringae* in asymptomatic leaf areas using chlorophyll fluorescence imaging. *Photosynth. Res.* 96: 27-35.
- Roh, E., Heu, S. y Moon, E. 2008. Genus-specific distribution and pathovar-specific variation of the glycinecin R gene homologs in *Xanthomonas* genomes. *J. Microbiol.* 46: 681-686.
- Roine, E., Wei, W., Yuan, J., Nurmiäho-Lassila, E.L., Kalkkinen, N., Romantschuk, M. y He, S.Y. 1997. Hrp pilus: an hrp-dependent bacterial surface appendage produced by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 3459-3464.
- Roine, E., Raineri, D.M., Romantschuk, M., Wilson, M. y Nunn, D.N. 1998. Characterization of type IV pilus genes in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Mol. Plant Microbe Interact.* 11: 1048-1056.
- Romano, C., Hein, M. y Klee, H. 1991. Inactivation of auxin in tobacco transformed with the indoleacetic acid-lysine synthetase gene of *Pseudomonas savastanoi*. *Genes Dev.* 5: 438-446.
- Romantschuk, M., Nurmiäho-Lassila, E.-L., Roine, E. y Suoniemi, A. 1993. Pilus-mediated adsorption of *Pseudomonas syringae* to the surface of host and non-host plant leaves. *J. Gen. Microbiol.* 139: 2251-2260.
- Römling, U., Gomelsky, M. y Galperin, M.Y. 2005. C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signalling system. *Mol. Microbiol.* 57: 629-639.
- Rost, F.W., 1995. *Fluorescence microscopy*. Cambridge University Press (ed.), New York, pp. 473.
- Russell, A. 2000. Do biocides select for antibiotic resistance? *J. Pharm. Pharmacol.* 52: 227-233.

- Ryder, C., Byrd, M. y Wozniak, D.J. 2007. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Curr. Opin. Microbiol.* 10: 644-648.
- Saier, M.H., Jr., Tran, C.V. y Barabote, R.D. 2006. TCDB: the transporter classification database for membrane transport protein analyses and information. *Nucleic Acids Res.* 34: 181-186.
- Sajjani, C., 2005. Infecciones virales como factor de estrés en fotosíntesis. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. Granada, España.
- Sajjani, C., Pérez-Bueno, M.L., Pineda, M., García-Luque, I., Nedbal, L., Benedikty, M., Roncel, M., Ortega, J.M., Ducruet, J.M., Romer, S. y Barón, M., 2005. The chloroplast as target of biotic stress: damage and defence during viral pathogenesis, in: *Photosynthesis: Fundamental aspects to global perspective*. van der Est, A. y Bruce, D. (eds.). ACG Publishing, Lawrence, KS.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T., 1989. *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sarkar, S.F. y Guttman, D.S. 2004. Evolution of the core genome of *Pseudomonas syringae*, a highly clonal, endemic plant pathogen. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 1999-2012.
- Sato, Z., Koiso, Y., Iwasaki, S., Matsuda, I. y Shirata, A. 1989. Toxins produced by *Pseudomonas glumae*. *Ann. Phytopat. Soc. Japan.* 55: 353-356.
- Sauvage, E., Kerff, F., Terrak, M., Ayala, J.A. y Charlier, P. 2008. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol. Rev.* 32: 234-258.
- Scharte, J., Schon, H. y Weiss, E. 2005. Photosynthesis and carbohydrate metabolism in tobacco leaves during an incompatible interaction with *Phytophthora nicotianae*. *Plant Cell Environ.* 28: 1421-1435.
- Scholz, O., Kostner, M., Reich, M., Gastiger, S. y Hillen, W. 2003. Teaching TetR to recognize a new inducer. *J. Mol. Biol.* 329: 217-227.
- Schreiber, L., Krimm, U., Knoll, D., Sayed, M., Auling, G. y Kroppenstedt, R. 2005. Plant-microbe interactions: identification of epiphytic bacteria and their ability to alter leaf surface permeability. *New Phytol.* 166: 589-594.
- Schuerger, A.C., Capelle, G.A., Di Benedetto, J.A., Mao, C., Thai, C.N., Evans, M.D., Richards, J.T., Blank, T.A. y Stryjewski, E.C. 2003. Comparison of two hyperspectral imaging and two laser-induced fluorescence instruments for the detection of zinc stress and chlorophyll concentration in bahia grass (*Paspalum notatum* Flugge). *Remote Sens. Environ.* 84: 572-588.
- Schumacher, M., Miller, M., Grkovic, S., Brown, M., Skurray, R. y Brennan, R. 2001. Structural mechanisms of QacR induction and multidrug recognition. *Science* 294: 2158-2163.
- Schweiger, J., Lang, M. y Lichtenthaler, H.K. 1996. Differences in fluorescence excitation spectra of leaves between stressed and non-stressed plants. *J. Plant Physiol.* 148: 536-547.
- Seeger, M.A., Diederichs, K., Eicher, T., Brandstatter, L., Schiefner, A., Verrey, F. y Pos, K.M. 2008. The AcrB efflux pump: conformational cycling and peristalsis lead to multidrug resistance. *Curr. Drug Targets.* 9: 729-749.
- Shimizu, T.S., Aksenov, S.V. y Bray, D. 2003. A spatially extended stochastic model of the bacterial chemotaxis signalling pathway. *J. Mol. Biol.* 329: 291-309.
- Shiomi, N., Fukuda, H., Fukuda, Y., Murata, K. y Kimura, A. 1991. Nucleotide sequence and characterization of a Gene conferring resistance to ethionine in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ferment. Bioengin.* 71: 211-215.

- Silby, M.W., Winstanley, C., Godfrey, S.A., Levy, S.B. y Jackson, R.W. 2011. *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS Microbiol. Rev.* 35: 652-680.
- Simon, R. 1984. High frequency mobilization of gram-negative bacterial replicons by the *in vitro* constructed *Tn5*-Mob transposon. *Mol. Gen. Genet.* 196: 413-420.
- Sisto, A., Cipriani, M.G., Morea, M., Lonigro, S.L., Valerio, F. y Lavermicocca, P. 2010. An Rhs-like genetic element is involved in bacteriocin production by *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 98: 505-517.
- Slater, H., Crow, M., Everson, L. y Salmond, G. 2003. Phosphate availability regulates biosynthesis of two antibiotics, prodigiosin and carbapenem, in *Serratia* via both quorum-sensing-dependent and -independent pathways. *Mol. Microbiol.* 47: 303-320.
- Slimestad, R., Fossen, T. y Verheul, M.J. 2008. The flavonoids of tomatoes. *J. Agric. Food Chem.* 56: 2436-2441.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J. y Remans, R. 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol. Rev.* 31: 425-448.
- Stafford, H.A. 1994. Anthocyanins and betalains: evolution of the mutually exclusive pathways. *Plant Sci.* 101: 91-98.
- Stanley, P., Packman, L.C., Koronakis, V. y Hughes, C. 1994. Fatty acylation of two internal lysine residues required for the toxic activity of *Escherichia coli* hemolysin. *Science* 266: 1992-1996.
- Starkey, M., Hickman, J.H., Ma, L., Zhang, N., De Long, S., Hinz, A., Palacios, S., Manoil, C., Kirisits, M.J., Starner, T.D., Wozniak, D.J., Harwood, C.S. y Parsek, M.R. 2009. *Pseudomonas aeruginosa* rugose small-colony variants have adaptations that likely promote persistence in the cystic fibrosis lung. *J. Bacteriol.* 191: 3492-3503.
- Stavri, M., Piddock, L.J.V. y Gibbons, S. 2007. Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. *J. Antimicrob. Chemother.* 59: 1247-1260.
- Steiner, S., Lori, C., Boehm, A. y Jenal, U. 2013. Allosteric activation of exopolysaccharide synthesis through cyclic di-GMP stimulated protein-protein interaction. *EMBO J.* 32: 354-368.
- Stober, F. y Lichtenthaler, H.K. 1992. Changes of the laser-induced blue, green and red fluorescence signatures during greening of etiolated leaves of wheat. *J. Plant Physiol.* 140: 673-680.
- Stober, F. y Lichtenthaler, H.K. 1993a. Characterization of the laser-induced blue, green and red fluorescence signatures of leaves of wheat and soybean grown under different irradiance. *Physiol. Plant.* 88: 696-704.
- Stober, F. y Lichtenthaler, H.K. 1993b. Studies on the localization and spectral characteristics of the fluorescence emission of differently pigmented wheat leaves. *Bot. Acta* 106: 365-370.
- Stoitsova, S.O., Braun, Y., Ullrich, M.S. y Weingart, H. 2008. Characterization of the RND-type multidrug efflux pump MexAB-OprM of the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 3387-3393.
- Strack, D., Heilemann, J., Mömken, M. y Wray, V. 1988. Cell wall-conjugated phenolics from coniferae leaves. *Phytochemistry* 27: 3517-3521.
- Su, X., Chen, J., Mizushima, T., Kuroda, T. y Tsuchiya, T. 2005. AbeM, an H<sup>+</sup>-coupled *Acinetobacter baumannii* multidrug efflux pump belonging to the MATE family of transporters. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 4362-4364.
- Sudo, R., Chung, S., Zervantonakis, I.K., Vickerman, V., Toshimitsu, Y., Griffith, L.G. y Kamm, R.D. 2009. Transport-mediated angiogenesis in 3D epithelial coculture. *FASEB J.* 23: 2155-2164.

- Sundin, G.W. y Murillo, J. 1999. Functional analysis of the *Pseudomonas syringae* *ruAB* determinant in tolerance to ultraviolet B (290–320 nm) radiation and distribution of *ruAB* among *P. syringae* pathovars. *Environ. Microbiol.* 1: 75-87.
- Suoniemi, A., Björklöf, K., Haahtela, K. y Romantschuk, M. 1995. Pili of *Pseudomonas syringae* pathovar *syringae* enhance initiation of bacterial epiphytic colonization of bean. *Microbiology* 141: 497-503.
- Swarbrick, P.J., Schulze-Lefert, P. y Scholes, J.D. 2006. Metabolic consequences of susceptibility and resistance (race-specific and broad-spectrum) in barley leaves challenged with powdery mildew. *Plant Cell Environ.* 29: 1061-1076.
- Szigeti, Z. 2008. Physiological status of cultivated plants characterised by multi-wavelength fluorescence imaging. *Acta Agron. Hung.* 56: 223-234.
- Szigeti, Z., Almási, A. y Sarvari, E. 2002. Changes in the photosynthetic functions in leaves of Chinese cabbage infected with turnip yellow mosaic virus. *Acta Biol. Szegediensis* 46: 137-138.
- Tafur, J.D., Torres, J.A. y Villegas, M.V. 2008. Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram-negativas. *Infectio* 12: 227-232.
- Tagliabue, L., Antoniani, D., Maciag, A., Bocci, P., Raffaelli, N. y Landini, P. 2010. The diguanylate cyclase YddV controls production of the exopolysaccharide poly-N-acetylglucosamine (PNAG) through regulation of the PNAG biosynthetic *pgaABCD* operon. *Microbiology* 156: 2901-2911.
- Taguchi, F. y Ichinose, Y. 2011. Role of type IV pili in virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 6605: correlation of motility, multidrug resistance, and HR-inducing activity on a nonhost plant. *Mol. Plant Microbe Interact.* 24: 1001-1011.
- Tampakaki, A., Skandalis, N., Gazi, A., Bastaki, M., Sarris, P., Charova, S., Kokkinidis, M. y Panopoulos, N. 2010. Playing the "Harp": evolution of our understanding of *hrp/hrc* genes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48: 347-370.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. y Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596-1599.
- Tanaka, Y., Hipolito, C., Maturana, A., Ito, K., Kuroda, T., Higuchi, T., Katoh, T., Kato, H., Hattori, M., Kumazaki, K., Tsukazaki, T., Ishitani, R., Suga, H. y Nureki, O. 2013. Structural basis for the drug extrusion mechanism by a MATE multidrug transporter. *Nature* 496:247-251.
- Tang, X., Xiao, Y. y Zhou, J. 2006. Regulation of the type III secretion system in phytopathogenic bacteria. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19: 1159-1166.
- Taylor, D.L., Bina, X.R. y Bina, J.E. 2012. *Vibrio cholerae* *vexH* encodes a multiple drug efflux pump that contributes to the production of cholera toxin and the toxin co-regulated pilus. *PLoS One* 7: 1-9.
- Taylor, J.D., Teverson, D.M., Allen, D.J. y Pastor-Corrales, M.A. 1996. Identification and origin of races of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* from Africa and other bean growing areas. *Plant Pathol.* 45: 469-478.
- Teather, R.M. y Wood, P.J. 1982. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 777-780.
- Tegos, G., Stermitz, F.R., Lomovskaya, O. y Lewis, K. 2002. Multidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 3133-3141.
- Terán, W., Felipe, A., Segura, A., Rojas, A., Ramos, J.L. y Gallegos, M.T. 2003. Antibiotic-dependent induction of *Pseudomonas putida* DOT-T1E TtgABC efflux pump is mediated by the drug binding repressor TtgR. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 3067-3072.

- Terán, W., Krell, T., Ramos, J.L. y Gallegos, M.T. 2006. Effector-repressor interactions, binding of a single effector molecule to the operator-bound TtgR homodimer mediates derepression. *J. Biol. Chem.* 281: 7102-7109.
- Thilmony, R., Underwood, W. y He, S. 2006. Genome-wide transcriptional analysis of the *Arabidopsis thaliana* interaction with the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 and the human pathogen *Escherichia coli* O157:H7. *Plant J.* 46: 34-53.
- Thimann, K.V. 1963. Plant growth substances: Past, present and future. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 14: 1-19.
- Thwaites, R., Spanu, P., Panopoulos, N., Stevens, C. y Mansfield, J. 2004. Transcriptional regulation of components of the type III secretion system and effectors in *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. *Mol. Plant Microbe Interact.* 17: 1250-1258.
- Tikhonova, E.B. y Zgurskaya, H.I. 2004. AcrA, AcrB, and TolC of *Escherichia coli* form a stable intermembrane multidrug efflux complex. *J. Biol. Chem.* 279: 32116-32124.
- Toutain, C.M., Zegans, M.E. y O'Toole, G.A. 2005. Evidence for two flagellar stators and their role in the motility of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 187: 771-777.
- Touze, T., Eswaran, J., Bokma, E., Koronakis, E., Hughes, C. y Koronakis, V. 2004. Interactions underlying assembly of the *Escherichia coli* AcrAB-TolC multidrug efflux system. *Mol. Microbiol.* 53: 697-706.
- Treutter, D. 2005. Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis. *Plant Biol.* 7: 581-591.
- Truman, W., Zabala, M.T. y Grant, M. 2006. Type III effectors orchestrate a complex interplay between transcriptional networks to modify basal defence responses during pathogenesis and resistance. *Plant J.* 46: 14-33.
- Tseng, T.T., Gratwick, K.S., Kollman, J., Park, D., Nies, D.H., Goffeau, A. y Saier, M.H., Jr. 1999. The RND permease superfamily: an ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1: 107-125.
- Tsiamis, G., Mansfield, J.W., Hockenhull, R., Jackson, R.W., Sesma, A., Athanassopoulos, E., Bennett, M.A., Stevens, C., Vivian, A., Taylor, J.D. y Murillo, J. 2000. Cultivar-specific avirulence and virulence functions assigned to *avrPphF* in *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola, the cause of bean halo-blight disease. *EMBO J.* 19: 3204-3214.
- Tsilibaris, V., Maenhaut-Michel, G. y Van, M.L. 2006. Biological roles of the Lon ATP-dependent protease. *Res. Microbiol.* 157: 701-713.
- Ullrich, M., Peñaloza-Vázquez, A., Bailey, A.M. y Bender, C.L. 1995. A modified two-component regulatory system is involved in temperature-dependent biosynthesis of the *Pseudomonas syringae* phytotoxin coronatine. *J. Bacteriol.* 177: 6160-6169.
- Underwood, W., Melotto, M. y He, S. 2007. Role of plant stomata in bacterial invasion. *Cell Microbiol.* 9: 1621-1629.
- Vaccaro, L., Koronakis, V. y Sansom, M. 2006. Flexibility in a drug transport accessory protein: molecular dynamics simulations of MexA. *Biophys. J.* 91: 558-564.
- VanDyK, T.K., Templeton, L., Cantera, K., Sharpe, P. y Sariaslani, F. 2004. Characterization of the *Escherichia coli* AaeAB efflux pump: a metabolic relief valve? *J. Bacteriol.* 186: 7196-7204.
- VanEtten, H., Temporini, E. y Wasmann, C. 2001. Phytoalexin (and phytoanticipin) tolerance as a virulence trait: why is it not required by all pathogens? *Physiol. Molec. Plant Pathol.* 59: 83-93.

- Van Veen, H.W., Higgins, C.F. y Konings, W.N. 2001. Molecular basis of multidrug transport by ATP-binding cassette transporters: a proposed two-cylinder engine model. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3: 185-192.
- Vargas, P., Felipe, A., Michan, C. y Gallegos, M.T. 2011. Induction of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 MexAB-OprM multidrug efflux pump by flavonoids is mediated by the repressor PmeR. *Mol. Plant Microbe Interact.* 24: 1207-1219.
- Vargas, P. 2013. Estudio de la respuesta de *Pseudomonas syringae* pv tomato DC3000 a flavonoides. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. Granada, España.
- Vargas, P., Farias, G.A., Nogales, J., Prada, H., Carvajal, V., Barón, M., Rivilla, R., Martín, M., Olmedilla, A. y Gallegos, M.T. 2013. Plant flavonoids target *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 flagella and type III secretion system. *Environ. Microbiol. Rep.* 5: 841-850.
- Vikram, A., Jesudhasan, P.R., Jayaprakasha, G., Pillai, S.D., Jayaraman, A. y Patil, B.S. 2011. Citrus flavonoid represses *Salmonella* pathogenicity island 1 and motility in *S. typhimurium* LT2. *Int. J. Food Microbiol.* 145: 28-36.
- Vila, J. y Martínez, J. 2008. Clinical impact of the over-expression of efflux pump in nonfermentative Gram-negative bacilli, development of efflux pump inhibitors. *Curr. Drug Targets.* 9: 797-807.
- Vogelmann, T., 1994. Light within the plant, in: *Photomorphogenesis in Plants*. Kendrick, R.E. y Kronenberg, G.H.M. (eds.), pp. 491-535. Springer Netherlands
- Vogelmann, T.C. 1993. Plant tissue optics. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* 44: 231-251.
- Vorholt, J.A. 2012. Microbial life in the phyllosphere. *Nat. Rev. Microbiol.* 10: 828-840.
- Wallace, A.J., Stillman, T.J., Atkins, A., Jamieson, S.J., Bullough, P.A., Green, J. y Artymiuk, P.J. 2000. *E. coli* hemolysin E (HlyE, ClyA, SheA): X-ray crystal structure of the toxin and observation of membrane pores by electron microscopy. *Cell* 100: 265-276.
- Walsh, C. 2000. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature.* 406: 775-781.
- Waterfield, N.R., Bowen, D.J., Fetherston, J.D. y Perry, R.D. 2001. The *tc* genes of *Photobacterium*: a growing family. *Trends Microbiol.* 9: 185-191.
- Webber, M., Bailey, A., Blair, J., Morgan, E., Stevens, M., Hinton, J., Ivens, A., Wain, J. y Piddock, L. 2009. The global consequence of disruption of the AcrAB-TolC efflux pump in *Salmonella enterica* includes reduced expression of SPI-1 and other attributes required to infect the host. *J. Bacteriol.*: 4276-4285.
- Wei, C., Deng, W. y Huang, H. 2005. A chaperone-like HrpG protein acts as a suppressor of HrpV in regulation of the *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* type III secretion system. *Mol. Microbiol.* 57: 520-536.
- Wei, C.F., Kvitko, B.H., Shimizu, R., Crabill, E., Alfano, J.R., Lin, N.C., Martin, G.B., Huang, H.C. y Collmer, A. 2007. A *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 mutant lacking the type III effector HopQ1-1 is able to cause disease in the model plant *Nicotiana benthamiana*. *Plant J.* 51: 32-46.
- Wei, W., Plovanich-Jones, A., Deng, W.L., Jin, Q.L., Collmer, A., Huang, H.C. y He, S.Y. 2000. The gene coding for the Hrp pilus structural protein is required for type III secretion of Hrp and Avr proteins in *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 2247-2252.
- Wendler, J., Haehnel, W. y Holzwarth, A.R., 1984. Time-resolved picosecond fluorescence spectra of the antenna chlorophylls in the green alga *Chlorella vulgaris*, in: *Ultrafast Phenomena IV*. Auston, D. and Eisenthal, K. (eds.). pp. 503-505. Springer Berlin Heidelberg.

Wilkes, T., Darby, A., Choi, J., Colbourne, J., Werren, J. y Hurst, G. 2010. The draft genome sequence of *Arsenophonus nasoniae*, son-killer bacterium of *Nasonia vitripennis*, reveals genes associated with virulence and symbiosis. *Insect. Mol. Biol.* 1: 59-73.

Wong, K., Ma, J., Rothnie, A., Biggin, P.C. y Kerr, I.D. 2014. Towards understanding promiscuity in multidrug efflux pumps. *Trends Biochem. Sci.* 39: 8-16.

Wood, D., Setubal, J., Kaul, R., Monks, D., Kitajima, J., Okura, V., Zhou, Y., Chen, L., Wood, G., Almeida, N., Jr., Woo, L., Chen, Y., Paulsen, I., Eisen, J., Karp, P., Bovee, D., Sr., Chapman, P., Clendenning, J., Deatherage, G., Gillet, W., Grant, C., Kutayavin, T., Levy, R., Li, M., McClelland, E., Palmieri, A., Raymond, C., Rouse, G., Saenphimmachak, C., Wu, Z., Romero, P., Gordon, D., Zhang, S., Yoo, H., Tao, Y., Biddle, P., Jung, M., Krespan, W., Perry, M., Gordon-Kamm, B., Liao, L., Kim, S., Hendrick, C., Zhao, Z., Dolan, M., Chumley, F., Tingey, S., Tomb, J., Gordon, M., Olson, M. y Nester, E. 2001. The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science* 294: 2317-2323.

Wulf, J.S., Herppich, W.B., Geyer, M. y Zude, M. 2003. Laser-induced fluorescence spectroscopy (LIFS) - a non-destructive method to detect tissue browning. *Acta Hort.* 1-2: 653-658.

Xiao, Y., Heu, S., Yi, J., Lu, Y. y Hutcheson, S. 1994. Identification of a putative alternate sigma factor and characterization of a multicomponent regulatory cascade controlling the expression of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Pss61 hrp and hrmA genes. *J. Bacteriol.* 176: 1025-1036.

Xiao, Y. y Hutcheson, S.W. 1994. A single promoter sequence recognized by a newly identified alternate sigma factor directs expression of pathogenicity and host range determinants in *Pseudomonas syringae*. *J. Bacteriol.* 176: 3089-3091.

Xiao, Y., Lu, Y., Heu, S. y Hutcheson, S. 1992. Organization and environmental regulation of the *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 hrp cluster. *J. Bacteriol.* 174: 1734-1741.

Xin, X.F. y He, S.Y. 2013. *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000: a model pathogen for probing disease susceptibility and hormone signaling in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 51: 473-498.

Yang, S., Lopez, C.R. y Zechiedrich, E.L. 2006. Quorum sensing and multidrug transporters in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 2386-2391.

Yanisch-Perron, C., Vieira, J. y Messing, J. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mpl8 and pUC19 vectors. *Gene* 33: 103-119.

Yazaki, K. 2005. Transporters of secondary metabolites. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8: 301-307.

Young, J.M., Dye, D.W., Bradbury, J.F., Panagopoulos, C.G. y Robbs, C.F. 1978. A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. *N. Z. J. Agric. Res.* 21: 153-177.

Yu, E.W., Aires, J.R. y Nikaido, H. 2003. AcrB multidrug efflux pump of *Escherichia coli*: composite substrate-binding cavity of exceptional flexibility generates its extremely wide substrate specificity. *J. Bacteriol.* 185: 5657-5664.

Yu, J., Penaloza-Vazquez, A., Chakrabarty, A.M. y Bender, C.L. 1999. Involvement of the exopolysaccharide alginate in the virulence and epiphytic fitness of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Mol. Microbiol.* 33: 712-720.

Yu, Z., Reichheld, S., Savchenko, A., Parkinson, J. y Davidson, A. 2010. A comprehensive analysis of structural and sequence conservation in the TetR family transcriptional regulators. *J. Mol. Biol.* : 847-864.

Zgurskaya, H. y Nikaido, H. 1999. AcrA is a highly asymmetric protein capable of spanning the periplasm. *J. Mol. Biol.* 285: 409-420.

Zgurskaya, H.I. y Nikaido, H. 2000. Cross-Linked Complex between Oligomeric Periplasmic Lipoprotein AcrA and the Inner-Membrane-Associated Multidrug Efflux Pump AcrB from *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 182: 4264-4267.

Zhao, Y., Thilmony, R., Bender, C., Schaller, A., He, S. y Howe, G. 2003. Virulence systems of *Pseudomonas syringae* pv. tomato promote bacterial speck disease in tomato by targeting the jasmonate signaling pathway. Plant J. 36: 485-499.

Zhou, H., Lin, J., Johnson, A., Morgan, R., Zhong, W. y Ma, W. 2011. *Pseudomonas syringae* type III effector HopZ1 targets a host enzyme to suppress isoflavone biosynthesis and promote infection in soybean. Cell Host Microbe 9: 177-186.

Zipfel, W., Williams, R., Christie, R., Nikitin, A., Hyman, B. y Webb, W. 2003. Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 7075-7080.

Zude, M. 2006. Detection of fruit tissue browning using laser-induced fluorescence spectroscopy. Acta Hortic. 1-2: 85-90.

Zwiesler-Vollick, J., Plovianich-Jones, A., Nomura, K., Bandyopadhyay, S., Joardar, V., Kunkel, B. y He, S. 2002. Identification of novel hrp-regulated genes through functional genomic analysis of the *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 genome. Mol. Microbiol. 45: 1207-1218.



## APÉNDICE



# Plant flavonoids target *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 flagella and type III secretion system

Paola Vargas,<sup>1</sup> Gabriela A. Farias,<sup>1,2</sup>  
Joaquina Nogales,<sup>1</sup> Harold Prada,<sup>1</sup> Vivian Carvajal,<sup>1,2</sup>  
Matilde Barón,<sup>2</sup> Rafael Rivilla,<sup>3</sup> Marta Martín,<sup>3</sup>  
Adela Olmedilla<sup>2</sup> and María-Trinidad Gallegos<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Soil Microbiology and Symbiotic Systems, Estación Experimental del Zaidín (EEZ-CSIC), Granada, Spain.

<sup>2</sup>Department of Biochemistry, Cell and Molecular Biology of Plants, Estación Experimental del Zaidín (EEZ-CSIC), Granada, Spain.

<sup>3</sup>Department of Biology, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain.

## Summary

Flavonoids are among the most abundant plant secondary metabolites involved in plant protection against pathogens, but micro-organisms have developed resistance mechanisms to those compounds. We previously demonstrated that the MexAB-OprM efflux pump mediates resistance of *Pseudomonas syringae* pv. tomato (Pto) DC3000 to flavonoids, facilitating its survival and the colonization of the host. Here, we have shown that tomato plants respond to Pto infection producing flavonoids and other phenolic compounds. The effects of flavonoids on key traits of this model plant-pathogen bacterium have also been investigated observing that they reduce Pto swimming and swarming because of the loss of flagella, and also inhibited the expression and assembly of a functional type III secretion system. Those effects were more severe in a mutant lacking the MexAB-OprM pump. Our results suggest that flavonoids inhibit the function of the GacS/GacA two-component system, causing a depletion of *rsmY* RNA, therefore affecting the synthesis of two important virulence factors in Pto DC3000, flagella and the type III secretion system. These data provide new insights into the flavonoid role in the molecular dialog between host and pathogen.

## Introduction

*Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 (Pto DC3000) causes bacterial speck on tomato and *Arabidopsis*, and represents an important model in molecular plant pathology. Pto relies on the type III secretion system (T3SS) to deliver virulence or effector proteins into the plant cells by means of long *hrp* pili (Roine *et al.*, 1997; Brown *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2002). In *P. syringae*, T3SS genes are induced when the bacteria get into the leaf mesophyll through stomata, but can be also induced *in vitro* in a suitable minimal medium mimicking the host environment (Huynh *et al.*, 1989; Xiao and Hutcheson, 1994; Boureau *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2006). This regulation is under the control of HrpL, an alternate RNA-polymerase sigma factor, whose transcription is dependent on  $\sigma^{54}$  and HrpR and HrpS, enhancer-binding proteins of the NtrC family of regulatory proteins (Xiao *et al.*, 1994; Hendrickson *et al.*, 2000a,b; Hutcheson *et al.*, 2001). Once inside the plant cell, effectors promote pathogenesis by disrupting and suppressing host defence responses at multiple levels or they can be recognized by plant disease resistance proteins and trigger successful host immune response (Jones and Dangl, 2006).

Flagellar motility is considered an important fitness trait that enables bacteria to locate nutrients, access sites protected from environmental stresses, colonize plant tissues and subsequently disperse in the environment (Ottemann and Miller, 1997; Quiñones *et al.*, 2005; Melotto *et al.*, 2006). Therefore, motility favours bacterial epiphytic survival and entry into leaves but, on the other hand, flagellin, the major component of flagella filaments, is recognized by means of the FLS2 receptor-like kinase as a potent elicitor of the defence response in plants (Gómez-Gómez and Boller, 2000; 2002). In *Pseudomonas*, FleQ is a  $\sigma^{54}$ -dependent activator and the flagella master regulator that activates transcription of class II genes encoding components of the basal body, motor and export apparatus, as well as the regulatory proteins FleN and FleS/FleR. FleN negatively regulates the activity of FleQ through direct interactions to restrict flagellar assembly, and the two-component system (TCS) FleS/FleR is required for the expression of class III genes, which encode the remaining basal body components, hook and hook-associated proteins. Class IV genes are  $\sigma^{28}$  (FliA)-dependent and encode the flagellin, chemotaxis

Received 4 March, 2013; accepted 10 July, 2013. \*For correspondence. E-mail maritriini.gallegos@eez.csic.es; Tel. (+34) 958 181600 ext. 133; Fax (+34) 958 129600.

proteins and the anti- $\sigma^{28}$  factor FlgM (Dasgupta *et al.*, 2003).

Coordination of bacterial metabolic pathways with host physiological responses is also necessary for *P. syringae* growth within plant tissues, and the GacS/GacA TCS has a key role regulating processes like the production of quorum-sensing signals, phytotoxins, antibiotics, extracellular proteases or alginate, as well as swarming motility, biofilm formation, sensitivity to reactive oxygen intermediates, lesion and disease development (Lindeberg *et al.*, 2008; Kong *et al.*, 2012). In Pto DC3000, the GacS/GacA TCS is essential for the production of coronatine via the transcription factor SalA, and also has a positive effect on HrpL, controlling pathogenicity on tomato and hypersensitive response (HR) in non-host plants (Chatterjee *et al.*, 2003; 2007). In *P. fluorescens*, the GacS/GacA TCS is strictly required for the expression of three small RNAs, RsmX, RsmY and RsmZ, which exhibit high affinity for two small RNA-binding proteins, RsmA and RsmE, that affect the stability, turnover and/or translation rates of target mRNAs (Blumer *et al.*, 1999; Reimmann *et al.*, 2005; Valverde and Haas, 2008). Although the chain of command in the GacS/GacA cascade of *P. syringae* pathovars has not been identified conclusively, bioinformatic studies have revealed that strain DC3000 has seven GacA-controlled small RNAs (*rsmX1-5*, *rsmY*, *rsmZ*) and four RsmA-like RNA-binding proteins (Heeb *et al.*, 2006; Kulkarni *et al.*, 2006; Moll *et al.*, 2010).

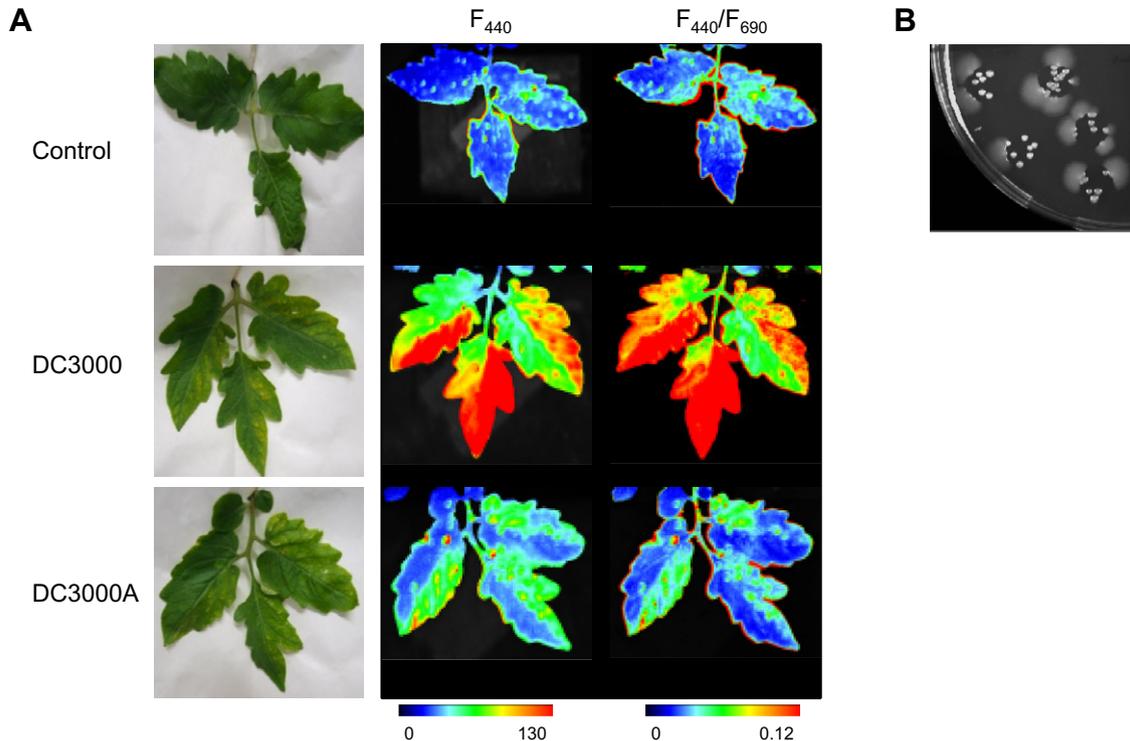
Plants produce a vast array of natural products, of which flavonoids, isoprenoids and alkaloids confer selective advantage against microbial attack. The antibacterial mechanisms of action of several flavonoids have been elucidated and shown to act directly on multiple cellular targets (reviewed by Cushnie and Lamb, 2005; 2011). Moreover, they exhibit synergistic and antibiotic resistance-modulating activity and attenuate bacterial pathogenicity by hindering several bacterial virulence factors, including quorum-sensing signal receptors, enzymes and toxins, which results in the inhibition of biofilm formation, of bacterial attachment to host, of virulence factor secretion and neutralization of cytotoxicity (Choi *et al.*, 2007; Delehanty *et al.*, 2007; Vandeputte *et al.*, 2010; 2011; Vikram *et al.*, 2010; 2011). In a previous work, it was demonstrated that different flavonoids exhibit antimicrobial activity against Pto DC3000, and the MexAB-OprM resistance-nodulation-cell division efflux pump mediates resistance to those plant secondary metabolites, conferring protection that facilitates the initial survival in the leaf surface, and subsequent colonization of the host and disease. It was also shown that some flavonoids, like phloretin and naringenin, are the best substrates of MexAB-OprM and the best inducers of its expression at transcriptional level (Stoitsova *et al.*, 2008;

Vargas *et al.*, 2011). While knowledge about the antibacterial action of several flavonoids is accumulating (Cushnie and Lamb, 2011), it is not well understood how bacteria sense these signals and transduce them to the regulatory networks controlling virulence. To investigate the physiological effects caused by different flavonoids on Pto DC3000, we took advantage of the DC3000A mutant constructed in our laboratory lacking the MexAB-OprM transporter (Vargas *et al.*, 2011). In particular, we have observed that different flavonoids reduce the expression of the T3SS and also inhibit Pto swimming and swarming motility by diminishing the expression of flagella, being those effects more drastic in the DC3000A mutant.

## Results and discussion

We have previously characterized the multidrug resistance (MDR) efflux pump MexAB-OprM of Pto DC3000 as a key mechanism of bacterial resistance to different flavonoids that facilitates survival and colonization of tomato plants (Vargas *et al.*, 2011). In order to detect differences between the host responses to the wild type strain and the mutant DC3000A, we used a multicolour fluorescence (MCF) imaging system. MCF induced by ultraviolet light can provide information about the primary and secondary metabolism of plants (phenolic and flavonoid compounds bound to the walls or found in the vacuoles of epidermal cells) during pathogenesis by monitoring signals of the red chlorophyll fluorescence and blue-green fluorescence (Pineda *et al.*, 2008).

Wild type and DC3000A mutant produced the characteristic symptoms in the host with initial chlorosis and subsequent tissue necrosis (Fig. 1A), but these symptoms were delayed in the case of DC3000A with respect to those induced by the wild type probably because of the lower population of the DC3000A mutant (Vargas *et al.*, 2011). Accordingly, plants inoculated with DC3000 exhibited greater  $F_{440}$  emission in inoculated areas from 2 dpi (not shown), and this became more evident at 9 dpi (Fig. 1A). The ratio between blue and red fluorescence ( $F_{440}/F_{690}$ ) has demonstrated to be an excellent plant stress indicator, particularly in plant-pathogen interactions (Buschmann *et al.*, 2000; Pineda *et al.*, 2008). The differences in the host response against DC3000 and the mutant were more evident in the  $F_{440}/F_{690}$  images, which are dominated by  $F_{440}$ , related to the activation of the secondary plant metabolism and the subsequent accumulation of fluorophores (Fig. 1A). Activation of secondary metabolism in the host by the pathogen invasion was greater in the case of the wild type, whereas the response to the DC3000A mutant was milder, possibly because it senses that the mutant population was lower. It is known that chalconaringenin is the major flavonoid in tomatoes, followed by rutin (a quercetin glycoside). Also, quercetin



**Fig. 1.** Host response to infection with *Pto* DC3000 and DC3000A.

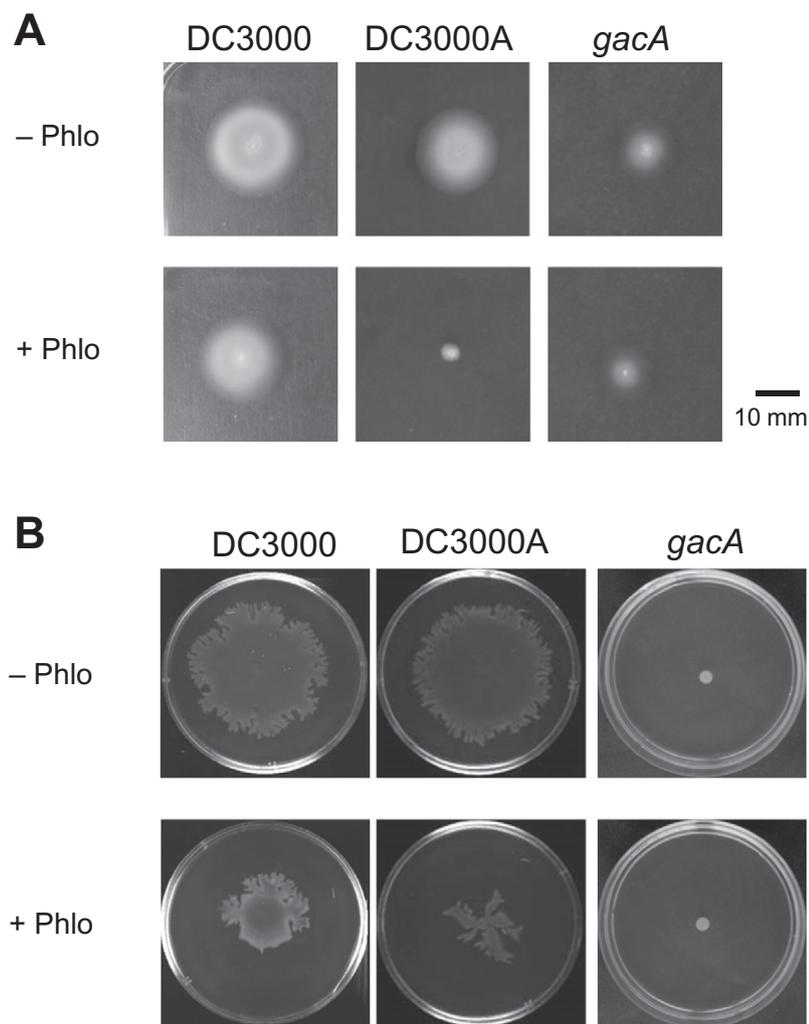
A. Leaves were infiltrated with  $\text{MgCl}_2$  (control plants), wild type (DC3000) and a mutant lacking the MexAB-OprM pump (DC3000A). On the left, symptoms induced in tomato leaves; centre, blue fluorescence images ( $F_{440}$ ) and right, blue/red fluorescence images ( $F_{440}/F_{690}$ ). Picture shows the fluorescence imaging measurements carried out in control and bacterial-challenged plants at 9 dpi (days post-infection). Three different experiments with four repetitions for every sample were made.

B. Effect of plant extract on motility. Bacteria were recovered from infected tomato leaves by homogenizing the tissue and serial dilutions were dropped on LB plates and incubated at  $25^\circ\text{C}$ . After 48 h, bacteria moved away of the drop in the lower dilution.

3-(2''-apiosyl-6''-rhamnosyl)glucoside) and phloretin 3',5'-di-C-glucoside are present at similar levels as rutin in some cultivars, whereas kaempferol 3-rutinoside is a more limited distributed flavonoid (Slimestad *et al.*, 2008). Furthermore, it was observed that high concentrations of amino acids, organic acids, rutin and phenylpropanoids were characteristic of *Pto*-infected tomato plants (López-Gresa *et al.*, 2010; 2011). Here, we show that tomato plants respond to *Pto* DC3000 infection by producing flavonoids and other phenolic compounds.

In our laboratory, to quantify bacterial populations in infected plants, we take leaf samples using a cork borer, homogenize the tissue by mechanical disruption and count colony forming units by drop-plating serial dilutions of bacterial suspensions on Luria broth (LB) agar. In the lower dilutions, we observed that bacteria moved only when they reached the edge of the drop (Fig. 1B), which suggests that some compounds present in the plant extract might be inhibiting bacterial motility. Because tomato plants respond to *Pto* DC3000 infection by producing flavonoids and their extracts appear to have an effect on motility, we decided to explore the action of various flavonoids on the physiology of *Pto* DC3000.

To investigate the effect of different flavonoids on *Pto* DC3000 motility, we carried out swimming and swarming assays. We observed that the swimming motility of *Pto* DC3000 was suppressed by sub-minimum inhibitory concentrations (MIC) of morin, naringenin, phloretin (flavonoids) and chloramphenicol (antibiotic), but not by phloridzin (phloretin 2'- $\beta$ -D-glucoside) (Figs 2A and S1A). Interestingly, it had been previously shown that those flavonoids were substrates of the MexAB-OprM efflux (Stoitsova *et al.*, 2008; Vargas *et al.*, 2011). To verify the flavonoid effect on motility, we compared the behaviour of the wild type strain with respect to the mutant DC3000A, both in the absence and in the presence of flavonoids. It was observed that the DC3000A mutant strain exhibited remarkably reduced swimming motility in the presence of certain MexAB-OprM substrates (not only the flavonoids phloretin, morin and naringenin, but also the antibiotic chloramphenicol, Figs 2A and S1A), and this motility was partially restored in the complemented strain (Fig. S1B). We also observed that, apart from phloretin, naringenin, morin or chloramphenicol, biocides like butylparaben and methylparaben reduced the swarming in the wild type strain and more drastically in the DC3000A mutant



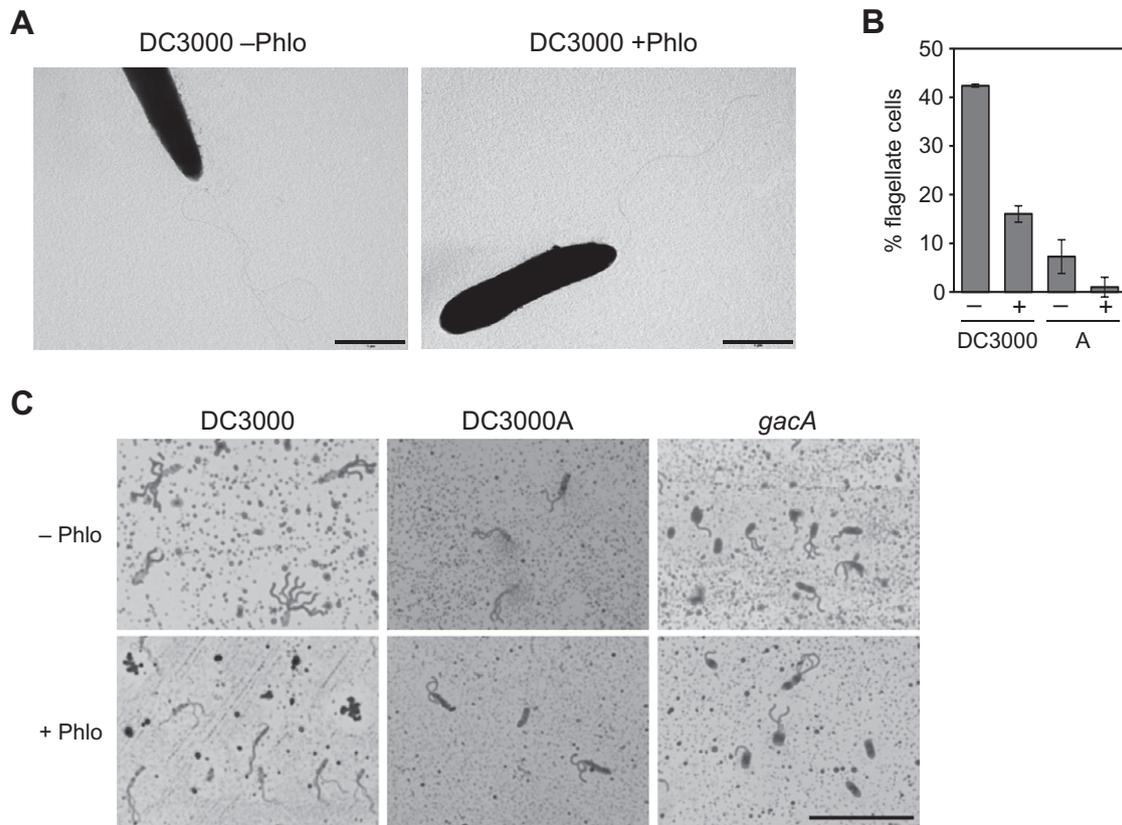
**Fig. 2.** Motility assays. Swimming (A) and swarming (B) assays were performed in the absence (- Phlo) and in the presence (+ Phlo) of 0.3 mM and 0.15 mM of phloretin, respectively, with the wild type and the indicated mutants. Pictures were taken 48 h (A) or 24 h (B) after inoculation. Three motility plates were used for each molecule, and the experiment was repeated with three independent cultures (a total of nine motility plates per molecule).

(Figs 2B and S2A), being partially restored in the complemented strain (Fig. S2B).

We have shown that the presence of flavonoids decreases swimming and swarming and that phloretin exhibited a much stronger inhibitory effect on the motility of Pto than the other flavonoids we used (Figs S1A and S2A). To assess whether phloretin diminished the production of flagella, we observed bacteria both non-treated and treated with phloretin after negative staining by transmission electron microscopy (TEM). Pto DC3000 grown in LB produced one to three polar flagella (Fig. 3A), as seen by Roine and colleagues (1997). Quantification of flagella number from TEM images showed that about 42% of the DC3000 cells bore one to three flagella, but, in the presence of phloretin, only 16% of the cells were flagellated (Fig. 3B). In the DC3000A mutant, the number of bacteria with flagella drastically decreased to less than 10%, even in the absence of phloretin, and almost 100% of the population analysed was aflagellate in the presence of phloretin (Fig. 3B). We also stained swarmer cells, but

because flagella observation by TEM was very difficult in this case, we carried out the Leifson flagella staining procedure for light microscopy as described in Clark (1976). We observed that Pto DC3000 produced two to five polar flagella (Fig. 3C), and no significant difference in the number of flagella was observed in DC3000 in the presence of phloretin, whereas the addition of phloretin to the DC3000A mutant caused a substantial decrease. Therefore, microscopy revealed the morphological consequences of flavonoid exposure, a reduction in the number of flagellate cells in liquid cultures and in the number of flagella in swarmer cells, which was more drastic in the mutant lacking the MexAB-OprM transporter that may accumulate flavonoids given its inability to eliminate them (Vargas *et al.*, 2011).

Because flagella observations suggested that the inhibiting effect of flavonoids may be due to the suppression of flagellin production, we analysed the expression of *fliC* by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (qRT-PCR) (Fig. 4A). To find out whether flavonoids



**Fig. 3.** Influence of flavonoids on flagella abundance.

A. TEM visualization of wild type strain grown in LB media. Scale bars represent 1  $\mu$ m.

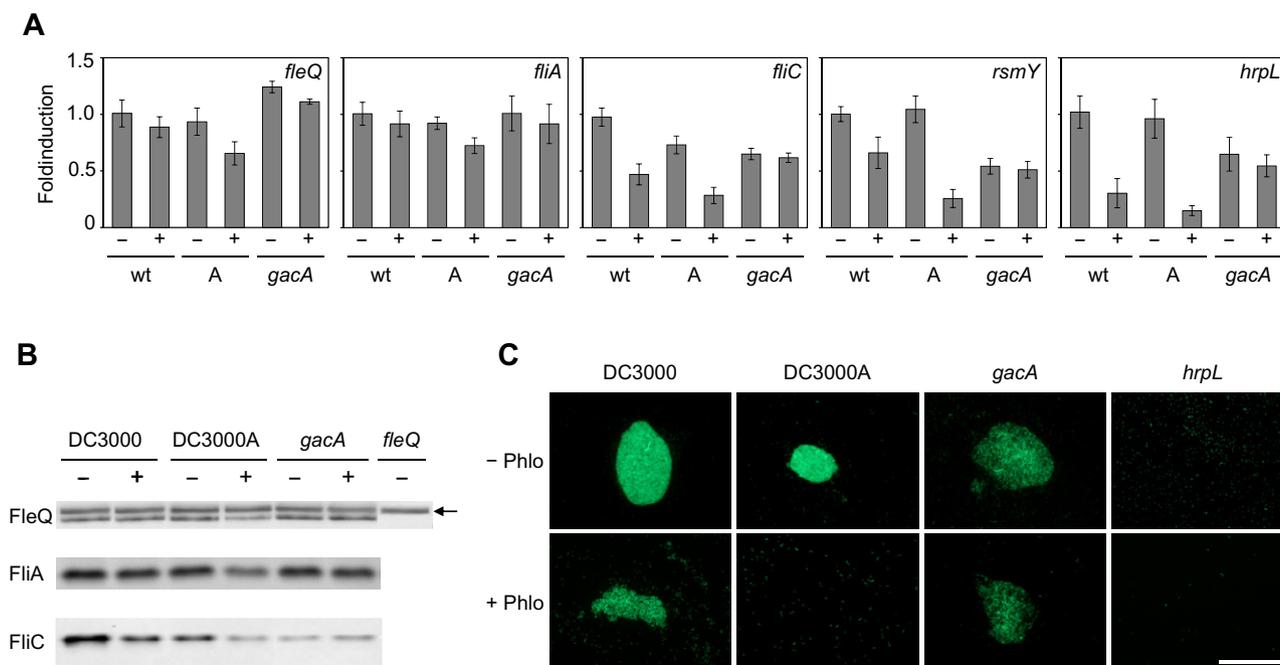
B. Quantification of flagella number from TEM images in cells grown in LB. The flagella (per cell) were counted in preparations of DC3000 and DC3000A. Values represent the percentage of flagellated bacteria of the total cells counted (approximately 200). Bacteria were grown in LB at 28°C in the absence (- Phlo) and in the presence of phloretin (+ Phlo, 0.3 mM for DC3000 and 0.05 mM for DC3000A).

C. Visualization of flagellar abundance in cells of DC3000, DC3000A and *gacA* from swarming plates. Light microphotographs of cells from PG-agar plates in the absence (- Phlo) or presence (+ Phlo, 0.3 mM) of phloretin stained with the Leifson method. Scale bar represents 5  $\mu$ m. All experiments were performed at least two times.

could exert the same effect on virulent bacteria, we mimicked the plant apoplastic conditions by using the T3SS-inducing minimal medium with fructose (MMF) (Huynh *et al.*, 1989; Rahme *et al.*, 1992). In *Pto* DC3000, 50% less *fliC* mRNA was detected when the medium was supplemented with phloretin in comparison with the unamended MMF. However, in DC3000A, the basal *fliC* mRNA levels were 25% lower than in the wild type and further diminished in the presence of phloretin (Fig. 4A). The results of the motility assays and the microscopy observations were in accordance. DC3000A moved slower than the wild type, and phloretin decreased the motility of both strains (Fig. 2A), which together with the fact that that DC3000A bore less flagella than the wild type strain and with phloretin both strains produced less flagella (Fig. 3), further proves the inhibitor effect of phloretin on the expression of *fliC* and corroborates qRT-PCR data.

To examine the effect of phloretin on flagellin production, we carried out immunoblots with total cell extracts.

The flagellin of *Pto* DC3000 was predicted to be 29 kDa in size; however, by using an anti-FliC antiserum, it appeared as a single band on membranes of approximately 33.5 kDa in apparent size, probably because of its glycosylation (Takeuchi *et al.*, 2003; Taguchi *et al.*, 2006). The production of flagellin in the wild type was maximal in the absence of phloretin and slightly diminished in the presence of this flavonoid (Fig. 4B). Smaller amounts of flagellin were produced by the DC3000A mutant in the absence of phloretin and further decreased in its presence (Fig. 4B). In summary, a good correlation exists among the observations of flagella at the microscopic level (Fig. 3), *fliC* expression and FliC production in the different strains and conditions (Fig. 4A and B). Curiously, in the DC3000A mutant, *fliC* expression was different than in the wild type because, even in the absence of phloretin but more in its presence, mRNA levels were clearly reduced (Fig. 4A). Concomitantly, flagellin and flagella production decreased in the mutant, both in the absence and (qRT-PCR) in the presence of phloretin (Figs 3 and



**Fig. 4.** Expression of flagellar genes and T3SS under *hrp*-inducing conditions.

Total RNAs and cells extracts were obtained from bacteria grown in LB medium to an  $OD_{660}$  of 0.5 and subsequently incubated in MMF for 3 h at 25°C in the absence (–) and in presence (+) of 0.15 mM of phloretin.

A. qRT-PCR expression values were normalized with the housekeeping gene *gyrA* and referred to the wild type condition without phloretin. The bars reflect the means and standard deviations of three experiments with three technical replicates each one.

B. Production of FleQ, FliA and FliC by DC3000, DC3000A and *gacA* mutants. Proteins were detected using anti-FleQ and FliA antibodies from *P. aeruginosa* (Jyot *et al.*, 2007) and an anti-FliC antibody from *P. fluorescens* (de Weger *et al.*, 1987). FleQ (pointed out with an arrow), FliA and FliC appeared on membranes bands of approximately 55, 29 and 33.5 kDa, respectively, in apparent size.

C. Autoagglutination assays. Agglutinates epifluorescence micrographs of different Pto DC3000 strains expressing GFP. Micrographs were obtained after 48 h of incubation in MMF medium in the absence (–) and in presence (+) of 0.15 mM of phloretin. Scale bar represents 100  $\mu$ m.

4). Probably some cellular metabolite(s) accumulate(s) in DC3000A causing the same effect as phloretin; therefore, we sought to find those MexAB-OprM efflux pump substrates by several approaches, but we have not succeeded identifying them.

We analysed the expression of representative genes of the Pto DC3000 flagellar cascade in different conditions with the aim of determining at which level phloretin was acting. The level of expression of *fleQ*, *fliA* (Fig. 4A), *rpoN* (Fig. S3), *fleS* and *flgF* (not shown) did not substantially change with phloretin in the wild type. However, *fliC* transcription was significantly reduced in the presence of phloretin (Fig. 4A), and the same outcome was observed at the protein level (Fig. 4B). In DC3000A, the genes differentially expressed were *fliC*, *fleQ* and *fliA* (Fig. 4A) because, in the presence of phloretin, *fleQ* and *fliA* mRNA were 20% reduced, and the amount of detected FleQ and FliA protein also diminished (Fig. 4A and B). Overall, phloretin caused a significant reduction of the sigma factor FliA protein levels in DC3000A, whereas those changes, if any, were more subtle in the wild type. Therefore, accumulation of flavonoids like phloretin in the efflux pump mutant reduces flagellin expression and flagella

production by decreasing the intracellular levels of FleQ and FliA. This would bring down the expression of genes dependent on FliA and, in agreement with that, we observed that the expression of *aer-2* and *cheA2*, previously demonstrated to be dependent on that sigma factor (Dasgupta *et al.*, 2003; Österberg *et al.*, 2010; Rodríguez-Herva *et al.*, 2010), exhibited the same behaviour as *fliC*, i.e. significantly diminished in the presence of phloretin in DC3000A (Fig. S3).

We also investigated if the GacS/GacA system had any role in reducing the expression of *fliC* in Pto DC3000. Chatterjee and colleagues (2003) had shown that a *gacA* mutant was impaired in swarming, which we corroborated (Fig. 2B), but we observed that those immobile cells bore some flagella both in the absence and in the presence of phloretin, although less abundant and shorter than in the wild type (Fig. 3C). Also, the *gacA* mutant was able to swim; however, the size of the halos was smaller than those of the wild type and did not change with phloretin (Fig. 2A). In accordance with that, *fliC* mRNA levels were reduced in the *gacA* mutant but they did not further diminished with phloretin, unlike what was observed in the wild type. Moreover, FliC levels were lower in the *gacA* mutant

than in the wild type in the absence of phloretin, and remained unchanged in its presence (Fig. 4B), suggesting that phloretin could affect flagellin expression through the GacS/GacA system (Fig. 4A and B). Conversely, *fleQ* and *fliA* mRNA and protein levels in the *gacA* mutant were comparable to those of the wild type, both in the absence and presence of phloretin (Fig. 4A and B). Therefore, *fliC* expression, flagellin synthesis and flagella production were reduced in the *gacA* mutant, both in the absence and in the presence of phloretin (Figs 3 and 4) and that was not due to changes in the master regulator FleQ or the sigma factor FliA protein levels (Fig. 4B). These results suggest that the expression of FleQ is independent of the GacS/GacA TCS in *Pto* DC3000, at least in the assayed conditions.

Several reports suggest that perception of plant signals is important for the activation of the T3SS genes in phytobacteria, and its regulation is dependent on the sigma factor HrpL, the transcriptional regulators HrpR and HrpS, and is also influenced by the global regulatory system GacS/GacA (Xiao and Hutcheson, 1994; Xiao *et al.*, 1994; Grimm *et al.*, 1995; Hutcheson *et al.*, 2001; Zwiesler-Vollick *et al.*, 2002; Chatterjee *et al.*, 2003). It was demonstrated that some plant phenolic compounds inhibited the expression of T3SS in several Gram-negative bacteria (Li *et al.*, 2009; Vikram *et al.*, 2010; 2011). To test whether this also occurred in *Pto*, we measured the alternative sigma factor *hrpL* mRNA levels in the absence and in the presence of phloretin. We observed a significant induction of *hrpL* expression by MMF, as previously shown (Huynh *et al.*, 1989). However, in the presence of phloretin, *hrpL* mRNA levels were 70% diminished in both the wild type and the DC3000A mutant (Fig. 4A).

To discard the possibility that phloretin repressed T3SS gene expression through the HrpR/HrpS regulators, mRNA levels of *hrpR* and *rpoN* in the wild type and a *hrpS* mutant were evaluated and found not to significantly change with phloretin (Fig. S3). These results suggest that flavonoids do not inhibit expression of T3SS genes through the HrpR/HrpS-HrpL regulatory pathway, at least at transcriptional level. To check whether phloretin inhibited T3SS gene expression through the GacS/GacA system, we quantified *hrpL* mRNA levels in the *gacA* mutant and, compared with the wild type, they were reduced, as shown previously (Chatterjee *et al.*, 2003). However, phloretin did not cause a significant inhibition of *hrpL* expression in the *gacA* mutant, as seen in the wild type or in the DC3000A mutant (70% and 84% inhibition, respectively, Fig. 4A). Our results demonstrate that flavonoids also diminished T3SS production in DC3000 (Fig. 4A), by specifically lowering *hrpL* mRNA levels, and not those of *rpoN* or *hrpRS* (Fig. S3), therefore reducing the expression of the T3SS genes controlled by this alternative sigma factor.

The expression and assembly of a functional T3SS apparatus under inducing conditions can cause auto-agglutination in *P. syringae* (Taira *et al.*, 1999; Ortiz-Martín *et al.*, 2010). By carrying out this assay, we found a high number of large bacterial aggregates in preparations of the wild type strain, which were absent from the *hrpL* preparations (Fig. 4C), indicating that the aggregates were mediated by T3SS. In the DC3000A mutant, aggregates were significantly smaller in size and number and less dense than those of the wild type (Fig. 4C). Moreover, in the presence of phloretin, the aggregates of the wild type strain decreased in size and density, and the ones from DC3000A disappeared. Additionally, auto-agglutination assays showed that the *gacA* mutant produced a number of aggregates comparable to the wild type, but they were significantly less dense and indistinguishable from those formed in the presence of phloretin. All these results suggest that the repression of the T3SS expression by phloretin seems to occur mainly through the GacS/GacA TCS.

To verify that phloretin acts through GacS/GacA, we measured *rsmY* and *rsmZ* transcript levels in the wild type and the DC3000A and *gacA* mutants, both in the absence and in the presence of phloretin. qRT-PCRs suggest that *rsmY* and *rsmZ* transcription depends on GacA, although at different degree (Figs 4A and S3), because the loss of GacA had more impact on *rsmY* than on *rsmZ*, which was slightly diminished, as it had been previously observed (Chatterjee *et al.*, 2003). Furthermore, *rsmY* RNA clearly decreased in the presence of phloretin, both in the wild type and DC3000A, but not in the *gacA* mutant (Fig. 4A). However, *rsmZ* levels did not change with phloretin, both in the wild type and the *gacA* mutant, but diminished in DC3000A (Fig. S3). Therefore, *fliC* expression, flagellin synthesis and flagella production and *hrpL* expression and synthesis of a functional T3SS were reduced in the presence of phloretin (Figs 3 and 4). Phloretin seem to inhibit the function of the GacS/GacA TCS in *Pto* DC3000 causing a depletion of *rsmY* RNA, probably increasing the cellular concentration of one or several RsmA paralogs present in *Pto*, which act as translational repressors of *hrpL* and *fliC* mRNAs and target them for degradation. This remark is in accordance with that observed in the *gacA* mutant, where no phloretin inhibition or changes in the *rsmY* levels were detected (Fig. 4A).

The accumulation of flavonoids in DC3000A, caused by the absence of an efflux pump that removes them from the cell, resulted in a stronger reduction of swimming and swarming motility, significant loss of flagella and T3SS production and lower expression of *fliC* and *hrpL* than in the wild type. The complementation of the mutant with the efflux pump genes reverted those effects (Figs S1B and S2B). Therefore, flavonoids not only caused a severe reduction of flagellin production in DC3000A (Fig. 4B),

which was detected at mRNA level (Fig. 4A), but also inhibited the expression of FleQ and FliA, further decreasing the expression of *fliC* and other genes depending on FliA (Figs 4 and S3B). Therefore, it seems to be two performance levels of flavonoids: first, they affect the stability of *fliC* mRNA via the Gac-rsm pathway and second, excessive accumulation of flavonoids reduce flagellin and flagella production by decreasing the intracellular levels of the master regulator FleQ.

The plant apoplast is a space for arms race between plants and bacteria. Plants recognize and counteract both molecular patterns and activity of pathogens, and they employ several independent pathways of secretion of antimicrobial and structural compounds for defence. Hence, flavonoids may constitute a first line of plant defence against pathogen attack and inhibiting bacterial motility, and virulence factor production may help in preventing or delaying the onset of infection. But, bacteria have evolved developing mechanisms to prevent the intracellular accumulation of flavonoids, which have deleterious effects, and fight against plant defences. Pto DC3000 is inherently resistant to antimicrobial compounds thanks to efflux pumps like MexAB-OprM, so it is able to proliferate in the plant environment and initiate the infection. This enables Pto DC3000 in a second step to block the further production of antimicrobials by the translocation of type III effectors into plant cells. It was demonstrated that the T3SS and perhaps other virulence factors under HrpL control (but not coronatine) are required for blocking the synthesis or exudation of antimicrobial compounds (Bais *et al.*, 2005). More recently, it has been shown that the effector HopZ1 promotes *P. syringae* multiplication in soybean by targeting the enzyme 2-hydroxyisoflavanone dehydratase (GmHID1), which is involved in isoflavanoid biosynthesis (Zhou *et al.*, 2011). It seems that Pto DC3000 has a fail-safe mechanism for overcoming host defences; furthermore, we show that the Pto detects and responds to flavonoids by at least one signalling and two gene expression pathways, defining these compounds as signals in the molecular dialog between host and pathogen.

### Acknowledgements

We thank Antonia Felipe for their technical assistance and Marisa Pérez-Bueno and Mónica Pineda for advice with the MCF experiments. We also thank to Isabel M. Aragón and Cayo Ramos for *hrpL*, Chris Waite and Martin Buck for *hrpS*, Sheng Yang He for *fliC* DC3000 mutants; Helge Weingart for the pBBR1-MCS::*mexAB-oprM* plasmid, de Weger for the anti-FliC from *P. fluorescens* and Reuben Ramphal and Jeevan Jyot for the anti-FliA and anti-FleQ antibodies. This research was supported by grants BFU2008-00086, AGL2008-00214, BIO2011-23032 and BIO2009-08254 from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación/Ministerio de

Economía y Competitividad and P08-CVI-3475 and P10-CVI-5800 from the Junta de Andalucía, all of them cofinanced by European Regional Development Fund. P.V. was supported by a JAE-Pre fellowship from the CSIC, H.P. by a FPI predoctoral fellowship and V.C. by a pre-doctoral fellowship from the Andalusian Government, both, also cofinanced by European Regional Development Fund. The authors have no conflict of interest to declare.

### References

- Bais, H.P., Prithiviraj, B., Jha, A.K., Ausubel, F.M., and Vivanco, J.M. (2005) Mediation of pathogen resistance by exudation of antimicrobials from roots. *Nature* **434**: 217–221.
- Blumer, C., Heeb, S., Pessi, G., and Haas, D. (1999) Global GacA-steered control of cyanide and exoprotease production in *Pseudomonas fluorescens* involves specific ribosome binding sites. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 14073–14078.
- Boureau, T., Routtu, J., Roine, E., Taira, S., and Romantschuk, M. (2002) Localization of *hrpA*-induced *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 in infected tomato leaves. *Mol Plant Pathol* **3**: 451–460.
- Brown, I.R., Mansfield, J.W., Taira, S., Roine, E., and Romantschuk, M. (2001) Immunocytochemical localization of HrpA and HrpZ supports a role for the Hrp pilus in the transfer of effector proteins from *Pseudomonas syringae* pv. tomato across the host plant cell wall. *Mol Plant Microbe Interact* **14**: 394–404.
- Buschmann, C., Langsdorf, G., and Lichtenthaler, H.K. (2000) Imaging of the blue, green, and red fluorescence emission of plants: an overview. *Photosynthetica* **38**: 483–491.
- Chatterjee, A., Cui, Y., Yang, H., Collmer, A., Alfano, J.R., and Chatterjee, A.K. (2003) GacA, the response regulator of a two-component system, acts as a master regulator in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 by controlling regulatory RNA, transcriptional activators, and alternate sigma factors. *Mol Plant Microbe Interact* **16**: 1106–1117.
- Chatterjee, A., Cui, Y., Hasegawa, H., and Chatterjee, A.K. (2007) PsrA, the *Pseudomonas* sigma regulator, controls regulators of epiphytic fitness, quorum-sensing signals, and plant interactions in *Pseudomonas syringae* pv. tomato strain DC3000. *Appl Environ Microbiol* **73**: 3684–3694.
- Choi, O., Yahiro, K., Morinaga, N., Miyazaki, M., and Noda, M. (2007) Inhibitory effects of various plant polyphenols on the toxicity of staphylococcal  $\alpha$ -toxin. *Microb Pathog* **42**: 215–224.
- Clark, W.A. (1976) A simplified Leifson flagella stain. *J Clin Microbiol* **3**: 632–634.
- Cushnie, T.P.T., and Lamb, A.J. (2005) Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents* **26**: 343–356.
- Cushnie, T.P.T., and Lamb, A.J. (2011) Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents* **38**: 99–107.
- Dasgupta, N., Wolfgang, M.C., Goodman, A.L., Arora, S.K., Jyot, J., Lory, S., and Ramphal, R. (2003) A four-tiered transcriptional regulatory circuit controls flagellar biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **50**: 809–824.

- De Weger, L.A., van der Vlugt, C.I., Wijffjes, A.H., Bakker, P.A., Schippers, B., and Lugtenberg, B. (1987) Flagella of a plant-growth-stimulating *Pseudomonas fluorescens* strain are required for colonization of potato roots. *J Bacteriol* **169**: 2769–2773.
- Delehanty, J.B., Johnson, B.J., Hickey, T.E., Pons, T., and Ligler, F.S. (2007) Binding and neutralization of lipopolysaccharides by plant proanthocyanidins. *J Nat Prod* **70**: 1718–1724.
- Gómez-Gómez, L., and Boller, T. (2000) FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Mol Cell* **5**: 1003–1011.
- Gómez-Gómez, L., and Boller, T. (2002) Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends Plant Sci* **7**: 251–256.
- Grimm, C., Aufsatz, W., and Panopoulos, N.J. (1995) The *hrpRS* locus of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola constitutes a complex regulatory unit. *Mol Microbiol* **15**: 155–165.
- Heeb, S., Kuehne, S.A., Bycroft, M., Crivii, S., Allen, M.D., Haas, D., et al. (2006) Functional analysis of the post-transcriptional regulator RsmA reveals a novel RNA-binding site. *J Mol Biol* **355**: 1026–1036.
- Hendrickson, E.L., Guevera, P., Peñaloza-Vázquez, A., Shao, J., Bender, C., and Ausubel, F.M. (2000a) Virulence of the phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. maculicola is *rpoN* dependent. *J Bacteriol* **182**: 3498–3507.
- Hendrickson, E.L., Guevera, P., and Ausubel, F.M. (2000b) The alternative sigma factor RpoN is required for *hrp* activity in *Pseudomonas syringae* pv. maculicola and acts at the level of *hrpL* transcription. *J Bacteriol* **182**: 3508–3516.
- Hutcheson, S.W., Bretz, J., Sussan, T., Jin, S.M., and Pak, K. (2001) Enhancer-binding proteins HrpR and HrpS interact to regulate *hrp*-encoded type III protein secretion in *Pseudomonas syringae* strains. *J Bacteriol* **183**: 5589–5598.
- Huynh, T., Dahlbeck, D., and Staskawicz, B. (1989) Bacterial blight of soybean: regulation of a pathogen gene determining host cultivar specificity. *Science* **245**: 1374–1377.
- Jones, J.D.G., and Dangl, J.L. (2006) The plant immune system. *Nature* **444**: 323–329.
- Jyot, J., Sonawane, A., Wu, W., and Ramphal, R. (2007) Genetic mechanisms involved in the repression of flagellar assembly by *Pseudomonas aeruginosa* in human mucus. *Mol Microbiol* **63**: 1026–1038.
- Kong, H.S., Roberts, D.P., Patterson, C.D., Kuehne, S.A., Heeb, S., Lakshman, D.K., and Lydon, J. (2012) Effect of overexpressing *rsmA* from *Pseudomonas aeruginosa* on virulence of select phytotoxin-producing strains of *P. syringae*. *Phytopathology* **102**: 575–587.
- Kulkarni, P.R., Cui, X., Williams, J.W., Stevens, A.M., and Kulkarni, R.V. (2006) Prediction of CsrA-regulating small RNAs in bacteria and their experimental verification in *Vibrio fischeri*. *Nucleic Acids Res* **34**: 3361–3369.
- Li, C.M., Brown, I., Mansfield, J., Stevens, C., Boureau, T., Romantschuk, M., and Taira, S. (2002) The Hrp pilus of *Pseudomonas syringae* elongates from its tip and acts as a conduit for translocation of the effector protein HrpZ. *EMBO J* **21**: 1909–1915.
- Li, Y., Peng, Q., Selimi, D., Wang, Q., Charkowski, A.O., Chen, X., and Yang, C.H. (2009) The plant phenolic compound *p*-coumaric acid represses gene expression in the *Dickeya dadantii* type III secretion system. *Appl Environ Microbiol* **75**: 1223–1228.
- Lindeberg, M., Myers, C.R., Collmer, A., and Schneider, D.J. (2008) Roadmap to new virulence determinants in *Pseudomonas syringae*: insights from comparative genomics and genome organization. *Mol Plant Microbe Interact* **21**: 685–700.
- López-Gresa, M.P., Maltese, F., Bellés, J.M., Conejero, V., Kim, H.K., Choi, Y.H., and Verpoorte, R. (2010) Metabolic response of tomato leaves upon different plant–pathogen interactions. *Phytochem Anal* **21**: 89–94.
- López-Gresa, M.P., Torres, C., Campos, L., Lisón, P., Rodrigo, I., Bellés, J.M., and Conejero, V. (2011) Identification of defence metabolites in tomato plants infected by the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Environ Exp Bot* **74**: 216–228.
- Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K., and He, S.Y. (2006) Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* **126**: 969–980.
- Moll, S., Schneider, D.J., Stodghill, P., Myers, C.R., Cartinhour, S.W., and Filiatrault, M.J. (2010) Construction of an *rsmX* co-variance model and identification of five *rsmX* non-coding RNAs in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *RNA Biol* **7**: 508–516.
- Ortiz-Martín, I., Thwaites, R., Mansfield, J.W., and Beuzón, C.R. (2010) Negative regulation of the Hrp type III secretion system in *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. *Mol Plant Microbe Interact* **23**: 682–701.
- Österberg, S., Skärfstad, E., and Shingler, V. (2010) The  $\sigma$ -factor FliA, ppGpp and DksA coordinate transcriptional control of the *aer2* gene of *Pseudomonas putida*. *Environ Microbiol* **12**: 1439–1451.
- Ottmann, K.M., and Miller, J.F. (1997) Roles for motility in bacterial-host interactions. *Mol Microbiol* **24**: 1109–1117.
- Pineda, M., Gáspár, L., Morales, F., Szigeti, Z., and Barón, M. (2008) Multicolor fluorescence imaging of leaves-A useful tool for visualizing systemic viral infections in plants. *Photochem Photobiol* **84**: 1048–1060.
- Quiñones, B., Dulla, G., and Lindow, S.E. (2005) Quorum sensing regulates exopolysaccharide production, motility, and virulence in *Pseudomonas syringae*. *Mol Plant Microbe Interact* **18**: 682–693.
- Rahme, L.G., Mindrinos, M.N., and Panopoulos, N.J. (1992) Plant and environmental sensory signals control the expression of *hrp* genes in *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. *J Bacteriol* **174**: 3499–3507.
- Reimann, C., Valverde, C., Kay, E., and Haas, D. (2005) Posttranscriptional repression of GacS/GacA-controlled genes by the RNA-binding protein RsmE acting together with RsmA in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *J Bacteriol* **187**: 276–285.
- Rodríguez-Herva, J.J., Duque, E., Molina-Henares, M.A., Navarro-Avilés, G., van Dillewijn, P., Torre, J., et al. (2010) Physiological and transcriptomic characterization of a *fliA* mutant of *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol Rep* **2**: 373–380.
- Roine, E., Wei, W., Yuan, J., Nurmiaho-Lassila, E.L., Kalkkinen, N., Romantschuk, M., and He, S.Y. (1997) Hrp

- pilus: an *hrp*-dependent bacterial surface appendage produced by *Pseudomonas syringae* pv. tomato?DC3000. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 3459–3464.
- Slimestad, R., Fossen, T., and Verheul, M.J. (2008) The flavonoids of tomatoes. *J Agric Food Chem* **56**: 2436–2441.
- Stoitsova, S.O., Braun, Y., Ullrich, M.S., and Weingart, H. (2008) Characterization of the RND-type multidrug efflux pump MexAB-OprM of the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Appl Environ Microbiol* **74**: 3387–3393.
- Taguchi, F., Takeuchi, K., Katoh, E., Murata, K., Suzuki, T., Marutani, M., et al. (2006) Identification of glycosylation genes and glycosylated amino acids of flagellin in *Pseudomonas syringae* pv. tabaci. *Cell Microbiol* **8**: 923–938.
- Taira, S., Tuimala, J., Roine, E., Nurmiaho-Lassila, E.-L., Savilahi, H., and Romantschuk, M. (1999) Mutational analysis of the *Pseudomonas syringae* pv. tomato *hrpA* gene encoding Hrp pilus subunit. *Mol Microbiol* **34**: 737–744.
- Takeuchi, K., Taguchi, F., Inagaki, Y., Toyoda, K., Shiraishi, T., and Ichinose, Y. (2003) Flagellin glycosylation island in *Pseudomonas syringae* pv. glycinea and its role in host specificity. *J Bacteriol* **185**: 6658–6665.
- Tang, X., Xiao, Y., and Zhou, J.M. (2006) Regulation of the type III secretion system in phytopathogenic bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* **19**: 1159–1166.
- Valverde, C., and Haas, D. (2008) Small RNAs controlled by two-component systems. In *Bacterial Signal Transduction: Networks and Drug Targets*. Utsumi, R. (ed.). New York, USA: Springer, pp. 54–79.
- Vandeputte, O.M., Kiendrebeogo, M., Rajaonson, S., Diallo, B., Mol, A., El Jaziri, M., and Baucher, M. (2010) Identification of catechin as one of the flavonoids from *Combretum albiflorum* bark extract that reduces the production of quorum-sensing-controlled virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Appl Environ Microbiol* **76**: 243–253.
- Vandeputte, O.M., Kiendrebeogo, M., Rasamiravaka, T., Stévigny, C., Duez, P., Rajaonson, S., et al. (2011) The flavanone naringenin reduces the production of quorum sensing-controlled virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiology* **157**: 2120–2132.
- Vargas, P., Felipe, A., Michán, C., and Gallegos, M.T. (2011) Induction of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 MexAB-OprM multidrug efflux pump by flavonoids is mediated by the repressor PmeR. *Mol Plant Microbe Interact* **24**: 1207–1219.
- Vikram, A., Jayaprakasha, G.K., Jesudhasan, P.R., Pillai, S.D., and Patil, B.S. (2010) Suppression of bacterial cell-cell signalling, biofilm formation and type III secretion system by citrus flavonoids. *J Appl Microbiol* **109**: 515–527.
- Vikram, A., Jesudhasan, P.R., Jayaprakasha, G.K., Pillai, S.D., Jayaraman, A., and Patil, B.S. (2011) Citrus flavonoid represses *Salmonella* pathogenicity island 1 and motility in *S. typhimurium* LT2. *Int J Food Microbiol* **145**: 28–36.
- Xiao, Y., and Hutcheson, S.W. (1994) A single promoter sequence recognized by a newly identified alternate sigma factor directs expression of pathogenicity and host range determinants in *Pseudomonas syringae*. *J Bacteriol* **176**: 3089–3091.
- Xiao, Y., Heu, S., Yi, J., Lu, Y., and Hutcheson, S.W. (1994) Identification of a putative alternate sigma factor and characterization of a multicomponent regulatory cascade controlling the expression of *Pseudomonas syringae* pv. syringae Pss61 *hrp* and *hrmA* genes. *J Bacteriol* **176**: 1025–1036.
- Zhou, H., Lin, J., Johnson, A., Morgan, R.L., Zhong, W., and Ma, W. (2011) *Pseudomonas syringae* type III Effector HopZ1 targets a host enzyme to suppress isoflavone biosynthesis and promote infection in soybean. *Cell Host Microbe* **9**: 177–186.
- Zwiesler-Vollick, J., Plovianich-Jones, A.E., Nomura, K., Bandyopadhyay, S., Joardar, V., Kunkel, B.N., et al. (2002) Identification of novel *hrp*-regulated genes through functional genomic analysis of the *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 genome. *Mol Microbiol* **45**: 1207–1218.

### Supporting information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site:

**Fig. S1.** Swimming motility assays.

**Fig. S2.** Swarming motility assays.

**Fig. S3.** Expression values were normalized with the house-keeping gene *gyrA* and are referred to the wild type condition without phloretin. Results shown are the means and standard deviations of three independent experiments with three replicates.

**Table S1.** Bacterial strains and plasmids.

**Table S2.** Primers used in the qRT-PCR assay.

**Appendix S1.** Experimental procedures.