

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



**UNIVERSIDAD DE GRANADA**



**Regulación de la virulencia en *Pseudomonas syringae* pv.  
tomato DC3000. Señalización por Gac-rsm.**

**TESIS DOCTORAL**

**Programa de Doctorado en Biología Fundamental y de Sistemas**

**M<sup>a</sup> Dolores Ferreiro García**

**2019**

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: María Dolores Ferreiro García  
ISBN: 978-84-1306-579-3  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/63349>



Esta tesis doctoral ha sido realizada en el Grupo Interacciones Planta-Bacteria perteneciente al Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos de la Estación Experimental del Zaidín, gracias a un contrato del Programa 'Ayudas para la formación de profesorado universitario (FPU)' del Ministerio de Educación y Formación Profesional del Gobierno de España. La investigación ha sido financiada con los proyectos BIO2014-55075-P, del Ministerio de Economía y Competitividad, y BIO2017-83533-P, del Ministerio de Ciencia y Universidades, ambos cofinanciados por FEDER. Durante la tesis doctoral se realizó una estancia breve en el laboratorio del Prof. Dr. Martin Buck (Imperial College London, Reino Unido) financiada por una 'Ayuda a la movilidad para estancias breves y traslados temporales' del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades del Gobierno de España.

Los resultados obtenidos durante esta tesis doctoral han sido presentados en los siguientes congresos y publicaciones:

#### Publicaciones

Ferreiro, M. D., Nogales, J., Farias, G. A., Olmedilla, A., Sanjuán, J., & Gallegos, M. T. (2018). Multiple CsrA Proteins Control Key Virulence Traits in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Mol Plant Microbe Interact*, 31(5), 525-536. doi: 10.1094/MPMI-09-17-0232-R

Pérez-Mendoza, D., Felipe, A., Ferreiro, M. D., Sanjuán, J., & Gallegos, M. T. (2019). AmrZ and FleQ Co-regulate Cellulose Production in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Front Microbiol*, 10, 746. doi: 10.3389/fmicb.2019.00746

#### Congresos

Ferreiro, M. D., Farias, G. A. & Gallegos, M. T. (2016). Estudio de la ruta Gac-rsm en *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *I Jornadas de Investigadores en Formación. Fomentando la Interdisciplinariedad*, Granada, España.

Ferreiro, M. D., Farias, G. A. & Gallegos, M. T. (2016). Papel de las proteínas CsrA en *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *I YouR Science. Young Researchers Science Symposium*, Granada, España.

Ferreiro, M. D., Nogales, J., Farias, G. A. & Gallegos, M. T. (2016). Estudio de la ruta Gac-rsm en *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *XI Reunión del grupo especializado de Microbiología Molecular*, Sevilla, España.

Ferreiro, M. D., Nogales, J., Farias, G. A., Olmedilla, A., & Gallegos, M. T. (2017). Role of the CsrA post-transcriptional regulators in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *FEMS 2017. 7th Congress of European Microbiologists*, Valencia, España.

Gallegos, M. T., Ferreiro, M. D. & Farias, G. A. (2017). Papel de las proteínas reguladoras CsrA en *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *MIP'17. VII Reunión del grupo especializado de Microbiología de Plantas*, Salamanca, España.

Ferreiro, M. D., Felipe, A. y Gallegos & M. T. (2018). Global regulation by the Gac-rsm pathway in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *6th Workshop CSIC-CNRS "Microbial Adaptation to Environmental Stresses"*, Gif-sur-Yvette, Francia.

Ferreiro, M. D., Felipe, A. & Gallegos, M. T. (2018). Global regulation by the Gac-rsm pathway in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *YMS18. Young Microbiologists Symposium on Microbe Signalling, Organization and Pathogenesis*, Belfast, Reino Unido.

Gallegos, M. T., Felipe, A., Ferreiro, M. D., Prada-Ramírez, H. A. & Pérez-Mendoza, D. (2018). *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 FleQ, a multifunctional regulator. *XII Reunión del grupo especializado de Microbiología Molecular de la SEM*, Zaragoza, España.

Ferreiro, M. D., Felipe, A. & Gallegos, M. T. (2019). Regulación global por la ruta Gac-rsm en *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. VIII Reunión del Grupo Especializado de Microbiología de Plantas, Osuna, España.



*'Begin now by observing as much as you can of what nature teaches*

*and you'll find a new happiness in life'*

Marianne North (1830-1890)

*'O verdadeiro heroísmo está en transformar*

*os desexos en realidades e as ideas en feitos'*

Alfonso Daniel R. Castelao (1886-1950)



*A mis abuelos*

*A mis padres y mi hermano*

*A Rubén*



# Agradecimientos

Tras la finalización de esta memoria soy más consciente que nunca de la importancia que ha tenido toda la ayuda brindada por las personas que me han acompañado durante el camino y que han contribuido en mayor o menor medida a la conclusión de esta etapa de mi formación y a mi desarrollo personal.

Me gustaría agradecer en primer lugar a mi directora de tesis, la Dra. Mari Trini Gallegos, por proponerme formar parte de este proyecto y por su gran implicación en él. Te agradezco enormemente la dedicación y el tiempo invertido en mi formación como doctora, siempre intentando hacerme ver 'un poco más allá' y animándome a mejorar, así como la comprensión mostrada en los momentos difíciles, a nivel profesional y personal.

A mi tutora, la Dra. Adela Olmedilla, gracias por la eficiencia con la que has gestionado las cuestiones burocráticas y por abrirme las puertas de tu laboratorio para realizar los ensayos de microscopía.

Al Dr. Juan Sanjuán, gracias por permitirme formar parte de tu grupo de investigación y por la gran utilidad de los comentarios y discusiones científicas aportados en los seminarios de grupo.

Debo dar las gracias al Ministerio de Educación y Formación Profesional del Gobierno de España, que financió esta tesis doctoral a través del programa 'Ayudas para la formación de profesorado universitario (FPU)' y la estancia realizada con el programa 'Ayudas a la movilidad para estancias breves y traslados temporales'.

A todo el personal de investigación, administrativo, técnico y de limpieza de la Estación Experimental del Zaidín, especialmente a los miembros del grupo del Dr. José Manuel García por permitirme el uso de sus aparatos y a la Dra. Lourdes Sánchez, por su asistencia con los experimentos de HPLC y LC-MS.

Al personal del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Universidad de Granada, donde he realizado mi formación docente. Gracias por acogerme y guiarme en ese campo que era tan desconocido para mí.

Con el permiso del lector, voy a escribir este párrafo en inglés para dar las gracias a nuestros colaboradores internacionales. Firstly, I would like to thank Dr. Martin Buck for giving me the opportunity to work in his lab and for being always available for discussing results. I want to acknowledge the help provided by Martin's lab members, specially Chris Waite, who lent me his bench, protocols and strains and taught me how to work with proteins; Milija Jovanovic, who showed me her kindness in rough times; and Matt, who livened up the lab with his 'It's coming home' spirit. I am also grateful to Dr. Mary Wildermuth and Dr. Mathias Ulrich for providing mutant strains.

A continuación me gustaría darles las gracias a los miembros del grupo de investigación, por ayudarme y acompañarme en las aventuras y desventuras del día a día en la ciencia. A Quina, por ayudarme a dar los primeros pasos en el laboratorio y por abrir camino en la línea de investigación de mi tesis. A Soco, por preocuparte por mí como una madre y por estar siempre dispuesta a ayudar. A María José, por asesorarme con los experimentos y por proponerme siempre alternativas cuando algo no funcionaba. A Toñi, por todo lo que me has enseñado (del laboratorio y de jardinería) y por acudir en mi ayuda cuando me desbordaban los experimentos. A Dani, por ser la voz de la experiencia, animarme a insistir y darme consejos muy útiles sin la necesidad de pedírtelos. A Gabriela, por enseñarme y ayudarme con todo lo relacionado con la microscopía y

con la vida en general. Tu amistad durante todos estos años ha sido muy importante para mí. A Liz, por ser mi compinche de experimentos dentro y fuera del laboratorio, por hacerme salir cuando lo necesitaba pero no me daba cuenta y por su amistad, que tanto valoro. A Lara (espero que ya seas capaz de entender esto en español), por dejarme ser tu 'supervisor' y transmitirme tu alegría y espíritu aventurero. A Ariana, por sufrir conmigo pacientemente la recta final de la escritura y por acompañarme en mis locuras gatunas. A todas las personas con las que he coincidido brevemente en el laboratorio, especialmente a Laura, Sara, David, Mariana, Pedro y Ana, porque su compañerismo logró crear un buen ambiente que hacía más ameno el día a día.

También me gustaría agradecer a mis 'compañeras de beca', en especial a Ana Lasa y a Laura Terrón, por ayudarme a salir a flote en los mares de la burocracia, y a Álex González, por ayudarme a ver la cara positiva de la ciencia y llegar a convencerme de que todo saldrá bien.

A mis compañeros de máster: Bran, Irene, Claudia, Vicen, Rodri, Patri, Migue y Paz, por hacer que mi primer año en Granada fuese maravilloso y me plantease seguir aquí durante la tesis.

A mis amigos, Stephania, Rubén y Anabel, que durante todos estos años habéis sabido sacar un momento para verme siempre que volvía a casa. A Áurea, por tu amistad sincera y por saber darme un golpe de realidad siempre que lo he necesitado. Cuando nos vinimos juntas para Granada no me imaginaba que cambiaríamos las horas interminables estudiando juntas en la biblioteca por fructíferas conversaciones en el sofá hasta altas horas de la noche, en las que por supuesto, siempre me quedaba dormida primero. A Elo, por transmitirme tu alegría, por lo fácil que has hecho la convivencia en el piso y por tu cercanía desde el primer día, que pronto se convirtió en amistad.

Ruego que me disculpen de nuevo, pero es una necesidad casi fisiológica dar las gracias a mi familia en mi lengua materna. Á miña nai, grazas pola túa confianza en min, pola túa valiosa visión crítica, por ser o meu 'pepito grillo' e por animarme a loitar polas cousas nas que creo. Ó meu pai, pola túa honestidade que tanto admiro e por ser o primerio que me rescata en caso de apuro. Ó meu irmán Jorge, por aguantarme dende o inicio dos tempos, por axudarme a ter unha mente máis aberta e por valorarme. Ós meus avós, por apostar por min aínda que non remataran de entender esta tolemia na que estaba metida. Ó meu avó Ramón, por inculcarme o valor de facer as cousas ben e dar o mellor de min. Á miña avoa Maruja, servíchesme como exemplo de fortaleza e demostráchesme que as ansias de aprender poden superar calquera limitación. Ó meu avó Ché, por ensinarme que a vida sempre se leva mellor con humor. Á miña avoa Carme, por coidarme e consentirme dende que teño uso de razón. Á miña tía avoa Manuela, pola positividade que sempre me transmites e a túa fe cega en min. Ó resto de membros da miña familia, grazas polo voso apoio constante, conseguistes facerme sentir arroupada a pesar da distancia.

Rubén, grazas pola túa infinita paciencia e comprensión, por ser o meu 'buffer' emocional, por ser un exemplo de afouteza, por ensinarme a non resignarme e a ser inconformista, por colocarme de novo no camiño sempre que perdo a perspectiva, por facerme crer no futuro e por todo o demáis.

A todos, GRACIAS.

# Resumen

Las enfermedades producidas por fitopatógenos constituyen una amenaza para la seguridad alimentaria global, ya que producen pérdidas masivas en las cosechas. La bacteria objeto de este estudio es *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 (Pto DC3000), que destaca por causar brotes esporádicos del moteado, enfermedad que provoca en sus hospedadores naturales (tomate y crucíferas), y por ser utilizada como modelo para el estudio de la interacción patógeno-planta junto a *Arabidopsis thaliana*.

En el medio ambiente y en el contexto de la infección, los microorganismos necesitan detectar estímulos ambientales, integrarlos y coordinar una respuesta fisiológica adecuada. Esto se logra mediante sistemas de transducción de señales, como la ruta de señalización Gac-rsm presente en  $\gamma$ -proteobacterias donde controla cambios en el estilo de vida o en el estado metabólico celular. La señalización comienza con la detección de un estímulo desconocido a nivel de la membrana plasmática por el sistema de dos componentes GacS/GacA, que activa la transcripción de ARN reguladores *rsm* que tienen la función de secuestrar a la familia de proteínas de unión a ARNm CsrA/RsmA. Esta tesis doctoral se centra en el estudio de la ruta Gac-rsm en Pto DC3000, determinando el papel de sus componentes en la interacción con la planta hospedadora y en la virulencia.

Se comenzó estudiando la diversidad y distribución de las proteínas CsrA dentro del género *Pseudomonas*, lo que reveló que CsrA2/RsmA está presente en todas las cepas, que la presencia de las variantes CsrA1, CsrA2 y CsrA3 está conservada dentro del linaje *P. fluorescens* (donde se encuentra *P. syringae*), que la variante RsmF es exclusiva de *P. aeruginosa*, y que existen otras muchas variantes todavía no estudiadas ni clasificadas. La variabilidad observada no había sido descrita anteriormente en ningún otro grupo bacteriano, lo que puede ser explicado por el hecho de que los miembros de este género son excepcionalmente diversos metabólicamente, ocupan nichos muy diferentes y presentan una gran plasticidad genómica.

De los cinco genes codificantes para proteínas CsrA presentes en el genoma de Pto DC3000 (cuatro de ellos previamente anotados y uno identificado en este trabajo) se detectaron los transcritos de *csrA2*, *csrA3* y *csrA5* en las condiciones de estudio. En cuanto a la funcionalidad, CsrA3 es el regulador central en esta cepa, favoreciendo por un lado la multiplicación celular y la acumulación de ácido salicílico en cultivos con deficiencia de hierro y, por otro, reprimiendo la síntesis del biosurfactante siringafactina esencial para motilidad tipo *swarming*, la producción del exopolisacárido alginato, la producción del sideróforo pioverdina en medios con deficiencia de hierro y el ensamblaje del sistema de secreción de tipo 3 necesario para la virulencia. Todos los procesos regulados por CsrA3 están también controlados por CsrA2, con un efecto más moderado, mientras que CsrA1 no parece ejercer ninguna función. La funcionalidad de CsrA4 y CsrA5 solo se comprobó mediante sobreexpresión.

Pto DC3000 codifica siete ARN *rsm*, cuyos promotores mostraron una actividad variable entre ellos que fue mayor en medios ricos nutricionalmente y que aumentó con la densidad celular. La expresión de los

promotores fue alta para *rsmX3*, *rsmX5* y *rsmY*, baja para *rsmX1* y *rsmZ* y variable para *rsmX2* y *rsmX4*. De forma general, se pudieron asociar a los niveles de expresión con las regiones -35 y -10 de sus promotores, mientras que la dependencia de GacA observada se pudo explicar por la cantidad y posición de los residuos conservados con respecto a la secuencia consenso para la unión de este regulador. Además, se comprobó la funcionalidad de *rsmY* y *rsmZ*, ya que su sobreexpresión desde un plásmido revirtió parcialmente el fenotipo de un mutante *gacA*.

En resumen, este trabajo supone un avance en el conocimiento de la fisiología *P. syringae* pv. tomato DC3000 y, en concreto, del funcionamiento de su compleja ruta Gac-rsm y su papel en la interacción de esta bacteria con la planta. Se ha revelado la regulación de múltiples procesos celulares y genes a través de esta ruta y se ha profundizado en el estudio de la expresión y función específica de las cinco proteínas CsrA y los siete ARN reguladores *rsm*.

## ÍNDICE



# ÍNDICE

Agradecimientos .....	xv
Resumen .....	xvii
ÍNDICE.....	xix
Lista de figuras .....	xxv
Lista de tablas.....	xxvii
Abreviaturas.....	xxviii
INTRODUCCIÓN.....	1
1. Regulación génica global en bacterias.....	5
1.1. Regulación del inicio de la transcripción .....	6
1.2. Regulación postranscripcional .....	12
1.3. Regulación postraduccional.....	14
1.4. Sistemas de transducción de señales .....	15
1.5. La ruta Gac-rsm.....	22
2. <i>Pseudomonas syringae</i> .....	30
2.1. Factores de virulencia: sistema de secreción tipo III y fitotoxinas.....	33
2.2. Motilidad .....	38
2.3. Sideróforos .....	40
2.4. Síntesis de exopolisacáridos .....	44
3. Pto DC3000 como modelo en el estudio de la interacción patógeno-planta .....	47
3.1. Factores de virulencia.....	48
3.2. Motilidad: flagelo y siringafactina .....	49
3.3. Sideróforos .....	50
3.4. Síntesis de exopolisacáridos .....	52
3.5. Factores $\sigma$ .....	52
3.6. Regulación por la ruta Gac-rsm .....	54
OBJETIVOS.....	55
MATERIALES Y MÉTODOS.....	59
1. Cepas, plásmidos y oligonucleótidos .....	61
1.1. Cepas .....	61
1.2. Plásmidos .....	61
1.3. Oligonucleótidos .....	65
2. Medios y condiciones de cultivo .....	66
2.1. Medios ricos.....	66
2.2. Medios de composición definida.....	66
2.3. Antibióticos .....	67

2.4. Conservación de los cultivos bacterianos .....	67
3. Técnicas de manipulación genética.....	67
3.1. Preparación de células competentes de <i>E. coli</i> .....	67
3.2. Transformación bacteriana por choque térmico .....	68
3.3. Preparación de células electrocompetentes .....	68
3.4. Electroporación .....	68
3.5. Mutagénesis dirigida por integración e intercambio alélico .....	69
4. Técnicas de biología molecular .....	69
4.1. Aislamiento y cuantificación de ácidos nucleicos .....	69
4.2. Electroforesis .....	71
4.3. Reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasa termorresistente (PCR) .....	73
4.4. Clonaje de fragmentos de ADN en un vector .....	74
4.5. Extensión reversa a partir de cebador ( <i>primer extension</i> ).....	75
4.6. Análisis de la expresión génica .....	77
4.7. Cuantificación de proteína total.....	79
5. Ensayos <i>in vivo</i> .....	80
5.1. Curvas de crecimiento .....	80
5.2. Ensayos de producción y cuantificación de alginato .....	80
5.3. Ensayos de motilidad bacteriana .....	81
5.4. Ensayos de producción de biosurfactante .....	81
5.5. Ensayos de reproducción de la curva de crecimiento en placas multipocillo mediante diluciones seriadas .....	82
5.6. Ensayo enzimático de actividad $\beta$ -galactosidasa .....	82
5.7. Ensayos de auto-aglutinación .....	83
5.8. Ensayos de producción de sideróforos .....	83
5.9. Visualización de flagelos .....	84
5.10. Ensayos in planta .....	85
6. Detección y cuantificación de sideróforos y ácido salicílico en sobrenadantes .....	86
6.1. Cuantificación de pioverdina .....	86
6.2. Fluorimetría de sobrenadantes .....	87
6.3. Detección y cuantificación de ácido salicílico por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC)..	87
6.4. Detección y cuantificación de yersiniabactina por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) .....	88
7. Ensayos <i>in silico</i> .....	89
7.1. Obtención y alineamiento de secuencias .....	89
7.2. Creación de árboles filogenéticos .....	89
7.3. Predicción de secuencias diana de CsrA.....	89
7.4. Predicción de la estructura secundaria de los ARN .....	90

7.5. Búsqueda de secuencias en genomas bacterianos.....	90
7.6. Análisis estadísticos .....	90
7.7. Análisis de imágenes.....	90
7.8. Visualización de datos de RNA-Seq.....	90
RESULTADOS .....	91
Capítulo I. Diversidad y expresión de las proteínas CsrA.....	93
1. Diversidad de las proteínas CsrA en el género <i>Pseudomonas</i> .....	93
2. Expresión <i>in vivo</i> de las proteínas CsrA en Pto DC3000 .....	95
2.1. Niveles de los ARNm de <i>csrA1-5</i> .....	96
2.2. Análisis de los promotores de <i>csrA</i> .....	98
Capítulo II. Estudio funcional de las proteínas CsrA en Pto DC3000 .....	107
1. Crecimiento.....	107
2. Producción de alginato.....	109
3. Motilidad.....	114
3.1. Síntesis de los flagelos .....	116
3.2. Producción de siringafactina.....	118
4. Virulencia .....	122
5. Sideróforos.....	125
5.1. Producción de sideróforos en medio sólido .....	125
5.2. Producción de sideróforos en cultivos líquidos.....	127
5.3. Identificación del compuesto detectado a 410 nm .....	135
Capítulo III. Los ARN no codificantes <i>rsm</i> .....	141
1. Regulación de la expresión de los ARN <i>rsm</i> .....	142
2. Función biológica de <i>rsmY</i> y <i>rsmZ</i> .....	149
2.1. Motilidad .....	149
2.2. Virulencia.....	153
DISCUSIÓN.....	155
CONCLUSIONES .....	169
BIBLIOGRAFÍA.....	173
APÉNDICES .....	203
Apéndice A. Mapas de los vectores no comerciales utilizados .....	205
Apéndice B. Características de las parejas de oligonucleótidos de RT-qPCR.....	208
Apéndice C. Secuencia de las escaleras de secuenciación utilizadas en <i>primer extension</i> .....	209
Apéndice D. Presencia y distribución de CsrA en <i>Pseudomonas sp.</i> .....	210
Apéndice E. Árbol filogenético de las proteínas CsrA de <i>Pseudomonas spp.</i> .....	217
Apéndice F. Alineamiento de los promotores de <i>csrA2</i> en múltiples bacterias .....	218
Apéndice G. Predicción de las dianas de CsrA en Pto DC3000 .....	220

Apéndice H. Motilidad de los mutantes <i>syfA</i> y <i>syfA/csrA3</i> .....	222
Apéndice I. Estructura secundaria del ARN de <i>syfR</i> .....	223
Apéndice J. Pérdida de la fluorescencia de Pto DC3000 con altas concentraciones de hierro .....	224
Apéndice K. Detección de sideróforos en sobrenadantes de Pto DC3000 y mutantes en <i>pchA</i> y <i>pvdI</i> con pBBR1-MCS5. ....	225
Apéndice L. Estructura secundaria de los ARN <i>rsm</i> de Pto DC3000 .....	226
Apéndice M. Regiones promotoras de los ARN <i>rsm</i> de Pto DC3000 y otras bacterias.....	228
Apéndice N. Licencias de reproducción del material tomado de otros trabajos .....	229
Apéndice O. Artículo publicado .....	230

## Lista de figuras

Figura I1. Modelo en 'zigzag' de la evolución de la interacción fitopatógeno-planta.....	4
Figura I2. Representación esquemática del flujo de la información genética y su regulación.....	6
Figura I3. Holoenzima de $\sigma^{70}$ -ARN polimerasa unida al promotor.....	8
Figura I4. Mecanismos de represión y activación de promotores por factores de transcripción.....	11
Figura I5. Termorregulación de la traducción de <i>rpoH</i> .....	12
Figura I6. Disposición génica y mecanismos de regulación de <i>riboswitches</i> y ARN reguladores.....	13
Figura I7. Regulación postranscripcional por la proteína Hfq.....	14
Figura I8. Transducción de señales por sistemas de uno y dos componentes y por quimiotaxis.....	17
Figura I9. Organización estructural y señalización en sistemas de dos componentes.....	18
Figura I10. Sistemas de <i>quorum sensing</i> canónicos en <i>Vibrio</i> y <i>Pseudomonas</i> .....	20
Figura I11. Ruta Gac-rsm en <i>Pseudomonas protegens</i> CHA0.....	24
Figura I12. Modelos de represión y activación por CsrA/RsmA.....	26
Figura I13. Ciclo de vida de <i>P. syringae</i> en el medio ambiente y durante la infección.....	32
Figura I14. Organización génica de la isla de patogenicidad Hrp de <i>P. syringae</i> .....	33
Figura I15. El sistema de secreción de tipo 3 de <i>P. syringae</i> .....	34
Figura I16. Modelo de regulación de los genes <i>hrp/hrc</i> en <i>P. syringae</i> .....	37
Figura I17. Organización génica del <i>cluster</i> biosintético de la coronatina en <i>P. savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i> .....	38
Figura I18. Síntesis y estructura del flagelo de <i>Pseudomonas</i> .....	40
Figura I19. Genes implicados en la biosíntesis de pioverdina en <i>P. aeruginosa</i> y <i>P. syringae</i> .....	42
Figura I20. <i>Cluster</i> Ybt y proceso de biosíntesis de la yersiniabactina en <i>P. syringae</i> .....	43
Figura I21. Mecanismo de activación del ECF AlgU por la cascada RIP en <i>P. aeruginosa</i> .....	46
Figura I22. <i>Cluster</i> biosintético de la siringafactina en Pto DC3000.....	50
Figura M1. Generación de una deleción mediante PCR solapante.....	74
Figura R1. Alineamiento múltiple de las proteínas CsrA de Pto DC3000, otras <i>Pseudomonas</i> y <i>E. coli</i> .....	93
Figura R2. Expresión de los ARNm de <i>csrA1-5</i> en distintos medios.....	96
Figura R3. Niveles de expresión de <i>csrA5</i> en los mutantes <i>csrA2</i> y <i>csrA3</i> .....	97
Figura R4. Aumento de los niveles de <i>csrA1-3</i> por su expresión en <i>trans</i> .....	98
Figura R5. Expresión de <i>csrA1</i> .....	99
Figura R6. Transcriptoma de Pto DC3000 en la región adyacente a <i>csrA2</i> .....	100
Figura R7. Expresión de <i>csrA2</i> .....	102
Figura R8. Expresión de <i>csrA3</i> .....	103
Figura R9. Expresión de <i>csrA4</i> .....	104
Figura R10. Expresión de <i>csrA5</i> .....	105
Figura R11. CsrA2 y CsrA3 estimulan el crecimiento en medio MMF a 20°C.....	108
Figura R12. CsrA3 inhibe la producción de alginato.....	109

Figura R13. Regulación del operón de biosíntesis de alginato.....	111
Figura R14. CsrA3 regula la expresión de AlgU.....	113
Figura R15. CsrA2 y CsrA3 inhiben la motilidad <i>swimming</i> y <i>swarming</i> . ....	115
Figura R16. La sobreexpresión de CsrA4 y CsrA5 provoca una disminución de la motilidad <i>swarming</i> .....	116
Figura R17. CsrA1, CsrA2 y CsrA3 no alteran la morfología y estructura del flagelo en <i>swarming</i> . ....	117
Figura R18. Efecto de CsrA1, CsrA2 y CsrA3 sobre la producción de siringafactina.....	118
Figura R19. Efecto de CsrA1, CsrA2 y CsrA3 sobre la expresión de los genes de síntesis de siringafactina. ....	120
Figura R20. Las regiones promotoras de <i>syfA</i> y <i>syfR</i> contienen posibles sitios de unión a CsrA. ....	121
Figura R21. Efecto de CsrA1, CsrA2 y CsrA3 sobre la virulencia en plantas tomate.....	123
Figura R22. CsrA2 y CsrA3 reprimen la expresión del T3SS en Pto DC3000.....	124
Figura R23. Pto DC3000 produce pioverdina y yersiniabactina en medio MMR*.....	126
Figura R24. Efecto de GacA y CsrA sobre la producción de sideróforos en medio sólido. ....	127
Figura R25. Determinación de la concentración adecuada de biperidilo.....	128
Figura R26. Detección de sideróforos en los sobrenadantes de Pto DC3000 y mutantes en <i>pchA</i> y <i>pvdI</i> . ....	130
Figura R27. Espectro de fluorescencia del sobrenadante del mutante <i>gacA</i> . ....	130
Figura R28. Espectros de fluorescencia de sobrenadantes de Pto DC3000 sobreexpresando distintos <i>csrA</i> . ....	131
Figura R29. Efecto de CsrA2 y CsrA3 sobre la producción de sideróforos. ....	132
Figura R30. Efecto de CsrA2 y CsrA3 en los mutantes deficientes en la producción de pioverdina y yersiniabactina. ....	134
Figura R31. Curvas de crecimiento de los mutantes en sideróforos sobreexpresando CsrA2 y CsrA3. ....	135
Figura R32. Espectros de fluorescencia del ácido salicílico en medio MMR.....	136
Figura R33. Detección de ácido salicílico en sobrenadantes de cultivos. ....	137
Figura R34. Detección de yersiniabactina en sobrenadantes de cultivos. ....	138
Figura R35. CsrA3 induce la acumulación de ácido salicílico, pero no de yersiniabactina. ....	139
Figura R36. Secuencia de los ARN <i>rsm</i> presentes en Pto DC3000.....	141
Figura R37. Actividad de los promotores de los ARN <i>rsm</i> de Pto DC3000 en medios sólidos.....	143
Figura R38. Actividad de los promotores de <i>rsm</i> dependiendo de la fase de crecimiento en medio LB. ....	145
Figura R39. Actividad de los promotores de <i>rsm</i> dependiendo de la fase de crecimiento en medio MMR. ....	146
Figura R40. Actividad de los promotores de <i>rsm</i> dependiendo de la fase de crecimiento en medio MMF. ....	147
Figura R41. Efecto de <i>rsmY</i> y <i>rsmZ</i> sobre la motilidad <i>swimming</i> . ....	150
Figura R42. Papel de <i>rsmY</i> y <i>rsmZ</i> en el <i>swarming</i> . ....	151
Figura R43. Papel de <i>rsmY</i> y <i>rsmZ</i> en la producción de siringafactina. ....	152
Figura R44. Papel de <i>rsmY</i> y <i>rsmZ</i> en la infección de tomate.....	154

## Lista de tablas

Tabla I1. Factores $\sigma$ de <i>E. coli</i> y sus características principales.....	10
Tabla I2. Sistemas de transducción de señales presentes en el genoma de diversas bacterias.....	16
Tabla I3. Componentes de la ruta Gac-rsm en diferentes bacterias.....	23
Tabla I4. Factores $\sigma$ de Pto DC3000.....	53
Tabla M1. Cepas bacterianas utilizadas.....	61
Tabla M2. Plásmidos utilizados.....	62
Tabla M3. Oligonucleótidos generales.....	65
Tabla M4. Oligonucleótidos utilizados para RT-qPCR.....	65
Tabla M5. Concentración de los antibióticos empleados ( $\mu\text{g/ml}$ ).....	67
Tabla R1. Presencia de las distintas variantes de CsrA en el género <i>Pseudomonas</i> <sup>a</sup> .....	95
Tabla R2. Características de los ARN <i>rsm</i> de Pto DC3000.....	141
Tabla R3. Comparación de las regiones promotoras de los distintos rsm de Pto DC3000.....	149
Tabla R4. Porcentaje de células portadoras del plásmido en distintos puntos de la infección*.....	154

# Abreviaturas

+1	punto de inicio de la transcripción	ml	mililitro
(p)ppGpp	guaninas tetra y pentafofato	mM	milimolar
$\Delta_{xxx}$	delección en el gen <i>xxx</i>	MMF	medio inductor del T3SS
$\mu\text{g}$	microgramo	MMR	medio mínimo de <i>Rhizobium</i>
$\mu\text{l}$	microlitro	MMR*	medio mínimo de <i>Rhizobium</i> sin hierro
$\mu\text{M}$	micromolar	NaI	ácido nalidíxico
3'-UTR	región 3' no traducida	nm	nanómetros
5'-UTR	región 5' no traducida	nM	nanomolar
ADN	ácido desoxirribonucleico	NRPS	<i>nonribosomal peptide synthetases</i> , péptido sintetasa no ribosomales
ADNc	ADN complementario	°C	grados Celsius
AHL	<i>acyl homoserin lactone</i> , homoserín-lactonas aciladas	OCS	<i>one-component system</i> , sistema de un componente
AMPc	adenosina monofosfato cíclico	ONPG	<i>o</i> -nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido
ANOVA	análisis de la varianza	ORF	<i>open reading frame</i> , pauta de lectura abierta
Ap	ampicilina	p/v	peso en volumen, g/100ml
APS	persulfato amónico	PAD	<i>photodiode array detector</i>
ARN	ácido ribonucleico	PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i> , patrón molecular asociado a patógenos
ARNm	ARN mensajero	pb	pares de bases
ARNnc	ARN no codificante	PCR	reacción en cadena de la polimerasa
ARNr	ARN ribosómico	PDE	fosfodiesterasa
ARNt	ARN transferente	PDE	fosfodiesterasa
ATG	codón de inicio de una secuencia codificante (ADN)	pGpG	5'-fosfoguanilil-(3'-5')-guanosina
ATP	adenosina trifosfato	PKS	<i>polyketide synthase</i> , policétido sintetasa
AUG	codón de inicio de una secuencia codificante (ARNm)	Plac	promotor <i>lac</i>
BCP	1-bromo-3-cloropropano	PNK	polinucleótido quinasa
bEBP	<i>bacterial enhancer-binding proteins</i> , proteínas bacterianas de unión a <i>enhancer</i>	Pph	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>
CA	<i>catalytic and ATP-binding domain</i> , dominio catalítico y de unión a ATP	PRR	<i>pattern recognition receptors</i> , receptores de reconocimiento de patrones
CAS	Chrome Azurol S	Psy	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>
c-di-GMP	(3',5')-bis-guanosina monofosfato cíclico	PTI	<i>PAMP-triggered immunity</i> , inmunidad desencadenada por PAMP
CEL	<i>Conserved Effector Locus</i>	Pto	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Tomato</i>
CFA	ácido coronafácico	Pto	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>
CMA	ácido coronámico	DC3000	DC3000
cpm	cuentas por minuto	P <sub>xxx</sub>	promotor del gen <i>xxx</i>
Ct	valor del ciclo umbral	qPCR	PCR en tiempo real o cuantitativa
DEPC	dietilpirocarbonato	QS	<i>quorum sensing</i>
DGC	diguamilato ciclasa	R	resistente
DGC	diguamilato ciclasa	RBS	<i>ribosome binding sequence</i> , secuencia de unión del ribosoma
DHp	<i>dimerization and histidine phosphotransfer domain</i> , dominio de dimerización y	Rif	rifampicina
		RIP	<i>regulated intramembrane proteolysis</i> , proteólisis intramembrana regulada

	fosfotransferencia a histidina		
dNTP	desoxirribonucleótido(s) trifosfato	rpm	revoluciones por minuto
DO	densidad óptica	RR	regulador de respuesta
dpi	días post-inoculación	RSH	RelA/SpoT homolog, homólogo a RelA/SpoT
DTT	Dicloro difenil tricloraetano	RT	transcripción reversa
ECF	factor sigma extracitoplasmático	s	segundos
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético	s	sensible
EEL	<i>Exchangeable Effector Locus</i>	SA	ácido salicílico
EPS	exopolisacárido(s)	Sac	sacarosa
ETI	<i>effector-triggered immunity</i> , inmunidad desencadenada por efectores	SD	Shine Dalgarno
ETS	<i>effector-triggered sensitivity</i> , sensibilidad desencadenadas por efectores	SDS	dodecilsulfato sódico
g	gramos	Sm	estreptomina
<i>g</i>	fuerza g	Sp	espectinomicina
GDP	guanosina difosfato	T3E	efectores del sistema de secreción tipo III
Gm	gentamicina	T3SS	sistema de secreción tipo III
GMP	guanosina monofosfato	T6SS	sistema de secreción tipo IV
GTP	guanosina trifosfato	TAE	Tris-Acético-EDTA
GTP	guanosina trifosfato	TBE	Tris-Borato-EDTA
h	horas	Tc	tetraciclina
HK	histidina quinasa	TCS	sistema de dos componentes
HPLC	<i>high-performance liquid chromatography</i> , cromatografía líquida de alto rendimiento	TCS	<i>two-component system</i> , sistema de dos componentes
HPt	<i>histidine phosphotransfer domain</i> , dominio de fosfotransferencia a histidina	TE	Tris-EDTA
HR	respuesta hipersensible	TEM	<i>transmission electron microscopy</i> , microscopía electrónica de transmisión
IPTG	isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido	TEMED	N,N',N'-tetrametiletano-1,2-diamina
kb	kilobase	Tm	temperatura de fusión
kcal	kilocalorías	Tm	temperatura de fusión
Km	kanamicina	U	unidades
kV	kilovoltios	UA	unidades arbitrarias
L	litro	UFC	unidades formadoras de colonias
' <i>lacZ</i>	gen <i>lacZ</i> desprovisto de su promotor	UR	unidades relativas
LB	medio Luria-Bertani	UV	ultravioleta
LC-MS	<i>liquid chromatography-mass spectrometry</i> , cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas	V	voltios
M	molar	v	volumen(es)
MCP	<i>methyl-accepting chemotaxis protein</i> , proteína de quimiotaxis aceptadora de grupos metilo	v/v	volumen en volumen, ml/100ml
MCS	<i>multiple cloning site</i> , sitio de clonaje múltiple	W	vatios
MCS	multiple cloning site, sitio de clonaje múltiple	X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido
mg	miligramo	λ	longitud de onda
min	minutos		

## Abreviaturas de aminoácidos

Aminoácido	Abreviatura	Código de una letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Aspartato	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Glutamato	Glu	E
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

## INTRODUCCIÓN



En el contexto global actual, la población humana aumenta mientras que la superficie de tierra cultivable se reduce (McDonald y Stukenbrock, 2016; Zhan *et al.*, 2015). Las condiciones climáticas cambiantes y el tipo de modelo agronómico más utilizado (monocultivo intensivo) favorecen las epidemias de organismos fitopatógenos que ponen en peligro la producción de alimentos (Bartoli y Roux, 2017), estimándose que pueden reducir la producción de las cosechas hasta en un 15% (Agrios, 2005).

En la naturaleza, los eventos de infección son cortos y están limitados en la escala espacial gracias a la heterogeneidad genética de las poblaciones del hospedador y a la influencia del resto de organismos del ecosistema (Agrios, 2005; Burdon *et al.*, 2013; Van der Hoorn *et al.*, 2002). En los cultivos se rompe el equilibrio natural al disminuir la diversidad genética vegetal, impidiendo que se produzca la coevolución con su correspondiente patógeno (McDonald y Stukenbrock, 2016; Stukenbrock y McDonald, 2008). En este escenario se producen reiteradamente ciclos de ‘expansión y contracción’ donde las poblaciones del patógeno se reducen con la introducción de una variedad resistente y aumentan bruscamente al surgir nuevos patotipos capaces de vencer dicha resistencia (McDonald y Stukenbrock, 2016; Papaix *et al.*, 2015; Zhan *et al.*, 2015). Esto, junto con los problemas medioambientales generados por el uso excesivo de pesticidas y fertilizantes, ha provocado un interés creciente por la búsqueda de nuevas técnicas para el control de enfermedades en los cultivos. El diseño de estrategias específicas respetuosas con el medio ambiente y menos susceptibles a la aparición de resistencias y epidemias necesita de un conocimiento riguroso de la interacción patógeno-planta y de las condiciones que desencadenan los brotes de la enfermedad (Bartoli y Roux, 2017; McDonald y Stukenbrock, 2016; Papaix *et al.*, 2015; Stukenbrock y McDonald, 2008; Sundin *et al.*, 2016; Zhan *et al.*, 2015).

Los agentes etiológicos de las enfermedades en plantas son muy diversos: hongos, virus, bacterias, nematodos, protozoos e incluso factores ambientales (Agrios, 2005). En 2012, la revista especializada *Molecular Plant Pathology* realizó una encuesta a la comunidad científica para crear una lista de las bacterias fitopatógenas más relevantes a nivel científico y ambiental. El grupo considerablemente más representado fue *Pseudomonas syringae*, la bacteria objeto de estudio en esta tesis doctoral, seguido de *Ralstonia*, *Agrobacterium* y *Xanthomonas* (Mansfield *et al.*, 2012).

Cuando se produce una infección de una planta superior por un patógeno bacteriano se pueden activar dos respuestas inmunitarias diferenciadas (Figura I1). En primer lugar, se produce una respuesta inespecífica denominada PTI (*PAMP-triggered immunity*) por el reconocimiento de moléculas situadas en la superficie bacteriana, como flagelina, lipopolisacáridos o peptidoglicano, denominadas PAMP (*pathogen-associated molecular patterns*). La detección se lleva a cabo en el exterior de la célula vegetal por receptores PRR (*pattern recognition receptors*) situados en la membrana plasmática, que activan cascadas de MAP-quinasas cuyo

efecto final es la activación transcripcional de genes relacionados con la defensa, la biosíntesis y secreción de compuestos antimicrobianos y la deposición de calosa en la pared celular (Jones y Dangl, 2006; Nicaise *et al.*, 2009). Los factores de virulencia y/o efectores producidos por un fitopatógeno suprimen esta respuesta en hospedadores compatibles, permitiendo el desarrollo de la infección debido a la sensibilidad generada por los efectores (ETS, *effector-triggered sensibility*). La respuesta inmunitaria específica frente a dichos efectores (ETI, *effector-triggered immunity*) surgió para contrarrestar la supresión de la PTI por parte de la bacteria. La ETI se activa tras el reconocimiento, de manera directa o indirecta, de efectores bacterianos por complejos proteicos de resistencia (AvrR) en el citoplasma de la célula vegetal. Es una interacción 'gen por gen' donde se genera reiteradamente, por un lado, la aparición en la bacteria de efectores capaces de suprimir la ETI y, por otro, de proteínas de resistencia que los reconocen en la planta, dando lugar a lo que se conoce en términos evolutivos como una 'carrera de armamento' entre los dos organismos (Alfano y Collmer, 2004; Jones y Dangl, 2006). De manera general, la PTI es efectiva para prevenir la multiplicación de microorganismos no patógenos en la planta y la ETI es necesaria para impedir el desarrollo de las enfermedades producidas por patógenos (Klement *et al.*, 2003). Además, la ETI suele ir acompañada de la respuesta hipersensible (HR), una muerte celular programada cuyo objetivo es limitar el crecimiento y la dispersión de la bacteria en la planta (Alfano y Collmer, 2004; Jones y Dangl, 2006; Xin y He, 2013). En fitopatología, se denomina hospedador compatible a la planta en la que un patógeno es capaz de suprimir la respuesta defensiva y causar una infección. La planta que impide el desarrollo de la enfermedad gracias a la ETI y produce HR, se denomina hospedador no compatible (Alfano y Collmer, 2004; Lindeberg *et al.*, 2012).

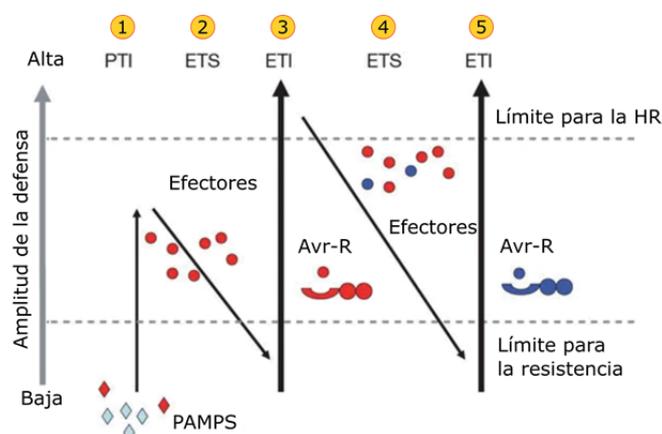


Figura I1. Modelo en 'zigzag' de la evolución de la interacción fitopatógeno-planta.

En el esquema se representa la amplitud de la defensa inmunitaria de la planta frente a un fitopatógeno, señalando los límites para la resistencia y el desarrollo de respuesta hipersensible (HR). Cuando la planta detecta los PAMP del patógeno (rombos rojos) a través de receptores PRR, se estimula la respuesta inespecífica o PTI (1). Los patógenos exitosos sintetizan efectores que bloquean la PTI o permiten la nutrición y dispersión del patógeno, resultando en sensibilidad o ETS (2). Si la planta reconoce un efector (rojo), se activa la respuesta inmunitaria específica o ETI (3), una versión amplificada de la PTI que sobrepasa el límite para la inducción de la respuesta hipersensible (HR). Los patógenos que han perdido el efector reconocido (rojo) y han adquirido nuevos efectores (azul) pueden suprimir la ETI provocando de nuevo ETS (4). La selección natural favorece la aparición de nuevos alelos de receptores de efectores en la planta, lo que resultaría otra vez en ETI (5). Adaptada de Jones y Dangl (2006).

El desarrollo de una enfermedad causada por un agente biótico depende de la relación triangular entre un hospedador compatible, un patógeno virulento y unas condiciones ambientales favorables (Stevens, 1960). Cuando se produce el contacto entre el hospedador y el patógeno, es imprescindible que las condiciones ambientales sean las adecuadas para que se inicie la infección. Por tanto, las bacterias fitopatógenas han evolucionado para detectar estímulos ambientales como la temperatura, la luz o el estrés hídrico (Leonard *et al.*, 2017). Además, la planta y el medio físico poseen una microbiota propia que competirá con el patógeno de forma directa (producción de compuestos antimicrobianos) y/o indirecta (consumo de nutrientes disponibles) (Xin *et al.*, 2018). El encuentro con la planta puede tener lugar de forma fortuita o de forma activa tras la detección de moléculas producidas por la misma, por lo que las bacterias también poseen sistemas para detectar este tipo de señales y desplazarse hacia ellas. El mismo proceso tiene lugar para alcanzar los puntos de entrada a la planta y los lugares donde tendrá lugar la multiplicación, generalmente tejidos específicos como el apoplasto o el sistema vascular (Baker *et al.*, 2010; Leonard *et al.*, 2017; Melotto *et al.*, 2008). Durante el curso de la infección, el patógeno tiene que llevar a cabo procesos costosos energéticamente como la síntesis de factores de virulencia y la multiplicación celular, al mismo tiempo que soporta múltiples estreses (defensas de la planta, estrés osmótico, estrés oxidativo). En esta situación es crucial que la bacteria monitoree los cambios en la fisiología del hospedador y ajuste la suya en consecuencia (Leonard *et al.*, 2017). En conclusión, el desarrollo exitoso de la infección no solo requiere que la bacteria porte en su genoma los factores de virulencia adecuados, sino que estos se expresen de manera coordinada y dinámica en el transcurso de la misma. De forma similar, la supervivencia fuera de la planta (en el medio ambiente) también depende de la capacidad de la bacteria para reconocer e integrar los estímulos ambientales y responder adecuadamente a ellos (Xin *et al.*, 2018).

## 1. Regulación génica global en bacterias

Tras el descubrimiento del ADN como la molécula portadora de la información genética en los organismos, se propuso que el flujo de dicha información es unidireccional y secuencial desde ADN a ARNm y proteína, lo que se conoce como el dogma central de la biología molecular (Crick, 1970). Según este, un gen se copia a una molécula de ARNm mediante el proceso de transcripción y esta se traduce para sintetizar una proteína con una función celular concreta (Figura I2). Aunque es válido para la mayoría de organismos, no se cumple para algunos virus que tienen la capacidad de replicar moléculas de ARN o sintetizar ADN a partir de ARN (Nelson *et al.*, 2005). Además, es necesario puntualizar que la transcripción no solo produce ARNm que codifican proteínas, sino que también sintetiza ARN no codificantes (ARNnc), como los ribosómicos y transferentes, ambos necesarios para la síntesis proteica, ARN con actividad catalítica y ARN reguladores que modifican la actividad de ARNm o proteínas mediante su unión a ellos (Pierce, 2012).

La regulación de la expresión génica puede tener lugar a distintos niveles: sobre el proceso de transcripción (transcripcional), sobre la disponibilidad o estabilidad del ARNm (postranscripcional) o sobre la actividad o integridad de una proteína ya sintetizada (postraduccion) (Figura I2). En ella juegan un papel esencial las

rutas de regulación global (Gottesman, 1984), dado que integran múltiples estímulos a través de los sistemas de transducción de señales para desencadenar una respuesta génica coordinada a los distintos niveles de regulación anteriormente mencionados (Galperin, 2004).

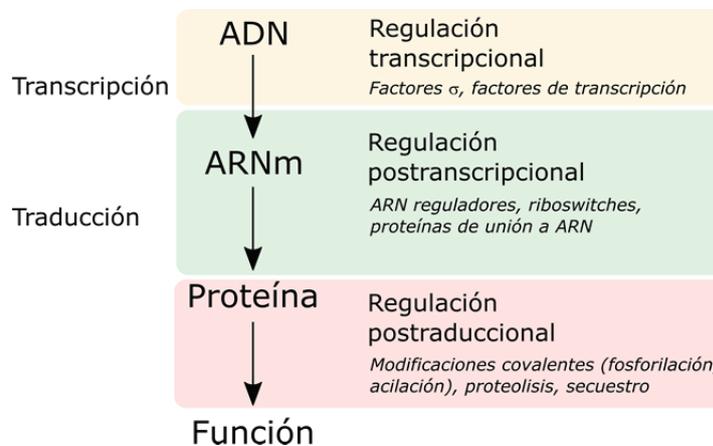


Figura I2. Representación esquemática del flujo de la información genética y su regulación.

Un fragmento de ADN se copia a una molécula de ARNm en el proceso de transcripción. La regulación sobre su iniciación se denomina transcripcional y depende fundamentalmente de proteínas implicadas en dicho proceso, como son los factores  $\sigma$  y los factores de transcripción. El ARNm se utiliza como molde para la síntesis de proteínas en el proceso de traducción. La regulación postranscripcional incluye desde la terminación de la transcripción hasta la disponibilidad o estabilidad del ARNm y la traducción. Esta tiene lugar a través de ARN reguladores, proteínas de unión a ARN o estructuras presentes en el propio ARNm, como los *riboswitches*. Una proteína puede ejercer su función directamente tras ser traducida o puede necesitar modificaciones postraduccionales para ser funcional. Estas modificaciones constituyen puntos de regulación postraduccional, junto con otros mecanismos como la degradación por proteólisis o el secuestro mediante su unión a otras moléculas.

### 1.1. Regulación del inicio de la transcripción

El proceso de transcripción se divide temporalmente en tres partes: iniciación, elongación y terminación. La iniciación consiste en la unión de la ARN polimerasa a la región promotora de la cadena molde del gen y la separación de la doble hebra del ADN formando lo que se denomina 'complejo abierto'. Durante la elongación, la ARN polimerasa se desplaza sobre el ADN sintetizando la molécula de ARN hasta que se alcanza el punto de terminación, en el que se produce la disociación del complejo formado por la ARN polimerasa, el ADN y el ARN tras la unión de un factor proteico denominado Rho o por la formación de un terminador, una estructura en forma de horquilla al final de la molécula de ARN (Pierce, 2012). La regulación de la expresión génica en procariotas se produce mayoritariamente a nivel de la iniciación de la transcripción, probablemente por razones de economía energética en la célula. En este punto, la regulación tiene lugar directamente sobre la ARN polimerasa, donde adquieren suma importancia los factores  $\sigma$ , o sobre la región promotora, fundamentalmente por la unión de proteínas reguladoras de la transcripción (Browning y Busby, 2004, 2016).

### 1.1.1. Factores $\sigma$

La ARN polimerasa bacteriana es un complejo multimérico cuyo núcleo (*core*) está formado por dos subunidades grandes ( $\beta$  y  $\beta'$ ), dos copias de una subunidad menor ( $\alpha$ ) y un polipéptido pequeño ( $\omega$ ). El sitio activo de la polimerasa está formado por las subunidades  $\beta$  y  $\beta'$ , cuya interacción depende de la formación del dímero de subunidades  $\alpha$  y del polipéptido  $\omega$ , que actúa como chaperona (Browning y Busby, 2004; Streips y Yasbin, 2002). El *core* de la ARN polimerasa es suficiente para que se produzca la transcripción, pero el reconocimiento de los promotores y el inicio de la transcripción requieren de la unión de otra subunidad, denominada factor  $\sigma$ , que forma el holoenzima (Figura I3) (Streips y Yasbin, 2002). El factor  $\sigma$  está unido a la ARN polimerasa durante el inicio de la transcripción y se libera tras la adición de los primeros nucleótidos al ARN naciente (Pierce, 2012).

La mayoría de promotores bacterianos contienen alguno de los siguientes elementos: la región -35, la región -10 y la región -10 extendida con respecto al inicio de la transcripción (+1), la región discriminadora y el elemento UP. Todos ellos son reconocidos por distintos dominios del factor  $\sigma$ , excepto el elemento UP, con el que interaccionan los dominios C-terminal de las subunidades  $\alpha$  (Figura I3) (Browning y Busby, 2016). No obstante, no todas las regiones están presentes en todos los promotores y existen múltiples variaciones sobre las posiciones exactas de las mismas. De hecho, la eficiencia con la que la ARN polimerasa se une al promotor e inicia la transcripción está determinada en gran medida por estas secuencias, el espacio entre ellas y su distancia del punto de inicio de la transcripción (Nelson *et al.*, 2005). La secuencia reconocida por  $\sigma^{70}$ -ARN polimerasa está conservada en la mayoría de bacterias y su consenso es TTGACA (región -35) y TATAAT (región -10) separados entre sí por 16-18 nucleótidos. Las secuencias de los promotores regulados por un mismo factor  $\sigma$  son variables, concordando 7-8 nucleótidos con la secuencia consenso, aunque los más similares suelen tener mayor expresión. También existe la posibilidad de que los promotores carezcan de una región -35 conservada y contengan la secuencia TGNTATAAT en la región -10, lo que se denomina región -10 extendida (Streips y Yasbin, 2002). Finalmente, el elemento UP es una región rica en A y T que se encuentra entre las posiciones -40 y -60 de genes con altos niveles de expresión (Nelson *et al.*, 2005). Los factores  $\sigma$  que interaccionan con promotores que presentan esta disposición son los más abundantes, están relacionados entre ellos estructural y evolutivamente y se clasifican dentro de la misma familia:  $\sigma^{70}$  (Paget, 2015; Paget y Helmann, 2003).  $\sigma^{70}$  o RpoD de *E. coli* da nombre a la familia por varias razones: es el factor  $\sigma$  mejor estudiado, es el mayoritario en la célula y promueve la transcripción constitutiva de una gran cantidad de genes. El grupo 1 de la familia está formado por factores  $\sigma$  de este tipo (*housekeeping* o primarios), que están presentes en todas las bacterias. El resto de grupos (2-4) incluye los denominados factores  $\sigma$  alternativos, que controlan grupos de genes relacionados con una función celular concreta, generalmente la respuesta a un estrés, mediante el reconocimiento de promotores distintos a los de  $\sigma^{70}$  (Feklistov *et al.*, 2014; Paget, 2015; Paget y Helmann, 2003). Los grupos mencionados difieren entre ellos en su función y en la presencia o ausencia de cuatro regiones conservadas ( $\sigma$ R1.1,  $\sigma$ R1.2-2.4,  $\sigma$ R3.0-3.2,  $\sigma$ R4.1-4.2) que se caracterizan por contener sus correspondientes dominios helicoidales ( $\sigma^{1.1}$ ,  $\sigma^2$ ,  $\sigma^3$  y  $\sigma^4$ ) (Figura I3). El dominio  $\sigma^1$  es el único que

no une ADN y su función es autoinhibitoria evitando su unión al promotor en ausencia de ARN polimerasa (Feklistov *et al.*, 2014).  $\sigma^2$  es el dominio más conservado y es crucial para la unión a la ARN polimerasa (por  $\sigma R2.2$ ) y para la estabilización del complejo abierto (unión de  $\sigma R2.3-2.4$  a la región -10 del promotor). Por otro lado,  $\sigma R1.2$  interacciona con la región discriminadora (situada inmediatamente en 3' de la región -10) y confiere inestabilidad al complejo cerrado, facilitando el acceso de (p)ppGpp durante el estrés de nutrientes y el intercambio de factores  $\sigma$  en la ARN polimerasa (Paget, 2015). El dominio  $\sigma^3$  interacciona con el surco mayor del ADN en la región extendida de -10 y estabiliza el complejo de iniciación cuando está ausente la región -35.  $\sigma^4$  se une a la ARN polimerasa y a la región -35. Este dominio sirve para el contacto con activadores transcripcionales que se unen en 5' de la región -35. La región que conecta  $\sigma^3$  y  $\sigma^4$  ( $\sigma R3.2$ ) atraviesa el sitio activo de ARN polimerasa y ocupa el sitio de salida del ARN naciente facilitando el inicio de la transcripción. Sin embargo, tras la adición de los primeros 4 nucleótidos del ARN es necesaria su disociación (Feklistov *et al.*, 2014; Paget, 2015).

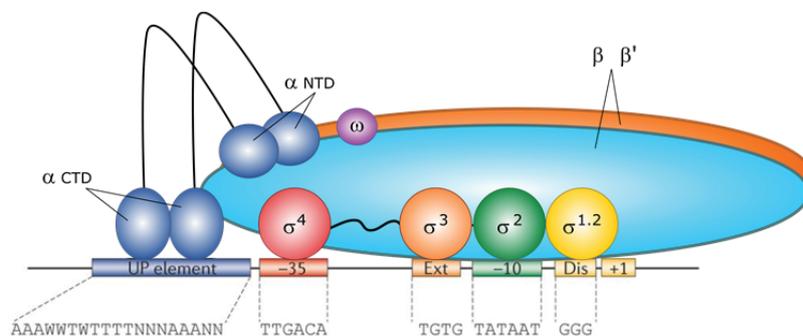


Figura 13. Holoenzima de  $\sigma^{70}$ -ARN polimerasa unida al promotor.

El *core* de la ARN polimerasa está formado por las subunidades  $\beta$  y  $\beta'$  (azul claro y naranja),  $\alpha$  (azul oscuro; dominios C-terminal (CTD) y N-terminal (NTD)) y el polipéptido  $\omega$  (violeta). La unión del factor  $\sigma$  forma el holoenzima y permite el reconocimiento del promotor. Los dominios  $\alpha$  CTD reconocen el elemento UP del promotor, mientras que las distintas subunidades del factor  $\sigma$  reconocen las regiones -35, -10 extendida, -10 y discriminadora (Dis). En la parte inferior de la figura se indican las secuencias consenso descritas para cada región el promotor. Adaptada de Browning y Busby (2016).

Los factores  $\sigma$  del grupo 1 poseen los 4 dominios descritos anteriormente, siendo el  $\sigma^{1.1}$  exclusivo de este grupo (Tabla I1). Algunos de ellos también presentan una región no conservada entre  $\sigma R1.2$  y  $\sigma R2.1$ , cuya longitud y composición varían y que está implicada en la unión al *core* de la polimerasa en *E. coli* (Feklistov *et al.*, 2014; Paget, 2015). El grupo 2 incluye factores  $\sigma$  estructuralmente muy similares a los del grupo 1, pero carecen de  $\sigma R1.1$ . Normalmente están relacionados con el estrés por falta de nutrientes u otros estreses relacionados con la entrada en la fase estacionaria de crecimiento, como  $\sigma^{38}$ /RpoS de *E. coli*, que es el mejor estudiado del grupo (Battesti *et al.*, 2011). Al ser tan similar a  $\sigma^{70}$ , los promotores que reconoce son parecidos, pero se diferencian en un nucleótido (C) situado en la posición -13 de la región -10 extendida (Paget, 2015). Los miembros del grupo 3 son diversos a nivel estructural y funcional, pero suelen contener los dominios  $\sigma^2$ ,  $\sigma^3$  y  $\sigma^4$ . Las secuencias de las regiones -35 y -10 que reconocen varían entre ellos y son diferentes a las reconocidas por los factores  $\sigma$  de los grupos 1 y 2, pudiendo unirse en algunos casos a regiones -10

extendidas (Paget, 2015). Este grupo se puede dividir en 4 subgrupos filogenéticamente diferentes pero funcionalmente relacionados: biosíntesis flagelar, respuesta al choque térmico, estrés general y esporulación (Paget, 2015). Cabe destacar el subgrupo que contiene factores  $\sigma$  relacionados con  $\sigma^{28}$ /FliA de *E. coli*, cuya función es activar la expresión de los genes tardíos de la cascada de la biosíntesis flagelar (Dasgupta *et al.*, 2003; Studholme y Buck, 2000). Estos están conservados en todas las bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, lo que los convierte en el grupo de factores  $\sigma$  alternativos más ampliamente distribuido (Paget, 2015). Otro factor  $\sigma$  de este grupo presente en *E. coli* es  $\sigma^{32}$ /RpoH, que se activa por la acumulación de proteínas desnaturalizadas en el citoplasma como consecuencia de un choque térmico u otros estreses (Meyer y Baker, 2011; Paget, 2015). Finalmente, el cuarto grupo de la familia  $\sigma^{70}$  se conoce como el grupo de los factores  $\sigma$  de función extracitoplasmática (ECF) (Lonetto *et al.*, 2019). Su denominación se debe a que responden a estímulos detectados en la membrana celular, en el periplasma o en el ambiente extracelular (Kazmierczak *et al.*, 2005; Mascher, 2013). Este grupo es con diferencia el más grande y diverso a nivel de secuencia primaria y puede regular procesos implicados en la respuesta a estrés de membrana, estrés oxidativo u homeostasis del hierro. Aunque es común encontrar múltiples factores  $\sigma$  de este tipo, no es habitual la regulación cruzada entre ellos (Feklistov *et al.*, 2014). Generalmente, están codificados en el genoma en una posición cercana a sus genes diana y su regulón suele ser pequeño. Estructuralmente son los más simples, ya que presentan únicamente los dominios  $\sigma^2$ , que incluso carece de la región  $\sigma R1.2$ , y  $\sigma^4$  (Paget, 2015). La regulación de este grupo de factores  $\sigma$  se detalla en la sección 1.4.5.

La otra gran familia de factores  $\sigma$  es la del factor  $\sigma$  alternativo  $\sigma^{54}$  o RpoN, que está presente en la mayoría de bacterias (Tabla I1). Tiene un origen evolutivo diferenciado de la familia de  $\sigma^{70}$  y su modo de acción, así como los promotores que reconoce, son diferentes (Browning y Busby, 2004, 2016).  $\sigma^{54}$  se une a nucleótidos situados en los elementos -24 (GG) y -12 (GC) que forman parte de la secuencia consenso YTGGCACGRNNNTTGCW (donde N representa cualquier nucleótido, Y las pirimidinas, R representa las purinas y W es A o T). Los elementos críticos para la unión de  $\sigma^{54}$  al promotor son la secuencia del elemento -12 y que la distancia entre -24 y -12 sea óptima (Bush y Dixon, 2012). La unión al promotor de  $\sigma^{54}$ -ARN polimerasa no es suficiente para formar el complejo abierto e iniciar la transcripción como ocurre con  $\sigma^{70}$ , sino que es necesaria la acción de unas proteínas denominadas proteínas bacterianas de unión a *enhancer* (bEBPs, *bacterial enhancer-binding proteins*) (Danson *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2016). Las bEBPs se unen en una región situada en 5' del promotor (a -100/-150 pb aproximadamente), oligomerizan y, gracias a su actividad ATPasa, remodelan el complejo cerrado a abierto, con lo que se inicia la transcripción. El dominio con actividad ATPasa pertenece a la familia AAA+ y contiene los motivos Walker, que permiten la unión e hidrólisis de ATP, así como el motivo GAFTGA, necesario para la interacción directa con  $\sigma^{54}$ . Dado que la distancia entre las regiones de unión de las bEBPs y del holoenzima es grande, su interacción requiere una curvatura en el ADN que suele facilitar IHF (*integration host factor*) (Bush y Dixon, 2012). La familia de  $\sigma^{54}$  se asoció en un principio con el control del metabolismo del nitrógeno, pero después se descubrió que regula funciones celulares tan diversas como la utilización de fuentes de carbono, metabolismo energético, transporte de aminoácidos,

quimiotaxis, biosíntesis del flagelo y virulencia, entre otras (Buck *et al.*, 2000; Reitzer y Schneider, 2001; Studholme y Buck, 2000).

Tabla I1. Factores  $\sigma$  de *E. coli* y sus características principales.

	Factor $\sigma$	Gen	Grupo	Dominios	Procesos regulados	
<i>Familia de <math>\sigma^{70}</math></i>						
Housekeeping	$\sigma^{70}$ ( $\sigma^D$ )	<i>rpoD</i>	1	$\sigma^4$ - $\sigma^3$ - $\sigma^2$ - $\sigma^{1(1.2-1.1)}$	Housekeeping	
	$\sigma^S$ ( $\sigma^S$ )	<i>rpoS</i> ( <i>katF</i> )	2	$\sigma^4$ - $\sigma^3$ - $\sigma^2$ - $\sigma^{1(1.2)}$	Fase estacionaria	
	$\sigma^{32}$ ( $\sigma^H$ )	<i>rpoH</i> ( <i>htpR</i> )	3	$\sigma^4$ - $\sigma^3$ - $\sigma^2$	Choque térmico	
Alternativos	$\sigma^F$ ( $\sigma^{28}$ )	<i>fliA</i>	3	$\sigma^4$ - $\sigma^3$ - $\sigma^2$	Síntesis y actividad flagelar	
	ECF	$\sigma^E$	<i>rpoE</i>	4	$\sigma^4$ - $\sigma^2$	Choque térmico extremo
		$\sigma^{fecl}$	<i>fecl</i>	4	$\sigma^4$ - $\sigma^2$	Transporte de hierro
	<i>Familia de <math>\sigma^{54}</math></i>					
	$\sigma^{54}$ ( $\sigma^N$ )	<i>rpoN</i> ( <i>ntrA</i> )	-	-	Metabolismo del nitrógeno	

Adaptada de Burgess (2001).

Los diferentes factores  $\sigma$  se unen al mismo sitio en la superficie de la ARN polimerasa, de manera que se produce entre ellos una competencia por dicha unión. En condiciones de ausencia de estrés,  $\sigma^{70}$  se encuentra unido a la ARN polimerasa activando las funciones *housekeeping* de la célula, hasta ser desplazado por algún factor  $\sigma$  alternativo cuando aumentan sus niveles (Browning y Busby, 2016; Osterberg *et al.*, 2011; Paget, 2015). La disponibilidad de los factores  $\sigma$  alternativos está controlada por numerosos mecanismos como son la modificación covalente, el secuestro por factores anti- $\sigma$ , la localización subcelular o su tasa de síntesis/degradación. En algunos casos, el factor anti- $\sigma$  puede participar en un proceso de *partner switching* al ser secuestrado, a su vez, por un factor anti-anti- $\sigma$  (Browning y Busby, 2004, 2016; Mascher, 2013). Además, se ha descrito que el segundo mensajero (p)ppGpp (también conocido como alarmona) interfiere en la actividad de la holoenzima  $\sigma^{70}$ -ARN polimerasa favoreciendo el desplazamiento de  $\sigma^{70}$  por los factores  $\sigma$  alternativos (Osterberg *et al.*, 2011).

### 1.1.2. Factores de transcripción

El término factor de transcripción se refiere a proteínas que se unen al promotor de un gen afectando la transcripción del mismo al modificar la capacidad de unión y/o la actividad de la ARN polimerasa y, a veces, también de otros factores (Browning y Busby, 2016). La unión de los factores de transcripción al promotor se produce gracias a que poseen dominios de unión a ADN típicos como los 'hélice-giro-hélice', los 'dedos de zinc' o las 'cremalleras de leucina' (Normand *et al.*, 2015).

Las bases del estudio de los factores de transcripción se iniciaron con el descubrimiento por F. Jacob y J. Monod de que la actividad del represor del operón de la lactosa se modulaba alostéricamente por la unión de un ligando (Jacob y Monod, 1961), lo que permitió entender cómo se podía modificar la expresión génica en

función de una señal externa (Balleza *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2012). Posteriormente se amplió el conocimiento sobre los factores de transcripción, mostrando que pueden ser represores, activadores o ambos y que pueden ejercer su regulación por mecanismos distintos a la regulación alostérica (Figura I4) (Visweswariah y Busby, 2015). Por ejemplo, los factores de transcripción que forman parte de sistemas de dos componentes suelen activarse por fosforilación (sección 1.4.2).

Tras numerosos estudios sobre diferentes factores de transcripción, se observó que era común que existiese autoregulación y/o coregulación entre ellos, y que algunos actuaban como reguladores globales (Browning y Busby, 2016; Lee *et al.*, 2012). Por ejemplo, *E. coli* posee alrededor de 300 factores de transcripción, 7 de los cuales (CRP, FNR, IHF, FIS, ArcA, NarL y Lrp) controlan de manera directa la expresión del 51% de los genes (Martinez-Antonio y Collado-Vides, 2003). Algunos de ellos, como FIS e IHF, habían sido descritos previamente como proteínas asociadas al nucleoide con la función de plegar y compactar el cromosoma (Browning *et al.*, 2010; Dillon y Dorman, 2010). De hecho Visweswariah y Busby (2015) proponen que los factores de transcripción tienen su origen evolutivo en este tipo de proteínas.

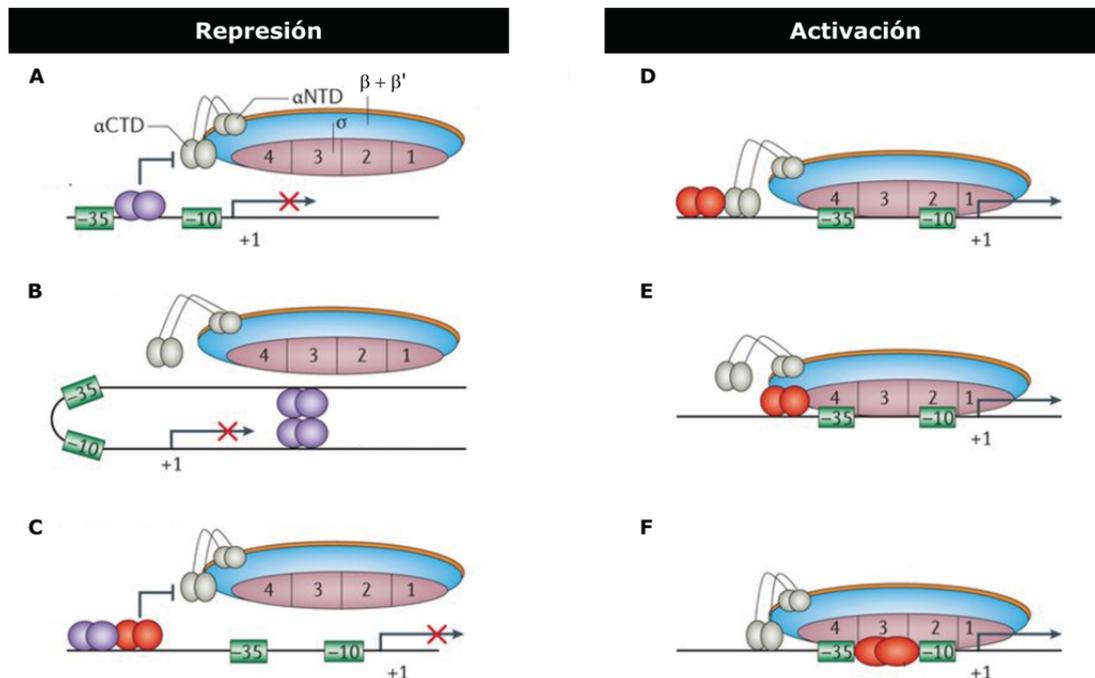


Figura I4. Mecanismos de represión y activación de promotores por factores de transcripción. Representación esquemática de diversos mecanismos de regulación de la actividad de promotores por factores de transcripción represores (morado) y activadores (rojo) utilizando el ejemplo de la holoenzima  $\sigma^{70}$ -ARN polimerasa de *E. coli*. La represión se produce al impedir la unión de la ARN polimerasa por la unión a esta del represor a un sitio que solapa con los elementos de reconocimiento del promotor (A), la formación de bucles por interacciones proteína-proteína entre represores que se unen a sitios en 5' y 3' del promotor (B) o el bloqueo del efecto de un activador (C). La unión del activador al promotor puede reclutar la ARN polimerasa mediante el contacto con el dominio C-terminal de las subunidades  $\alpha$  ( $\alpha$ CTD) (D), mediante interacciones con el dominio 4 del factor  $\sigma$  (E) o facilitando el reconocimiento de los elementos -35 y -10 (F). Tomada de (Browning y Busby, 2016).

## 1.2. Regulación postranscripcional

La regulación postranscripcional permite cambios rápidos en la síntesis de proteínas al actuar directamente sobre un ARNm que ya ha comenzado a sintetizarse. Este proceso es esencial bajo condiciones de estrés o durante el desarrollo de la infección en patógenos, por lo que es común que se regulen ARNm de reguladores implicados en esos procesos (Gottesman, 2019; Grenga *et al.*, 2017; Quereda y Cossart, 2017). Los mecanismos más comunes de este tipo de regulación en bacterias incluyen estructuras reguladoras que están en el propio ARNm, ARNnc, proteínas de unión a ARN o la activación/bloqueo de la degradación por ARNasas (Meyer, 2017).

Las moléculas de ARNm forman estructuras secundarias por las interacciones entre sus bases nitrogenadas y algunas de ellas pueden ser determinantes para su estabilidad o traducción, por lo que su formación/desaparición constituye una forma de regulación. Los *riboswitches* son estructuras reguladoras, situadas normalmente en la región 5' no traducida (5'-UTR, 5' *untranslated region*) del ARNm, que sufren cambios conformacionales dependientes de la temperatura, el pH o la unión de ligandos (Sherwood y Henkin, 2016; Waters y Storz, 2009). Un ejemplo de ARNm termorregulado es el que codifica el factor  $\sigma$   $\sigma^{32}$ /RpoH de *E. coli*, que forma una estructura que dificulta el acceso del ribosoma a bajas temperaturas, pero que se deshace con el aumento de temperatura, lo que permite su traducción (Figura I5) (Kortmann y Narberhaus, 2012).

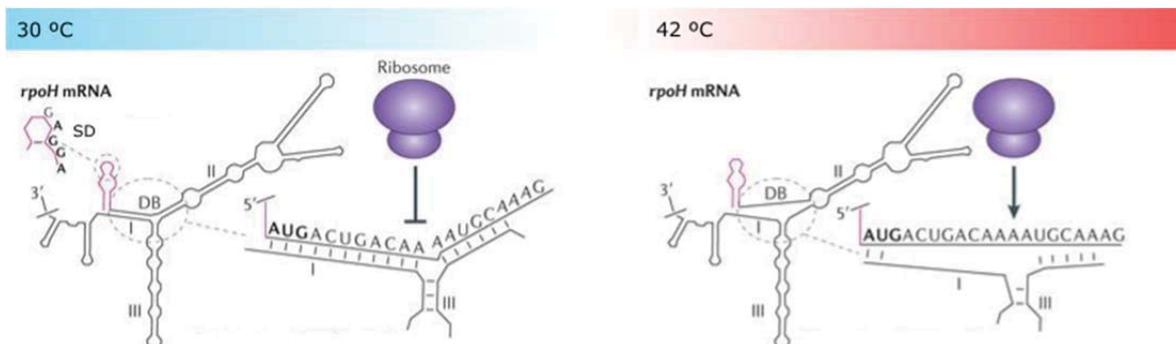


Figura I5. Termorregulación de la traducción de *rpoH*.

A bajas temperaturas (30°C), el ARNm de *rpoH* forma una horquilla (III) que provoca un plegamiento en la caja (DB) situada en 3' del sitio de unión del ribosoma (SD, secuencia Shine-Dalgarno) e interfiere con la unión del mismo. Además, el secuestro del codón de inicio AUG (negrita) por la estructura I impide el inicio de la traducción. El aumento de temperatura a 42°C desnaturaliza las estructuras I y III, por lo que el codón de inicio y la región DB se liberan produciéndose la traducción. Modificada de Kortmann y Narberhaus (2012).

El ARN es poco estable químicamente, por lo que los ARNm tienen vidas medias bajas (1-15 min) y las variaciones en su tasa de degradación afectan significativamente a la expresión génica. Las ARNasas son proteínas implicadas en el procesamiento y degradación del ARN, siendo la ARNasa E la más relevante para el metabolismo de estas moléculas en *E. coli*. Los cambios en la estructura del ARNm o la unión de reguladores a los transcritos afectan al reconocimiento por esta enzima y también constituyen un método de regulación (Bossi y Figueroa-Bossi, 2016; Mackie, 2012).

Los ARNnc se clasifican en dos categorías: *cis*, cuando están codificados en la cadena complementaria al ARNm que regulan y *trans*, cuando se expresan desde una región del genoma distinta a sus ARNm diana (Figura I6). Los ARNnc *cis*, tras transcribirse, se aparean con el ARNm complementario y bloquean su traducción (Storz *et al.*, 2011; Waters y Storz, 2009). Los ARNnc *cis* estudiados hasta la fecha están implicados en el control del número de copias de elementos móviles (plásmidos o transposones) o de la expresión de ARNm que codifican toxinas o proteínas tóxicas a altos niveles. También pueden unirse al transcrito de un operón en las regiones intergénicas provocando una expresión diferencial de las proteínas codificadas (Bertram y Schuster, 2014; Saberi *et al.*, 2016; Waters y Storz, 2009). Por otro lado, los ARNnc *trans* pueden regular a múltiples transcritos al presentar menor complementariedad con sus ARNm diana. Pueden actuar como *antisense* por un mecanismo similar a los ARNnc *cis* o competir con los ARNm diana por proteínas de unión a ARN (Gottesman y Storz, 2011; Waters y Storz, 2009). La proteína de unión a ARN Hfq forma parte de una red global de control postranscripcional facilitando la interacción entre los ARNnc *trans* y sus correspondientes ARNm diana (Hor *et al.*, 2018; Vogel y Luisi, 2011), pero también puede actuar independientemente como represor de la traducción al unirse a diferentes ARNm en ausencia de ARNnc (Kavita *et al.*, 2018).

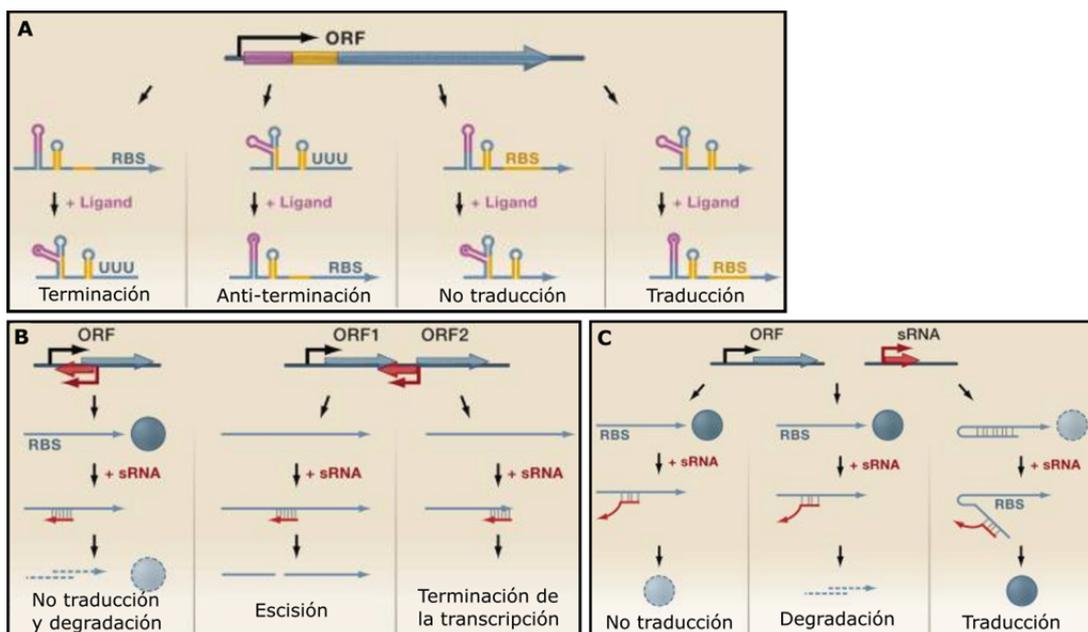


Figura I6. Disposición génica y mecanismos de regulación de *riboswitches* y ARN reguladores.

A. Los *riboswitches* están formados por una región que reconoce un ligando (rosa) cuya unión provoca cambios conformacionales que se transmiten a otras regiones del ARNm (amarillo) e interfieren con la terminación de la transcripción y/o la traducción. B. Los ARNnc *cis* (rojo) están codificados solapando parcialmente con una ORF (izquierda) o con la región intergénica de un operón (derecha). Tras aparearse con sus ARNm diana (azul) pueden afectar a diversos procesos: traducción, degradación o procesamiento del ARNm y la terminación de la transcripción. C. Los ARNnc *trans* (rojo) están codificados en genes separados en el genoma. Tras aparearse con una baja afinidad a su ARNm diana (azul), alteran su traducción y/o degradación por su unión directa o por provocar cambios en la estructura. Se señala el sitio de unión del ribosoma (RBS, *ribosome binding sequence*) o secuencia SD y el terminador (UUU). Adaptada de Waters y Storz (2009).

Las proteínas de unión a ARN están muy conservadas en todos los organismos vivos y contienen dominios de unión a ARN muy diversos. En bacterias, la mayoría de proteínas de unión a ARN forman parte del ribosoma o están implicadas en el metabolismo de ARNr y ARNt. Sin embargo, en los últimos años se ha descubierto la relevancia de proteínas como Hfq, ProQ, CsrA o RapZ (revisado en Holmqvist y Vogel (2018)) en la regulación postranscripcional. Estas ejercen su regulación modificando la unión del ribosoma al ARNm, alterando el reconocimiento y degradación por ARNasas; facilitando su reconocimiento por ARN reguladores o cambiando su estructura; como se mencionó anteriormente para Hfq (Figura I7) (Holmqvist y Vogel, 2018; Hor *et al.*, 2018; Van Assche *et al.*, 2015). En este escenario, un ARN regulador puede unirse a múltiples ARNm, un ARNm puede estar regulado por varios ARNnc y, en algunos casos, también están implicadas proteínas de unión a ARN. Las relaciones complejas de competición que se producen por la unión entre ellos resulta en una regulación cruzada sobre los ARNm diana (Bossi y Figueroa-Bossi, 2016).

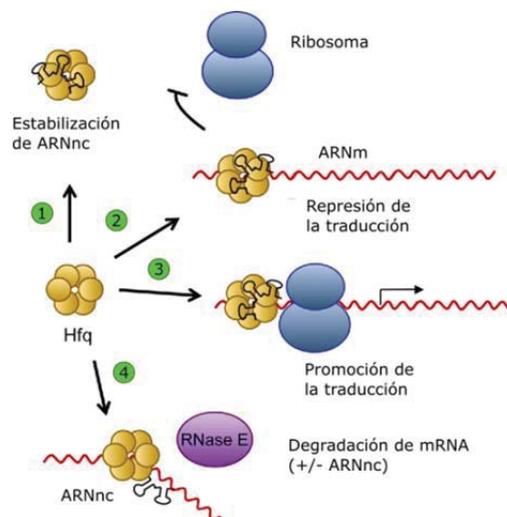


Figura I7. Regulación postranscripcional por la proteína Hfq.

La proteína de unión a ARN Hfq une ARNnc estabilizándolos (1) o promoviendo el reconocimiento de su ARNm diana para reprimir (2) o promover (3) la traducción. También puede intervenir en la degradación permitiendo o bloqueando el acceso de ARNasas al unirse al ARNm en ausencia o en presencia de un ARNnc (4). Modificada de Grenga *et al.* (2017).

### 1.3. Regulación postraducciona

Cuando una proteína ha sido sintetizada por el ribosoma puede sufrir modificaciones covalentes (reversibles o irreversibles) o no covalentes para llegar a una forma final activa o para adquirir una localización celular concreta. Estas modificaciones incluyen la eliminación de aminoácidos por procesamiento enzimático (proteólisis), la adición de grupos funcionales (acetilo, fosforilo, metilo o carboxilo, entre otros) y/o de otras moléculas, como lípidos y oligosacáridos o grupos prostéticos de distinta naturaleza (Cain *et al.*, 2014; Nelson *et al.*, 2005). Por tanto, el control de estas modificaciones constituye un mecanismo de regulación postraducciona. De entre ellas cabe destacar la fosforilación/desfosforilación (unión/eliminación de un grupo fosforilo) llevada a cabo por proteínas quinasas/fosfatasa, por ser una forma muy común de regulación de

enzimas metabólicas y de cascadas de regulación involucradas en la transducción de señales (Pisithkul *et al.*, 2015; Stock *et al.*, 2000).

La proteólisis es una modificación postraduccional irreversible que consiste en la degradación de proteínas por la acción de proteasas y peptidasas. Se puede diferenciar entre una proteólisis inespecífica, que degrada proteínas dañadas o mal plegadas, y una proteólisis regulada, que se produce sobre proteínas concretas en función de señales específicas (Gur *et al.*, 2011). El proceso denominado proteólisis intramembrana regulada (RIP, *regulated intramembrane proteolysis*) está implicado en la transducción de señales a través de membrana y consiste en la ruptura de una proteína transmembrana para liberar un dominio regulador con una función biológica concreta (Brown *et al.*, 2000).

Otro mecanismo habitual de regulación de la actividad proteica es el secuestro por otras proteínas o ARN reguladores, que también pueden competir directamente por el acceso a los sustratos o las moléculas diana con las que interaccionan. Este mecanismo, ya descrito en apartados previos de esta sección, es el que tiene lugar, por ejemplo en la interacción de las proteínas de unión a ARN con ARN reguladores y en los sistemas factor  $\sigma$ /anti- $\sigma$  (Hor *et al.*, 2018; Paget, 2015). En el caso de las enzimas es común la regulación alostérica, que consiste en la unión de un ligando a un sitio que afecta a las propiedades de unión o catálisis en otro sitio de la enzima (Eoh y Rhee, 2014).

#### 1.4. Sistemas de transducción de señales

Los sistemas de transducción de señales transforman un estímulo externo o interno, físico o químico en señales de tipo bioquímico que modifican la respuesta génica (Hengge *et al.*, 2016; Jung *et al.*, 2018; Stock *et al.*, 2000). Dentro de los mecanismos de transducción de señales procariontas se encuentran los ECF, las enzimas que sintetizan o degradan segundos mensajeros, los sistemas de *quorum sensing*, los sistemas quimiotácticos y los sistemas de uno o dos componentes (Galperin, 2018).

El número de proteínas transductoras de señales (o su porcentaje dentro del total de proteínas) sirve para estimar la capacidad de adaptación a condiciones cambiantes y se denomina coeficiente de inteligencia bacteriano (*bacterial IQ*), mientras que el ratio entre los receptores transmembrana y los sensores intracelulares estima si la bacteria está más centrada en detectar señales ambientales o en su homeostasis interna (Galperin, 2005; Galperin *et al.*, 2010). De esta manera, los sistemas de señalización presentes en parásitos intracelulares y otros organismos que viven en nichos ecológicos estables son escasos y poco complejos, mientras que son más abundantes y complejos en microorganismos ambientales (Tabla I2).

Tabla I2. Sistemas de transducción de señales presentes en el genoma de diversas bacterias.

Cepa	Genoma		Sistemas de transducción de señales					Total
	Número de acceso	Tamaño (Mpb)	OCS	TCS	Quimio-taxis*	ECF	Otros	
<i>Mycoplasma genitalium</i>	GCF_000027325.1	0,58	5	0	0	0	2	7
<i>Legionella pneumophila</i>	GCF_000008485.1	3,40	93	27	0	2	7	129
<i>Anabaena sp.</i>	GCF_000312705.1	5,31	101	59	8	3	14	190
<i>Salmonella enterica</i>	GCF_000006945.2	4,95	158	42	12	2	11	225
<i>Escherichia coli</i>	GCF_000005845.2	4,64	251	61	10	3	21	345
<i>Yersinia enterocolitica</i>	GCF_000009345.1	4,68	245	62	18	4	23	352
<i>Bacillus subtilis</i>	GCF_000009045.1	4,22	239	70	18	11	17	355
<i>Xanthomonas campestris</i>	GCF_000007145.1	5,08	178	106	43	11	18	356
<i>Vibrio cholerae</i>	GCF_000006745.1	4,03	213	86	65	5	19	388
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	GCF_000023605.1	4,86	274	58	43	9	26	410
<i>Pseudomonas entomophila</i>	GCF_000026105.1	5,89	347	126	52	22	18	565
<i>Pseudomonas syringae</i>	GCF_000007805.1	6,54	324	133	74	10	29	570
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	GCF_000006765.1	6,26	423	132	48	23	29	655
<i>Myxococcus xanthus</i>	GCF_000012685.1	9,14	299	263	59	55	34	710
<i>Pseudomonas protegens</i>	GCF_000397205.1	6,87	484	165	61	30	27	767
<i>Streptomyces coelicolor</i>	GCF_000203835.1	9,06	755	198	1	58	43	1055

\*Incluye todas las proteínas de la ruta de señalización. Fuente: mistdb.com

#### 1.4.1. Sistemas de un componente

Los sistemas de un componente (OCS) son los mecanismos mayoritarios de transducción de señales en procariontes. Están formados por proteínas que permiten la transmisión directa de estímulos gracias a su simplicidad, ya que contienen en la misma molécula el dominio sensor/receptor de la señal y el regulador/efector (Figura I8). Al contrario que otros sistemas de transducción de señales, estas no suelen participar en rutas complejas o sufrir modificaciones covalentes o fosforilaciones (Ulrich *et al.*, 2005; Wuichet *et al.*, 2010). La señalización comienza cuando el dominio receptor reconoce el estímulo correspondiente, tras lo que se produce un cambio conformacional que activa el dominio regulador. Los dominios sensores más abundantes son los que reconocen pequeñas moléculas (dominios tipo LysR, AraC, PAS o GAF), mientras que los dominios reguladores suelen ser de unión a ADN (el 80% de OCS contienen un dominio hélice-giro-hélice) o de síntesis y/o degradación de segundos mensajeros nucleotídicos. Su localización es fundamentalmente citoplasmática, donde reconocen señales intracelulares o moléculas que difunden a través de la membrana, y actúan generalmente como factores de transcripción (Galperin, 2004; Ulrich *et al.*, 2005). Sin embargo, un 3% de los OCS descritos están integrados en la membrana. Los mejor conocidos pertenecen a la familia de ToxR, que contienen un dominio N-terminal de unión a ADN que regula la transcripción, una hélice transmembrana y un dominio C-terminal sensor situado en el periplasma (Jung *et al.*, 2018; Schlundt *et al.*, 2017).

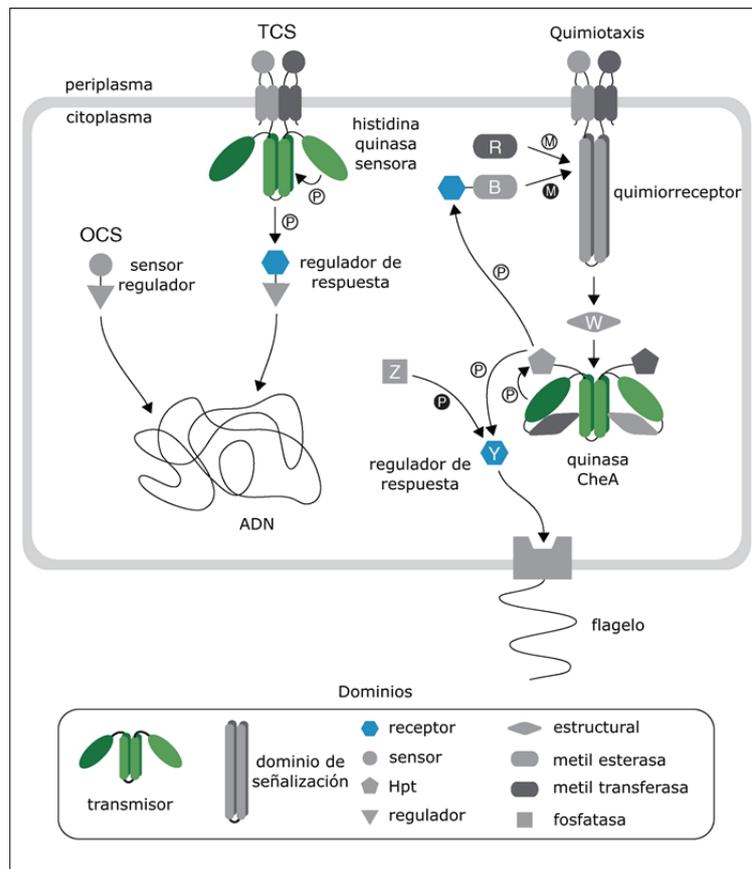


Figura I8. Transducción de señales por sistemas de uno y dos componentes y por quimiotaxis.

La mayoría de sistemas de un componente (OCS) son citoplasmáticos y actúan como factores de transcripción. Están formados por una única proteína que contiene un dominio sensor (círculo) y un dominio regulador (triángulo). Los sistemas de dos componentes (TCS) están formados por una histidina-quinasa sensora integrada en la membrana plasmática y un regulador de respuesta citoplásmico. Cuando el dominio sensor (círculo) de la histidina-quinasa reconoce un estímulo, el dominio histidina quinasa (verde) se autofosforila y transfosforila el dominio receptor (azul) del regulador de respuesta activándolo. El regulador de respuesta activo se une al ADN por su dominio regulador (triángulo), actuando como factor de transcripción. Los sistemas quimiotácticos están formados por receptores quimiotácticos que regulan la fosforilación de la histidina-quinasa CheA en función de estímulos externos. CheA fosforilada es activa y transfiere su grupo fosforilo al regulador de respuesta CheY que, a su vez, actúa sobre el motor flagelar para regular la motilidad. La ruta está modulada por múltiples componentes mediante transferencias de grupos metilo (M) y fosforilo (P). La metilación por CheR, desmetilación por CheB y la desfosforilación por CheZ. La proteína CheW controla la autofosforilación de CheA y estabiliza el complejo quimiorreceptor-CheA. Se representa en color blanco la adición del grupo funcional y en negro, su eliminación. Adaptada de Wuichet *et al.* (2010).

#### 1.4.2. Sistemas de dos componentes

Un sistema de dos componentes (TCS) prototípico consiste en una histidina-quinasa (HK) integrada en la membrana, que percibe el estímulo, y un regulador de respuesta (RR) citoplasmático, que media la respuesta (Figura I8). Tras la detección de la señal o señales, la proteína sensora se autofosforila en una histidina (H) y activa al RR por fosfotransferencia a un residuo de aspartato (D), que funciona entonces como regulador transcripcional de uno o más genes (Heeb y Haas, 2001; Jung *et al.*, 2012; Stock *et al.*, 2000). La HK presenta dos dominios funcionales: un dominio N-terminal sensor variable que reconoce un ligando específico y un dominio C-terminal más conservado que se encarga de la transmisión de la señal. A su vez, el dominio transmisor puede dividirse en dos partes: el dominio de dimerización y fosfotransferencia a histidina

(*dimerization and histidine phosphotransfer domain*, DHp); y el dominio catalítico unión a ATP (*catalytic and ATP-binding domain*, CA) (Groisman, 2016; Jung *et al.*, 2012).

Según la organización básica de sus dominios transmisores, las HK se agrupan en clase I y clase II (Figura I9). En las HK de clase I, el dominio DHp está conectado mediante una región de unión más o menos flexible al dominio CA, mientras que las HK de clase II contienen un dominio de fosfotransferencia a histidina (*histidine phosphotransfer domain*, Hpt) en lugar del DHp, el cual está separado del dominio catalítico por un dominio de entrada y un dominio de dimerización (Dim) extra. Además, los dominios reguladores (Reg) que modulan la señalización son típicos de las HK de clase II. Por otro lado, dentro de las HK de clase I destacan las HK híbridas, típicas de las cadenas de fosforilación. En ellas están presentes dominios adicionales, receptor y Hpt, a los que se transfiere el grupo fosfato antes de llegar al receptor de respuesta. El dominio Hpt, en algunos casos, puede estar presente en una proteína independiente de la HK (Jung *et al.*, 2012; Wuichet *et al.*, 2010).

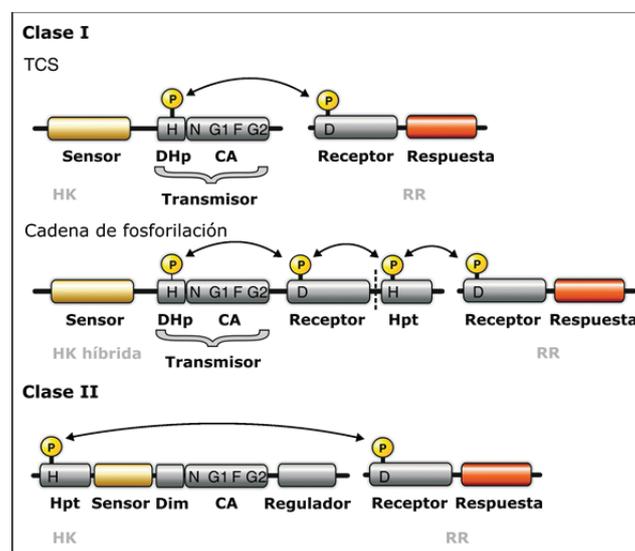


Figura I9. Organización estructural y señalización en sistemas de dos componentes.

En las HK de clase I, la parte transmisora está compuesta por el dominio DHp conectado al dominio catalítico de unión a ATP (CA). En las HK de clase II, el dominio de Hpt está separado del dominio CA por el dominio sensor y un dominio de dimerización extra (Dim). Los sistemas de dos componentes (TCS) prototípicos se caracterizan por una única fosfotransferencia (H→D), mientras que las cadenas de fosforilación (en las que participan HK híbridas) presentan múltiples reacciones de fosfotransferencia (H→D→H→D). Los sitios de fosforilación son: H, histidina y D, aspartato. Adaptada de Jung *et al.* (2012).

En general, las HK sensoras son proteínas integrales de membrana homodiméricas que detectan la señal gracias a un bucle extracelular. Sin embargo, algunas detectan perturbaciones en la membrana o señales intracelulares y su dominio sensor está localizado en la membrana o dentro del citoplasma, respectivamente. Dada la variedad de estímulos que son reconocidos por un número igualmente diverso de HK, los dominios sensores no son similares a nivel de secuencia primaria (Ali-Ahmad *et al.*, 2017; Jung *et al.*, 2012; Mascher *et al.*, 2006; Perry *et al.*, 2011). Por ello, es común desconocer el ligando de una HK incluso en sistemas bien estudiados donde se conocen en detalle la cascada de señalización y los procesos celulares que regula (Fernandez *et al.*, 2016; Perry *et al.*, 2011).

El RR posee un dominio receptor, que es fosforilado por la HK, y uno o varios dominios de respuesta, incluyendo dominios de unión al ADN de tipo hélice-giro-hélice (Jung *et al.*, 2012; Stock *et al.*, 2000). Los RR actúan como interruptores que se activan por fosforilación en un residuo de aspartato (Figura I9), sufriendo un cambio conformacional que les permite unirse al ADN y activar la transcripción de determinados genes o realizar otras funciones (Perry *et al.*, 2011; Zschiedrich *et al.*, 2016).

#### 1.4.3. Sistemas quimiotácticos

Muchos procariontes móviles son capaces de detectar gradientes espaciales de sustancias químicas, pH, osmolaridad, temperatura o potencial redox, y desplazarse hasta encontrar las condiciones ambientales más favorables fisiológicamente para ellos. Los sistemas quimiotácticos juegan un papel clave en este proceso, ya que integran varios estímulos de este tipo y coordinan el sistema flagelar y otros mecanismos de motilidad para producir un movimiento neto (Bi y Sourjik, 2018; Tu, 2013; Wuichet *et al.*, 2007).

Los sistemas quimiotácticos controlan dos rutas: la ruta de excitación que resulta en la interacción con los mecanismos de motilidad y la ruta de adaptación, que proporciona un mecanismo para la memoria molecular (Wuichet *et al.*, 2007). Los receptores de la señal son proteínas de quimiotaxis aceptadoras de grupos metilo (*methyl-accepting chemotaxis proteins*, MCP) que se asocian formando grupos hexagonales denominados complejos quimiosensores. Estas estructuras destacan por su alta sensibilidad para detectar ligandos, la cooperatividad entre docenas de receptores acoplados, su estabilidad y la rapidez de señalización (milisegundos) (Falke y Piasta, 2014; Hazelbauer *et al.*, 2008). Los complejos quimiosensores, además de los quimiorreceptores, incluyen la histidina-quinasa de clase II CheA y la proteína estabilizadora CheW, que controla la autofosforilación de CheA y la estabilidad del complejo. En la ruta modelo de *E. coli*, las MCP controlan la fosforilación de CheA en función de los estímulos externos y esta dona el grupo fosforilo al regulador de respuesta citoplasmático CheY para activarlo e inducir la rotación del motor flagelar (Figura I8). Muchos sistemas quimiotácticos poseen una o más fosfatasa (CheC, CheX y/o CheZ) en la ruta de excitación que contribuyen a la desfosforilación de CheY. Tras la respuesta inicial, las células pueden adaptarse a un estímulo persistente mediante el ajuste de los niveles de metilación del receptor por la ruta de adaptación. La metiltransferasa CheR metila el receptor en una conformación quinasa apagada y CheB desmetila receptores en modo quinasa encendida, lo que provoca variaciones en la actividad de CheA (Bi y Sourjik, 2018; Wuichet *et al.*, 2007).

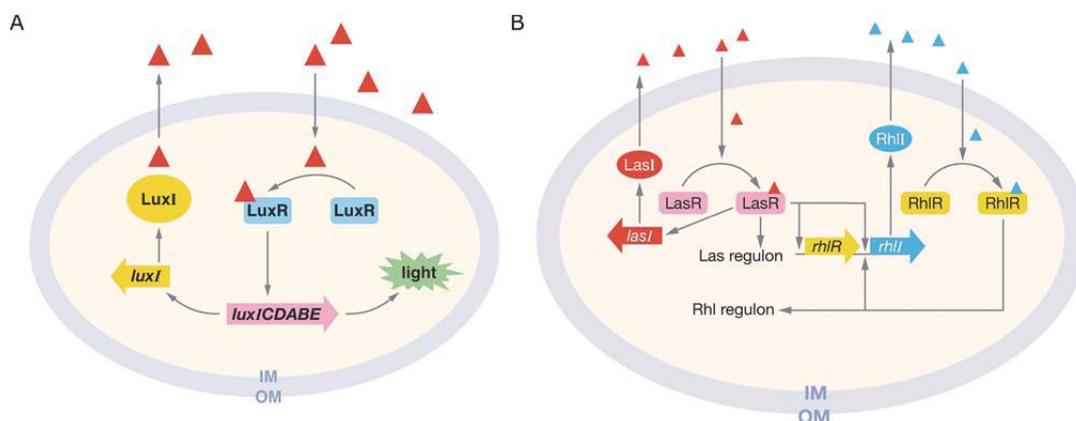
#### 1.4.4. Quorum sensing

El *quorum sensing* (QS) es un mecanismo de comunicación célula-célula que permite detectar los niveles poblacionales del entorno, propios o ajenos, a través de señales que difunden a través de la membrana plasmática y se acumulan en el medio (Troselj *et al.*, 2018; Waters y Bassler, 2005). La mayoría de procesos controlados por QS, como la bioluminiscencia, la virulencia, la producción de antibióticos, la motilidad social o

la esporulación, son improductivos si los llevan a cabo células individuales, pero beneficiosos cuando los realiza una población grande (Papenfort y Bassler, 2016; Waters y Bassler, 2005).

Las señales de QS, denominadas de forma general autoinductores, pueden ser de distinta naturaleza: en bacterias Gram-negativas suelen ser homoserín-lactonas aciladas (AHL) y en Gram-positivas, oligopéptidos cortos con distintas modificaciones químicas (Abisado et al., 2018). Las AHL fueron descritas por primera vez en los años 1960-70 en el sistema descubierto por J. W. Hastings, donde la bacteria marina *Vibrio fischeri* no producía bioluminiscencia hasta llegar a altas densidades celulares (Nealson et al., 1970).

La señalización clásica del QS está representada por el sistema LuxI/LuxR de *Vibrio* (Figura I10A) y se basa en dos componentes: los homólogos de LuxI, que catalizan la síntesis de AHL, y los homólogos de LuxR, que reconocen específicamente las AHL producidas por el primero (Waters y Bassler, 2005; Whiteley et al., 2017). Los reguladores de tipo LuxR presentan un dominio N-terminal de unión a ligando y un dominio C-terminal de unión a ADN. La mayoría de proteínas tipo LuxR no se pliegan correctamente y se degradan rápidamente en ausencia de la señal, mientras que el complejo con esta las estabiliza y permite su actuación como factores de transcripción (Hawver et al., 2016). El 76% de las proteínas anotadas como LuxR no tienen una sintetasa tipo LuxI asociada, siendo común la detección de moléculas de QS producidas por organismos distanciados filogenéticamente. Algunos de ellos incluso presentan variaciones en los dominios de unión con respecto a los que unen AHL, por lo que podrían estar dedicados a la detección de otros tipos de señales ambientales (Hawver et al., 2016; Papenfort y Bassler, 2016; Whiteley et al., 2017).



**Figura I10. Sistemas de quorum sensing canónicos en *Vibrio* y *Pseudomonas*.**

**A.** Sistema LuxI/LuxR en *V. fischeri*. El autoinductor (triángulo rojo) sintetizado por LuxI se acumula en el medio de cultivo hasta que alcanza niveles suficientes para estabilizar al regulador LuxR, que entonces promueve la transcripción del operón *luxICDABE* para producir luminiscencia. **B.** *P. aeruginosa* posee dos sistemas tipo LuxI/LuxR: LasI/LasR y RhlI/RhIR, que se activan cada uno por su correspondiente autoinductor (triángulos rojo y azul, respectivamente). LasR activo induce la transcripción de múltiples genes incluyendo *lasI*, lo que genera un bucle de retroalimentación positiva, y además activa la expresión de *rhIR* y *rhII*. RhIR activo promueve la transcripción de su propio regulón. Estos sistemas están dispuestos en serie, dado que la activación del sistema RhlI/RhIR es dependiente de la activación previa de LasI/LasR. IM y OM significan membrana interna y externa, respectivamente. Tomada de Waters y Bassler (2005).

Una misma cepa puede poseer múltiples rutas de QS, por ejemplo *P. aeruginosa* posee dos sistemas autoinductores canónicos de AHL (Figura 110) y dos con autoinductores no AHL, mientras que *V. harveyi* posee tres autoinductores (una AHL y dos moléculas atípicas), cada uno de ellos con una función particular: comunicación intraespecífica, intragénero e interespecífica (Defoirdt, 2018; Defoirdt *et al.*, 2008; Papenfort y Bassler, 2016). Por tanto, además del sistema tipo LuxI/LuxR donde existe una relación 'uno a uno' entre el autoinductor y el regulador, también puede suceder que una misma proteína LuxR reconozca varias señales y que varias actúen en paralelo o de forma jerárquica para regular un determinado proceso (Hawver *et al.*, 2016; Papenfort y Bassler, 2016).

#### 1.4.5. Factores $\sigma$ extracitoplasmáticos (ECF)

La actividad de los ECF depende de estímulos externos generalmente detectados y transmitidos por sistemas de señalización situados en la membrana bacteriana (revisado en Mascher (2013)). La variabilidad observada en los ECF a nivel de su secuencia aminoacídica y de los promotores que reconocen se extiende también a los mecanismos que regulan su actividad. El mecanismo más extendido es el secuestro por factores anti- $\sigma$  anclados a la membrana, que lo liberan tras la activación de cascadas proteolíticas que los degradan (Bastiaansen *et al.*, 2015; Llamas *et al.*, 2014; Pinto *et al.*, 2019). Otros modos de regulación son los cambios conformacionales de factores anti- $\sigma$  solubles, la activación transcripcional por TCS, las interacciones proteína-proteína, la fosforilación por serina o treonina por quinasa o las extensiones reguladoras (Mascher, 2013; Otero-Asman *et al.*, 2019). Estas últimas se han descubierto recientemente en ECF que no poseen un factor anti- $\sigma$  asociado y cuya activación depende de los cambios conformacionales producidos tras la unión de un ligando a la extensión C terminal (Pinto *et al.*, 2019).

#### 1.4.6. Segundos mensajeros

Los segundos mensajeros son moléculas pequeñas que se sintetizan o degradan en el interior celular como respuesta a una señal primaria detectada generalmente en el exterior celular, aunque también puede ser interna. Pueden regular de diferentes formas la expresión génica mediante su unión a factores de transcripción o *riboswitches*, así como la actividad de enzimas a nivel alostérico (Pesavento y Hengge, 2009; Romling *et al.*, 2013). En bacterias se ha estudiado con más profundidad el papel de los segundos mensajeros nucleotídicos cAMP, (p)ppGpp y c-di-GMP, aunque el nivel de conocimiento sobre su metabolismo y señalización todavía dista del alcanzado en eucariotas (Kalia *et al.*, 2013; Pesavento y Hengge, 2009).

El (3',5')-bis-guanosina monofosfato cíclico, diguanilato cíclico o c-di-GMP controla la transición entre distintas fases del ciclo celular, modo de vida sésil y planctónico o virulencia aguda y crónica (Hengge, 2009; Romling *et al.*, 2013). En función de las señales externas, el c-di-GMP se sintetiza por la acción de diguanilato ciclasas (DGC) a partir de dos moléculas de guanosina trifosfato (GTP) y se degrada por la actividad de fosfodiesterasas (PDE) (Hengge, 2009; Jenal y Malone, 2006; Romling *et al.*, 2013). La actividad DGC está asociada al dominio GGDEF, que lleva el nombre de la secuencia de aminoácidos que une el c-di-GMP (Ausmees *et al.*, 2001), mientras que la actividad PDE es debida a dominios EAL y HD-GYP (Romling *et al.*,

2013). Los efectores a los que se une el c-di-GMP carecen, salvo algunas excepciones, de un dominio característico como el de las enzimas de síntesis y degradación, lo que ha ralentizado su identificación (Hengge, 2009; Romling *et al.*, 2013). El c-di-GMP se une a proteínas efectoras con dominios PilZ ejerciendo una regulación postraduccional, a factores de transcripción modificando su unión al ADN y proteínas con dominios GGDEF y EAL degenerados que ejercen su regulación por diversos mecanismos. Además, regula la expresión génica y controla la traducción por su unión a distintos *riboswitches* (Sondermann *et al.*, 2012).

El (3',5')-adenosina monofosfato cíclico, adenilato cíclico o cAMP se sintetiza por la adenilato ciclasa CyaA y ejerce su función principalmente uniéndose al factor de transcripción CRP, que activa la expresión génica. Su degradación la lleva a cabo la fosfodiesterasa CpdA. Los fenotipos controlados por cAMP varían entre grupos bacterianos, aunque el mejor conocido es el control del metabolismo alternativo de azúcares en *E. coli* (Hengge *et al.*, 2016; Kalia *et al.*, 2013; Pesavento y Hengge, 2009).

Las guanosinas tetra y pentafofosfato, (p)ppGpp o 'alarmonas' son los principales mensajeros de la respuesta estricta (*stringent response*) en cloroplastos y bacterias, un mecanismo que coordina funciones pleotrópicas de adaptación a la escasez de nutrientes y a otras condiciones de estrés (Irving y Corrigan, 2018; Potrykus y Cashel, 2008; Steinchen y Bange, 2016). Su síntesis tiene lugar por la transferencia de un grupo pirofosforilo del ATP a GTP o GDP y su degradación, por la reacción contraria. Las sintetetas e hidrolasas implicadas en su metabolismo pertenecen a la superfamilia RSH (RelA/SpoT *homolog*), que adquiere su nombre de las enzimas RelA (sintetasa) y SpoT (enzima bifuncional) de *E. coli* por ser las primeras descubiertas (Irving y Corrigan, 2018). Las (p)ppGpp se unen a la ARN polimerasa afectando de forma global a la transcripción, viéndose acentuado su efecto cuando se unen también a la proteína DksA. Otro modo de acción es su unión a proteínas de unión a nucleótidos (proteínas G) para regular la traducción (Pesavento y Hengge, 2009).

### 1.5. La ruta Gac-rsm

La ruta Gac-rsm está presente en *Pseudomonas* y otras muchas  $\gamma$ -proteobacterias, como *Azotobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Legionella*, *Pectobacterium*, *Salmonella*, *Vibrio*, *Xanthomonas* o *Yersinia*. Además, algunos componentes pueden encontrarse de manera aislada en otros grupos bacterianos, como es el caso de la proteína CsrA en *Bacillus subtilis* y *Sinorhizobium meliloti* (Tabla I3). La señalización comienza a nivel de la membrana plasmática cuando un TCS recibe una señal y activa la transcripción de ARN reguladores cuya función es secuestrar a una familia de proteínas de unión a ARNm (Lapouge *et al.*, 2008; Vakulskas *et al.*, 2015). Por tanto, se trata de una señalización por un TCS acoplada a una regulación postraduccional de proteínas que ejercen una regulación postranscripcional, por lo que se genera un sistema complejo que es susceptible de regulación en múltiples puntos. La denominación de sus componentes difiere entre grupos bacterianos: el sistema de dos componentes se llama BarA/UvrY en *E. coli* y otros patógenos animales, mientras que en *Pseudomonas* y algunos patógenos vegetales se adoptó la denominación GacS/GacA. Por otro lado, los ARN no codificantes y las proteínas reguladoras se denominan Csr o Rsm según el organismo (Tabla I3).

Tabla I3. Componentes de la ruta Gac-rsm en diferentes bacterias.

Cepa	TCS	ARN antagonistas**	Proteínas	Dianas directas
<b>Enterobacteriaceae</b>				
<i>E. coli</i>	BarA/UvrY	<i>csrB, csrC, mcaS</i>	CsrA	<i>glgCAP, pgaABCD, csrA, flhDC</i>
<i>P. carotovorum</i> *	GacS(ExpS)/ GacA(ExpA)	<i>rsmB</i>	RsmA	ND
<i>S. enterica</i>	BarA/SirA	<i>csrB, csrC</i>	CsrA	<i>fimAICDHF</i>
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	BarA/UvrY	<i>csrB, csrC</i>	CsrA	<i>flhDC</i>
<b>Pseudomonaceae</b>				
<i>A. vinelandii</i>	GacS/GacA	<i>rsmY, rsmZ1-7</i>	RsmA	<i>algD</i>
<i>P. aeruginosa</i>	GacS/GacA	<i>rsmY, rsmZ, rsmV, rsmW</i>	RsmA, RsmF	<i>psl, tssA1, phz2, algU</i>
<i>P. entomophila</i>	GacS/GacA	<i>rsmX, rsmY, rsmZ</i>	RsmA1-3	ND
<i>P. protegens</i>	GacS/GacA	<i>rsmX, rsmY, rsmZ</i>	RsmA, RsmE	<i>hcnA</i>
<i>P. syringae</i> *	GacS/GacA	<i>rsmX, rsmY, rsmZ</i>	CsrA1-3	ND
<b>Otros grupos</b>				
<i>B. subtilis</i>	ND	ND	CsrA	<i>hag</i>
<i>L. pneumophila</i>	LetS/LetA	<i>rsmX, rsmY, rsmZ</i>	CsrA	ND
<i>V. cholerae</i>	VarS/VarA	<i>csrB, csrC, csrD</i>	CsrA	ND
<i>Xanthomonas</i> *	GacS/GacA	ND	RsmA	<i>hrpG, hrpD</i>

\*Fitopatógenos, \*\*Diferente dependencia de GacA, ND: no determinado. Adaptado de Vakulskas et al. (2015).

El sistema de dos componentes GacS/GacA (Gac, *global activation*) fue descrito por primera vez en dos cepas colonizadoras de plantas. La HK GacS, inicialmente denominada LemA (*lesion manifestation*), se describió en *P. syringae* pv. *syringae* B728a como un factor esencial para la producción de lesiones en hojas de judía, ya que la inactivación de *gacS* provocaba una disminución de la supervivencia bacteriana y de la virulencia en planta (Hrabak y Willis, 1992). El RR GacA se describió por primera vez en *P. protegens* CHA0 (anteriormente *P. fluorescens*) como un activador global de la producción de antibióticos y ácido cianhídrico. En esta cepa la pérdida de *gacA* disminuyó su capacidad de adaptación y actividad antifúngica (Laville et al., 1992). Posteriormente, este TCS se ha encontrado en otras bacterias Gram-negativas demostrándose que controla una gran variedad de funciones celulares: patogenicidad, capacidad promotora del crecimiento vegetal, supervivencia, motilidad, formación de biopelículas o producción de metabolitos secundarios, como antibióticos, señales de *quorum sensing*, toxinas, exopolisacáridos (EPS), proteínas secretadas, sideróforos y enzimas extracelulares (Heeb y Haas, 2001; Lapouge et al., 2008; Sonnleitner et al., 2009). En *P. syringae* el sistema de dos componentes GacS/GacA es el regulador maestro del metabolismo secundario y varios estudios han demostrado que diversos procesos bacterianos importantes dependen de él en diferentes patovares (Chatterjee et al., 2003; Kinscherf y Willis, 1999; Sonnleitner y Haas, 2011; Vargas et al., 2013).

En un principio se creía que el regulador de respuesta GacA controlaba la expresión génica a nivel transcripcional, pero posteriormente se descubrió que el sistema GacS/GacA ejerce su acción principalmente a través de la red de regulación del metabolismo secundario Rsm (*regulator of secondary metabolism*) (Brencic et al., 2009; Cha et al., 2012; Heeb et al., 2002; Kay et al., 2005). La cascada de transducción de señales en la

que interviene el sistema GacS/GacA está muy bien estudiada en *P. protegens* CHA0 (Figura I11) y se inicia con la recepción de la señal, hasta ahora desconocida, por la proteína sensora GacS en la membrana, tras lo que se fosforila a sí misma y al RR GacA, localizado en el interior de la célula. GacA fosforilada es activa y se une a una secuencia conservada denominada caja Gac (cuyo consenso es TGTAAGN<sub>6</sub>CTTACA) situada aguas arriba de los promotores de unos ARN reguladores de pequeño tamaño: *rsmX*, *rsmY* y *rsmZ* (Heeb y Haas, 2001; Humair *et al.*, 2010; Kay *et al.*, 2005; Kulkarni *et al.*, 2006; Valverde *et al.*, 2003). Estos ARN se unen con alta afinidad a dos proteínas: RsmA y RsmE. En condiciones normales, las proteínas RsmA/E se encuentran unidas a determinados ARNm implicados en la síntesis de compuestos del metabolismo secundario de la bacteria, bloqueando sus secuencias Shine-Dalgarno (SD) con lo que inhiben su traducción y/o afectan a la estabilidad de esos ARNm (Schubert *et al.*, 2007; Vakulskas *et al.*, 2015). En presencia de los ARN reguladores de pequeño tamaño, las proteínas represoras se unen a ellos con alta afinidad y liberan los ARNm, lo que permite su traducción (Blumer *et al.*, 1999; Reimmann *et al.*, 2005).

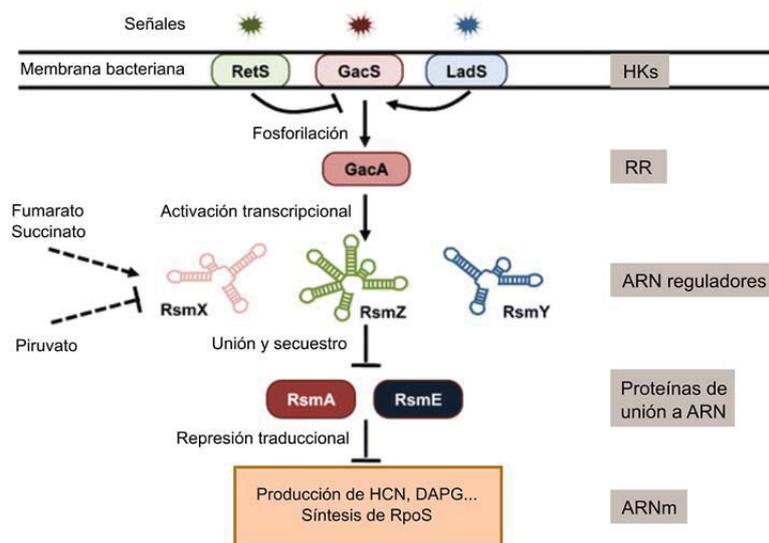


Figura I11. Ruta Gac-rsm en *Pseudomonas protegens* CHA0.

Las HK RetS, GacS y LadS detectan señales ambientales que se integran para regular la fosforilación del RR GacA por GacS. GacA fosforilado activa la transcripción de los ARN no codificantes *rsmX*, *rsmY* y *rsmZ*, que sequestran a las proteínas de unión a ARN RsmA y RsmE. En ausencia de *rsm*, las proteínas RsmA/E se encuentran reprimiendo la traducción de ARNm relacionados con la síntesis de metabolitos secundarios y del factor  $\sigma$  RpoS. Los metabolitos fumarato, succinato y piruvato alteran los niveles de los ARN reguladores *rsm* por un mecanismo aún desconocido (líneas discontinuas). Las puntas de flecha indican regulación positiva y las líneas horizontales, regulación negativa. Modificado de Sonnleitner y Haas (2011).

### 1.5.1. Las proteínas RsmA/CsrA

RsmA (*regulator of secondary metabolism A*) o CsrA (*carbon storage regulator A*) es una proteína pequeña (60-80 aminoácidos) que se une a ARN y que está conservada en muchas bacterias Gram-negativas y algunas Gram-positivas (Vakulskas *et al.*, 2015) (Tabla I3). El gen *csrA* se descubrió originalmente tras obtener un mutante de *E. coli* que tenía afectadas la expresión de las rutas de flujo de carbono, la morfología celular y la

adhesión (Romeo y Gong, 1993; Romeo *et al.*, 1993). Un ortólogo de este gen, denominado *rsmA*, se identificó posteriormente en *Pectobacterium carotovorum*, observándose que reprimía su virulencia (Heeb y Haas, 2001; Vakulskas *et al.*, 2015).

En los últimos años se ha determinado la estructura tridimensional de las proteínas CsrA/RsmA de *E. coli*, *Yersinia enterocolitica*, *P. fluorescens* y *P. aeruginosa*, observándose que forma dímeros de subunidades idénticas que contienen 5 hojas  $\beta$  en tándem, una hélice  $\alpha$  corta y un extremo C-terminal flexible. Las hojas  $\beta$  de los monómeros se entrelazan para formar un núcleo hidrofóbico, con las hélices  $\alpha$  y el extremo C-terminal hacia el exterior (Duss *et al.*, 2014a; Duss *et al.*, 2014b; Rife *et al.*, 2005; Schubert *et al.*, 2007). Asimismo, se ha determinado que dos superficies idénticas de las proteínas CsrA de *E. coli*, formadas por las hojas  $\beta$ 1 y  $\beta$ 5 de polipéptidos opuestos, median la unión al ARN y la regulación (Mercante *et al.*, 2009).

El estudio de la unión de CsrA a los ARN *rsm* y a sus ARNm diana se inició a raíz del descubrimiento de *csrB*, el primer ARN de tipo *rsm* caracterizado, que fue detectado en *E. coli* al copurificar con CsrA (Liu *et al.*, 1997). La secuencia y estructura de *csrB* ofrecieron la primera pista sobre el posible motivo de unión a CsrA, ya que presentaba numerosas horquillas con el trinucleótido GGA en sus bucles. Posteriormente, se determinó por SELEX (*systematic evolution of ligands by exponential enrichment*) una secuencia para la unión de CsrA con alta afinidad, RUACARGGAUGU, donde los motivos ACA y GGA estaban conservados (Dubey *et al.*, 2005). La mutagénesis de las dianas conocidas de CsrA permitió determinar que la secuencia primaria, concretamente el trinucleótido GGA, es clave para la unión de CsrA y que su localización en el bucle de una horquilla aumenta la afinidad (Dubey *et al.*, 2005; Duss *et al.*, 2014a; Duss *et al.*, 2014b; Schubert *et al.*, 2007). Los ARN *rsm* presentan numerosos motivos de alta afinidad, lo que les permite competir exitosamente con los ARNm diana por la unión de CsrA, pero también poseen sitios de baja afinidad que contribuyen a la unión cooperativa de CsrA al unirse un segundo monómero de CsrA tras la interacción del primero con un sitio primario (Duss *et al.*, 2014a; Mercante *et al.*, 2009). Cuando se produce la unión secuencial de los monómeros, la distancia entre los motivos de unión es crítica, tanto en motivos de alta como de baja afinidad (Mercante *et al.*, 2009).

El hecho de que el motivo de unión a CsrA guarde gran similitud con la secuencia SD (AGGAGG) y que CsrA ejerza un efecto represor sobre los primeros ARNm diana descubiertos, provocó que se asumiera que el bloqueo del inicio de la traducción era el único modo de acción de estas proteínas (Romeo y Babitzke, 2018; Vakulskas *et al.*, 2015). Basándose en estas asunciones, Kulkarni *et al.* (2014) crearon un algoritmo para la predicción de genes regulados por CsrA en el genoma mediante la búsqueda de secuencias A(N)GGA en su región 5'-UTR. Sin embargo, CsrA puede ejercer un papel represor o activador uniéndose a distintas regiones del ARNm, como se muestra en la figura I12 (Vakulskas *et al.*, 2015). De hecho, estudios *in vivo* revelaron la interacción directa de CsrA con cientos de genes donde aproximadamente el 20% se producía por unión a la región 5'-UTR (Holmqvist *et al.*, 2016; Potts *et al.*, 2017). Además, CsrA controla de manera indirecta múltiples funciones celulares modulando la expresión de determinados reguladores transcripcionales (Brencic y Lory, 2009; Potts *et al.*, 2019; Sahr *et al.*, 2017), lo que potencia su efecto global en la célula.

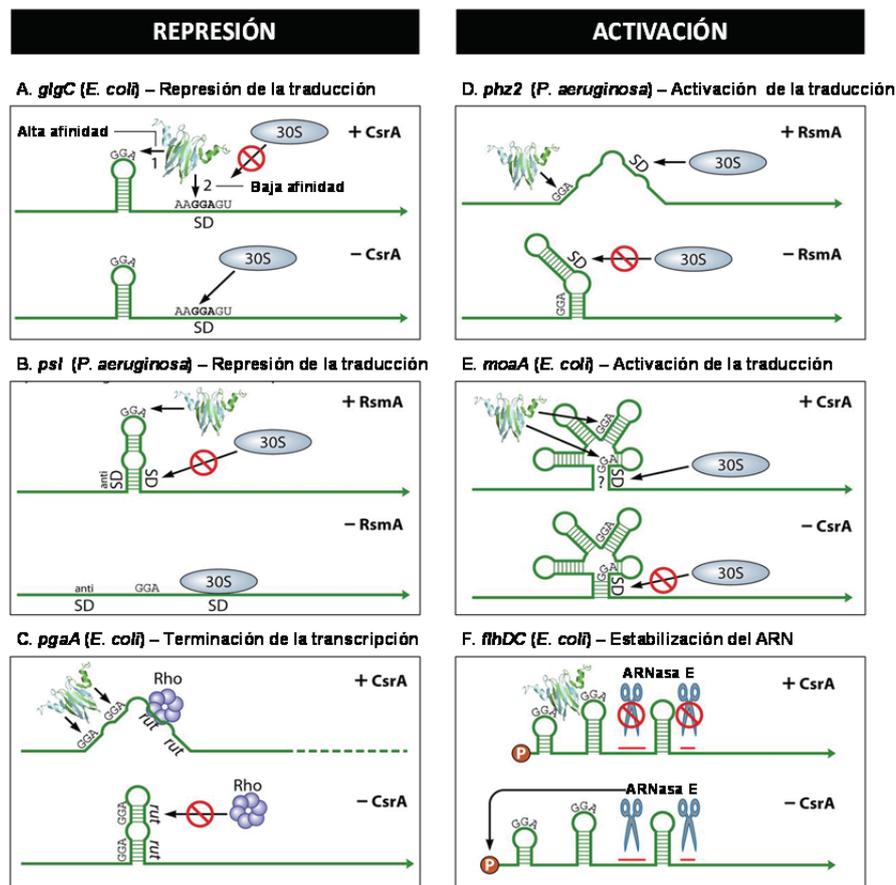


Figura I12. Modelos de represión y activación por CsrA/RsmA.

A. CsrA reprime la expresión de *glgC* uniéndose a su secuencia SD e impidiendo la unión de la subunidad 30S del ribosoma (Baker *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 1995; Mercante *et al.*, 2009). B. RsmA se une al ARNm de *psi* provocando que la secuencia SD aparezca con la antiSD, impidiendo que la subunidad 30S del ribosoma se una y se inicie la traducción (Irie *et al.*, 2010). C. La unión de CsrA al ARN *pgaA* deshace la horquilla y permite la entrada del terminador Rho abortando tempranamente la transcripción (Figuroa-Bossi *et al.*, 2014). D. La unión de RsmA al ARN *phz2* libera la secuencia SD de la estructura secundaria que la atrapaba y favorece la traducción (Ren *et al.*, 2014). E. CsrA se une y modifica la estructura secundaria del ARNm de *moaA* permitiendo su traducción (Patterson-Fortin *et al.*, 2013). F. La unión de CsrA impide la degradación del ARNm de *flhDC* por la ARNasa (Yakhnin *et al.*, 2013). Modificado de (Vakulskas *et al.*, 2015).

La mayoría de bacterias donde se ha estudiado la funcionalidad de CsrA cuentan con una única copia de la proteína (Tabla I3). Sin embargo, hay cepas del género *Pseudomonas* que poseen varios parálogos, de entre los cuales el denominado RsmA es el ortólogo a CsrA de enterobacterias y el que generalmente asume un papel más relevante en la regulación (Vakulskas *et al.*, 2015). *P. protegens* posee dos: RsmA y RsmE, que tienen funciones redundantes y se unen a sus ARN antagonistas con una afinidad similar, aunque se expresan diferencialmente a lo largo de la curva de crecimiento (Reimann *et al.*, 2005; Zha *et al.*, 2014). *P. putida*, *P. fluorescens* y *P. entomophila* tienen RsmA, RsmE y RsmI (Huertas-Rosales *et al.*, 2016; Vallet-Gely *et al.*, 2010). Los tres son intercambiables en el control del regulador transcripcional *cfcR* en *P. putida*, con RsmA ejerciendo un papel más relevante (Huertas-Rosales *et al.*, 2017). No obstante, difieren en su expresión y solo RsmE y RsmI reprimen la formación de biopelículas, mientras que RsmA y RsmE son más relevantes para la motilidad (Huertas-Rosales *et al.*, 2016). En *P. entomophila*, los parálogos RsmA1 (RsmA) y RsmA2 (RsmE) reprimen la producción de hemolisinas, lipopéptidos y virulencia, mientras que

RsmA3 (RsmI) no tiene efecto (Vallet-Gely *et al.*, 2010). De la misma manera, la motilidad *swimming* está reprimida por RsmA y RsmE, pero no por RsmI en *P. fluorescens* F113 (Martínez-Granero *et al.*, 2012). Por otra parte, *P. aeruginosa* posee dos parálogos: RsmA y RsmF/RsmN (Marden *et al.*, 2013; Morris, E. R. *et al.*, 2013), que presentan dianas exclusivas y compartidas, así como diferentes afinidades de unión a los ARN antagonistas (Janssen *et al.*, 2018a; Marden *et al.*, 2013; Morris, E. R. *et al.*, 2013). RsmF/N difiere estructuralmente del resto de proteínas RsmA/CsrA descritas y, aunque también forma homodímeros y la región de unión al ARN está conservada, dicha región se forma en cada polipéptido en vez de participar cadenas polipeptídicas de cada monómero (Marden *et al.*, 2013; Morris, E. R. *et al.*, 2013).

### 1.5.2. Los ARN *rsm*

La importancia de los ARN no codificantes tipo *rsm* en la ruta Gac-rsm radica en que controlan la unión de RsmA/CsrA a sus ARNm dianas. En Enterobacterias se denominan *csr*, tienen un tamaño de 300-400 nt, aproximadamente 20 sitios de unión a CsrA y una vida media baja, mientras que en *Pseudomonas* se llaman *rsm*, son más pequeños (100-130 nt), presentan menos secuencias de unión a CsrA y son más estables (Vakulskas *et al.*, 2015) (Tabla I3). En Enterobacterias, *csrB* tiene un papel principal en el secuestro de CsrA, mientras que la función de *csrC* se pone en manifiesto únicamente en ausencia del primero y su expresión es independiente de GacA. En *Pseudomonas* es común la presencia de 2-4 variantes, de las que pueden existir una o más copias, con una dependencia variable de GacA. Así, se encuentran *rsmV*, *rsmW*, *rsmY*, *rsmZ* en *P. aeruginosa* y *rsmX*, *rsmY* y *rsmZ* en *P. fluorescens*, *P. protegens*, *P. putida* y *P. syringae*. En otras  $\gamma$ -proteobacterias el número y tipo de ARN *rsm* son variables: *L. pneumophila* cuenta con las variantes *rsmX*, *rsmY* y *rsmZ* (Sahr *et al.*, 2009; Sahr y Buchrieser, 2013), *A. vinelandii* presenta una copia de *rsmY* y siete de *rsmZ* (Hernández-Eligio *et al.*, 2012) y *V. cholerae* contiene tres ARN redundantes *csrB*, *csrC* y *csrD* (Lenz *et al.*, 2005).

Los genes *rsmY* y *rsmZ* fueron descubiertos en distintas cepas de *Pseudomonas*, pero estudiados más detalladamente en *P. protegens* CHA0 (Kay *et al.*, 2005; Lapouge *et al.*, 2008; Sonnleitner *et al.*, 2009; Sonnleitner y Haas, 2011). En esta bacteria es necesaria la delección de los tres ARN *rsm* (*rsmX*, *rsmY* y *rsmZ*) para obtener un fenotipo similar al que presenta un mutante *gacA*, lo que sugiere que la proteína GacA ejerce su función principalmente a través de ellos (Kay *et al.*, 2005). Utilizando *microarrays* en *P. aeruginosa* se observó que todos los genes controlados por GacA eran dependientes de *rsmZ* y *rsmY*, los únicos ARN *rsm* conocidos en esa bacteria en aquel momento (Brencic *et al.*, 2009). Sin embargo, en *P. syringae* pv. *tabaci* se ha observado la unión *in vitro* de GacA a los promotores de varios genes de virulencia (Cha *et al.*, 2012), por lo que no se descarta que pueda haber una regulación transcripcional directa de otros genes por GacA en algunas cepas.

La expresión de los ARN *rsm* varía según las condiciones de cultivo y la fase de crecimiento en diversas cepas de *Pseudomonas*, no obstante lo más común es que sus niveles sean máximos en fase estacionaria (Janssen *et al.*, 2018a; Jean-Pierre *et al.*, 2016; Kay *et al.*, 2005; Lalaouna *et al.*, 2012a; Sonnleitner y Haas,

2011). La secuencia de la caja Gac en los promotores de *rsm* determina la mayor o menor dependencia de GacA (Janssen *et al.*, 2018a; Kay *et al.*, 2005; Lalaouna *et al.*, 2012a; Song *et al.*, 2014). Sin embargo, no todos los ARN antagonistas de RsmA/CsrA poseen una caja Gac, a pesar de ser nombrados como ARN *rsm*, como ocurre con *rsmV* y *rsmW* de *P. aeruginosa* (Janssen *et al.*, 2018a; Miller *et al.*, 2016). Los niveles de *rsm* también están controlados por otros reguladores, como PsrA y AlgR, que promueven la transcripción de *rsmZ* en *P. protegens* CHA0 (Humair *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2017) o HptB y MvaT, que disminuyen los niveles de *rsmZ* en *P. aeruginosa* (Brencic *et al.*, 2009; Jean-Pierre *et al.*, 2016). Asimismo, las proteínas RsmA y RsmE de *P. protegens* CHA0 ejercen una acción positiva sobre la transcripción de los ARN *rsm*, lo que resulta a su vez en un mayor secuestro de las mismas, generando un bucle regulador negativamente retroalimentado (Humair *et al.*, 2010; Kay *et al.*, 2005; Sonnleitner y Haas, 2011). En esta misma bacteria también se ha detectado un control de la expresión de *rsm* por compuestos del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (Kay *et al.*, 2005; Sonnleitner y Haas, 2011).

Se ha observado que a pesar de su diferente secuencia y expresión, los ARN *rsm* pueden ser funcionalmente redundantes en determinadas condiciones; es decir, la sobreexpresión de *rsmX* compensa la ausencia de *rsmY* y *rsmZ* (Kay *et al.*, 2005) y la sobreexpresión de ARN artificiales complementa un mutante  $\Delta rsmXYZ$  (Valverde, 2009). Esto es debido a que todos poseen estructuras secundarias en forma de horquilla que exponen la secuencia GGA en los bucles externos y permiten la unión de RsmA/CsrA (Duss *et al.*, 2014b; Sonnleitner y Haas, 2011). Sin embargo, incluso presentando motivos de unión para RsmA/CsrA similares, las variaciones estructurales determinan diversos modos de unión de estas proteínas y, por tanto, diferentes afinidades (Duss *et al.*, 2014a; Duss *et al.*, 2014b; Janssen *et al.*, 2018b).

### 1.5.3. El sistema de dos componentes GacS/GacA

La HK GacS pertenece al grupo de las HK híbridas o no ortodoxas, cuya particularidad es que fosforilan un dominio HptB, situado en la propia HK o en una proteína distinta, antes de transfosforilar el RR. Esta cadena de fosforilación genera múltiples puntos de regulación y permite un ajuste más fino que los TCS prototípicos (Jung *et al.*, 2012). De hecho, GacS está modulada por otras quinasas sensoras, denominadas RetS y LadS, en *P. aeruginosa* y *P. protegens* CHA0. LadS (*lost adherence sensor*) actúa en paralelo con GacS, mientras que RetS (*regulator of exopolysaccharide and type III secretion*) regula negativamente a GacA (Chambonnier *et al.*, 2016; Sonnleitner *et al.*, 2009). RetS forma heterodímeros con GacS provocando su inhibición (Goodman *et al.*, 2004; Goodman *et al.*, 2009), mientras que LadS mantiene la actividad de GacS por un mecanismo de fosfotransferencia (Chambonnier *et al.*, 2016; Ventre *et al.*, 2006; Workentine *et al.*, 2009). En *P. aeruginosa* se descubrió otra HK, PA1611, que es estructuralmente similar a GacS y compite por la formación de heterodímeros con RetS, por lo que ejerce un efecto positivo sobre GacS (Bhagirath *et al.*, 2017; Kong *et al.*, 2013). En conjunto, RetS, GacS, LadS y PA1611 determinan la activación o no de GacA y, por tanto, de la cascada Gac-rsm. Además, en *P. aeruginosa* se ha descrito otra ruta alternativa donde la interacción entre múltiples HK híbridas (PA1611, ErcS', SagS y RetS) determinan el estado de fosforilación de la proteína HptB,

cuyo papel es activar por fosforilación al TCS HsbR/HsbA, que activa la transcripción de *rsmY* (Bordi *et al.*, 2010; Bouillet *et al.*, 2019; Hsu *et al.*, 2008).

A pesar del estudio extensivo del sistema Gac-rsm, la identidad de la señal que desencadena la respuesta todavía se desconoce en muchos microorganismos (Jimenez *et al.*, 2012). En *P. protegens* CHA0 se ha observado activación de la ruta (a nivel de *rsmZ*) por una molécula de bajo peso molecular, que no es una molécula de *quorum sensing*, producida a altas densidades celulares y que está presente en el sobrenadante de cultivos en fase estacionaria (Heeb *et al.*, 2002; Zuber *et al.*, 2003). En los sobrenadantes de cultivos del mutante *gacA* no se detecta esa activación, lo que sugiere que la señal actúa como autoinductor del sistema por un bucle de retroalimentación positiva (Kay *et al.*, 2005). Se ha especulado que la señal reconocida por GacS podría estar relacionada con el estado metabólico de la célula, ya que la alteración del ciclo de Krebs influye en los niveles de los ARN dependientes de GacA (Takeuchi *et al.*, 2009). Sin embargo, ningún intermediario ensayado *in vitro* hasta el momento interacciona directamente con el dominio de unión a ligando de GacS (Ali-Ahmad *et al.*, 2017). Curiosamente, un mutante carente de este dominio de unión no inactiva la ruta como un mutante carente de la HK, sino que provoca una activación constitutiva de la misma (Zuber *et al.*, 2003).

#### 1.5.4. Regulación por Gac-Rsm

La actividad de la ruta Gac-Rsm está asociada a cambios en el estilo de vida o en el estado metabólico celular. Por ejemplo, controla la transición entre un modo de vida replicativo y otro transmisivo en *L. pneumophila*, la producción de factores de virulencia tras el contacto con el hospedador en patógenos de animales como *Salmonella*, *E. coli* o *Yersinia*, y en patógenos de plantas como *P. carotovorum* o *Xanthomonas*, así como la producción de factores de biocontrol en *P. fluorescens* o *P. protegens* (Romeo y Babitzke, 2018; Vakulskas *et al.*, 2015).

En *P. protegens* CHA0, la delección de *gacA* o *rsmXYZ* reduce la producción de compuestos necesarios para el biocontrol, como el cianhídrico, el 2,4-diacetilfloroglucinol o la exoproteasa A, así como la motilidad *swarming* (Blumer *et al.*, 1999; Kay *et al.*, 2005; Laville *et al.*, 1992; Schnider-Keel *et al.*, 2000). La represión de la producción de cianhídrico se produce por la unión directa de RsmA a tres sitios diana en la región 5'-UTR del primer gen del operón de biosíntesis, *hcnA* (Lapouge *et al.*, 2007). En *P. fluorescens* SS101, los mutantes *rsmYZ* y *gacS/gacA* presentan una reducción del *swarming* por la represión de la síntesis del biosurfactante masetolido A por RsmA (Song *et al.*, 2014). La mutación de *gacS* en la cepa SBW25 provoca el aumento de la respuesta a estrés oxidativo, de la biosíntesis de los sideróforos pioverdina y ornicrogugatina, mientras que reprime la motilidad, la formación de biopelículas y la producción de metabolitos secundarios y exoproteasas (Cheng *et al.*, 2013). La motilidad está regulada de forma opuesta en *P. fluorescens* F113, de modo que los mutantes *gacS* y *gacA* muestran una mayor motilidad *swimming* y están perjudicados en la formación de biopelículas (Barahona *et al.*, 2010; Martínez-Granero *et al.*, 2012; Navazo *et al.*, 2009). RsmA y RsmE reprimen la traducción del ARNm que codifica *algU*, el factor  $\sigma$  necesario para la expresión de *amrZ*, que a su

vez es el represor transcripcional de *fleQ*, el regulador maestro de la biosíntesis flagelar (Martínez-Granero *et al.*, 2012).

En *P. aeruginosa* la ruta Gac-rsm controla la elección entre un metabolismo promotor de la infección crónica, caracterizado por la formación de biopelículas y la expresión del sistema de secreción tipo VI (T6SS), o de la infección aguda, donde intervienen factores como el sistema de secreción tipo III (T3SS), los pili tipo IV y el flagelo (Coggan y Wolfgang, 2012). El estudio del regulón de RsmA ha puesto de manifiesto su efecto activador sobre el T3SS a nivel de la expresión de su regulador maestro ExsA por un mecanismo desconocido, y sobre la biogénesis de los pili tipo IV de manera indirecta (Brencic y Lory, 2009). La síntesis del EPS Psl, esencial para la formación de biopelículas en cepas no mucosas (Colvin *et al.*, 2011), está reprimida por la unión directa de RsmA a la 5'-UTR del primer gen de su operón de síntesis (*pslA*) (Irie *et al.*, 2010). RsmA también reprime la expresión del T6SS y se ha demostrado su unión directa a los ARNm *tssA1* y *fha1*, que codifican componentes estructurales del mismo (Brencic y Lory, 2009; Marden *et al.*, 2013). El EPS alginato juega un papel accesorio en la formación de biopelículas, pero es crucial para la supervivencia bacteriana en los pulmones de personas con fibrosis quística (Folkesson *et al.*, 2012). La relación de la ruta Gac-rsm con la regulación del alginato es compleja, ya que RsmA reprime los genes de biosíntesis *algD* y *algB* (Burrowes *et al.*, 2006) mientras que el ECF AlgU y el RR AlgR, ambos necesarios para la biosíntesis de alginato, activan la transcripción de *rsmA* (Stacey y Pritchett, 2016; Stacey *et al.*, 2017). En cuanto a la motilidad, un mutante en *gacA* presenta mayor *swarming*, un aumento en la expresión de flagelina (FliC) y de la proteína de recubrimiento del filamento (FliD) (Kay *et al.*, 2006). Por el contrario, la mutación en *rsmA* abole el *swarming* y el *swimming* (Burrowes *et al.*, 2006; Heurlier *et al.*, 2004), indicando que este sistema regula los dos tipos de motilidad. Además, RsmA reprime la biosíntesis de los sideróforos pioverdina y piochelina de manera indirecta, disminuyendo los niveles del segundo mensajero diguanilato cíclico (c-di-GMP) independientemente del regulador Fur (Frangipani *et al.*, 2014).

La expresión heteróloga de RsmA de *P. aeruginosa* en varias cepas de *P. syringae* (pv. phaseolicola NPS3121 ahora *P. savastanoi*, y pv. *syringae* B728a y BR2R) provocó una disminución del *swarming*, la colonización de la planta, la producción de fitotoxinas, proteasas y sideróforos. Sin embargo, los resultados de producción de alginato, formación de biopelículas y HR fueron variables entre cepas (Kong *et al.*, 2012).

## 2. *Pseudomonas syringae*

El género *Pseudomonas* está integrado por bacilos Gram-negativos rectos o ligeramente curvados, con metabolismo quimiorganoheterotrófico, aerobios y móviles gracias a la presencia de uno o varios flagelos polares (Palleroni, 1993, 2010). Se sitúa filogenéticamente dentro de las  $\gamma$ -proteobacterias y engloba 254 especies (LPSN, *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*). Su gran versatilidad metabólica les permite colonizar nichos muy diversos, por lo que es considerada una de las bacterias más ubicuas del mundo (Peix *et al.*, 2009). Este grupo ha sido foco de atención en investigación tanto por su potencial biotecnológico como por su patogenicidad: las cepas *P. fluorescens*, *P. protegens* y *P. putida* se utilizan en procesos de

biorremediación, biocontrol y promoción del crecimiento de plantas, mientras que *P. aeruginosa* y *P. syringae* son patógenos de animales/humanos y plantas, respectivamente (Silby *et al.*, 2009).

El complejo *Pseudomonas syringae* incluye más de 50 patovares que difieren en su rango de hospedador, infectando plantas herbáceas y leñosas de gran importancia agronómica (Berge *et al.*, 2014; Hirano y Upper, 2000). C. J. J. van Hall caracterizó y nombró esta especie por primera vez a partir de un aislado previo que M. W. Beijerinck había realizado de una planta de lila (*Syringa vulgaris*) con síntomas de enfermedad (Young, 1991). La sintomatología de una infección por *P. syringae* es muy variable, pudiendo manifestarse como moteados y necrosis en hojas, podredumbre de frutas, tumores en tallos y chancros, entre otros, dependiendo del tipo de planta y del lugar de la infección (Hirano y Upper, 2000). La taxonomía de *P. syringae* ha variado mucho a lo largo del tiempo, porque se basaba inicialmente en sus rasgos fenotípicos y en su hospedador, que no reflejaban la realidad filogenética del grupo, y posteriormente, en ensayos de hibridación de ácidos nucleicos, que aportaban escasa resolución (Baltrus *et al.*, 2017). Actualmente las clasificaciones se basan en árboles filogenéticos creados por MLST (*multilocus sequence tagging*) que reflejan mejor el pasado evolutivo y permiten subdividir la especie en 13 filogrupos (Berge *et al.*, 2014). Gracias a las técnicas de secuenciación masiva, desde 2003 se han secuenciado por completo los genomas de varios patovares de *P. syringae* (<http://www.pseudomonas-syringae.org/>). Los mejor estudiados y anotados son los patovares tipo: phaseolicola (Pph, actualmente *P. savastanoi* pv. phaseolicola), syringae (Psy) y tomato (Pto), causantes de la grasa de la judía, el moteado de la judía y el moteado del tomate, respectivamente (Buell *et al.*, 2003; Feil *et al.*, 2005; Joardar *et al.*, 2005).

Aunque *P. syringae* es objeto de numerosas investigaciones por su papel como fitopatógeno, se ha observado que también está presente como epífita en la superficie de hojas asintomáticas, en plantas silvestres y en diversos ambientes ligados al agua dulce (nubes, nieve, lagos y ríos) (Hirano y Upper, 2000; Morris, C. E. *et al.*, 2013; Morris *et al.*, 2008) (Figura I13A). Estos actúan como reservorio, vía de transmisión y fuente de variabilidad genética (Monteil *et al.*, 2013). Como es común en bacterias ambientales, la diversidad en los genomas de *P. syringae* es consecuencia de la transferencia horizontal (Guttman *et al.*, 2008; Nowell *et al.*, 2014) y es especialmente notoria en genes que están fuertemente sujetos a presión selectiva, como los relacionados con la virulencia (Baltrus *et al.*, 2011; Ruinelli *et al.*, 2019).

El ciclo de la infección comienza cuando la bacteria llega a la filosfera de un hospedador compatible (Figura I13B,D). Este es un punto crítico, ya que ahí se tiene que enfrentar a condiciones ambientales muy cambiantes y a menudo extremas, a otros microorganismos competidores y a las barreras físicas de defensa de la planta, como la cutícula (Xin *et al.*, 2018). *P. syringae* es un patógeno oportunista que aprovecha los eventos de apertura de los estomas o la formación de heridas para invadir los espacios intercelulares del interior de la hoja, lo que se denomina apoplasto (Melotto *et al.*, 2008; Melotto *et al.*, 2017) (Figura I13E). Algunas cepas poseen además coronatina, una toxina que induce la apertura estomática (Bender *et al.*, 1999; Melotto *et al.*, 2017). Una vez en el apoplasto (Figura I13F), actúa como hemibiotrofo utilizando los nutrientes disponibles para multiplicarse sin causar daño celular. Posteriormente, las bacterias sintetizan numerosos compuestos que

manipulan la respuesta inmunitaria y el metabolismo del hospedador (Lindeberg *et al.*, 2012; Rico *et al.*, 2011), lo que acaba produciendo la necrosis de los tejidos (Boureau *et al.*, 2002; Melotto *et al.*, 2008; Xin y He, 2013) (Figura I13C). La infección se produce a nivel local, transmitiéndose a otras zonas de la planta u otras plantas a partir de las lesiones necróticas (Xin y He, 2013). El éxito de la infección suele estar determinado por la producción de factores de virulencia y toxinas, pero otras funciones celulares como la motilidad, síntesis de sideróforos o producción de EPS también contribuyen a que la infección sea exitosa (Hirano y Upper, 2000; Xin *et al.*, 2018).

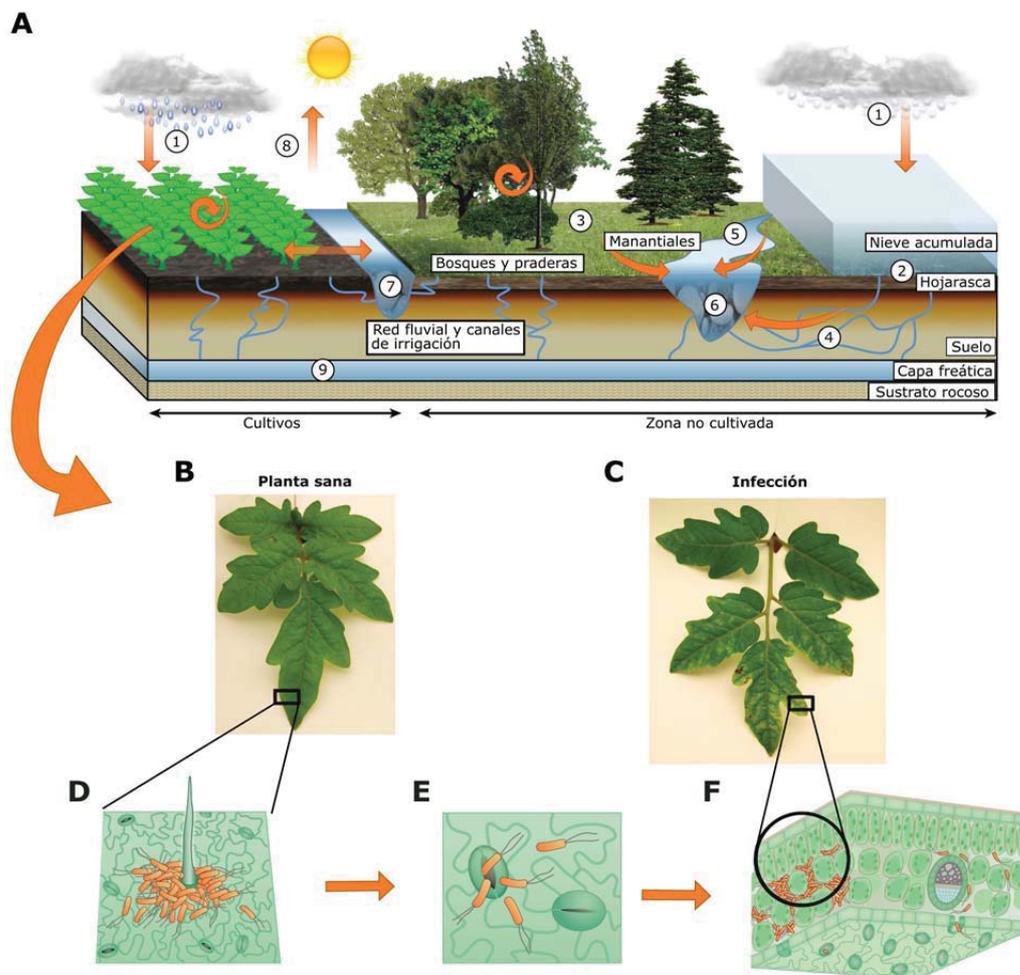


Figura I13. Ciclo de vida de *P. syringae* en el medio ambiente y durante la infección.

A. *P. syringae* llega al suelo y la superficie de las plantas (1) a través de las precipitaciones atmosféricas. En ambientes alpinos y subalpinos sobrevive en la nieve acumulada (2), en la hojarasca y en pastos (3). Durante el deshielo y la lluvia, una parte de estas poblaciones sigue el flujo de agua subterráneo (4) o superficial (5) hasta llegar a la red fluvial (6), por la que es diseminada. Las poblaciones epífitas de *P. syringae* en plantas silvestres o ecosistemas agrícolas también pueden seguir esta ruta llegando a la superficie de los cultivos mediante precipitación (1) o irrigación (8). Finalmente, las poblaciones de la superficie de las hojas pueden formar aerosoles (8) y alcanzar la troposfera o, incluso, atravesar el suelo y llegar a la capa freática (9). Modificado de Morris, C. E. *et al.* (2013). B-F. *P. syringae* comienza su ciclo infeccioso cuando alcanza la hoja de una planta sana (B), formando agregados en zonas protegidas, como la base de los tricomas (D). Las bacterias aprovechan la presencia de heridas y la apertura de los estomas (E) para llegar al apoplasto (F), donde se multiplican y expresan factores de virulencia causando una sintomatología específica de la cepa (C). Modificado de Xin y He (2013).

## 2.1. Factores de virulencia: sistema de secreción tipo III y fitotoxinas

Los principales factores de virulencia de *P. syringae* son el T3SS y las fitotoxinas. El T3SS o inyectisoma 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 & Collmer, 2004). Una vez allí, los efectores bloquean a distintos niveles la respuesta defensiva de la planta. La capacidad de reconocimiento de los mismos por las proteínas R de la planta determina si se produce o no una infección compatible (Lindeberg *et al.*, 2012).

El T3SS ha diversificado mucho debido a la transferencia horizontal y a la presión selectiva, por lo que se han originado 7 familias (Cornelis, 2006). El de los fitopatógenos se denomina sistema Hrp (*hypersensitive response and pathogenicity*) y se distinguen dos tipos: Hrp1 (*Pseudomonas*, *Erwinia*) y Hrp2 (*Ralstonia*, *Xanthomonas*), que difieren en su organización y regulación (Alfano y Collmer, 1997; Cornelis, 2006; Tampakaki *et al.*, 2010). En *P. syringae*, la región génica que codifica el T3SS y numerosos efectores fue descrita por primera vez tras conferirle a la cepa no patógena *P. fluorescens* la capacidad de desencadenar HR en plantas de tabaco (Figura I14) (Huang *et al.*, 1988; Lindgren *et al.*, 1989; Lindgren *et al.*, 1986). Es una isla de patogenicidad de aproximadamente 25 kb que está formada por un *cluster* central *hrp/hrc*, que contiene los genes estructurales del inyectisoma, flanqueado por dos regiones que codifican efectores: EEL (*Exchangeable Effector Locus*) y CEL (*Conserved Effector Locus*) (Alfano *et al.*, 2000)

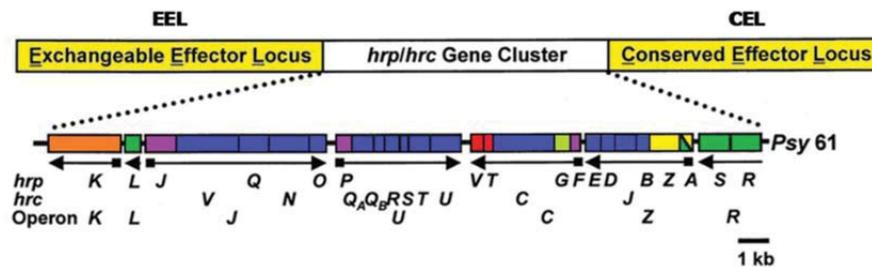


Figura I14. Organización génica de la isla de patogenicidad Hrp de *P. syringae*.

La isla de patogenicidad Hrp se organiza en tres partes: una región central (genes *hrp/hrc*), que abarca aproximadamente 25 kbp y contiene los genes que codifican el T3SS y sus reguladores, y las regiones adyacentes EEL y CEL, que codifican proteínas que se secretan a través del T3SS. En la parte inferior de la figura se muestra un esquema de los genes del *cluster* central *hrp/hrc* con los nombres de los genes y los operones que contiene. Estos genes codifican proteínas reguladoras (control positivo, verde y control negativo, rojo), componentes Hrc asociados a la maquinaria del T3SS (azul), proteínas secretadas (amarillo), la proteína del translocón (naranja) y proteínas reguladoras o que contribuyen a la secreción (violeta). Las flechas indican el sentido de la transcripción y los cuadrados la presencia de una caja *hrp* en los promotores dependientes de HrpL. Las regiones EEL y CEL son de tamaño variable y no están representadas a escala. Modificado de Alfano *et al.* (2000).

El inyectisoma está compuesto por un complejo ATPasa citosólico, un anillo C citoplasmático, un aparato de exportación situado en la membrana interna, un cuerpo basal englobado en la membrana, un pili extracelular y un poro de translocación que se sitúa en la membrana del hospedador (Deng *et al.*, 2017; Galán *et al.*, 2014; Tampakaki *et al.*, 2010) (Figura I15A). Evolutivamente tiene el mismo origen que el sistema de ensamblaje del

flagelo, presenta homología de secuencia con las proteínas del cuerpo basal y homología estructural con otros componentes (Deng *et al.*, 2017; Galán *et al.*, 2014). La estructura del T3SS *hrp/hrc* es similar al de patógenos animales, donde se ha caracterizado de forma pormenorizada. Las proteínas conservadas HrcJ, HrcU, HrcV, HrcR, HrcT, HrcS y HrcC forman anillos que componen el cuerpo basal (Figura I15A). La secretina putativa HrcC es la única de estas proteínas que no está conservada en el aparato flagelar y se cree que forma un anillo en la membrana externa bacteriana. En el T3SS tipo Hrp1 la proteína HrcQ está dividida en HrcQ<sub>A</sub> y HrcQ<sub>B</sub>, con homología de secuencia y estructura con FliM y FliN, respectivamente, que forman un anillo citoplasmático análogo al anillo C flagelar. Los componentes extracelulares del T3SS son los menos conservados, ya que están implicados en el contacto con el hospedador y, por tanto, sujetos a presión selectiva para evitar el reconocimiento por parte de este. El *pili* de los fitopatógenos destaca por su longitud, midiendo 2  $\mu\text{m}$  en contraste con los 60 nm del *pili* de los patógenos animales, necesaria para atravesar la pared celular vegetal (Figura I15B). En *P. syringae* está formado por el ensamblaje helicoidal de pequeños monómeros de HrpA dejando un conducto en su interior. La interacción con la célula del hospedador se produce mediante un poro formado en su membrana plasmática por una estructura denominada translocón; en *P. syringae* HrpK parece ser uno de sus componentes (Deng *et al.*, 2017; Tampakaki *et al.*, 2010) (Figura I15A).

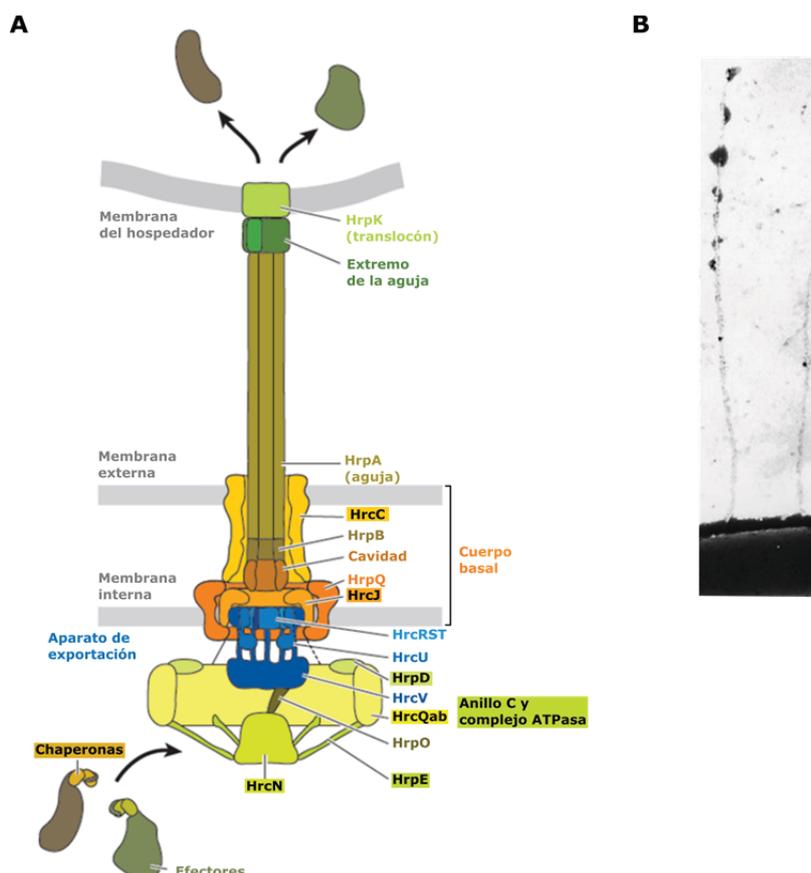


Figura I15. El sistema de secreción de tipo 3 de *P. syringae*.

A. Representación esquemática del inyectisoma señalando sus componentes estructurales básicos: translocón (verde), aguja (marrón), cuerpo basal (naranja), aparato de exportación (azul), anillo C y complejo ATPasa (amarillo). Modificado de Galán *et al.* (2014). B. Microfotografía del inyectisoma de Pto DC3000 tras la inducción de su síntesis en medio de cultivo. La detección de HrpA marcada con FLAG se llevó a cabo con la tinción *immunogold*. En la parte inferior de la figura se observa la célula bacteriana de la cuál sale el inyectisoma. La barra representa 0,5  $\mu\text{m}$ . Tomado de Li *et al.* (2002).

Los efectores del T3SS (T3E, *type III secretion system effectors*) de *P. syringae* se denominan proteínas Hop (*Hrp outer protein*) o Avr (*avirulence*) dependiendo de cómo fueron descubiertas. Una mutación en las proteínas Avr provoca la pérdida de reconocimiento por su correspondiente proteína R en un hospedador no compatible y, por tanto, la pérdida de la HR asociada. El término Hop surge en relación a la capacidad de estas proteínas para ser translocadas a través del T3SS y se utiliza como designación más genérica para todos los T3E. Algunos efectores cuentan con las dos denominaciones, como HopAB2/AvrPtoB (Lindeberg *et al.*, 2012; Lindeberg *et al.*, 2008). Los T3E pueden estar codificados en las regiones CEL o EEL, o estar dispersos en el genoma, individualmente o formando *clusters* (Kvitko *et al.*, 2009; Lindeberg *et al.*, 2008). En los primeros estudios, se determinó que la región CEL (AvrE, HopM1, HopAA1-1) era más importante que EEL para la patogenicidad (Alfano *et al.*, 2000); posteriormente se comprobó que las mutaciones simples en T3E producen escaso fenotipo y se describieron dos grupos de efectores redundantes (REGs, *redundant effector groups*), AvrE/HopR1/HopM1 y AvrPto/AvrPtoB, que actúan sinérgicamente para bloquear la respuesta defensiva del hospedador (Badel *et al.*, 2006; Kvitko *et al.*, 2009; Lin y Martin, 2005; Xin y He, 2013). La creación de una cepa de Pto DC3000 con los 28 T3E activos mutados ha permitido determinar que existe un mínimo de 8 genes (AvrPtoB, AvrE, HopM1, HopE1, HopG1, HopAM1, HopAA1-1 y HopN1) necesarios para restaurar el crecimiento bacteriano y la producción de síntomas en un hospedador compatible (Cunnac *et al.*, 2011). Actualmente se conocen las dianas concretas de los efectores más relevantes de *P. syringae* (revisado en Xin y He (2013) y Wei y Collmer (2018)) y varios estudios de expresión heteróloga con distintas cepas de *P. syringae* sugieren que la mayoría de ellos funciona en multitud de especies vegetales (Cunnac *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2006; Lindeberg *et al.*, 2009; Nguyen *et al.*, 2010). Por ejemplo, AvrPto, AvrPtoB, HopF2 y HopA11 interfieren con las cascadas de quinasas de la PTI y/o ETI; HopM1 bloquea el tráfico de vesículas necesario para la deposición de calosa en la pared celular vegetal; y HopG1 y HopN1 impiden el correcto funcionamiento de la mitocondria y el cloroplasto, respectivamente (Xin y He, 2013).

Otro componente esencial para el funcionamiento del T3SS son las chaperonas, unas proteínas citosólicas pequeñas que se unen a T3E o a proteínas estructurales para evitar su polimerización prematura y/o para enmascarar dominios que podrían ser tóxicos para la bacteria (Cornelis, 2006).

La expresión de la mayoría de los genes del T3SS depende del factor  $\sigma$  ECF HrpL, que reconoce en sus promotores una secuencia denominada *hrp box* (Fouts *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2006) (Figura I16). La transcripción de *hrpL* depende de  $\sigma^{54}$ /RpoN y de los activadores HrpR y HrpS (Jovanovic *et al.*, 2011; Jovanovic *et al.*, 2014; Tang *et al.*, 2006). HrpR y HrpS son codependientes para su unión al ADN formando anillos hexámicos que, tras hidrolizar ATP, remodelan el complejo  $\sigma^{54}$ -ARN polimerasa mientras está unido al promotor y activan la transcripción (Hutcheson *et al.*, 2001; Jovanovic *et al.*, 2011; Jovanovic *et al.*, 2014; Schumacher *et al.*, 2014). Además, al promotor de *hrpL* también se une IHF, que favorece la transcripción al promover la interacción entre los complejos HrpRS y la  $\sigma^{54}$ -ARN polimerasa al doblar el ADN (Jovanovic *et al.*, 2011). La formación del complejo HrpRS está controlada por las proteínas HrpV y HrpG mediante interacciones proteína-proteína: HrpV se une a HrpS provocando su disociación de HrpR y actúa, por tanto, como anti-

activador, mientras que HrpG se une a HrpV para liberar a HrpS (Jovanovic *et al.*, 2011; Jovanovic *et al.*, 2014; Tang *et al.*, 2006; Wei *et al.*, 2005) (Figura I16). La proteólisis de HrpR por la proteasa Lon proporciona un mecanismo adicional de regulación ambiental de la expresión de *hrpL* y del T3SS. 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 HrpRS y la inducción de la expresión de *hrpL* (Lan *et al.*, 2007; Ortiz-Martín *et al.*, 2010). HrpA (la proteína estructural que forma la aguja del T3SS) regula la expresión de *hrpRS* por un mecanismo todavía desconocido, de manera que la mutación en HrpA provoca un descenso en la transcripción de varios genes del T3SS que se complementa con la sobreexpresión de *hrpRS* (Wei *et al.*, 2000). La ruta de regulación global Gac-rsm también interviene en la expresión del T3SS, de manera que un mutante *gacA* presenta niveles disminuidos de *hrpL*, *hrpRS* y *rpoN* (Chatterjee *et al.*, 2003) (Figura I16). El factor  $\sigma$  ECF AlgU responde al estrés y perturbaciones en la envuelta celular bacteriana y su expresión temporal en la planta se correlaciona con las ráfagas de estrés oxidativo producidas por el sistema defensivo de la planta (Keith *et al.*, 2003). Además de su papel clásico como inductor de la síntesis de alginato, AlgU controla la expresión de genes implicados en virulencia, incluyendo *hrpL* y *hrpRS* (Markel *et al.*, 2016). Otra proteína implicada en virulencia, el RR CorR, también se une al promotor de *hrpL* para activar su expresión (Peñaloza-Vázquez *et al.*, 2000; Sreedharan *et al.*, 2006).

Un estudio reciente ha demostrado que la transcripción de *hrpL* está bajo un control autógeno negativo. En el modelo propuesto, HrpL-ARN polimerasa se une a la caja *hrp* del promotor de *hrpJ* (situado divergentemente en 5' con respecto al promotor de *hrpL*) bloqueando las secuencias de unión de HrpRS e IHF en el promotor de *hrpL* y limitando, por tanto, su transcripción (Waite *et al.*, 2017) (Figura I16). Además, un ligero incremento en los niveles intracelulares de HrpL provocó un aumento de la secreción de HrpA y la acumulación de sustratos tardíos del T3SS, sugiriendo que el proceso de secreción está finamente regulado para funcionar de manera óptima.

La expresión del T3SS depende de la presencia de la planta y se induce por pequeñas moléculas solubles presentes en exudados de plantas hospedadoras y no hospedadoras (Haapalainen *et al.*, 2009), aunque también se puede conseguir un cierto nivel de inducción en condiciones de laboratorio (Huynh *et al.*, 1989). La temperatura, la composición del medio y el pH afectan a la expresión del T3SS de manera variable según las cepas. Se cree que la fuente de carbono óptima para la estimulación de la síntesis del T3SS en cada cepa tiene relación con la composición del apoplasto de cada hospedador (Huynh *et al.*, 1989; Tang *et al.*, 2006).

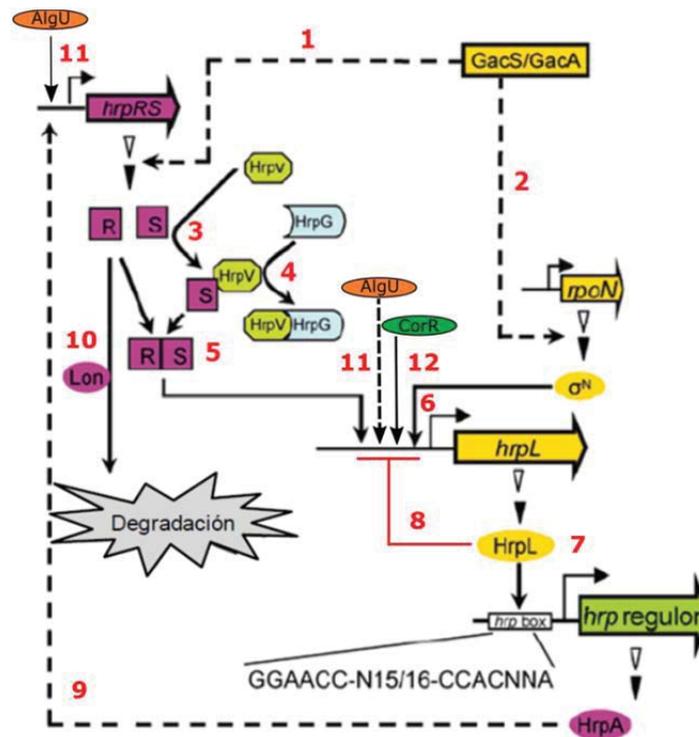


Figura I16. Modelo de regulación de los genes *hrp/hrc* en *P. syringae*.

Las señales provenientes 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 postranscripcional (2). HrpV inhibe la acción de HrpS a través de una interacción proteína-proteína (3). HrpG, por el contrario, interacciona con HrpV para liberar a HrpS (4). HrpS y HrpR forman un heterodímero (5) activando la transcripción de *hrpL*, que es dependiente del complejo RpoN( $\sigma^{54}$ )-ARN polimerasa (6). HrpL reconoce la caja *hrp* en la región promotora de los genes *hrp/hrc* activando la expresión del T3SS, de modo que se forma un aparato de secreción funcional que moviliza los efectores (7). Además, el complejo HrpL-ARN polimerasa se une a una región en 5' de su propio promotor bloqueando la unión de HrpRS e IHF y limitando su transcripción (8). HrpA tiene un efecto positivo sobre la transcripción de *hrpRS*, estimulando la expresión del T3SS (9). Bajo condiciones represoras (por ejemplo, en medio rico), los niveles de HrpR se mantienen bajos debido a su degradación por Lon (10). 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 (10). El ECF AlgU aumenta la expresión de *hrpL*, al menos promoviendo la expresión de *hrpRS* (11). El RR CorR también reconoce el promotor de *hrpL* y activa su transcripción (12). Modificado de Tang *et al.* (2006).

Las fitotoxinas tienen un papel accesorio en la virulencia de *P. syringae*, ya que, sin ser indispensables en la patogenicidad, provocan una mayor severidad de los síntomas (Bender *et al.*, 1999). Se cree son más importantes para las cepas del filogrupo 2, puesto que cuentan con un menor número de T3E (Baltrus *et al.*, 2011). Las fitotoxinas de *P. syringae* difieren en su distribución, especificidad y estructura química, aunque todas suelen ser sintetizadas por péptido sintetasas no ribosomales (NRPS, *nonribosomal peptide synthases*) y policétido sintetasas (PKS, *polyketide synthases*) (Bender *et al.*, 1999; Lindeberg *et al.*, 2008). La siringomicina, siringopeptina y siringafactina son lipopéptidos con actividad surfactante que contribuyen a la aparición de los síntomas necróticos (Berti *et al.*, 2007; Raaijmakers *et al.*, 2006), mientras que la faseolotoxina, tabtoxina y mangotoxina son toxinas antimetabolito, oligopéptidos producidos por algunos patovares de *P. syringae* capaces de inhibir la actividad de enzimas implicadas en las rutas de biosíntesis de algunos aminoácidos

(Arrebola *et al.*, 2012; Bender *et al.*, 1999; Lindeberg *et al.*, 2008). *P. syringae* pv. tomato, atropurpurea, maculicola y morsprunorum y *P. savastanoi* pv. glycinea producen coronatina, una toxina que afecta la señalización por el ácido jasmónico, interfiere con las respuestas de la planta mediadas por ácido salicílico y promueve la apertura de los estomas permitiendo la entrada de las bacterias, el crecimiento bacteriano en el apoplasto, la susceptibilidad sistémica y el desarrollo de síntomas manifestados como clorosis (Buell *et al.*, 2003; Melotto *et al.*, 2014; Melotto *et al.*, 2008; Melotto *et al.*, 2017).

La coronatina está compuesta por una molécula de ácido coronafácico (CFA) junto con el ácido coronámico (CMA), que se sintetizan de forma independiente y se unen mediante un enlace amida para formar el compuesto final (Bender *et al.*, 1999). El *cluster* génico de biosíntesis de coronatina suele encontrarse codificado en plásmidos y contiene, entre los operones de síntesis de CFA y CMA, tres genes reguladores indispensables para la activación de la ruta (Figura I17). Estos forman parte de un TCS modificado que incluye, además de la HK CorS y el RR CorR, un tercer componente (CorP) cuya función no se ha determinado todavía (Braun *et al.*, 2008; Smirnova *et al.*, 2002; Ulrich *et al.*, 2005). La unión de CorR a los promotores de los operones CFA y CMA se demostró mediante ensayos *in vitro* (Liyanage *et al.*, 1995; Ullrich *et al.*, 1995). Además, el factor  $\sigma$  alternativo RpoN ( $\sigma^{54}$ ) es necesario para la biosíntesis de coronatina, como ocurre con otros determinantes de virulencia de *P. syringae* (Alarcón-Chaidez *et al.*, 2003).

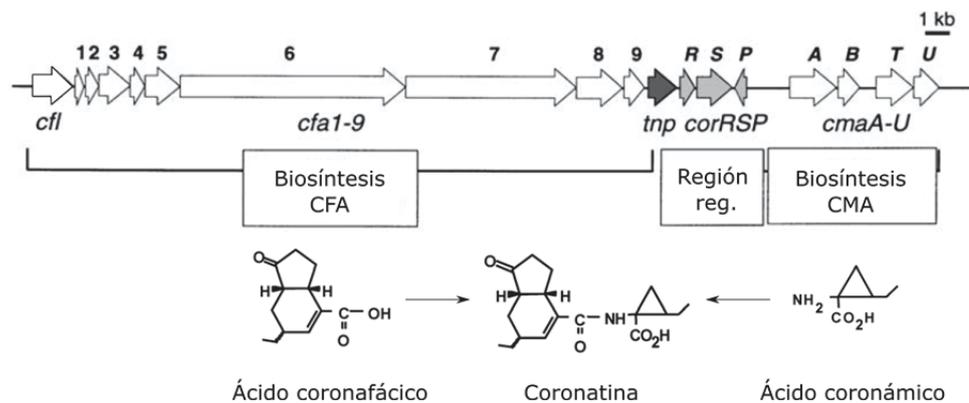


Figura I17. Organización génica del *cluster* biosintético de la coronatina en *P. savastanoi* pv. glycinea. Mapa génico de los genes implicados en la síntesis de coronatina y su regulación señalando los genes implicados en la síntesis de CFA y CMA (blanco), así como los reguladores implicados en su activación (gris). En la parte inferior de la figura se muestran las estructuras químicas de los ácidos coronafácico (CFA) y coronámico (CMA) y de la toxina coronatina. Adaptada de Smirnova *et al.* (2002).

## 2.2. Motilidad

La motilidad es crucial para la bacteria, ya que le permite responder a estímulos externos dirigiéndose hacia entornos favorables o huyendo de condiciones adversas, incrementando así su competitividad (Smith y Hoover, 2009). En la infección por *P. syringae*, es clave para invadir el apoplasto del hospedador, la diseminación a otros hospedadores y la supervivencia en el ambiente (Melotto *et al.*, 2008).

El flagelo es el orgánulo de locomoción bacteriana más estudiado por ser el más complejo y efectivo, capaz de propulsar a las bacterias individualmente en medios líquidos (motilidad tipo *swimming*) y poblacionalmente sobre superficies o a través de ambientes viscosos (motilidad tipo *swarming*) (Jarrell y McBride, 2008; Kearns, 2010). Adicionalmente, los flagelos desempeñan un papel importante en la adhesión a sustratos, la formación de biopelículas y contribuyen a la virulencia de las bacterias patógenas (Chaban *et al.*, 2015; Smith y Hoover, 2009). El flagelo se compone de unas 30 proteínas estructurales presentes en número variable en la estructura final y se puede dividir en tres partes: cuerpo basal (ancla la estructura a la membrana bacteriana y contiene la maquinaria de rotación), gancho (sale del cuerpo basal al exterior de la membrana y actúa como enganche) y filamento (al que se transmite el movimiento y actúa como propulsor, constituye un PAMP) (Chaban *et al.*, 2015) (Figura I18A). La biosíntesis del flagelo requiere el ensamblaje secuencial de sus componentes, lo que se logra con una regulación jerárquica de la transcripción de los genes estructurales (Smith y Hoover, 2009) (Figura I18B). Dicha regulación está muy bien estudiada en *P. aeruginosa*, que posee un flagelo polar cuyos genes de biosíntesis se clasifican en cuatro clases: I-IV. Los genes de clase I codifican proteínas reguladoras que inician la transcripción de genes estructurales tempranos, por lo que se les conoce como reguladores maestros. El regulador maestro en *Pseudomonas* es FleQ, un activador dependiente de  $\sigma^{54}$  que regula la expresión de la mayoría de los genes flagelares. Los genes de clase II dependen tanto de FleQ como del factor  $\sigma^{54}$  y codifican las proteínas necesarias para el inicio del ensamblaje del flagelo o proteínas reguladoras, como FleS. Los genes de clase III dependen de  $\sigma^{54}$  y de FleS y codifican las proteínas que constituyen el cuerpo basal (*flgF*) del flagelo y el gancho. Los genes de clase IV requieren el factor  $\sigma$  alternativo  $\sigma^{28}$  (FliA) y expresan proteínas que forman parte del motor flagelar y del filamento, destacando *fliC*, el gen que codifica la flagelina, la proteína estructural del filamento (Dasgupta *et al.*, 2003) (Figura I18). Además de la biosíntesis del flagelo, el regulador maestro FleQ también regula otros procesos dentro del género *Pseudomonas* como la síntesis de EPS, surfactantes, adhesinas o el sistema de secreción tipo VI (Baraquet y Harwood, 2016; Jiménez-Fernández *et al.*, 2016; Molina-Henares *et al.*, 2016; Nogales *et al.*, 2015; Pérez-Mendoza *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2018). En *P. syringae* la mayoría de los genes que intervienen en la cascada flagelar están conservados con respecto a *P. aeruginosa* (Nogales *et al.*, 2015). Sin embargo, se ha observado que los patógenos *averrhoi*, *phaseolicola*, *tabaci* y *tomato* presentan múltiples flagelos polares (Arnold *et al.*, 2011; Nogales *et al.*, 2015; Taguchi *et al.*, 2008; Wei *et al.*, 2012), por lo que la regulación de la biosíntesis flagelar debe ser distinta.

El flagelo es esencial para la motilidad tipo *swimming* y *swarming*, aunque esta última también depende de la producción de biosurfactantes (Kearns, 2010; Nogales *et al.*, 2015). Los biosurfactantes son moléculas anfipáticas compuestas por una parte hidrofóbica lipídica y una parte hidrofílica que puede contener carbohidratos, péptidos, alcoholes o ácidos carboxílicos (Santos *et al.*, 2016). Su importancia en motilidad radica en que reducen la tensión superficial entre la bacteria y una superficie facilitando así el movimiento (Burch *et al.*, 2010; Kearns, 2010). Además de su papel en motilidad, pueden contribuir a la formación y dispersión de biopelículas, acceso a nutrientes hidrofóbicos, transmisión de señales insolubles e incluso actuar como toxinas o antimicrobianos (Burch *et al.*, 2010).

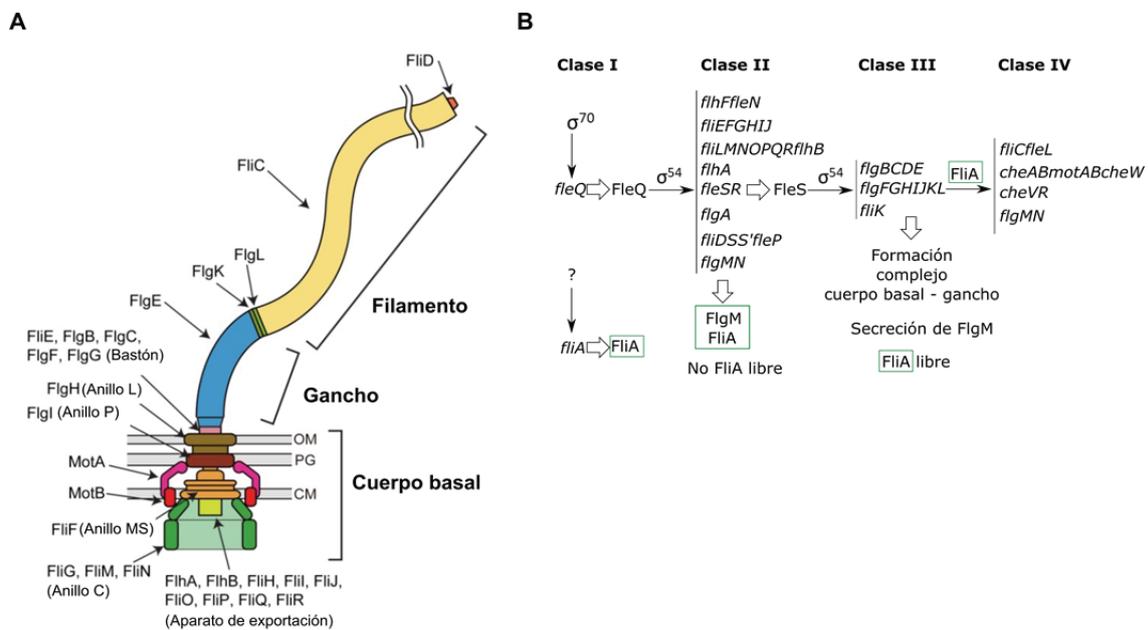


Figura 118. Síntesis y estructura del flagelo de *Pseudomonas*.

A. Representación esquemática del flagelo señalando sus partes básicas: filamento, gancho y cuerpo basal, así como los genes y subcomponentes que forman cada una. Modificado de Morimoto y Minamino (2014). B. Jerarquía transcripcional de expresión de los genes flagelares. Las flechas negras representan procesos de transcripción dependientes del factor  $\sigma$  indicado (encima) y las flechas blancas indican traducción. Modificado de Dasgupta *et al.* (2003).

Las bacterias del género *Pseudomonas* sintetizan biosurfactantes de distinta naturaleza, entre los que destacan los ramnolípidos y los lipopéptidos cíclicos, considerándose el segundo mayor grupo bacteriano productor de estos compuestos después de *Bacillus sp.* (Das et al., 2008; Santos et al., 2016). Los ramnolípidos, que han sido más estudiados en *P. aeruginosa*, se sintetizan enzimáticamente y están formados por una o dos moléculas de ramnosa y una cadena lipídica (Santos et al., 2016; Soberon-Chavez et al., 2005). En las bacterias que interactúan con plantas es común la producción de lipopéptidos cíclicos mediante NRPS, como, por ejemplo, la viscosina y los masetólidos de *P. fluorescens* o la putisolvina de *P. putida* (Das et al., 2008; Raaijmakers et al., 2006). En fitopatógenos, estos compuestos son esenciales para la colonización epifítica de la hoja, permitiendo el movimiento en su superficie cerosa y reteniendo humedad (Burch et al., 2016; Burch et al., 2010; Burch et al., 2014). Además, algunos biosurfactantes de *P. syringae* causan daño celular y sintomatología de la enfermedad al ser producidos en el apoplasto (Raaijmakers et al., 2006) y por ello son también considerados toxinas, como se ha mencionado anteriormente. En *P. syringae* B728a la producción del biosurfactante siringafactina es dependiente de temperatura, del contacto con una superficie sólida y del regulador maestro flagelar FleQ (Burch et al., 2011; Burch et al., 2012; Hockett et al., 2013).

### 2.3. Sideróforos

El hierro es un compuesto esencial para el crecimiento y metabolismo de los microorganismos, pero sus propiedades químicas hacen que suela estar inaccesible en medios aeróbicos debido a que está oxidado y es poco soluble (Andrews *et al.*, 2003; Cornelis, 2010). Una estrategia utilizada por las bacterias para obtener

hierro es la síntesis de unos compuestos denominados sideróforos, que son secretados al medio extracelular donde quelan el hierro en su forma férrica siendo posteriormente importados de nuevo al citoplasma donde lo liberan, lo que permite su utilización (Andrews *et al.*, 2003; Cornelis, 2010). Los sideróforos constituyen una herramienta de competición por el hierro ambiental, por lo que distintas cepas sintetizan compuestos que difieren en sus propiedades, e incluso algunas bacterias pueden importar sideróforos sintetizados por otras (Cornelis, 2010; Niehus *et al.*, 2017). Aunque su papel fundamental es la captación de hierro, los sideróforos también pueden unir otros iones, como  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  o  $\text{Cd}^{2+}$  (Hannauer *et al.*, 2012; Koh *et al.*, 2017).

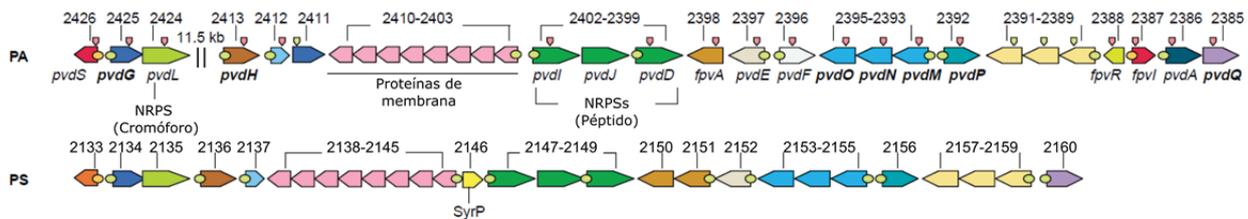
La producción de sideróforos es clave para el desarrollo de la infección por patógenos de animales como *P. aeruginosa* o *Y. pestis*. Por ejemplo, la pioverdina de *P. aeruginosa* es esencial para la colonización del hospedador, la formación de biopelículas y su competitividad en suelo (Cornelis, 2010). Pero el impacto de estos compuestos en fitopatógenos varía dependiendo del patosistema: *Dickeya* y *Pectobacterium* requieren sideróforos para causar infección, mientras que las cepas de *P. syringae* estudiadas mostraron resultados diversos (Franza y Expert, 2013) y los mutantes carentes de sideróforos de los patovares phaseolicola, syringae y tomato no mostraron alteraciones en virulencia en sus hospedadores naturales (Cody y Gross, 1987; Jones *et al.*, 2007; Jones y Wildermuth, 2011; Owen y Ackerley, 2011). Curiosamente, estas bacterias suelen poseer varios sideróforos y sistemas de transporte, por lo que también pueden captar sideróforos producidos por la planta, como el citrato o la nicotianamina (Franza y Expert, 2013). En cambio, la pioverdina es necesaria para la infección de hojas de tabaco por *P. amygdali* pv. tabaci (Taguchi *et al.*, 2010).

El sideróforo primario producido por numerosas cepas de *Pseudomonas* es la pioverdina, un pigmento descubierto a principios del siglo XX por su color verdoso y fluorescencia y que posteriormente se relacionó con la captación de hierro (Cezard *et al.*, 2015; Ringel y Bruser, 2018). La capacidad de síntesis de este compuesto se utilizó para clasificar a las cepas como *Pseudomonas* fluorescentes (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. syringae*) o no fluorescentes (*P. alcaligenes*, *P. mendocina*, *P. stutzeri*). El término pioverdina engloba más de 100 compuestos distintos y, aunque su estructura es variable, todos comparten un fluoróforo derivado de la 2,3-diamino-6,7-dihidroxiquinolina, una cadena peptídica de 6-14 aminoácidos, algunos de los cuales son inusuales (no proteogénicos), unida por su extremo amino al grupo carboxilo del cromóforo, y un grupo acilo derivado de un ácido dicarboxílico y unido a la posición C-3 del cromóforo (Figura I19). El fluoróforo está conservado en *Pseudomonas* y la agrupación catecol une  $\text{Fe}^{3+}$  provocando la pérdida de fluorescencia. La cadena peptídica es la parte más importante del sideróforo, no sólo por su mayor tamaño sino por su variabilidad y su papel en el reconocimiento por parte de la bacteria (Cezard *et al.*, 2015).

Las pioverdinas están bien estudiadas en *P. aeruginosa* por ser esenciales para la colonización del hospedador. Están diseñadas y optimizadas para cumplir dos funciones principales: quelar los cationes  $\text{Fe}^{3+}$  de forma hexacoordinada y activar el transportador FpvA (Cezard *et al.*, 2015). Su síntesis comienza en el citosol, donde un complejo enzimático formado por NRPS, PKS y otras enzimas denominado siderosoma sintetiza la ferribactina, el precursor peptídico de la pioverdina (Ravel y Cornelis, 2003; Ringel y Bruser, 2018). Esta se transporta al periplasma, donde se sintetiza el fluoróforo y se producen modificaciones de las cadenas laterales

para formar la molécula final de pioverdina. Su exportación al exterior celular puede seguir diferentes rutas, mientras que la importación de ferrioverdina al periplasma tiene lugar a través de la proteína FpvA. Una vez allí, el hierro se reduce a  $Fe^{2+}$  y la molécula de pioverdina se recicla exportándose de nuevo (Ravel y Cornelis, 2003; Ringel y Bruser, 2018). Cada receptor tipo FpvA reconoce un único tipo de pioverdina, que puede estar producida por dicha bacteria o por otros microorganismos (Ringel y Bruser, 2018).

A



B

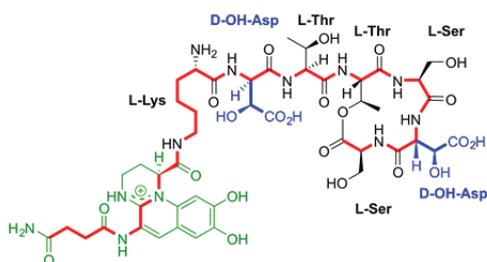


Figura I19. Genes implicados en la biosíntesis de pioverdina en *P. aeruginosa* y *P. syringae*.

A. En *P. syringae* (PS) todos los genes se encuentran formando un único *cluster* y carece del sistema anti- $\sigma$  FpvR/FpvI y de algunos genes biosintéticos (PA2411, *pvdF* y *pvdA*), con respecto a *P. aeruginosa* (PA). Además, contiene el gen *SyrP*, homólogo a un regulador de la síntesis de siringomicina de *P. syringae* pv. *syringae*. Modificado de Ravel y Cornelis (2003). B. Estructura química de la pioverdina de *P. syringae* deducida a partir de la organización modular de las péptido sintetasas no ribosomales PvdI, PvdJ, PvdK y PvdD y de análisis de masas y de RMN (Bultreys *et al.*, 2004; Cezard *et al.*, 2015). El cromóforo dihidroquinolina está representado en su forma de ácido carboxílico (líneas verdes). Los D-aminoácidos están coloreados en azul y la línea roja muestra la columna vertebral del péptido.

Los sideróforos secundarios están menos extendidos dentro del género *Pseudomonas* y pueden ser sintetizados por NRPS (piochelina, yersiniabactina) o mediante otras rutas (acromobactina) (Cornelis, 2010). La yersiniabactina es un sideróforo heterocíclico que se aisló por primera vez en *Yersinia pestis* (Figura I20), aunque también lo sintetizan varias enterobacterias, incluidas determinadas cepas comensales y patógenas de *E. coli*, y algunas cepas de *P. syringae* (Cornelis, 2010). La ruta de síntesis de yersiniabactina incluye proteínas biosintéticas y de transporte, de entre las que destacan Irp1 (NRPS) e Irp2 (NRPS/PKS) que sintetizan yersiniabactina a partir de un ácido salicílico, tres cisteínas y un malonil-CoA (Figura I20). El complejo formado por la yersiniabactina y el hierro  $Fe^{3+}$  es reconocido por la proteína de membrana externa FyuA (*ferric yersiniabactin uptake A*) y transportado al citoplasma por el transportador YbtPQ, ubicado en la membrana interna. Una vez allí, el hierro se incorpora al metabolismo tras su reducción (Perry y Fetherston, 2011). Estudios recientes indican que, además de su papel como sideróforo, la yersiniabactina protege a *E. coli* de la toxicidad del cobre a la vez que permite utilizarlo para su nutrición (Koh *et al.*, 2017).

El *cluster Ybt* de *P. syringae* presenta baja identidad con respecto al de *Yersinia* y parece haber evolucionado separadamente, aunque todas las proteínas están presentes y son homólogas funcionalmente (Bultreys *et al.*, 2006) (Figura I20). Su distribución génica varía dentro del complejo *P. syringae*, estando presente en el patovar tomate y phaseolicola y ausente en *syringae* B728a (Bultreys *et al.*, 2006; Jones *et al.*, 2007; Jones y Wildermuth, 2011).

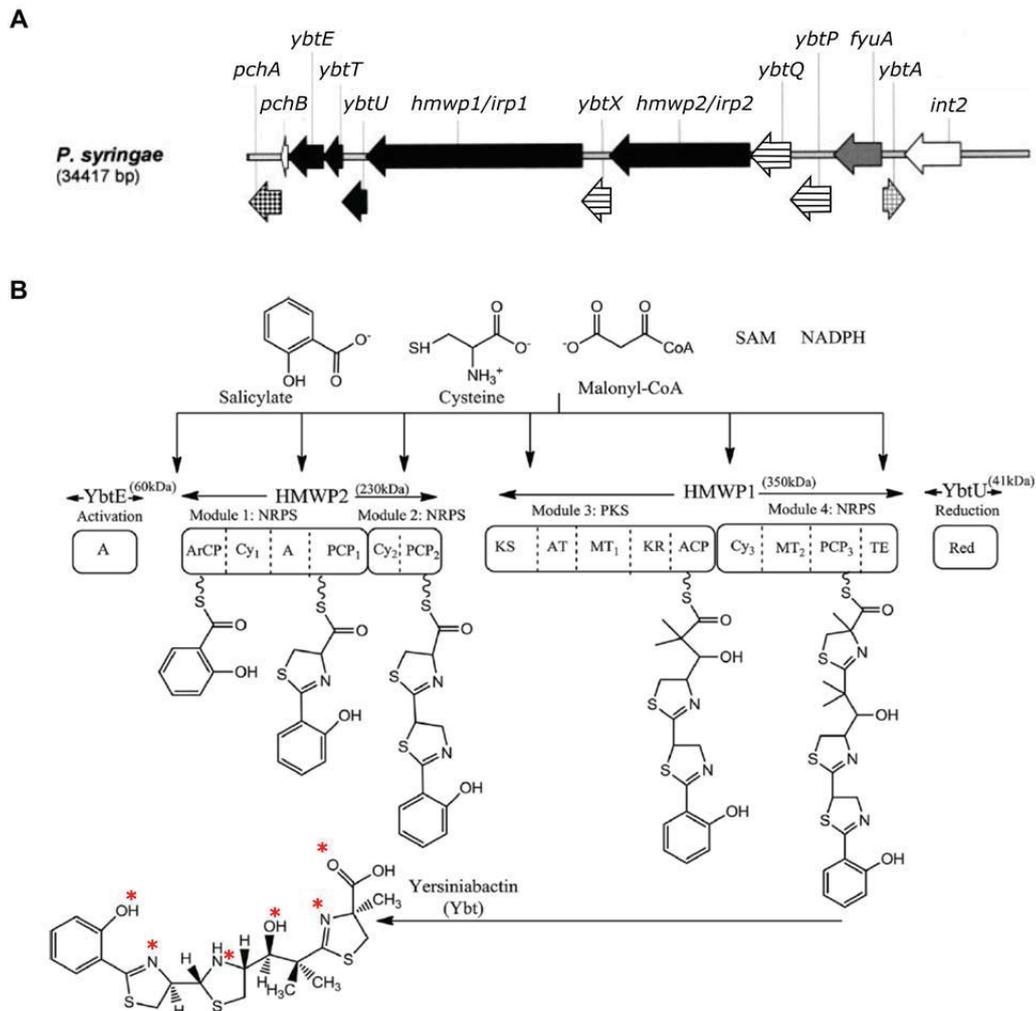


Figura I20. *Cluster Ybt* y proceso de biosíntesis de la yersiniabactina en *P. syringae*.

A. Esquema de los genes de biosíntesis de yersiniabactina de *P. syringae*. El color de los genes indica la función de sus productos: enzimas biosintéticas (negro), receptores de membrana (gris), síntesis del precursor isocorismato (cuadrados oscuros), regulador (cuadrados claros) y proteínas transportadoras (líneas horizontales). Los genes coloreados en blanco no presentan un homólogo en *Yersinia*. Adaptado de Bultreys *et al.* (2006). B. Representación esquemática del proceso de biosíntesis de yersiniabactina. En la parte superior se muestran las moléculas utilizadas para la reacción, en la parte central se representan las enzimas implicadas con sus correspondientes módulos y la reacción química que catalizan, y en la parte inferior, se muestra la estructura química final de la yersiniabactina, con asteriscos rojos que identifican los sitios de coordinación para un ión Fe<sup>3+</sup>. Modificado de Ahmadi *et al.* (2015).

La síntesis de sideróforos está muy regulada debido al gasto energético que supone y a los problemas causados por el estrés oxidativo que provoca el exceso de hierro intracelular (Cornelis, 2010). El regulador global Fur (*ferric uptake regulator*) controla la homeostasis del hierro en *Pseudomonas* y otras muchas

bacterias. Tras la unión a  $Fe^{2+}$ , su co-represor, reprime transcripcionalmente los genes de captación de hierro y de otras rutas metabólicas uniéndose a la caja Fur de sus promotores, que están situadas entre -35 y -10 (Andrews *et al.*, 2003). En *P. aeruginosa*, Fur detecta la presencia de  $Fe^{2+}$  en el citoplasma y reprime los genes implicados en la captación de hierro, incluidos los que codifican las proteínas reguladoras FpvR, Fpvl y PvdS, involucradas en la síntesis y captación de pioverdina y en la producción de toxinas. PvdS es un ECF requerido para la expresión de los genes de biosíntesis de la pioverdina y otros genes, algunos relacionados con la virulencia. Fpvl es otro ECF necesario para la expresión de FpvA, el receptor/importador de pioverdina situado en la membrana externa, y FpvR es un factor anti- $\sigma$  que se une a PvdS y Fpvl y, por lo tanto, los inactiva (Ringel y Bruser, 2018). Asimismo, Fur reprime la expresión de un regulador necesario para la síntesis y captación de piochelina (PchR), sistemas de dos componentes implicados en la importación de otros sideróforos y receptores dependientes de transportadores de tipo TonB (Cornelis, 2010). En cuanto a la yersiniabactina, Fur también reprime la transcripción de la mayoría de los operones necesarios para la síntesis de este sideróforo. Además, YbtA, un regulador transcripcional de la familia AraC/XylS, controla negativamente su propia expresión y activa los promotores *ybt* en condiciones limitantes de hierro mediante su unión a unas secuencias específicas que se encuentran en ellos (Perry y Fetherston, 2011). Por tanto, la regulación de la biosíntesis de sideróforos por hierro es muy compleja, pero también hay otras señales que modulan la producción de sideróforos (revisado en Ringel y Bruser (2018)) a través de la ruta Gac-rsm, que regula la producción de pioverdina tanto en *P. aeruginosa* (Frangipani *et al.*, 2014) como en *P. syringae* (Yu *et al.*, 2014).

#### 2.4. Síntesis de exopolisacáridos

Los EPS bacterianos confieren una ventaja adaptativa al proteger a la célula de estreses abióticos y bióticos, incluyendo las respuestas defensivas del hospedador. Son los principales constituyentes de la matriz extracelular donde participan en procesos de reconocimiento entre células, adhesión a superficies y formación de biopelículas. Están sintetizados por rutas biosintéticas diferentes, pero suelen presentar un esquema de regulación similar (Schmid *et al.*, 2015). Además, sus interesantes propiedades químicas y reológicas han despertado un interés creciente en su producción biotecnológica (Pérez-Mendoza y Sanjuán, 2016).

Las bacterias del género *Pseudomonas* son productoras prolíficas de EPS, con cepas que producen multitud de ellos: alginato, celulosa (acetilada o no), levano, Pea, Peb, Pel y Psl (Mann y Wozniak, 2012; Nilsson *et al.*, 2011; Spiers *et al.*, 2003). Esta variabilidad sugiere que dichos compuestos aportan ventajas diferentes a la célula aunque, en algunos casos, sus funciones son solapantes. Los polisacáridos capsulares (levano, alginato) se sitúan en la superficie y tienen una función protectora, mientras que los agregativos (celulosa, Pel, Psl) proporcionan integridad estructural e interaccionan con otros componentes de la matriz (Mann y Wozniak, 2012). Sin embargo, la presencia de los distintos EPS es muy variable, llegando a diferir incluso entre cepas de la misma especie, tanto en distribución como en función. Por ejemplo, el EPS Pel es prescindible para la formación de biopelículas de *P. aeruginosa* PAO1, mientras que en la cepa PA14 es el principal constituyente de la matriz (Colvin *et al.*, 2011; Colvin *et al.*, 2012).

El alginato es un polímero de alto peso molecular formado por monómeros no repetidos de ácidos L-gulurónico y D-manurónico unidos por enlaces  $\beta$ -1,4 (Mann y Wozniak, 2012). Su síntesis y regulación han sido muy estudiadas en *P. aeruginosa*, donde constituye un factor de virulencia relevante al proteger a la bacteria de la desecación y de los tratamientos antibióticos en infecciones crónicas (Gurung *et al.*, 2013; Mah *et al.*, 2003). En algunas cepas de *P. syringae* es el principal EPS producido en las lesiones acuosas y contribuye también a la colonización y supervivencia en la superficie de la hoja (Yu *et al.*, 1999). La expresión de alginato en *Pseudomonas* fluorescentes se estimula con el aumento de la osmolaridad del medio y con la deshidratación (Singh *et al.*, 1992). El regulador maestro de la síntesis de alginato es el ECF AlgU (también denominado RpoE, RpoT o  $\sigma^{22}$ ). Este factor  $\sigma$  se encuentra normalmente inactivo al estar unido a su factor anti- $\sigma$  MucA (Figura I21A). Por una señal de estrés en la membrana como el estrés oxidativo, elevada osmolaridad o la desestabilización de la membrana, se desencadena la respuesta RIP que resulta en la digestión de MucA y en la liberación de AlgU (Figura I21B). Este ECF activa la expresión de su propio operón y de los genes de biosíntesis y regulación del alginato, entre otros (Hay *et al.*, 2014). Estos genes están bastante conservados en multitud de *Pseudomonas*, pero la variabilidad de sus regiones promotoras indica que su regulación es diferente, probablemente por la adaptación a sus correspondientes nichos ecológicos (Fakhr *et al.*, 1999; Peñaloza-Vázquez *et al.*, 1997).

El levano es un polifrufructano compuesto por monómeros unidos mediante enlaces glucosídicos  $\beta$ -2,6 y a veces ramificaciones  $\beta$ -2,1, cuya biosíntesis la lleva a cabo una única enzima extracelular denominada levansucrasa. En *P. savastanoi* pv. *glycinea* se determinó que este EPS no contribuye a la estructura de biopelículas pero parece actuar como almacén energético en ellas, ya que los niveles de levansucrasa aumentan en fases tempranas de su formación (Laue *et al.*, 2006).

Pel es un EPS catiónico formado por monómeros de *N*-acetil galactosamina y *N*-acetil glucosamina unidos por enlaces glucosídicos  $\beta$ -1,4. En *P. aeruginosa* constituye un componente de la matriz de las biopelículas donde interacciona con el ADN extracelular y es capaz de compensar la ausencia de Psl, otro EPS necesario para la integridad de estas películas (Jennings *et al.*, 2015). Los genes para la síntesis de Pel no parecen estar presentes en *P. syringae*.

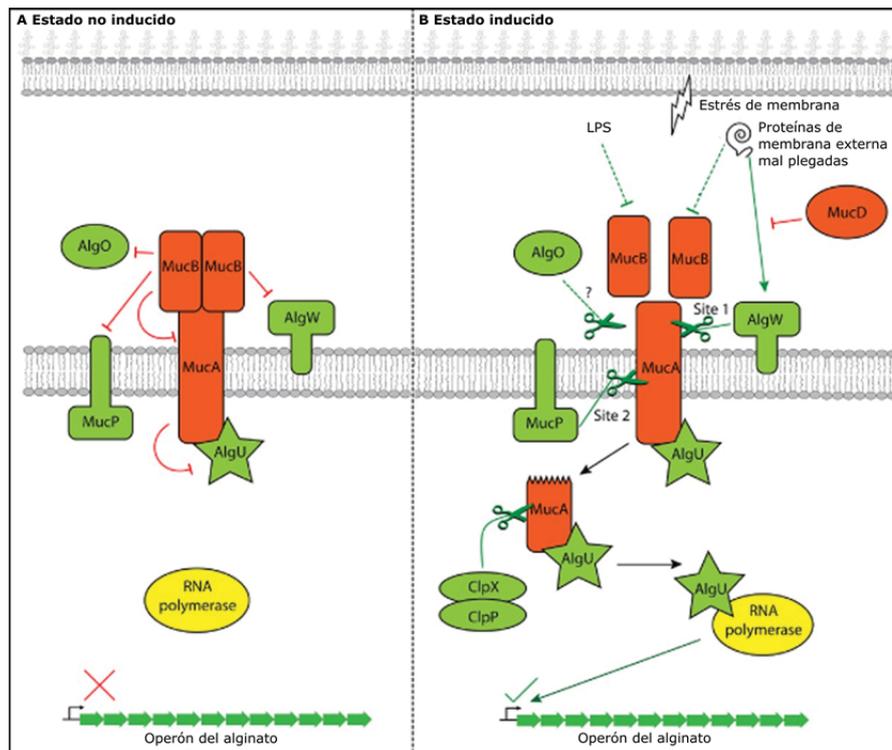


Figura I21. Mecanismo de activación del ECF AlgU por la cascada RIP en *P. aeruginosa*.

Las proteínas y líneas verdes indican un efecto positivo en la producción de alginato y las rojas, un efecto negativo. Las líneas discontinuas indican que el mecanismo no está claro o es desconocido. A. En la ausencia de estrés de membrana (rayo), el sistema está 'apagado': AlgU está secuestrado en la membrana interna por su factor anti- $\sigma$  MucA, que forma un complejo con MucB. La interacción MucA-MucB protege a MucA de la proteólisis por AlgW y MucP. B. Bajo condiciones de estrés, el sistema se activa: los daños en la membrana activan por diversas vías la proteólisis de MucA, liberando AlgU para interactuar con la ARN polimerasa y activar la expresión de los genes de síntesis de alginato.

El Psl está compuesto por repeticiones de un pentasacárido que contiene D-manosa, D-glucosa y L-ramnosa (Mann y Wozniak, 2012). El locus *psl* de *P. aeruginosa* PAO1 contiene 15 genes, pero solo se requieren 11 de ellos para formar una biopelícula adherente ya que los últimos 3 genes del operón (*pslMNO*) son prescindibles para esta función. *P. syringae* contiene todos los genes del operón excepto *pslC*, *pslL*, *pslM* y *pslO*, de los cuales solo *pslC* y *pslL* son indispensables para la síntesis de Psl (Byrd *et al.*, 2009; Mann y Wozniak, 2012). Sin embargo, en algunos patovares de *P. syringae* existe un gen adicional intercalado en el operón que podría suplir la carencia de *pslL* (Mann y Wozniak, 2012) y también poseen un ortólogo de *pslC* en otro lugar del cromosoma.

Los EPS Pea y Peb (*putida exopolysaccharide A* y *B*) están presentes en *P. putida* y parecen jugar un papel muy importante en la formación de biopelículas en esta cepa. Sin embargo, su ausencia no compromete la formación de la misma, por lo que se ha propuesto que actúan simplemente como estabilizadores de la estructura (Nilsson *et al.*, 2011).

La celulosa es un homopolímero lineal formado por D-glucosa unida por enlaces  $\beta$ -1,4 sintetizado por un complejo multiproteico anclado a la membrana. Se aisló por primera vez de *Komagaeibacter xylinus* (antes *Acetobacter xylinum*) y posteriormente se vio que estaba presente en muchas bacterias Gram-negativas

(Römling y Galperin, 2015). Los genes de biosíntesis de la celulosa están ampliamente distribuidos dentro del género *Pseudomonas*, donde se pueden distinguir dos tipos de operones: *bcs*, que codifica la maquinaria biosintética de la celulosa no acetilada y *wss*, que contiene algunos genes homólogos a *bcs* y otros genes necesarios para su acetilación (Römling y Galperin, 2015; Ude *et al.*, 2006; Whitney y Howell, 2013). La sobreproducción de celulosa provoca un fenotipo característico en las colonias que se denomina WS (*wrinkly spreader*) o *rdar* (*red, dry and rough*) y que se puede detectar fácilmente en presencia del colorante rojo congo (Römling, 2005; Ude *et al.*, 2006). *P. fluorescens* SBW25 y Pto DC3000 producen la forma acetilada de la celulosa, que contribuye a la integridad de las películas formadas en la interfase aire-líquido (*pellicles*) (Farias *et al.*, 2019; Spiers *et al.*, 2013; Ude *et al.*, 2006).

### 3. Pto DC3000 como modelo en el estudio de la interacción patógeno-planta

*P. syringae* pv. tomato (Pto) causa la mancha negra del tomate, una enfermedad ampliamente distribuida a nivel mundial y de gran relevancia económica (Hirano y Upper, 2000; Preston, 2000). En los últimos años se han reportado brotes esporádicos de Pto que causaron daños masivos en los cultivos y pérdidas en la producción de tomate y crucíferas, el otro hospedador natural de algunas cepas (Garibaldi *et al.*, 2007; Koike *et al.*, 2017; Shenge *et al.*, 2007).

Los síntomas de la infección por Pto son lesiones de color marrón oscuro a negro de forma y tamaño variables distribuidos en las hojas, frutos y tallos de la planta, a veces rodeadas de un halo clorótico. Cuando se concentran en el borde de las hojas provocan una extensa necrosis marginal, mientras que en el fruto suelen ser pequeñas, con forma de lunar, superficiales y presentar un halo verde en frutos inmaduros. El desarrollo de la enfermedad puede resultar en una clorosis generalizada, seguida de desecación y, en casos severos, las plantas infectadas presentan retraso en la madurez del fruto y reducen su producción (Hirano y Upper, 2000; Preston, 2000). En el caso de las crucíferas, donde el producto final de consumo es la hoja, se pierde por completo la producción debido a la dificultad para separar las hojas sanas de las enfermas a gran escala (Koike *et al.*, 2017). Las bacterias pueden sobrevivir en el suelo, en restos de plantas enfermas, en las semillas o en el ambiente. El patógeno se transmite y propaga asociado al agua, por las salpicaduras de agua de lluvia o por el riego mediante aspersion (Hirano y Upper, 2000; Morris *et al.*, 2008). La infección en 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).

Pto DC3000 es una cepa resistente a rifampicina derivada de NCPPB1106 que se empezó a utilizar en investigación por la facilidad con que acepta ADN exógeno y plásmidos (Cuppels, 1986). Cuando posteriormente se descubrió que también infectaba a la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (Whalen *et al.*, 1991), pasó a ser un referente para el estudio a nivel molecular de la interacción patógeno-planta (Xin y He, 2013). Además, provoca una respuesta hipersensible (HR) en hospedadores no compatibles como el tabaco (*Nicotiana tabacum*), *Nicotiana bethamiana* y judía (*Phaseolus vulgaris*) (Fouts *et al.*, 2003; Preston, 2000).

Pto DC3000 se engloba en el filogrupo 1, genomospecie 3 del complejo *P. syringae* y fue la primera *Pseudomonas* fitopatógica secuenciada (Berge *et al.*, 2014; Buell *et al.*, 2003). Su genoma consta de 5726 genes anotados codificados en un cromosoma circular de ~6,4 Mb y dos plásmidos, pDC3000A y pDC3000B, de 73 y 67 kb respectivamente. El análisis comparativo de su genoma con el de otras *Pseudomonas* ha permitido detectar la presencia de rutas metabólicas esenciales como la glucólisis, gluconeogénesis, la ruta de las pentosas fosfato y el ciclo de Krebs, pero es incapaz de convertir el piruvato en lactato por carecer de la enzima lactato deshidrogenasa (Buell *et al.*, 2003). La necesidad de adaptación a ambientes cambiantes se refleja en su repertorio génico, ya que según la base de datos Mist (mistdb.com), un 20% las proteínas codificadas en el genoma están relacionadas con la transducción de señales, de las cuales casi 500 forman parte de sistemas de uno o dos componentes y 74 están relacionadas con la quimiotaxis. Cuenta también con 15 factores  $\sigma$ , de los cuales 10 son ECF y están implicados, por tanto, en la respuesta a señales ambientales (Llamas *et al.*, 2014). El genoma de DC3000 codifica además numerosas proteínas implicadas de forma directa o indirecta en la virulencia, como aquellas relacionadas con el T3SS y el bloqueo de la respuesta inmunitaria del hospedador, la producción de toxinas, motilidad, adhesión, sistemas de captación de hierro o enzimas extracelulares, como se ha mencionado a lo largo del apartado anterior.

### 3.1. Factores de virulencia

A diferencia de otras cepas de *P. syringae*, Pto DC3000 es un epífito débil, no tiene una fase de multiplicación en la superficie de la hoja, por lo que depende de una entrada rápida al apoplasto (Boureau *et al.*, 2002; Xin y He, 2013; Xin *et al.*, 2018). Para ello, cuenta con los sistemas de motilidad, la toxina coronatina y el repertorio de T3E más extenso descrito en *P. syringae* hasta la fecha (Baltrus *et al.*, 2011; Lindeberg *et al.*, 2012), de los cuales utiliza 28 activamente, expresa 7 de manera débil y 12 están codificados por pseudogenes (Chang *et al.*, 2005; Ferreira *et al.*, 2006; Schechter *et al.*, 2006).

El factor de virulencia esencial de Pto DC3000 es el T3SS, ya que un mutante sin él pierde la capacidad de llevar a cabo la infección en hospedadores compatibles y de desencadenar HR en hospedadores no compatibles (Cunnac *et al.*, 2011; Preston, 2000; Xin y He, 2013). Pto DC3000 destaca por ser utilizada como organismo modelo para el estudio de la regulación del T3SS en *P. syringae*. El conocimiento adquirido acerca de la regulación del sistema HrpRS sobre la expresión de *hrpL* y la auto-regulación de HrpL proviene de experimentos realizados en esta bacteria (Tang *et al.*, 2006; Waite *et al.*, 2017). En el laboratorio del Dr. Alan Collmer se generó un mutante de Pto DC3000 carente de todos los T3E, lo que supuso una herramienta esencial para evaluar individualmente el papel específico de distintos efectores de esta y otras cepas en la interacción con diversos hospedadores (Cunnac *et al.*, 2011; Wei y Collmer, 2018; Wei *et al.*, 2018). Dicha cepa ha permitido determinar que existe un mínimo de 8 genes (AvrPtoB, AvrE, HopM1, HopE1, HopG1, HopAM1, HopAA1-1 y HopN1) necesarios para restaurar el crecimiento bacteriano y la producción de síntomas en un hospedador compatible (Cunnac *et al.*, 2011).

La toxina coronatina constituye un factor de virulencia secundario para Pto D3000, dado que los mutantes deficientes en su producción provocan la enfermedad en plantas de tomate aunque con una severidad menor a la mostrada con la cepa silvestre (Sreedharan *et al.*, 2006). Los genes implicados en la síntesis de coronatina no están codificados en plásmidos y agrupados, como ocurre con otros patovares, sino que están el cromosoma y separados 26 kb. Por un lado está el operón de síntesis de CFA y por otro, los genes reguladores junto al operón de síntesis de CMA (Brooks *et al.*, 2004). Otra peculiaridad de Pto DC3000 es que la síntesis de coronatina no está termorregulada como se ha observado para *P. savastanoi* pv. *glycinea*, que se activa a bajas temperaturas (18°C) y está reprimida a 28°C. Estas diferencias parecen ser debidas a la secuencia distinta de la HK de membrana CorS, aunque el mecanismo exacto todavía no se ha dilucidado (Braun *et al.*, 2008; Geng *et al.*, 2014). En Pto DC3000 se confirmó que el RR CorR es necesario para la síntesis de coronatina, CFA y CMA como ocurre en el *P. savastanoi* pv. *glycinea*, y se observó una regulación cruzada entre la síntesis del T3SS y la coronatina (Sreedharan *et al.*, 2006). El ECF HrpL promueve la expresión de los genes cotranscritos *hopAQ1-corR-corS* y un mutante en *hrpL* no produce coronatina (Fouts *et al.*, 2002; Lam *et al.*, 2014). Por otro lado, en un mutante *corR* la expresión de *hrpL* fue menor y más retrasada que en la cepa silvestre y se observó la unión *in vitro* de este RR a su promotor (Peñaloza-Vázquez *et al.*, 2000; Sreedharan *et al.*, 2006).

Aparte de las NRPS/PKS implicadas en la síntesis de coronatina, siringafactina, pioverdina, yersiniabactina y mangotoxina ya mencionadas anteriormente, Pto DC3000 posee otras de función desconocida codificadas por los genes PSPTO\_1633-1635, PSPTO\_3864, PSPTO\_4518-4519 y PSPTO\_5107,5110.

Por otro lado, el metabolismo de Pto DC3000 está muy especializado, permitiéndole aprovechar prácticamente todos los nutrientes presentes en el apoplasto del hospedador (Rico *et al.*, 2011). Cabe mencionar que esta cepa carece del gen que codifica la proteína nucleadora de hielo InaZ, responsable de los daños por heladas en plantas infectadas, que sí se encuentra presente en otras cepas del complejo *P. syringae* (Buell *et al.*, 2003; Lindgren *et al.*, 1989). El genoma de Pto DC3000 también posee genes que codifican posibles enzimas degradadoras de la pared celular: pectina liasa, poligalacturonasa y otras con posible actividad celulolítica, que podrían contribuir a la virulencia (Buell *et al.*, 2003).

### 3.2. Motilidad: flagelo y siringafactina

Estudios realizados en nuestro laboratorio han permitido establecer que Pto DC3000 produce de 1 a 5 flagelos polares indispensables para el *swimming*. Por tanto, los mutantes *fliC* (carente de flagelina) y *fleQ* (carente del regulador maestro flagelar) pierden este tipo de motilidad, aunque solo un mutante *fliC* pierde la motilidad *swarming* por completo (Nogales *et al.*, 2015; Vargas *et al.*, 2013). La cascada de regulación flagelar difiere de la descrita para *P. aeruginosa* en que FleQ ejerce la función de regulador maestro de todos los genes de la cascada, incluido *fliA*, y la organización de los operones de algunos genes de clase II es diferente (Nogales *et al.*, 2015).

Esta cepa también produce siringafactina, un conjunto de seis biosurfactantes lipopolipeptídicos lineales que son esenciales para su motilidad *swarming* (Berti *et al.*, 2007; Nogales *et al.*, 2015). Las siringafactinas A-F están compuestas por ocho aminoácidos (Leu-Leu-Gln-Leu-Thr-Val/Leu/Ile-Leu-Leu) con una cadena carbonada (3-hidroxidecanoil o 3-hidroxidodecanoil) unida a su extremo N-terminal. El *cluster* biosintético de la siringafactina consta de un operón formado por los genes que codifican dos NRPS (*syfA* y *syfB*) y dos proteínas de exportación (*syfC* y *syfD*), además de un regulador transcripcional tipo LuxR (*syfR*) que es necesario para activar la transcripción del operón (Figura I22) (Berti *et al.*, 2007; Burch *et al.*, 2010; Hockett *et al.*, 2013). El regulador maestro FleQ reprime la producción de siringafactina, por lo que su mutación ha permitido el descubrimiento en Pto DC3000 de otro tipo de motilidad independiente de flagelos denominada *sliding* (Kearns, 2010; Nogales *et al.*, 2015). Esta forma pasiva de motilidad podría ser relevante en la colonización de la hoja, puesto que permite el movimiento sin inducir la respuesta defensiva de la planta derivada del reconocimiento de la flagelina como PAMP (Nogales *et al.*, 2015).

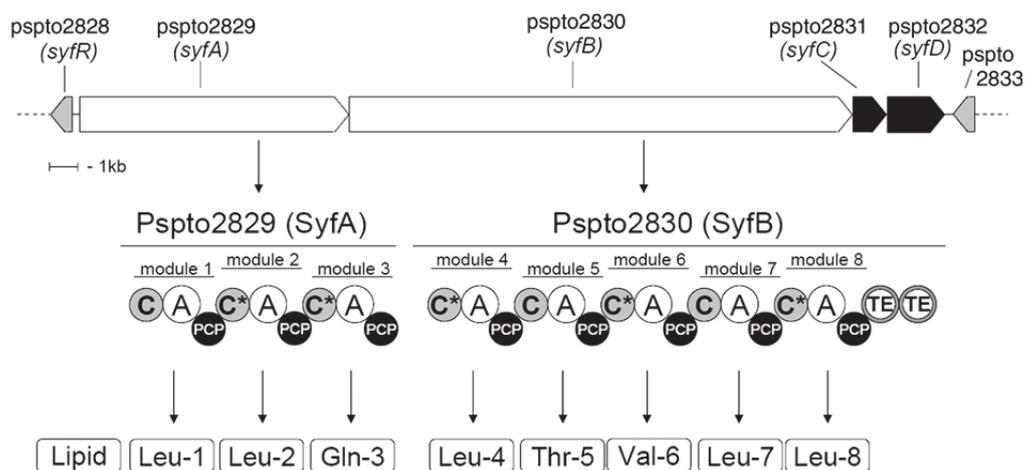


Figura I22. *Cluster* biosintético de la siringafactina en Pto DC3000.

En la parte superior se representan los genes implicados en la síntesis de siringafactina, señalando con colores las funciones de las proteínas codificadas (blanco: NRPS, gris: regulación, y negro: exportación). En el centro se muestran los diferentes dominios de las NRPS SyfA y SyfB (A: adenilación, C: condensación, Te: tioesterasa, C\*: función dual condensación-epimerización). Los dominios están agrupados en módulos identificados por una barra y un número. En la parte inferior se indican los aminoácidos incorporados por cada módulo y la composición final del lipopéptido. Tomada de Berti *et al.* (2007).

### 3.3. Sideróforos

El genoma de Pto DC3000 contiene un amplio repertorio de genes relacionados con la homeostasis del hierro, que codifican factores  $\sigma$  ECF, reguladores transcripcionales, proteínas biosintéticas de sideróforos y proteínas implicadas en su transporte (Buell *et al.*, 2003). Esta bacteria es muy dependiente del hierro cuando crece en medios de cultivo mínimos, disminuyéndose la actividad aconitasa (implicada en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos) y los niveles de ATP, lo que indica que la carencia de hierro afecta al metabolismo central (Kim *et al.*, 2010). La biodisponibilidad de hierro activa rutas relacionadas con su transporte y almacenamiento, así como genes implicados en la virulencia (Bronstein *et al.*, 2008). Actualmente se conocen los regulones de los

ECF PSPTO\_0444, PSPTO\_1203, PSPTO\_1209, PSPTO\_1286 y PSPTO\_2133 (PvdS) y del regulador primario de la homeostasis del hierro Fur (Butcher *et al.*, 2011; Markel *et al.*, 2013; Markel *et al.*, 2011; Swingle *et al.*, 2008). Los tres sideróforos caracterizados de Pto DC3000 son pioverdina, yersiniabactina y citrato, todos ellos prescindibles para la infección en *A. thaliana* pero funcionales *in vitro* bajo condiciones de escasez de hierro (Jones *et al.*, 2007; Jones y Wildermuth, 2011).

Jones *et al.* (2007) demostraron que tanto la pioverdina como la yersiniabactina se sintetizan en medios de cultivo con bajo hierro y que poseen una alta afinidad por Fe<sup>3+</sup>. En esta cepa, la pioverdina es capaz por sí sola de captar el hierro del medio necesario para el crecimiento bacteriano, pero, curiosamente, el mutante que no produce pioverdina no muestra un defecto de crecimiento en comparación con la cepa silvestre en medios con bajo contenido de hierro o *in planta*, que sí se observa en medios con hierro muy bajo tras la adición del agente quelante de hierro bipyridilo (Jones *et al.*, 2007; Jones y Wildermuth, 2011).

La isocorismato sintasa (PchA), responsable de la conversión de corismato a isocorismato, se requiere para la síntesis de ácido salicílico y sideróforos derivados de él; de hecho, los genes responsables de la síntesis de salicílico a partir de corismato en Pto DC3000 están localizados dentro del *cluster* Ybt y un mutante carente *pchA* no produce ni salicílico ni yersiniabactina (Jones *et al.*, 2007). Curiosamente, la carencia de yersiniabactina no tiene un impacto negativo en el crecimiento de Pto DC3000 en diferentes ensayos, tanto *in vitro* como *in planta* (Jones *et al.*, 2007; Jones y Wildermuth, 2011).

Aunque los sideróforos pioverdina y yersiniabactina son importantes para el crecimiento de Pto DC3000 en medios carentes de hierro, no son necesarios para su patogénesis, dado que el crecimiento y la virulencia de Pto DC3000 en hojas de tomate no se vieron significativamente alterados en las cepas mutantes *pchA*, *pvdI* o *pchA/pvdI*. Un mutante doble *pchA/pvdI* aún poseía una reducida pero detectable actividad de captación de hierro, lo que llevó a evaluar el papel del citrato como sideróforo en esta cepa (Jones *et al.*, 2007; Jones y Wildermuth, 2011). La mayoría del hierro presente en los fluidos apoplásticos de plantas está quelado por citrato y podría enmascarar el efecto de un mutante en la síntesis de citrato, por lo que estos autores generaron un mutante en el transportador de membrana FecA requerido para su transporte en otros microorganismos (Braun y Braun, 2002; Marshall *et al.*, 2009). Pese a que la afinidad del citrato por el hierro es menor que la de la pioverdina o la yersiniabactina, funciona eficientemente en condiciones muy limitantes de hierro (Jones y Wildermuth, 2011) y su exportación e importación está modulada por el transportador de membrana FecA, de forma similar a como ocurre en *E. coli* o *P. aeruginosa* (Braun y Braun, 2002; Marshall *et al.*, 2009).

En resumen, la comparación del crecimiento de los mutantes simples *pchA*, *pvdI* y *fecA*, los mutantes dobles *pchA/pvdI*, *pchA/fecA* y *pvdI/fecA*, y el mutante triple *pchA/pvdI/fecA* ha permitido determinar la importancia relativa de estos sideróforos para el crecimiento de Pto DC3000 en medios limitados en hierro. La pioverdina es el sideróforo más efectivo para la captación de hierro en medios donde este está muy limitado, seguido de la yersiniabactina y el citrato (a través de FecA) (Jones y Wildermuth, 2011).

### 3.4. Síntesis de exopolisacáridos

Pto DC3000 contiene los genes necesarios para la biosíntesis de alginato, celulosa acetilada, levano y un Psl distinto al de *P. aeruginosa* PAO1, ya que el operón que lo codifica está formado por menos genes (Pérez-Mendoza *et al.*, 2019). En esta cepa, se observó un aumento de la expresión de los genes biosintéticos del alginato en el apoplasto, tanto de hospedadores compatibles como de plantas resistentes a la infección, pero a pesar de producirse en la planta, la ausencia de alginato no compromete el desarrollo de la infección (Keith *et al.*, 2003). Su producción en laboratorio es muy baja con respecto a otras cepas de *Pseudomonas*, independientemente del medio de cultivo y la temperatura (Pérez-Mendoza *et al.*, 2014; Prada-Ramírez *et al.*, 2016). Además, Markel *et al.* (2016) no observaron inducción de AlgU por estrés osmótico como ocurre en otros patovares. Sin embargo, existe una conexión entre la virulencia y la síntesis de alginato a nivel del factor  $\sigma$  AlgU, que promueve directamente expresión de genes de factores de virulencia o sus reguladores (Markel *et al.*, 2016). Como se mencionó anteriormente, Pto DC3000 produce una forma acetilada de la celulosa que constituye el principal componente estructural de las películas formadas en la interfase aire-líquido en esta bacteria. Su síntesis está bajo el control de los reguladores AmrZ y FleQ y es dependiente de la presencia de altos niveles de c-di-GMP (Farias *et al.*, 2019; Pérez-Mendoza *et al.*, 2014; Pérez-Mendoza *et al.*, 2019; Prada-Ramírez *et al.*, 2016).

### 3.5. Factores $\sigma$

Pto DC3000 contiene genes que codifican para 15 factores  $\sigma$  en su genoma:  $\sigma^{70}$  (RpoD), los factores  $\sigma$  alternativos  $\sigma^{32}$  (RpoH),  $\sigma^{38}$  (RpoS),  $\sigma^{28}$  (FliA),  $\sigma^{54}$  (RpoN) y 10 ECF (kegg.jp) (Tabla I4). Los distintos patovares de *P. syringae*, entre ellos Pto DC3000, cuentan con un número menor de ECF en comparación con otras cepas de *Pseudomonas* a pesar de que el tamaño de sus genomas es similar (Tabla I2). Se ha propuesto que podría ser consecuencia de una adaptación a la infección de plantas (Oguiza *et al.*, 2005).

El tamaño de los regulones de los ECF estudiados en esta bacteria es muy variable, incluyendo desde multitud de genes implicados en procesos complejos como la virulencia y la producción de alginato (controlados por HrpL y AlgU, respectivamente) hasta solo 1-4 genes implicados en el transporte de complejos de hierro específicos (Lam *et al.*, 2014; Markel *et al.*, 2013; Markel *et al.*, 2011; Markel *et al.*, 2016; Swingle *et al.*, 2008). Cabe destacar que la mitad de los ECF de Pto DC3000 están relacionados con el metabolismo del hierro, por lo que este parece ser un elemento esencial para la supervivencia de la bacteria (Tabla I4). Se ha podido determinar experimentalmente la secuencia de unión consenso para algunos de estos ECF, lo que puede ser útil para la búsqueda *in silico* de genes diana en cepas relacionadas. Con respecto a los factores  $\sigma$  no ECF, más ampliamente distribuidos, se pueden predecir las secuencias de unión a los promotores que regulan utilizando las secuencias descritas para otras bacterias (Tabla I4).

Tabla 14. Factores  $\sigma$  de Pto DC3000.

Nombre	Factor $\sigma$	Anti- $\sigma$	Receptor	Secuencia (posición desde +1)	Cepa	Referencia	Procesos regulados
$\sigma^{70}$ , RpoD	PSPT00537			TTGACA (-35) TAAAT (-10)	E. coli	Domínguez-Cuevas y Marqués (2004)	Housekeeping
				TTGACC (-35) TATAAAT (-10)	P. aeruginosa	Domínguez-Cuevas y Marqués (2004)	
				TTGACC (-35) TATACT (-10)	P. putida	Domínguez-Cuevas y Marqués (2004)	
$\sigma^{32}$ , RpoH	PSPT00430			TGAA N <sub>14</sub> CCCTA (-10)	E. coli	Leneveu-Jenvrin et al. (2015)	Estrés térmico y otros estreses
				TTGAA N <sub>15</sub> CCCAT (-10)	P. fluorescens	Leneveu-Jenvrin et al. (2015)	
$\sigma^{38}$ , RpoS	PSPT01565			TTGACA N <sub>12</sub> TGTGCTATACT (-10)	E. coli	Burgess (2001); Schuster et al. (2004)	Respuesta a la falta de nutrientes
				CTATACT (-10)	P. aeruginosa	Schuster et al. (2004)	
$\sigma^{28}$ , FliA	PSPT01979	PSPT01925 (FliM)		TAAAGTTT (-34) N <sub>11</sub> GCCGATAA (-8)	E. coli	Burgess (2001)	Biosíntesis flagelar
				TAAA (-34) N <sub>15</sub> GCCCATA (-8)	P. putida	Rodríguez-Herva et al. (2010)	
				TCAAG (-34) N <sub>14</sub> GACGATAA (-8)	Pto DC3000	Filiatrault et al. (2011)	
$\sigma^{54}$ , RpoN	PSPT04453			CTGGCAC (-24) N <sub>5</sub> TTGCA (-12)	E. coli	Burgess (2001); (Burrows et al., 2003)	Metabolismo del nitrógeno y otros estreses
				CTGGCA (-24) TTGCA (-12)	Klebsiella sp.	Burrows et al. (2003)	
$\sigma^{19}$ , FliI	PSPT00444	PSPT00445		GAAC (-35) GTCNAA (-10)	Pto DC3000	Markel et al. (2013)	Importación de hierro mediado por ferricromo
$\sigma^{22}$ , AlgU/ AlgT/RpoE	PSPT04224	PSPT04225		GAACTT N <sub>16-17</sub> TCcaA (-10)	Pto DC3000	Markel et al. (2016)	Producción de alginato
SigX	PSPT02298		PSPT02297	ATGAC N <sub>16</sub> ATGAA (-10)	P. aeruginosa	Firoved et al. (2002)	Virulencia y biofilm
PvdS	PSPT02133	PSPT0_2358 (FpWR)	PSPT0_2151 (FpVA)	TAAATA (-35) CGTTC/TT/A (-10)	P. aeruginosa	Chevalier et al. (2019)	Síntesis e importación de pioverdina
-	PSPT01209	PSPT01208	PSPT01207		Pto DC3000	Swingle et al. (2008)	Importación de hierro mediado por citrato
-	PSPT01286	PSPT01285	PSPT01284		Pto DC3000	Markel et al. (2013)	Importación de hemo
-	PSPT05176	PSPT05177			Pto DC3000	Markel et al. (2013)	
-	PSPT01043	PSPT01042			Pto DC3000	Markel et al. (2011)	Importación de hierro mediado por sideróforos hidroximatos
-	PSPT01203	PSPT01204	PSPT01205	CGTCAT (-10)	Pto DC3000	Markel et al. (2011)	Virulencia
Hrpl	PSPT01404			GAAC (-35) CCACNNA (-10)	Pto DC3000	Lam et al. (2014)	

Se indican con subrayado las bases nitrogenadas indispensables para la unión del factor  $\sigma$  y con minúsculas, poco conservadas. Modificado de Llamas et al. (2014) y Otero-Asman et al. (2019).

### 3.6. Regulación por la ruta Gac-rsm

En Pto DC300, la ruta Gac-Rsm no ha sido caracterizada en profundidad. Al inicio de esta tesis doctoral se desconocía el papel fisiológico de sus componentes, excepto GacA (Chatterjee *et al.*, 2003), aunque se habían anotado en su genoma varias proteínas CsrA y varios ARN *rsm* por homología con otras *Pseudomonas* (kegg.jp). Los 4 genes que codifican proteínas tipo CsrA anotados en el genoma de Pto DC3000 al inicio de esta tesis doctoral son PSPTO\_1629 (CsrA-1), PSPTO\_1844 (CsrA-2), PSPTO\_3536 (CsrA-3) y PSPTO\_3943. Estos tienen un tamaño de 189 (*csrA-2* y *csrA-3*) o 195 pb (*csrA-1* y PSPTO\_3943) y codifican proteínas de 62 o 64 aminoácidos, respectivamente. En cuanto a los ARN *rsm*, posee 7: *rsmX1* (PSPTO\_5672), *rsmX2* (PSPTO\_5671), *rsmX3* (PSPTO\_5673), *rsmX4* (PSPTO\_5674), *rsmX5* (PSPTO\_5675), *rsmY* (PSPTO\_5647) y *rsmZ* (PSPTO\_5652) (Kulkarni *et al.*, 2006; Moll *et al.*, 2010; Valverde, 2009). El alineamiento de las regiones promotoras de los genes *rsmX1*, *rsmX2*, *rsmX3*, *rsmX4*, *rsmX5* y *rsmY* de Pto DC3000 reveló que las seis secuencias presentan un motivo similar al sitio de unión de GacA, por lo que parecen estar regulados por esta proteína (Moll *et al.*, 2010; Valverde *et al.*, 2003). Además, Nakatsu *et al.* (2019) observaron un aumento de la expresión de todos los ARN *rsm* de Pto DC3000 a altas densidades celulares.

La caracterización del mutante *gacA* mostró que esta cepa no presentaba motilidad en superficie, no producía pigmento verde y era menos virulenta (dependiente de dosis) (Chatterjee *et al.*, 2003). En medio inductor del T3SS, el mutante *gacA* presentó una disminución de los transcritos relacionados con la virulencia (T3E, proteínas implicadas en la síntesis de coronatina y los reguladores *hrpR*, *hrpS*, *corR* y *corS*), de varios factores  $\sigma$  (*hrpL*, *rpoN* y *rpoS*, pero no *algU*), con la producción de biosurfactantes (*syfR*) y con el *quorum sensing* (*psyl* y *psyR*), mientras que *algD* (síntesis de alginato) no estaba afectado (Chatterjee *et al.*, 2003). Además se demostró que GacA activa la transcripción de *rsmY* y, en menor grado, *rsmZ* (Chatterjee *et al.*, 2003; Vargas *et al.*, 2013).

**OBJETIVOS**



La bacteria *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 destaca por ser un fitopatógeno que actualmente causa brotes epidémicos esporádicos perjudicando las cosechas de varias especies vegetales y por ser utilizada como organismo modelo en el estudio de la interacción planta–bacteria fitopatógena.

El objetivo general de esta tesis doctoral consiste en elucidar cómo responde este microorganismo a las señales ambientales y coordina su respuesta fisiológica ante ellas, concretamente la señalización que se produce a través de la ruta de transducción de señales Gac-rsm en el contexto de la interacción con su hospedador. Para estudiarlo, se abordaron los siguientes objetivos específicos:

1. Explorar la diversidad de las proteínas CsrA dentro del género *Pseudomonas* y analizar la expresión de los parálogos presentes en Pto DC3000.
2. Conocer el papel de las proteínas CsrA en distintos aspectos de la fisiología de la bacteria relacionados con la colonización e infección del hospedador.
3. Evaluar los patrones de expresión de todos los ARN *rsm* de Pto DC3000 en diferentes condiciones y profundizar en el estudio de la función de *rsmY* y *rsmZ*.



## MATERIALES Y MÉTODOS



## 1. Cepas, plásmidos y oligonucleótidos

### 1.1. Cepas

La lista de cepas utilizadas en este trabajo y sus características más relevantes se recogen en la Tabla M1. La cepa objeto de estudio ha sido Pto DC3000 (Cuppels, 1986), por lo que se generaron mutantes en diversos genes y también se utilizaron mutantes cedidos por otros laboratorios. Las cepas de *Escherichia coli* se emplearon fundamentalmente como hospedadoras de plásmidos.

Tabla M1. Cepas bacterianas utilizadas.

Cepa	Características	Referencia
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato		
Pto DC3000	Rif <sup>R</sup> , cepa parental	Cuppels (1986)
<i>corS</i>	Rif <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> , <i>corS</i> ::Km	Braun <i>et al.</i> (2008)
<i>csrA1</i>	Rif <sup>R</sup> , $\Delta$ <i>csrA1</i>	Ferreiro <i>et al.</i> (2018)
<i>csrA2</i>	Rif <sup>R</sup> , $\Delta$ <i>csrA2</i>	Ferreiro <i>et al.</i> (2018)
<i>csrA3</i>	Rif <sup>R</sup> , $\Delta$ <i>csrA3</i>	Ferreiro <i>et al.</i> (2018)
<i>gacA</i> (AC811)	Rif <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> , <i>gacA</i> :: <i>mini-Tn5Km</i>	Chatterjee <i>et al.</i> (2003)
<i>hrcQ<sub>b</sub>-U</i> (CUCPB5113)	Rif <sup>R</sup> Sm/Sp <sup>R</sup> , $\Delta$ <i>hrcQbRSTU</i> ::Sp	Badel <i>et al.</i> (2006)
<i>hrpL</i>	Rif <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> , <i>hrpL</i> :: <i>npIII</i>	Castillo-Lizardo <i>et al.</i> (2015)
<i>pchA</i>	Rif <sup>R</sup> Tet <sup>R</sup> , $\Delta$ <i>pchA</i> ::Tet	Jones <i>et al.</i> (2007)
<i>pchA/pvdI</i>	Rif <sup>R</sup> Tet <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> , $\Delta$ <i>pchA</i> ::Tet $\Delta$ <i>pvdI</i> ::Km	Jones y Wildermuth (2011)
<i>pvdI</i>	Rif <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> , $\Delta$ <i>pvdI</i> ::Km	Jones y Wildermuth (2011)
<i>rsmY</i>	Rif <sup>R</sup> , $\Delta$ <i>rsmY</i>	J. Nogales, no publicado
<i>rsmZ</i>	Rif <sup>R</sup> , $\Delta$ <i>rsmZ</i>	J. Nogales, no publicado
<i>rsmYZ</i>	Rif <sup>R</sup> , $\Delta$ <i>rsmY</i> $\Delta$ <i>rsmZ</i>	J. Nogales, no publicado
<i>syfA</i>	Rif <sup>R</sup> , $\Delta$ <i>syfA</i>	Berti <i>et al.</i> (2007)
<i>syfA/csrA3</i>	Rif <sup>R</sup> , $\Delta$ <i>syfA</i> $\Delta$ <i>csrA3</i>	Ferreiro <i>et al.</i> (2018)
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 $\alpha$	Nal <sup>R</sup> ; <i>recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi-1</i> $\Delta$ <i>lacU169</i> ( $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15)	Hanahan (1983)
JM109	Nal <sup>R</sup> ; <i>recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi</i> $\Delta$ ( <i>lac-proAB</i> ) F' ( <i>traD36 proAB<sup>+</sup> lac<sup>R</sup> lacZ</i> $\Delta$ M15)	Yanisch-Perron <i>et al.</i> (1985)

### 1.2. Plásmidos

Los plásmidos utilizados y construidos en este trabajo se recogen en la Tabla M2. Para la ligación de productos de PCR se utilizó el vector comercial de alto número de copias pGEM-T. Como vectores de expresión se utilizaron los plásmidos de amplio rango de hospedador pBBR1-MCS5 (expresión de genes codificantes para proteínas) y pSRK5 (expresión de ARNs reguladores). La construcción de mutantes se llevó a cabo utilizando el vector no replicativo en Pto DC3000 pK18*mobsacB*. Por otro lado, el análisis de la actividad transcripcional y postranscripcional de diversos promotores se llevó a cabo desde los plásmidos pME6016 y pME6013 o pME6015, respectivamente.

Los mapas génicos de los vectores no comerciales utilizados se muestran el Apéndice A.

Tabla M2. Plásmidos utilizados.

Plásmido	Características	Referencia
pGEM-T	Ap <sup>R</sup> , vector de clonación	Promega
pBBR1-MCS5	Gm <sup>R</sup> ; vector de expresión de amplio rango de hospedador	Kovach <i>et al.</i> (1995)
pBBR:: <i>csrA1</i>	Gm <sup>R</sup> ; fragmento EcoRI de 568 pb que porta el gen <i>csrA1</i> completo clonado en pBBR1-MCS5 (a favor del promotor P <sub>lac</sub> )	Ferreiro <i>et al.</i> (2018)
pBBR:: <i>csrA2</i>	Gm <sup>R</sup> ; fragmento EcoRI de 888 pb que porta el gen <i>csrA2</i> completo clonado en pBBR1-MCS5 (a favor del promotor P <sub>lac</sub> )	Ferreiro <i>et al.</i> (2018)
pBBR:: <i>csrA3</i>	Gm <sup>R</sup> ; fragmento EcoRI de 1.376 pb que porta el gen <i>csrA3</i> completo clonado en pBBR1-MCS5 (a favor del promotor P <sub>lac</sub> )	Ferreiro <i>et al.</i> (2018)
pBBR:: <i>csrA4</i>	Gm <sup>R</sup> ; fragmento EcoRI de 423 pb que porta el gen <i>csrA4</i> completo clonado en pBBR1-MCS5 (a favor del promotor P <sub>lac</sub> )	Este trabajo
pBBR:: <i>csrA5</i>	Gm <sup>R</sup> ; fragmento EcoRI de 572 pb que porta el gen <i>csrA5</i> completo clonado en pBBR1-MCS5 (a favor del promotor P <sub>lac</sub> )	Este trabajo
pK18 <i>mobsacB</i>	Km <sup>R</sup> Sac <sup>S</sup> ; vector suicida	Schäfer <i>et al.</i> (1994)
pK18::Δ <i>csrA2</i>	Km <sup>R</sup> ; derivado de pK18 <i>mobsacB</i> con un fragmento EcoRI de 1.069 pb que porta el gen <i>csrA2</i> deletado (la delección abarca los nucleótidos 17-170 de la ORF)	Ferreiro <i>et al.</i> (2018)
pSRK	Km <sup>R</sup> ; vector de expresión constitutiva bajo el promotor P <sub>lac</sub>	Torres-Quesada <i>et al.</i> (2013)
pSRK5	Gm <sup>R</sup> ; fragmento EcoRI-SpeI de 1.293 pb de pSRK que contiene el gen <i>lacI</i> y el promotor P <sub>lac</sub> clonado en pBBR1-MCS5	Este trabajo
pSRK5:: <i>rsmY</i>	Gm <sup>R</sup> ; fragmento BglII-SpeI de 130 pb que contiene el gen <i>rsmY</i> clonado entre los sitios BamHI-SpeI de pSRK5 (expresión dependiente de P <sub>lac</sub> )	Este trabajo
pSRK5:: <i>rsmZ</i>	Gm <sup>R</sup> ; fragmento BamHI-SpeI 160 pb que contiene el gen <i>rsmZ</i> clonado entre los sitios BamHI-SpeI de pSRK5 (expresión dependiente de P <sub>lac</sub> )	Este trabajo
pME6013	Tc <sup>R</sup> ; vector para el ensayo de fusiones traduccionales al octavo codón del gen <i>lacZ</i>	Schnider-Keel <i>et al.</i> (2000)
pME6015	Tc <sup>R</sup> ; vector para el ensayo de fusiones traduccionales al octavo codón del gen <i>lacZ</i>	Schnider-Keel <i>et al.</i> (2000)
pME6016	Tc <sup>R</sup> ; vector para el ensayo de fusiones transcripcionales con el gen <i>lacZ</i> desprovisto de su promotor	Schnider-Keel <i>et al.</i> (2000)
pME6016::P <sub>algU</sub>	Tc <sup>R</sup> ; fusión transcripcional P <sub>algU</sub> :: <i>lacZ</i> pME6016 insertando un fragmento EcoRI-BamHI de 485 pb que contiene el promotor de <i>algU</i>	Este trabajo
pME6013::P <sub>algU</sub> _trad	Tc <sup>R</sup> ; fusión traduccional P <sub>algU</sub> :: <i>lacZ</i> pME6013 insertando un fragmento EcoRI-BamHI de 739 pb que contiene el promotor de <i>algU</i> y 246 nt de la ORF, que codifican los 82 primeros aa de AlgU	Este trabajo
pME6015::P <sub>fliC</sub> _trad	Tc <sup>R</sup> ; fusión traduccional P <sub>fliC</sub> :: <i>lacZ</i> pME6015 insertando un fragmento BamHI-PstI de 593 pb que contiene el promotor de <i>fliC</i> y 270 nt de la ORF, que codifican los 90 primeros aa de FliC.	Ferreiro <i>et al.</i> (2018)
pME6016::P <sub>rsmX1</sub>	Tc <sup>R</sup> ; fusión transcripcional P <sub>rsmX1</sub> :: <i>lacZ</i> pME6016 insertando un fragmento EcoRI-PstI de 176 pb que contiene el promotor de <i>rsmX1</i>	Este trabajo
pME6016::P <sub>rsmX2</sub>	Tc <sup>R</sup> ; fusión transcripcional P <sub>rsmX2</sub> :: <i>lacZ</i> pME6016 insertando un fragmento EcoRI-PstI de 231 pb que contiene el promotor de <i>rsmX2</i>	Este trabajo
pME6016::P <sub>rsmX3</sub>	Tc <sup>R</sup> ; fusión transcripcional P <sub>rsmX3</sub> :: <i>lacZ</i> pME6016 insertando un fragmento EcoRI-PstI de 188 pb que contiene el promotor de <i>rsmX3</i>	Este trabajo
pME6016::P <sub>rsmX4</sub>	Tc <sup>R</sup> ; fusión transcripcional P <sub>rsmX4</sub> :: <i>lacZ</i> pME6016 insertando un fragmento EcoRI-PstI de 184 pb que contiene el promotor de <i>rsmX4</i>	Este trabajo
pME6016_P <sub>rsmX5</sub>	Tc <sup>R</sup> ; fusión transcripcional P <sub>rsmX5</sub> :: <i>lacZ</i> pME6016 insertando un fragmento EcoRI-PstI de 237 pb que contiene el promotor de <i>rsmX5</i>	Este trabajo
pME6016::P <sub>rsmY</sub>	Tc <sup>R</sup> ; fusión transcripcional P <sub>rsmY</sub> :: <i>lacZ</i> pME6016 insertando un fragmento EcoRI-PstI de 256 pb que contiene el promotor de <i>rsmY</i>	Este trabajo
pME6016::P <sub>rsmZ</sub>	Tc <sup>R</sup> ; fusión transcripcional P <sub>rsmZ</sub> :: <i>lacZ</i> pME6016 insertando un fragmento EcoRI-BamHI de 361 pb que contiene el promotor de <i>rsmZ</i>	Este trabajo
pME6015::P <sub>syfA</sub> _trad	Tc <sup>R</sup> ; fusión traduccional P <sub>syfA</sub> :: <i>lacZ</i> en pME6015 insertando un fragmento BamHI-PstI de 380 pb que contiene el promotor de <i>fliC</i> y 81 nt de ORF, que codifican los 27 primeros aa de SyfA.	Este trabajo
pME6015::P <sub>syfR</sub> _trad	Tc <sup>R</sup> ; fusión traduccional P <sub>syfR</sub> :: <i>lacZ</i> en pME6015 insertando un fragmento EcoRI-PstI de 399 pb que contiene el promotor de <i>syfR</i> y 99 nt de su ORF, que codifican los 33 primeros aa de SyfR)	Este trabajo

R: resistente; S: sensible

### 1.2.1. pBBR1-MCS5 y derivados

El plásmido pBBR1MCS5 es de amplio rango de hospedador y se utiliza como vector de expresión bajo un promotor *lac* (*P<sub>lac</sub>*). Este vector se utilizó para la sobreexpresión y/o complementación de los genes *csrA1*, *csrA2*, *csrA3*, *csrA4* y *csrA5*. Se clonaron en el sitio de restricción EcoRI, incluyendo el gen completo y una porción variable de las regiones intergénicas en 5' y 3'. El vector pBBR::*csrA3* ya estaba disponible en el laboratorio al inicio de esta tesis doctoral y contiene un fragmento de 1.376 pb que porta el gen *csrA3* con su promotor.

Para clonar el resto de genes se partió de DNA genómico, se amplificó el fragmento deseado por PCR incorporándole sitios de restricción EcoRI en sus extremos con los correspondientes oligonucleótidos: *csrA1*-pB.F/R para *csrA1*, *csrA2.1/csrA2.i* para *csrA2*, *csrA4*-pB.F/R para *csrA4* y *csrA5*-pB.F/R para *csrA5*. Tras comprobar el tamaño de los fragmentos, estos se clonaron en pGEM-T, se comprobaron por PCR de colonia y se secuenciaron utilizando la pareja de oligonucleótidos M13U/R. Los insertos correctos se digirieron con EcoRI, se purificaron y se subclonaron en pBBR1-MCS5 digerido con el mismo enzima. La detección de las cepas con el plásmido portador del inserto se llevó a cabo por PCR de colonia utilizando la pareja de oligonucleótidos M13U/R. Finalmente, la orientación del inserto se determinó por digestión con enzimas de restricción utilizando una diana situada en uno de los extremos del inserto y otra en el vector, que resultaban en la obtención de un patrón de bandas diferente.

### 1.2.2. pK18*mobsacB* y derivados

El vector pK18*mobsacB* es un plásmido suicida o no replicativo, es decir, sólo puede permanecer en determinadas células bacterianas si se integra en su genoma por recombinación homóloga, por lo que constituye una herramienta útil para la mutagénesis.

La delección del gen *csrA2* comenzó con la amplificación por separado de las regiones situadas en 5' y en 3' de la delección utilizando como molde ADN cromosómico purificado y la posterior combinación de los dos fragmentos en una PCR solapante (sección 4.3.2). En la primera PCR se utilizaron los oligonucleótidos *csrA2.1/csrA2.2* y *csrA2.3/csrA2.4* en sus respectivas reacciones y para la reacción final se utilizaron *csrA2.1* y *csrA2.4*. Finalmente se obtuvo una construcción que presenta un gen *csrA2* delecionado desde el nt 17 hasta el 170 (80% del gen) y 580 nt en 5' y 441 nt en 3' para permitir la recombinación con el cromosoma. Además, los oligonucleótidos *csrA2.1* y *csrA2.4* incorporaron sitios de restricción EcoRI en los extremos del fragmento. El fragmento se clonó en el vector pGEM-T y su secuencia se comprobó por secuenciación con los oligonucleótidos M13U y M13R, tras lo que se extrajo por digestión con EcoRI y se subclonó en pK18*mobsacB* digerido con el mismo enzima. El correcto clonaje se comprobó mediante PCR de colonia con la pareja de oligonucleótidos *csrA2.1/csrA2.4* y la mutagénesis se llevó a cabo según lo detallado en la sección 3.5 de este apartado.

### 1.2.3. pSRK5 y derivados

El plásmido pSRK es un derivado de pBBR1-MCS2 con la región operadora donde se une *lacI* eliminada para conseguir una expresión constitutiva que se ha utilizado anteriormente para la expresión de ARN reguladores (Torres-Quesada *et al.*, 2013). Con objeto de utilizar esta construcción en un vector con una resistencia diferente, se extrajo un fragmento EcoRI-SpeI de 1.293 pb de pSRK que contenía el gen *lacI* y el promotor *P<sub>lac</sub>* y se clonó en pBBR1-MCS5 digerido con las mismas enzimas para obtener el vector denominado pSRK5. Debido a la formación de una horquilla con alta temperatura de *melting* en el plásmido vacío, el correcto clonaje se comprobó tras la ligación del inserto al vector utilizando el oligonucleótido M13U.

Los fragmentos de ADN para la sobreexpresión de *rsmY* y *rsmZ* se obtuvieron amplificando sus regiones codificantes a partir de ADN cromosómico purificado, utilizando los oligonucleótidos S<sub>rsmY</sub>.F/R y S<sub>rsmZ</sub>.F/R, respectivamente. Estos añadieron los sitios de restricción BglII (5' de *rsmY*), BamHI (5' de *rsmZ*) y SpeI (3' de ambos) en sus extremos. En primer lugar se clonaron al vector pGEM-T, tras lo que se extrajeron por digestión en los sitios de restricción incorporados con los oligonucleótidos y se subclonaron en pSRK5 digerido con BamHI-SpeI. Las construcciones se comprobaron por PCR de colonia y posterior secuenciación con los oligonucleótidos M13U y M13R.

### 1.2.4. pME6013-16 y derivados

Los vectores de este grupo contienen un gen funcional *lacZ* que codifica la  $\beta$ -galactosidasa y que sirve como reportero de los promotores insertados en el vector. pME6016 es un plásmido que permite la construcción de fusiones transcripcionales ya que el promotor a ensayar se puede clonar en un sitio de clonaje múltiple (MCS, *multiple cloning site*) por delante de la región que codifica una parte de la 5'-UTR de *lacZ*. Los vectores pME6013-15 permiten clonar insertos al octavo codón de *lacZ* (cada plásmido con una pauta de lectura diferente, (Apéndice A), de manera que se producirá un ARNm híbrido entre el inserto y *lacZ* y la producción de la correspondiente proteína híbrida que mantiene su actividad  $\beta$ -galactosidasa, que permitirá estudiar también la regulación postranscripcional del promotor insertado.

Los insertos se amplificaron a partir de ADN cromosómico purificado con los siguientes oligonucleótidos: PalgU.F/R para *PalgU*, PrsmX1.F/R para *PrsmX1*, PrsmX2.F/R para *PrsmX2*, PrsmX3.F/R para *PrsmX3*, PrsmX4.F/R para *PrsmX4*, PrsmX5.F/R para *PrsmX5*, PrsmY.F/R para *PrsmY*, PrsmZ.F/R para *PrsmZ* (fusiones transcripcionales); PalgU.F/PalgU\_trad.R para *PalgU\_trad*, PflIC.F/PflIC\_trad.R para *PflIC\_trad*, PsyfA\_EcoRI/PsyfA\_trad\_PstI para *PsyfA\_trad* y PsyfR\_EcoRI/PsyfR\_trad\_PstI para *PsyfR\_trad* (fusiones traduccionales). Tras comprobar el tamaño de los fragmentos, estos se clonaron en pGEM-T, se comprobaron por PCR de colonia y se secuenciaron utilizando la pareja de oligonucleótidos M13U/R. Los oligonucleótidos incorporaron los sitios de restricción especificados en la Tabla M2 a cada inserto, que se utilizaron para su subclonaje en el plásmido correspondiente. Las construcciones se comprobaron por PCR de colonia con los oligonucleótidos pME601\*.F2 y Z18.

### 1.3. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo fueron sintetizados por Sigma-Aldrich. Los oligonucleótidos utilizados para realizar clonajes, PCR de comprobación y RT-PCR se recogen la Tabla M3 y los utilizados para ensayos PCR a tiempo real, en la Tabla M4. Los detalles sobre el tamaño del producto amplificado y la eficiencia de las parejas de oligonucleótidos de qPCR se recogen en el Apéndice B.

Tabla M3. Oligonucleótidos generales

Nombre	Secuencia (5'→3')	Nombre	Secuencia (5'→3')
csrA1-pB.F	aaagaattCGACGATCATTCTGC	PrsmX1.R	aaactgcaGGGTAGATTGCGACTTTCC
csrA1-pB.R	aaagaattcGGCACTGACAACGG	PrsmX2.F	aaagaATTCATGATCTCACCCC
csrA1_PE	GGTGATGTCATCACC AATGG	PrsmX2.R	aaactgcaGAATTGGATCCTACATTG
csrA2.1	aaagaattcCGTGGCGTTCAAGATTCTCG	PrsmX3.F	aaagaattCTCGCCCTGATCGCTC
csrA2.2	GGCTTGGTTCTTCGGAGTCAGAATCAGC	PrsmX3.R	aaactgcaGGATCCAATATTACGG
csrA2.3	GCTGATTCTGACTCCGAAGAACCAAGCC	PrsmX4.F	aaagaattcGCCTGCGTATTTTGCTG
csrA2.4	aaagaattcCTGAGCTACGAGTGCATTGG	PrsmX4.R	aaactgcaGGATCCAATCTTATGCG
csrA2.C	aaagaattcAGGTGACTCCCTTAGCAGG	PrsmX5.F	aaagaaTTCTACTCCTGATGTTCCG
csrA2.i	CGAGAATCTTGAACGCCACG	PrsmX5.R	aaactgcaGGATCCAATATTACGAGG
csrA3-PE3	CCGATACGACGAGTGCG	PrsmY.F	aaagaattCAAGGCAGCCTTTG
csrA4-pB.F	aagaatTCCGCCGACTTCGCATTC	PrsmY.R	aaactgcaGTACAAGATTAAC
csrA4-pB.R	aagaattCGCCGAGAGTTGAATAGAAC	PrsmZ.F	aaagaaTTCCAGTAAACCTCCC
csrA5-pB.F	aagaattCCGAACGTAAAGTCGC	PrsmZ.R	aaactgcaGAGCAACACCCG
csrA5-pB.R	aagaatTCTTGTGCTCCTGATCTG	PsyfA_EcoRI	aaagaattCCTGAGCTTTCCTGATTC
M13U	GTTTTCCAGTCACGAC	PsyfA_trad_PstI	aaactgcaGATCGCCACGGCTGATCTG
M13R	AACAGCTATGACCATG	PsyfR_EcoRI	aaagaattcGGCTCAAGGTCTTCTTG
PalgU.F	GGCTCATCTGCGAATTCTG	PsyfR_trad_PstI	aaactgcaGCCCCGCAAATGTAGCGC
PalgU.R	tttggatTCCTCATTAAGCATGAAGG	SrsmY.F	aaagatctCATGGACGTAGCGCAG
PalgU_trad.R	tttggatCCGTGTTGATGGCGATGC	SrsmY.R	aaactagtGAAAACCCCGCCTAAG
PfliC.F	aaaaaggatCCGCAGGCTAAAAAGAG	SrsmZ.F	aaaggatccGCTGTGCCAACGGACAG
PfliC_trad.R	GCATACGCTGCAGAATGTTGG	SrsmZ.R	aaactagtCACTTTTGCATAGACG
pME601*.F2	CTGCGATTCCGACTCGTCC	Z18	GATGTGCTGCAAGGCGAT
PrsmX1.F	aaagaattCCTTGCTCAGGTGACAGC		

Mayúsculas: secuencia que hibrida con el genoma; minúsculas: secuencia añadida con el oligonucleótido; subrayado: secuencia diana de enzima de restricción.

Tabla M4. Oligonucleótidos utilizados para RT-qPCR

Nombre	Secuencia (5'→3')	Nombre	Secuencia (5'→3')
algD+	CGCTGCTCAATTCCGACTTCGATCAGG	gyrA+	GGCAAGGTCACCCGCTTCAAGGAAT
algD-	CGTCTTCGGTGGTGGCATTGGTCA	gyrA-	GACCGCCACGCTTGTACTCAGGGAAC
csrA1+	CAGATTCTGGGCGTGAACGGCAATCAGG	hrpA+	TGCACAAGCCAAGGCCAGTAAAGAGTCC
csrA1-	GGCCTGCTGCGAAAGCTTGTGGCGATT	hrpA-	TCGCTGTGGCACTGATCTTCTTGTGGT
csrA2+	TCTGACTCGTGGTGGCAGAAAGCCT	hrpL+	CAAACCGCAGACCTGGCTGTGTGG
csrA2-	GGTGAACCGCGACTTCTTTGGGCGCAT	hrpL-	TGACTGACATCACCGTGCCCTTCCA
csrA3+	CGCAAAGTAGGCGAAAGCATAAACATCGGT	syfA+	CTGCTTTTACCGCTGACGACCCTG
csrA3-	GGAGCCAGTTCCGCTGGATACGTT	syfA-	GCTTTGTGCGTGATGTTCCAGCAGC
csrA4+	GCCAGATCCGCCTGGGCATTGATG	syfR+	CGAGCAGATGCAGCGTCCGTGTGTTTTCGA
csrA4-	GACATGGCGCTCACTCCCGTTGC	syfR-	TTCATCATCTGCCGAAACCCACCCGCTCA
csrA5+	CAGATTGAAGCCCCGGATGTGCTCG		
csrA5-	CCAACGAACGCCACCGCGCTTA		

## 2. Medios y condiciones de cultivo

### 2.1. Medios ricos

Las cepas de Pto y *E. coli* se cultivaron rutinariamente a 28°C y 37°C, respectivamente, en medio rico Luria-Bertani (LB) (Sambrook *et al.*, 1989) y en condiciones de agitación para cultivos líquidos (180 rpm). La composición del LB es la siguiente: 10 g de bacto-triptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl y H<sub>2</sub>O hasta 1 litro.

La preparación de medios sólidos en placas de Petri se llevó a cabo añadiendo agar bacteriológico tipo europeo (Cultimed) a una concentración final del 1% (p/v). En la preparación de medio LB semisólido para los ensayos de movilidad bacteriana tipo *swimming*, se utilizó agar bacteriológico a una concentración final de 0,3% (p/v).

Los ensayos de movilidad en superficie en medio semisólido (*swarming*) se realizaron en medio PG-agar 0,5% (p/v) (Matilla *et al.*, 2007). La composición del PG-agar es la siguiente: 5 g de proteosa-peptona No.3 (Difco 211693); 2 g de glucosa, 5 g de bacto-agar (Difco 214010) y H<sub>2</sub>O hasta 1 litro.

Los medios, tanto líquidos como sólidos, se esterilizaron en autoclave a 120°C y a una atmósfera de presión durante 20 min.

### 2.2. Medios de composición definida

La producción de EPS se ensayó en el medio mínimo de *Rhizobium* (MMR) descrito por Robertsen *et al.* (1981). Su composición es: 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; ácido glutámico 7 mM y manitol 55 mM.

Para la estimulación de producción de sideróforos, se preparó MMR sin FeCl<sub>3</sub> (MMR\*) y se le añadió 2,2'-bipiridina (bipiridilo) a una concentración final de 100 µM para secuestrar el hierro residual presente en el material. Para la visualización de producción de sideróforos, al MMR\* se le añadió 1/10 V de solución Chrome Azurol S estéril preparada mezclando 50 ml de Chrome Azurol S (Sigma-Aldrich) 1,2 mg/ml en agua destilada, 10 ml de FeCl<sub>3</sub> 10 µM disuelto en HCl 10 mM y 40 ml de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HDTMA, Sigma-Aldrich) 1,83 mg/ml en agua destilada (Louden *et al.*, 2011).

La inducción del T3SS se realizó gracias al medio MMF, que simula la composición química del apoplasto vegetal (Huynh *et al.*, 1989). Está compuesto por: tampón fosfato potásico 50 mM pH 5,7; NaCl 1,7 mM; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 7,6 mM; MgCl<sub>2</sub> 1,7 mM y fructosa 10 mM. Los distintos componentes se esterilizaron independientemente y se mezclaron en el momento de preparación del medio. Para la preparación de medio sólido se añadió agar purificado (Oxoid) a una concentración final del 1,5% (p/v).

## 2.3. Antibióticos

Los antibióticos se prepararon en soluciones más concentradas en agua destilada, excepto la rifampicina y la tetraciclina, que se disolvieron en metanol. Las soluciones preparadas en agua se esterilizaron por filtración y se almacenaron en pequeñas alícuotas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Los antibióticos se usaron a las concentraciones finales ( $\mu\text{g/ml}$ ) indicadas en la Tabla M5, según la cepa bacteriana empleada.

**Tabla M5. Concentración de los antibióticos empleados ( $\mu\text{g/ml}$ ).**

Compuesto	Cepas de <i>E. coli</i>	Cepas de Pto
Ampicilina	100	200
Estreptomina	-	30
Gentamicina	10	5-10
Kanamicina	50	50
Rifampicina	-	10
Tetraciclina	10	10

## 2.4. Conservación de los cultivos bacterianos

La conservación a largo plazo de los cultivos bacterianos se realizó por congelación añadiendo un crioprotector. Esta sustancia permite paralizar el metabolismo celular manteniendo la viabilidad y evitando el daño celular causado por la formación de cristales de agua. Las cepas se conservaron en una solución de glicerol al 30%, que se preparó mezclando cultivo bacteriano crecido 8-16 h en medio líquido con una solución estéril de glicerol al 60% a partes iguales.

## 3. Técnicas de manipulación genética

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

La preparación de células competentes se realizó siguiendo el método descrito por (Lederberg & Cohen, 1974). A partir de un precultivo de *E. coli* se inocula un matraz con 1 ml de cultivo por cada 100 ml de medio y se incuba a  $37^{\circ}\text{C}$  y agitación (180 rpm) hasta que alcanza una  $\text{DO}_{660} \sim 0,4$ . Las células se enfrían en hielo durante 10 min, se centrifugan 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$  y  $10.000\times g$  y se elimina el sobrenadante. Luego se resuspenden las células en un volumen de  $\text{MgCl}_2$  0,1 M estéril preenfriado a  $4^{\circ}\text{C}$ , se vuelve a centrifugar 5 min a  $4^{\circ}\text{C}$  y  $5.000\times g$ . Se retira de nuevo el sobrenadante, se resuspenden las células en medio volumen de  $\text{CaCl}_2$  0,1 M estéril preenfriado a  $4^{\circ}\text{C}$  y se mantienen en hielo durante 30 min. La siguiente centrifugación es de 5 min a  $4^{\circ}\text{C}$  y  $5.000\times g$ , para resuspender después las células en una décima parte del volumen de  $\text{CaCl}_2$  0,1 M estéril y glicerol 20% preenfriado a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se reparten alícuotas de 100  $\mu\text{l}$  en tubos Eppendorf de 1,5 ml preenfriados en hielo, que serán almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### 3.2. Transformación bacteriana por choque térmico

La transformación de células competentes de *E. coli* con ADN plasmídico se realizó utilizando la técnica del choque térmico (Nishimura *et al.*, 1990). Una alícuota de las células competentes 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 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 del gen o genes de resistencia a antibióticos codificados en el plásmido introducido. Las células que habían adquirido el plásmido, y por tanto la resistencia a los antibióticos, se seleccionaron sembrando entre 100 y 200 µl de la suspensión celular en placas de LB sólido suplementado con los antibióticos correspondientes. Cuando el plásmido permitía la selección de colonias blancas/azules por complementación  $\alpha$  de la actividad  $\beta$ -galactosidasa (Sambrook *et al.*, 1989), se añadieron al medio IPTG y X-gal. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 h.

### 3.3. Preparación de células electrocompetentes

La electroporación es una técnica rápida y efectiva para transferir ADN plasmídico a células de *Pseudomonas*. Para que esta sea exitosa requiere que las células sean electrocompetentes y la ausencia de sales en el medio que puedan causar interferencias.

La preparación de células electrocompetentes de Pto DC3000 se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Choi *et al.* (2006). Se parte de un cultivo líquido incubado durante 12-16 h a 28°C en LB con agitación y suplementado con los antibióticos correspondientes. Se recogen las células de 4 ml de cultivo por centrifugación a máxima velocidad durante 2 min. Se lava dos veces el sedimento celular con 300 µl de sacarosa 300 mM estéril y se resuspende en un volumen final de 100 µl de sacarosa 300 mM estéril. Las células electrocompetentes se mantendrán en hielo hasta ser utilizadas, realizando la electroporación inmediatamente después de su preparación.

### 3.4. Electroporación

A la solución de células electrocompetentes mantenidas en hielo se le añadió ADN plasmídico purificado (10-50 ng para vectores replicativos y 300-500 ng para vectores suicidas) y se mezcló suavemente. La mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación, previamente enfriada a 4°C, que se sometió a un pulso eléctrico de 1,8 kV en un electroporador *Eporator* (Eppendorf). Las células se recogieron inmediatamente añadiendo 1 ml de medio LB y se incubaron 2-3 h a 28°C antes de sembrar diluciones en medio sólido selectivo para los transformantes.

### 3.5. Mutagénesis dirigida por integración e intercambio alélico

En este trabajo se generaron mutantes de pérdida de función génica por delección del correspondiente gen total o parcialmente. Para ello, el fragmento de ADN con el gen modificado que se había obtenido mediante PCR solapante se clonó en un vector no replicativo o suicida, con un fragmento de al menos 500 pb de secuencia a cada lado del gen para permitir la recombinación homóloga e integración en el cromosoma. pK18*mobsacB* fue el vector seleccionado para realizar la mutagénesis, ya que porta los genes *sacB* (confiere sensibilidad a sacarosa, Sac<sup>S</sup>) y Km<sup>R</sup> (confiere resistencia a kanamicina). Estas características permiten seleccionar la integración o pérdida del plásmido fácilmente mediante la adición de estos compuestos a las placas de cultivo. Tras la electroporación de Pto DC3000 con el plásmido, se seleccionaron las cepas que lo habían integrado (Km<sup>R</sup> y Sac<sup>S</sup>) y posteriormente se cultivaron a baja temperatura (4°C) y sin antibiótico durante toda la noche, para facilitar la pérdida del mismo. Se sembraron diluciones seriadas del cultivo en LB con sacarosa al 15% (p/v) para obtener colonias aisladas que fuesen Sac<sup>R</sup> por no portar el vector. Tras comprobar que las colonias eran Km<sup>S</sup> y Sac<sup>R</sup>, se llevó a cabo un *screening* por PCR de colonia para identificar las colonias portadoras de la delección.

Las mutaciones se comprobaron por PCR, utilizando como molde ADN obtenido tras lisis celular y también ADN cromosómico purificado. También se secuenciaron el gen y su entorno para descartar la presencia de mutaciones puntuales indeseadas.

## 4. Técnicas de biología molecular

Las técnicas de biología molecular se llevaron a cabo según los métodos descritos por Sambrook *et al.* (1989) y siguiendo las indicaciones de los proveedores de reactivos.

### 4.1. Aislamiento y cuantificación de ácidos nucleicos

#### 4.1.1. Aislamiento y purificación de ADN cromosómico

Para aislar ADN cromosómico de alta pureza se utilizó el kit comercial *Realpure Genomic DNA Extraction kit* (Real, RBMEG01). Se partió de 1 ml de un cultivo crecido durante 12-16 h en LB suplementado con los antibióticos correspondientes, a temperatura óptima y en agitación. Se siguieron las instrucciones del fabricante hasta la rehidratación de la muestra tras la purificación, que se realizó utilizando agua milliQ para minimizar las interferencias en otras técnicas como la secuenciación.

#### 4.1.2. Aislamiento y purificación de ADN plasmídico

La obtención de ADN plasmídico con alta concentración y calidad se consiguió gracias al kit comercial *NucleoSpin Plasmid* (Macherey-Nagel). Se partió de 1-5 ml de cultivo en función del número de copias del

plásmido y se siguieron las instrucciones del fabricante. Para minimizar las interferencias con técnicas realizadas posteriormente, la elución del ADN se realizó usando agua milliQ.

#### 4.1.3. Aislamiento rápido de ADN por lisis térmica

En situaciones donde se prefería la rapidez en la obtención del ADN y no su pureza, se aisló ADN total mediante lisis térmica de bacterias crecidas en medio sólido. Para ello, se resuspendió una colonia de la cepa de interés en 50 µl de agua milliQ estéril y se incubó a 95°C durante 5 min. Posteriormente se centrifugó a máxima velocidad durante 2 min en una centrífuga de mesa y se tomaron 1-5 µl de sobrenadante como molde para realizar una PCR. Esta técnica permite obtener tanto ADN cromosómico como plasmídico.

#### 4.1.4. Aislamiento y purificación de ARN total

El aislamiento y manipulación del ARN requieren de unas condiciones de trabajo libre de ARNasa para evitar la degradación del ARN durante el proceso. Por ello, se trabajó con material de plástico libre de ARNasa certificado por el fabricante y material de vidrio tratado con cloroformo. Para preparar todas las soluciones se utilizó agua tratada con DEPC (Sigma-Aldrich), un compuesto que inactiva estas enzimas.

La obtención de muestras para el aislamiento de ARN se realizó a partir de distintos cultivos:

- 10 ml de cultivos líquidos ajustados a  $DO_{660}=0,5$  y crecidos en MMF más antibióticos a 20°C y 80 rpm de agitación durante 24 h partiendo de cultivos crecidos en medio LB con antibióticos a 28°C y 180 rpm de agitación la misma  $DO_{660}$  (ensayos de autoaglutinación).
- Cultivos en placas Petri de LB con antibióticos incubados a 28°C durante 48 h y resuspendidos en 2 ml de agua milliQ.
- Placas de ensayos *swarming* cuya masa celular se resuspendió en 2 ml de agua milliQ.

Las suspensiones bacterianas se recogieron en tubos enfriados previamente en nitrógeno líquido y se centrifugaron a 4°C y máxima velocidad en una centrífuga de mesa para sedimentar las células. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y los tubos se sumergieron en nitrógeno líquido. Las muestras se almacenaron a -80°C. Las centrifugaciones cortas y las temperaturas bajas permitieron paralizar el metabolismo celular. De esta manera se obtiene el ARN que estaría presente en las condiciones de cultivo y se evitan variaciones debidas a la manipulación, ya que los niveles de ARN varían muy rápidamente en función de cambios externos.

Las muestras almacenadas a -80°C se descongelaron en hielo y se añadió 1,5 ml de TRI Reagent (Sigma-Aldrich) precalentado a 70°C. Tras una incubación de 10 min a 65°C, las muestras se centrifugaron 10 min a máxima velocidad y 4°C en una microcentrífuga y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo. A este se le añadió 1/10 v de BCP y se agitó en un agitador de tubos durante 30 s. Las muestras se incubaron 5 min a temperatura ambiente y se centrifugaron en las mismas condiciones durante 15 min. La fase acuosa (superior) se transfirió a otro tubo al que se le añadió 1 v de isopropanol para precipitar el ARN. Tras una incubación de

10 min a temperatura ambiente se volvió a centrifugar la muestra durante 10 min. El precipitado se lavó con etanol al 70% (v/v) en agua milliQ, se centrifugó de nuevo y se eliminó el sobrenadante por decantación. El sedimento se incubó a 50°C hasta que estaba totalmente seco y se resuspendió en 50-100 µl de agua libre de ARNasa manteniéndolo a 50°C hasta su completa solubilización.

Para eliminar los restos de ADN contaminante de las preparaciones de ARN, las muestras se trataron con ADNasa (*DNase I recombinant RNase-free*, Roche ref. 10882822). A cada 100 µl de ARN se les añadieron 5 U de ADNasa, 15 µl de tampón de ADNasa (10×), 40 U de inhibidor de ARNasa (Ambion, AM2682) y agua libre de ARNasa hasta un volumen final de 150 µl. La reacción se incubó a 37°C durante 1 h y se realizó una extracción con fenol-cloroformo. Para ello, se añadió 1 v de fenol ácido:cloroformo:cloroformo isoamílico (25:24:1 v/v), se mezcló 30 s en un agitador de tubos y se centrifugó durante 10 min a velocidad máxima y 4°C. La fase acuosa (superior) se transfirió a un nuevo tubo y se repitió el proceso con 1 v de cloroformo:cloroformo isoamílico (24:1 v/v). La fase superior se transfirió a otro tubo y se añadieron 1/10 v de acetato sódico 3M pH 4,8 y 3 v de etanol absoluto frío para precipitar el ARN. La reacción se incubó toda la noche a -20°C y el precipitado se recuperó centrifugando a máxima velocidad y 4°C durante 15 min en una centrifuga de mesa. Se descartó el sobrenadante, se lavó el sedimento con 1 ml de etanol 70% en agua milliQ y se centrifugó en las mismas condiciones durante 5 min. El sobrenadante se eliminó por decantación, el sedimento se incubó a 50°C hasta que estaba totalmente seco y se resuspendió en 25-100 µl de agua libre de ARNasa manteniéndolo a 50°C hasta su completa solubilización. Las muestras se almacenaron a -20°C para su uso inmediato y a -80°C para su conservación a largo plazo.

#### 4.1.5. Determinación de la concentración y pureza de ácidos nucleicos

La concentración y pureza de los ácidos nucleicos se cuantificó por métodos espectrofotométricos utilizando el sistema NanoDrop ND-1000 (Bio-Rad). Se midió la absorbancia a 260 nm y utilizando el factor correspondiente (1  $DO_{260}$ =50 ng/µl ADN de cadena doble y 1  $DO_{260}$ =40 ng/µl ARN de cadena sencilla) se calculó la concentración. La pureza se estimó calculando el ratio de absorbancia 260/280, considerando las muestras aptas para su posterior utilización cuando esta relación era cercana a 1,8 para el ADN y 2 para el ARN.

## 4.2. Electroforesis

La electroforesis es una técnica que permite la separación de las moléculas en función de su carga mediante la migración de estas bajo una corriente eléctrica. Cuando se realiza usando como soporte un gel con un determinado tamaño de poro también permite una separación de las moléculas en función de su tamaño y estructura.

#### 4.2.1. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa

La detección o separación de fragmentos de ADN se llevó a cabo por electroforesis horizontal en geles de agarosa sumergidos en tampón TAE (Tris-base 40mM, ácido acético glacial al 12% (v/v) y EDTA-Na<sub>2</sub> 2 mM pH 8). La concentración de agarosa disuelta en TAE se ajustó a 0,8% (p/v) o 1,5% (p/v) en función del tamaño de las moléculas a separar, utilizando la más concentrada para moléculas menores de 500 pb. Utilizando diversos marcadores comerciales (Marcador II y III de Roche y 100 bp DNA Ladder de New England Biolabs) se pudo estimar el tamaño de los fragmentos presentes en el gel.

Antes de cargar las muestras en el gel, estas se mezclaron con 1/6 v de tampón de carga (30% de glicerol (p/v); 0,25% de azul de bromofenol (p/v) y 0,25% de xilencianol (p/v) en agua destilada). La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 70-90 V. Tras teñir el gel con bromuro de etidio, el ADN se visualizó en un transiluminador (Bio-Rad Molecular Imager Gel Doc XR) bajo luz UV y se capturaron las imágenes usando el software Gel Doc XR (Bio-Rad).

La determinación de la integridad del ARN se llevó a cabo mediante su visualización en un gel de agarosa al 1,5% (p/v) tras la electroforesis. Las muestras se mezclaron con 1/6 v de tampón de carga (30% de glicerol (p/v); 0,25% de azul de bromofenol (p/v) y 0,25% de xilencianol (p/v) en agua libre de RNAsa) y se colocaron en el gel. La electroforesis se realizó a 90 V durante no más de 30 min, para minimizar la degradación del ARN. Tras teñir el gel con bromuro de etidio, el ADN se visualizó en un transiluminador (Bio-Rad Bio-Rad Molecular Imager Gel Doc XR) bajo luz UV y se capturaron las imágenes usando el software Gel Doc XR (Bio-Rad).

La presencia de tres bandas nítidas correspondientes a los ARN ribosómicos (23S, 16S y 5S), los más abundantes en la muestra, se consideró indicadora de que la muestra era apta para su posterior utilización. También permitió comprobar la presencia de ARN pequeños que se podrían haber perdido más fácilmente durante el aislamiento.

#### 4.2.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes

Los resultados de las reacciones de extensión reversa a partir de cebador (sección 2.4.7) se visualizaron en un gel de poliacrilamida desnaturalizante para lograr una alta resolución en la separación de bandas.

El gel se preparó a una concentración final de acrilamida-bisacrilamida 29:1 (Bio-Rad) del 6,5% y urea 7 M (condiciones desnaturalizantes) en tampón Tris-Borato-EDTA (TBE) según Sambrook *et al.* (1989). La polimerización de poliacrilamida se catalizó añadiendo 0,42 ml de persulfato amónico (APS) al 10% (p/v) y 0,12 ml de N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED, T9281) por cada 100 ml de solución.

El gel se pre-corrió a potencia fija de 45 W durante 45 min o hasta que su temperatura alcanzó los 50°C. Se cargaron las muestras previamente desnaturalizadas y mantuvo la potencia a 40 W (aprox. 1.700 V) durante el resto de la electroforesis. Tras 1,5-2 h, el gel se transfirió a un papel de filtro Whatman 3MM por adhesión, se cubrió con una película de plástico transparente y se secó al vacío durante 30 min utilizando el sistema Gel

Dryer 583 (Bio-Rad). Las bandas de ADN se visualizaron por exposición en pantallas Imaging Screen K (Bio-Rad) utilizando un equipo Phosphor Imager Personal FX (Bio-Rad).

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

La reacción de amplificación en cadena con polimerasa termo-resistente se empleó para amplificar fragmentos del cromosoma bacteriano de Pto DC3000 o de plásmidos, para la creación de fragmentos con sitios de restricción en los extremos o mutaciones y para la detección de insertos en plásmidos y en el genoma bacteriano.

#### 4.3.1. Método estándar

Las reacciones se ajustaron en función de la polimerasa empleada. Los fragmentos que serían subclonados posteriormente se amplificaron con la polimerasa de alta fidelidad Accuprime Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, ref. 12346-086). La concentración final de los componentes fue: 0,04 U/ $\mu$ l de polimerasa, 60 mM Tris-SO<sub>4</sub> (pH 8,9), 18 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,2 mM dNTPs, 0,2  $\mu$ M oligonucleótido directo y reverso y 40 ng de ADN cromosómico o 10-20 ng de ADN plasmídico purificado.

La PCR para detección de insertos o deleciones en plásmidos y genomas se llevó a cabo usando la polimerasa DreamTaq DNA Polymerase (Thermo Scientific, ref. EP0702). La reacción final contenía: 0,04 U/ $\mu$ l de polimerasa, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, KCl y (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (concentración no especificada en el tampón comercial), 0,2 mM dNTPs, 0,2  $\mu$ M oligonucleótido directo y reverso y 5  $\mu$ l de lisado bacteriano.

Las condiciones estándar de reacción fueron las siguientes: (i) una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min, (ii) 30-35 ciclos de 30 s a 94°C (desnaturalización); 30 s a 50-58°C (hibridación); 30 s/kb a la temperatura óptima de elongación de la polimerasa, y (iii) una elongación final de 10 min. Para llevar a cabo el proceso se utilizó un termociclador T100 (Bio-Rad).

#### 4.3.2. PCR solapante

La PCR solapante es una técnica utilizada para generar inserciones o deleciones en un fragmento de ADN (Lee *et al.*, 2010). El fundamento de esta técnica consiste en la amplificación de fragmentos con extremos solapantes que portan la secuencia situada a ambos extremos de la región a deleccionar (1ª PCR) para generar un producto final que carece de dicha región con una 2ª PCR. Para poder llevar a cabo esta técnica, es necesario incorporar en los oligonucleótidos centrales (2 y 3), que hibridan en 3' del fragmento A (secuencia situada a 5' de la deleción) y en 5' del fragmento B (secuencia situada a 3' de la deleción), la secuencia que se encuentra al otro lado de la deleción (Figura M1). En primer lugar se realizan dos PCR independientes con los oligonucleótidos 1-2 y 3-4, de manera que se obtienen los fragmentos A y B, ambos con una pequeña región que solapa con el otro fragmento. En la segunda PCR se mezclan los fragmentos A y B, se realiza una desnaturalización e hibridación inicial que producirá fragmentos híbridos A-B gracias a los extremos solapantes

y posteriormente se realiza una amplificación estándar. Al final del proceso se obtiene el fragmento que porta la deleción apto para ser clonado directamente en un plásmido (Figura M1).

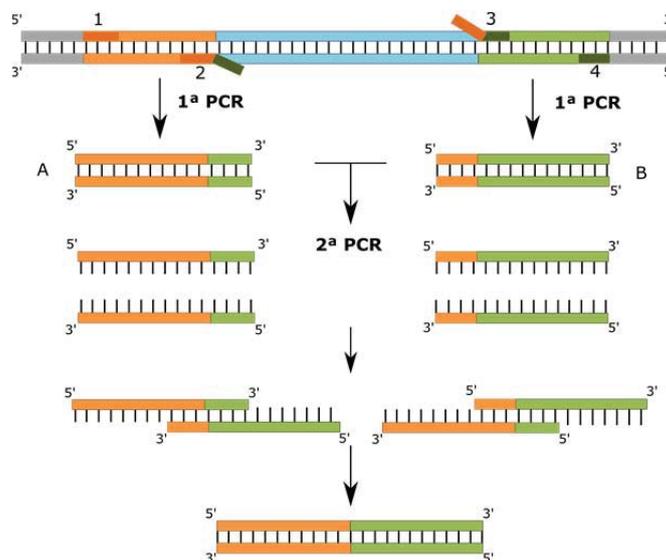


Figura M1. Generación de una deleción mediante PCR solapante.

En la primera PCR, se amplifica por un lado la zona situada en el extremo 5' (naranja claro) del fragmento que queremos eliminar (en azul) y por otro, la zona 3' (verde claro). Con un color más oscuro se representan los oligonucleótidos empleados, situados en la zona donde hibridan. El oligonucleótido reverso del fragmento 5' (2) y el oligonucleótido directo del fragmento 3' (3) poseen una secuencia solapante, de manera que las secuencias de esos productos solapan en los extremos eliminándose la secuencia entre ellos. En la segunda PCR se mezclan los fragmentos y se desnaturalizan, tras lo cual hibridarán por la región solapante, lo que sirve de molde para la amplificación. Al final se obtiene un fragmento que posee la secuencia de las regiones 5' y 3' del gen delecionado fusionadas.

#### 4.4. Clonaje de fragmentos de ADN en un vector

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

La reacción de digestión se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante (Roche y New England Biolabs). Cuando fue necesario utilizar más de una enzima de restricción, la digestión se realizó simultáneamente en los casos donde el tampón y la temperatura de reacción eran compatibles. En caso contrario, se digirió primero con la enzima que requería un tampón de menor fuerza iónica y posteriormente con la segunda enzima y su correspondiente tampón. Tras la reacción, las enzimas se inactivaron por calor o se perdieron al purificar el ADN tras electroforesis en gel de agarosa.

##### 4.4.2. Reacción de defosforilación de ADN con fosfatasa alcalina

En una reacción de clonaje es posible que el plásmido digerido con una enzima de restricción se ligue de nuevo sin incorporar el inserto de interés. Para evitar este problema, se realizó un tratamiento con fosfatasa

que elimina el grupo fosfato en los extremos 5' necesario para la ligación. De esta manera, sólo se ligan los fragmentos con extremos 5' intactos, como el inserto, y aumenta así la eficiencia en el clonaje.

Se añadió 1 unidad de fosfatasa antártica (Roche) por cada 5-10 pmoles de extremos 5' en el tampón proporcionado por el fabricante y se incubó durante 1 h a 37°C. La reacción se detuvo por inactivación de la enzima con calor (15 min a 70°C).

#### 4.4.3. Purificación de bandas de ADN de geles de agarosa

Para el aislamiento de fragmentos de restricción y productos de amplificación obtenidos mediante PCR, primero se realizó una electroforesis en gel de agarosa que se tiñó con bromuro de etidio para la detección del ADN. El fragmento deseado se cortó con un bisturí y se purificó utilizando el sistema comercial NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel), siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### 4.4.4. Ligación a un vector de clonación

La unión covalente de dos moléculas de ADN lineal con extremos compatibles se llevó a cabo gracias a la enzima T4 ADN ligasa (Roche). La reacción tuvo lugar en un volumen final de 15-20 µl a 14-16°C durante 12-16 h y utilizando una proporción molar vector:inserto de 1:3.

#### 4.4.5. Secuenciación y análisis de secuencias

La secuenciación de ADN fue realizada por el servicio de secuenciación de la Estación Experimental del Zaidín (Granada) en un sistema ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer. La proporción de ADN y cebador fue ajustada según las indicaciones del servicio.

Los resultados de secuenciación se alinearon con una secuencia patrón utilizando el software ChromasPro (Technelysium), lo que nos permitió detectar las mutaciones introducidas durante la amplificación del fragmento.

### 4.5. Extensión reversa a partir de cebador (*primer extension*)

Esta técnica se empleó para determinar el punto de inicio de la transcripción de un gen a partir de su ARNm. Para ello se mezcla una muestra de ARN total con un oligonucleótido complementario al ARNm problema que hibrida ~50 pb por debajo del extremo 5' esperado o del inicio de la secuencia codificante. El oligonucleótido se marca radiactivamente, lo que permite detectar y estimar la longitud del producto formado tras una reacción de reverso transcripción.

#### 4.5.1. Marcaje de cebadores

El marcaje de oligonucleótidos se realizó por fosforilación en su extremo 5'-OH mediante transferencia de un fosfato marcado radiactivamente en posición y de una molécula de ATP gracias a la polinucleótido quinasa del fago T4 (PNK, Roche). Se marcaron 10-20 pmoles de oligonucleótido con 1 µl [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP (6000Ci/mmol

10mCi/ml EasyTide, Perkin Elmer) y 1 U de PNK en un volumen final de 10  $\mu$ l de tampón de reacción (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, pH 7,5). La reacción se incubó a 37°C durante 1 h y se inactivó la enzima calentando a 70°C durante 10 min. Se duplicó el volumen de la reacción con agua DEPC y se pasó a través de una columna *Micro Bio-Spin 6* (Bio-Rad) para eliminar el exceso de ATP radiactivo. El marcaje se cuantificó utilizando un contador de centelleo TRI-CARB 1500 Liquid Scintillation Analyzer (Packard).

#### 4.5.2. Reacción de hibridación y extensión reversa

Las secuencias de los cebadores utilizados se recogen en la Tabla M3.

Para la hibridación se mezclaron 20-30  $\mu$ g de ARN, 1,5  $\mu$ l de cebador marcado (~200.000 cpm), 3  $\mu$ l de tampón comercial de SSIV (5 $\times$ , New England Biolabs Inc.) y agua DEPC en un volumen final de 15  $\mu$ l. La reacción se incubó a 90°C durante 5 min para deshacer las estructuras secundarias del ARN, posteriormente a 65°C durante 5 min para permitir la hibridación del oligonucleótido a su región complementaria y se dejó enfriar lentamente hasta 56°C, la temperatura óptima de funcionamiento de la reversotranscriptasa Superscript IV (SSIV, Invitrogen).

La extensión se inició añadiendo 5  $\mu$ l de una mezcla de extensión que contenía: dNTP 2 mM, 40 U de inhibidor de ARNasa (Thermo Fisher Scientific), 1  $\mu$ l de tampón comercial de SSIV y DTT 10 mM. La reacción se incubó a 56°C durante 1 h y los ácidos nucleicos se precipitaron con 1/10 v de acetato sódico 3 M y 3 v de etanol absoluto frío durante toda la noche a -20°C. El sedimento se recogió por centrifugación a 12.000 $\times g$  y 4°C durante 15 min, se lavó con 1 ml de etanol 70% (v/v) en agua milliQ frío y se secó en un bloque térmico a 50°C. Las muestras se rehidrataron y resuspendieron en 4  $\mu$ l de tampón TE (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM) y 2  $\mu$ l de tampón de carga desnaturante (azul de bromofenol 0,3% (p/v), xilencianol 0,3% (p/v), EDTA 10 mM, formamida desionizada 97,5% (p/v)). Las muestras se desnaturizaron incubándolas a 90°C durante 3 min, se enfriaron en hielo y se cargaron en geles de poliacrilamida desnaturantes para analizarlas en un sistema de electroforesis vertical (sección 4.2.2).

Para estimar de manera inequívoca el tamaño del producto de *primer extension* se utilizó una escalera de secuenciación Sanger. Se empleó el sistema comercial DNA Cycle Sequencing Kit (Jena Bioscience) siguiendo las instrucciones del fabricante, usando como molde de la reacción un vector con un fragmento de ADN de secuencia conocida (Apéndice C) y uno de los cebadores marcado radiactivamente para poder visualizar los resultados. Tras la reacción de secuenciación se duplicó el volumen de las muestras y se utilizaron 4  $\mu$ l para cargar en el gel junto a las muestras problema.

## 4.6. Análisis de la expresión génica

### 4.6.1. Síntesis de ADNc

La síntesis de la hebra complementaria de ADN (ADNc) a partir de muestras de ARN total se realizó utilizando la enzima transcriptasa reversa SuperScript II (SSII, Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Primero se mezcló 1 µg de ARN total con 2 µl de First Strand Buffer (5×) y 100 ng de hexámeros aleatorios (cebadores de la reacción) en agua libre de ARNasa hasta un volumen final de 10 µl. La reacción se incubó 5 min a 65°C, se enfrió en hielo y se le añadieron 9 µl de una solución que contenía 2 µl de First Strand Buffer (5×), DTT 20 mM, dNTP 1 mM y agua. Tras una incubación de 2 min a temperatura ambiente, se añadió la reverso transcriptasa (SSII), se incubó durante 10 min a 25°C, 2 h a 42°C y se inactivó a 65°C durante 15 min. El volumen se duplicó, por lo que la concentración final con respecto al ARN inicial fue de 25 ng/µl. Las muestras se almacenaron a -20°C.

### 4.6.2. Reacción de PCR acoplada a una reacción de transcripción reversa (RT-PCR)

Esta técnica permite comprobar si dos genes que forman parte de un operón se cotranscriben basándose en la amplificación de su región intergénica a partir de ADNc. Para ello se diseñan pares de oligonucleótidos que hibriden al final de la región codificante del primer gen y al inicio del segundo gen, de manera que sólo se producirá amplificación cuando los dos genes formen parte de una misma molécula de ADNc. Las muestras de ADNc se utilizaron como molde para una reacción de PCR estándar. El control negativo fue el mismo ARN total utilizado para la reacción de síntesis de ADNc y el control positivo, una muestra de ADN cromosómico. Los cebadores utilizados en estos ensayos se recogen en la Tabla M4.

### 4.6.3. Cuantificación de la expresión génica por PCR a tiempo real

#### A. Diseño de oligonucleótidos

Las secuencias de los genes para el diseño de los cebadores específicos para cada transcrito se obtuvieron de la Enciclopedia de los Genes y Genomas de Kioto ([www.kegg.jp](http://www.kegg.jp)). El diseño se realizó con el programa Oligo 6 (Molecular Biology Insights) siguiendo las recomendaciones descritas en Pueyo *et al.* (2002). En general, se buscaron oligonucleótidos que amplificaran un producto de entre 100 y 200 pb, evitando la formación de estructuras secundarias y amplificaciones inespecíficas. Los cebadores seleccionados presentaban valores de  $T_m$  altos, con diferencias menores de 1°C entre los miembros de una misma pareja y valores óptimos de  $3'\Delta G \geq -8$  kcal/mol.

### B. PCR en tiempo real o cuantitativa

La PCR en tiempo real permite la cuantificación de ácidos nucleicos con gran exactitud y fiabilidad, ya que monitoriza mediante fluorescencia la amplificación de los productos en tiempo real. El número de copias de ADN molde al inicio de la reacción se puede cuantificar a través del valor del ciclo umbral (Ct). Este valor se define como el número de ciclos necesarios para que se produzca un aumento de fluorescencia significativo con respecto a la señal basal y es inversamente proporcional a la cantidad inicial de moléculas molde.

La reacción de amplificación se realizó utilizando como molde muestras de ADNc, lo que se denomina RT-qPCR. Para la amplificación se utilizó un termociclador iCycler MyiQ2 (Bio-Rad) con reacciones que contenían: 50 ng de ADNc, 300 nM de oligonucleótidos y una mezcla comercial (2× iTaq Universal SYBR Green Supermix, Bio-Rad) que contiene el resto de reactivos necesarios, en un volumen final de 25 µl. Las condiciones estándar de la reacción de amplificación consistieron en una desnaturalización inicial a 95°C durante 2 min seguida de 40 ciclos de 20 s a 95°C (desnaturalización) y 30 s a 70°C (hibridación y extensión).

Tras la amplificación, se obtuvo una curva de fusión o curva de *melting* de los productos de amplificación con el siguiente programa: 1 min a 95°C y 30 ciclos de 10 s, iniciando a 95°C y disminuyendo 1°C por ciclo hasta 66°C. Esta técnica permite detectar la disminución de la fluorescencia resultante de la desnaturalización dependiente de temperatura del producto de PCR. Al calcular y representar la relación entre la derivada de la fluorescencia y la temperatura se obtiene una gráfica cuyo pico máximo corresponde a la temperatura de fusión (T<sub>m</sub>), que es específica para cada producto. De esta manera, los productos de una pareja de cebadores presentan una misma T<sub>m</sub> y analizando esta se pueden detectar amplificaciones inespecíficas. Las muestras cuyos productos presentaron curvas de fusión no homólogas fueron descartadas.

### C. Cálculo de la eficiencia de los pares de oligonucleótidos

La eficiencia de las amplificaciones obtenidas mediante PCR en tiempo real a partir de cada pareja de cebadores puede calcularse realizando una curva patrón. Dicha curva se obtiene representando el logaritmo del número inicial de moléculas frente al número mínimo de ciclos de PCR necesarios para observar amplificación partiendo de esa cantidad de transcrito (ciclo umbral, Ct). En nuestro caso, cuantificando el ARN inicial y suponiendo una eficiencia del 100% en la síntesis del ADNc se realizaron diluciones seriadas (1:10) entre 200 ng y 0,02 ng de muestra por reacción. De esta manera se correlacionaron la cantidad inicial de transcrito y el valor de Ct obtenido para cada dilución.

Durante la fase exponencial de la PCR en tiempo real la cantidad de producto de PCR se duplica en cada ciclo. Por tanto, la diferencia entre los valores de Ct de cada dilución está determinada por la ecuación  $2^n = \text{factor de dilución}$ , donde n es el número de ciclos de diferencia. Con un factor de dilución de 10, los valores de Ct deberían estar separados 3,32 ciclos. La eficiencia de la amplificación E, se calcula a partir de la pendiente de la curva patrón utilizando la fórmula:  $E = 10^{-1/a} - 1$ , donde E=eficiencia y a=pendiente de la recta de regresión. Si la cantidad de producto de PCR se duplica exactamente en cada ciclo, E=1.

#### D. Cálculo de la expresión génica relativa

El cálculo de la expresión relativa de un gen en distintas cepas o condiciones se realizó a partir de los datos de PCR en tiempo real por el método  $\Delta\Delta Ct$  (Livak y Schmittgen, 2001). Usando las muestras de ADNc como molde para una PCR cuantitativa, se amplificaron los genes de estudio junto con el gen de referencia *gyrA* y se calculó su variación relativa como  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

#### E. Cálculo de la expresión génica absoluta

Cuando el objetivo era obtener los valores absolutos de expresión para varios genes en la cepa silvestre crecida en diferentes medios y condiciones de cultivo, se utilizó una PCR en tiempo real de las muestras para compararlas con controles de concentraciones conocidas. La cuantificación absoluta de la expresión génica se realizó comparando los Ct obtenidos para cada gen de la muestra problema con una recta patrón calculada para ese mismo gen a partir de distintas concentraciones de ADN cromosómico. Para ello, en una misma placa de reacciones se realizó una PCR cuantitativa con cada pareja de oligonucleótidos sobre 400, 40, 4, 0,4 y 0,04 ng de ADN cromosómico y 40 ng de ADNc de las muestras problema. El cálculo de la recta patrón que relacionaba la concentración inicial de ADN cromosómico con sus Ct permitió obtener por extrapolación las concentraciones de ADNc de las muestras a partir de los valores de Ct obtenidos. De esta manera, los valores de expresión obtenidos para cada gen y muestra se expresaron en unas unidades equivalentes a ng de ADN cromosómico. Finalmente, se dividieron los valores de cada gen analizado en la muestra por sus correspondientes niveles del gen *housekeeping gyrA* con el objetivo de normalizarlos.

En cada experimento se utilizaron 3 réplicas biológicas independientes para cada condición y 3 réplicas técnicas por muestra en cada placa. Para que las comparaciones fueran válidas, se asumió que la eficiencia de la transcripción reversa y la amplificación fueron constantes en todas las muestras.

#### 4.7. Cuantificación de proteína total

Las cuantificaciones de proteína total se realizaron por espectrofotometría mediante el ensayo de Bradford (Bradford, 1976), utilizando el kit comercial de Bio-Rad (*protein assay kit*). Esta técnica se basa en la reacción colorimétrica que se produce cuando el compuesto Coomassie G-250 se une a las proteínas, fundamentalmente interaccionado con aminoácidos básicos y con aquellos que presentan residuos aromáticos. En ausencia de proteína, este compuesto está presente en su forma catiónica, que posee una coloración rojiza y un máximo de absorbancia a 470 nm. Cuando se une a la proteína, este pasa a su forma aniónica y presenta una coloración azul con un máximo de absorbancia a 595 nm. La aparición de la coloración azul es proporcional a la cantidad de proteína presente en la muestra, por lo que se puede relacionar la  $DO_{595}$  con la concentración de proteína total. Los valores de proteína total de las muestras problema se obtuvieron por extrapolación a partir de una recta patrón calculada con los valores de  $DO_{595}$  frente a la concentración de muestras estándar.

Para la determinación de proteína total en los sedimentos celulares obtenidos en los ensayos de producción de alginato (sección de 5.2 de este apartado) se resuspendieron en 1 ml de agua destilada y se sometieron a lisis térmica mediante una incubación de 5 min a 95°C. Se tomaron entre 2-10 µl para realizar el ensayo, a los que se les aumentó añadiendo agua milliQ hasta 800 µl y se añadieron 200 µl de reactivo de Bradford. Tras una incubación de 30 min, se midió su DO<sub>595</sub>. Las muestras estándar para calcular la recta patrón se prepararon con albúmina de suero bovina (Sigma, A7030) y se ensayaron en paralelo a las muestras problema. Para cada ensayo, se llevaron a cabo dos reacciones de Bradford con diferentes volúmenes de la muestra problema, a partir de las cuales se calculó la media de la concentración.

## 5. Ensayos *in vivo*

### 5.1. Curvas de crecimiento

Para de detectar diferencias en el crecimiento de las distintas cepas estudiadas se realizaron curvas de crecimiento en las condiciones de cultivo habituales en el laboratorio. Partiendo de cultivos incubados 48 h a 28°C en placas de LB suplementado con antibióticos, las cepas se resuspendieron en agua milliQ y se ajustaron a DO<sub>660</sub>=0,1. Las suspensiones bacterianas se diluyeron 1/10 en el correspondiente medio de cultivo y se dispensaron 200 µl en una microplaca de poliestireno (Nunc MicroWell 167008) que se incubó a 20 o 28°C con agitación continua en un sistema Bioscreen C (MBR). El incremento de la turbidez se determinó midiendo la DO<sub>660</sub> cada 30 min hasta que el cultivo alcanzó la fase estacionaria de crecimiento. Cada cepa contó con cuatro réplicas por microplaca y el ensayo se realizó al menos dos veces para cada cepa y condición.

### 5.2. Ensayos de producción y cuantificación de alginato

Estudios previos realizados en el laboratorio determinaron que Pto DC3000 sintetiza alginato en placas de medio LB a 28°C y MMR a 20°C incubadas durante 3 días (Pérez-Mendoza *et al.*, 2014). Por tanto, se partió de cultivos bacterianos crecidos en placas de LB con antibióticos durante 48 h a 28°C y se sembraron en estría en las condiciones anteriormente mencionadas.

Estas placas se utilizaron para la extracción y cuantificación de alginato utilizando el método del carbazol con modificaciones (May y Chakrabarty, 1994). Las células se recogieron de cada placa resuspendiéndolas en NaCl al 0,9% (p/v), se ajustaron a DO<sub>660</sub>=2,0 en un volumen final de 5 ml y se centrifugaron durante 30 min a 3.300×g. Los sedimentos se reservaron para cuantificar la proteína total (sección 4.7) y los sobrenadantes se transfirieron a tubos nuevos, donde se precipitaron los EPS añadiendo 3 v de etanol al 95% (v/v) en agua destilada. Tras una incubación de 16 h a 20°C, las muestras se centrifugaron durante 30 min a 38.500×g, se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en agua milliQ. Se mezclaron 140 µl de cada extracción de EPS con 1,2 ml de solución de borato-ácido sulfúrico y 40 µl de carbazol al 0,1 % (p/v) en etanol absoluto. La solución de borato-ácido sulfúrico se preparó fresca para cada ensayo a partir de una solución madre de borato (24,74 g de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> en 45 ml de KOH 4 M y completado hasta 100 ml con agua destilada) que

se diluyó 1:4 en ácido sulfúrico concentrado para obtener la solución de trabajo. Las reacciones se incubaron a 55°C durante 30 min para que se produjese la reacción coloreada, que se midió a 530 nm. Los niveles de alginato se cuantificaron a partir de una recta patrón de ácido algínico del alga *Macrocystis pyrifera* (Sigma A7003) y se estandarizaron por la cantidad de proteína total en la muestra inicial. Los datos se expresan en  $\mu\text{g}$  de ácido urónico / mg de proteína celular total y se muestran datos de al menos 3 experimentos independientes.

### 5.3. Ensayos de motilidad bacteriana

#### 5.3.1. Swimming

Partiendo de cultivos bacterianos crecidos en placas de LB con antibióticos durante 48 h a 28°C, se recogió biomasa con agua milliQ y se ajustó a  $\text{DO}_{660}=2,0$ . Se inocularon alícuotas de 2  $\mu\text{l}$  de las suspensiones 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 20°C durante 24-72 h. El ensayo se realizó por triplicado y con, al menos, tres réplicas técnicas para cada cepa.

El diámetro de los halos de dispersión se midió al finalizar el tiempo de incubación utilizando el programa ImageJ (Schindelin *et al.*, 2012). La motilidad se expresó como la media del diámetro del halo  $\pm$  desviación estándar, a partir de los datos de al menos 9 placas de motilidad para cada condición.

#### 5.3.2. Swarming

Los cultivos bacterianos crecidos sobre placas de Petri de LB con antibióticos durante 48 h a 28°C se recogieron en agua milliQ y se ajustaron a  $\text{DO}_{660}=2,0$ . Se depositaron gotas de 2  $\mu\text{l}$  de las suspensiones 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 boca arriba a 20°C durante 24-72 h. El ensayo se realizó por triplicado y con, al menos, tres réplicas técnicas para cada cepa.

El área de los halos de dispersión se midió al finalizar el tiempo de incubación utilizando el programa ImageJ (Schindelin *et al.*, 2012). La motilidad se expresó como la media área de *swarming*  $\pm$  desviación estándar, a partir de los datos de al menos 9 placas para cada condición.

### 5.4. Ensayos de producción de biosurfactante

A partir de cultivos bacterianos crecidos durante 48 h a 28°C, se recogió biomasa en agua milliQ y se ajustó a  $\text{DO}_{660}=1,0$ . Se depositaron alícuotas de 10  $\mu\text{l}$  de las suspensiones sobre placas de Petri preparadas con 25 ml de LB 1% agar y se dejaron secar en la cabina de flujo laminar durante 5 min. Las placas se incubaron boca arriba a 20°C durante 24-48 h. El ensayo se realizó por triplicado y con, al menos, tres réplicas técnicas para cada cepa.

Para revelar la presencia del biosurfactante, se pulverizó una fina capa de aceite mineral (Sigma, ref. M5904) uniformemente sobre la placa (Burch *et al.*, 2010). El área de las colonias y de los halos de producción de biosurfactante se midieron utilizando el programa ImageJ (Schindelin *et al.*, 2012). La producción se calculó hallando la diferencia entre el área del halo de biosurfactante y el área de la colonia  $\pm$  desviación estándar, a partir de los datos de al menos 9 placas para cada condición.

### 5.5. Ensayos de reproducción de la curva de crecimiento en placas multipocillo mediante diluciones seriadas

Las cepas crecidas en placas de LB a 28°C se resuspendieron en agua milliQ estéril, se centrifugaron 5 min a 2.000 g y se resuspendieron en el medio correspondiente tras descartar el sobrenadante. Los cultivos se ajustaron a  $DO_{660} \sim 4,0$  y se dispensaron en la placa multipocillo (Greiner Cellstar 96 de fondo redondo, ref. M9436) para realizar diluciones seriadas (1:2) hasta  $DO_{660} = 0,125$ . Se utilizó un volumen final de 150  $\mu$ l para cada pocillo y se incluyeron varios controles de medio sin inocular en posiciones aleatorias de la placa en todos los experimentos.

Las placas se incubaron a 20°C en un agitador IKA MS 3 Basic con un soporte para placas multipocillo a una agitación constante de 600 rpm durante 5 h, 12 h o 48 h para LB, MMR y MMF, respectivamente. Cada experimento se realizó de manera independiente al menos 2 veces y para cada condición se utilizaron 2-4 réplicas según el experimento.

### 5.6. Ensayo enzimático de actividad $\beta$ -galactosidasa

La medida de actividad  $\beta$ -galactosidasa se llevó a cabo en células permeabilizadas (Miller, 1972). Este método se basa en la reacción colorimétrica producida por la hidrólisis del *o*-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (ONPG) por parte de la enzima  $\beta$ -galactosidasa para formar galactosa y *o*-nitrofenol. Este último compuesto es de color amarillo y su concentración se puede medir a partir de la medida de absorbancia utilizando la ley Beer-Lambert-Bouguer, que relaciona la absorbancia de una sustancia con su concentración ( $c$ ), su coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) y la longitud atravesada por la luz en el medio ( $l$ ):  $Abs = c \times \epsilon \times l$ .

Se partió de cultivos celulares crecidos en medio líquido, en placa multipocillo o resuspendidos a partir de un cultivo en placa de Petri (muestras de ensayos de *swarming* o cultivos estándar de LB, MMR y MMF) y ajustados a  $DO_{660} = 0,5-1,0$  en agua milliQ. Las células se permeabilizaron añadiendo 20  $\mu$ l de SDS 0,1% (p/v) y 20  $\mu$ l de cloroformo a alícuotas de 20-100  $\mu$ l de las suspensiones celulares.

El ensayo enzimático se llevó a cabo añadiendo 0,8 ml de tampón Z pH 7,0 ( $Na_2HPO_4$  60 mM,  $NaH_2PO_4$  40 mM, KCl 10 mM,  $MgSO_4$  1 mM y  $\beta$ -mercaptoetanol 0,27% (v/v)) y 0,2 ml de una solución de ONPG (0,4 mg/ml ONPG en tampón fosfato sódico 0,1 M pH 7,0). La mezcla se incubó a 30°C hasta la aparición de color (5-30 min) y se detuvo añadiendo 2 ml de una solución de  $Na_2CO_3$  0,5 M. Para los cultivos crecidos en placa multipocillo, de los que se disponía un menor volumen, se escaló la reacción enzimática a la mitad y se realizó

el ensayo placas de polipropileno con pocillos hondos (VWR, 732-3323) mantenidas a 30°C en un baño con agua. La concentración de *o*-nitrofenol y la contribución de la turbidez celular en la reacción se determinaron espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 420 nm y 550 nm, respectivamente. Además, se determinó la densidad celular de las suspensiones iniciales midiendo su turbidez a 660 nm. Las mediciones en placas multipocillo se realizaron transfiriendo 100 µl del volumen de reacción a placas Cellstar 96 de fondo plano (Greiner M0812) para realizar las lecturas en un lector de placas Eon Biotek con el *software* Gen5. Los ensayos se realizaron por triplicado para cada condición, con 3 réplicas técnicas por cada experimento. La actividad β-galactosidasa, expresada en unidades Miller (UM), se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad } \beta \text{ – galactosidasa} = \frac{1000 \times [\text{DO}_{420} - (1,7 \times \text{DO}_{550})]}{t \times v \times \text{DO}_{660}}$$

Donde t representa el tiempo en min y v el volumen en ml de la suspensión bacteriana añadido a la reacción.

### 5.7. Ensayos de auto-aglutinación

Las cepas de Pto utilizadas en este ensayo se inocularon a  $\text{DO}_{660}=0,05$  en medio LB suplementado con antibióticos a partir de cultivos frescos crecidos en placas de Petri de LB durante 48 h a 28°C y resuspendidos en agua milliQ. Los cultivos se incubaron durante 12 h a 25°C y 90 rpm de agitación hasta alcanzar una  $\text{DO}_{660}=0,5$ . Posteriormente, los cultivos se lavaron dos veces con MMF y se ajustaron en ese medio a  $\text{DO}_{660}=0,5$  para incubarlos durante 24 h a 20°C y 90 rpm. Las muestras se montaron en fresco en un portaobjetos y se visualizaron en un microscopio *Axio Scope* (Zeiss). El experimento se realizó por triplicado y se visualizaron tres muestras por cada cepa.

### 5.8. Ensayos de producción de sideróforos

#### 5.8.1. Producción de sideróforos en medio sólido

La detección de sideróforos fluorescentes en medio sólido se realizó en placas de MMR\* sin adicionar ningún compuesto. La fluorescencia se visualizó directamente bajo luz UV en un transiluminador Vilber Lourmat FLX-20M.

La evaluación de la capacidad de síntesis de sideróforos también se llevó a cabo en medio MMR sólido con Chrome Azurol S (CAS). Este compuesto contiene complejos ternarios del colorante CAS con  $\text{Fe}^{3+}$  y HDTMA que presentan una coloración azul-verdosa. Los sideróforos quelan el hierro de los complejos provocando un cambio en la coloración que vira de azulado a naranja, de manera que se puede detectar visualmente la presencia de los mismos.

Los ensayos se realizaron a partir de placas frescas crecidas a 28°C durante 48 h en LB cuya masa celular se resuspendió en agua milliQ y se ajustó a  $\text{DO}_{660}=0,1$ . Se realizaron 5 diluciones seriadas 1:10 y se

depositaron gotas de 5  $\mu$ l en placas cuadradas de MMR\* con CAS, que se dejaron secar 5 min a temperatura ambiente y posteriormente se incubaron a 20°C durante 48 h.

### 5.8.2. Producción de sideróforos en cultivos líquidos

Para realizar este ensayo se partió de cultivos frescos crecidos en placa durante 48 h a 28°C, que se resuspendieron en agua milliQ y se ajustaron a  $DO_{660}=0,05$  en MMR\* con 100  $\mu$ M de biperidilo. Para cada cepa se utilizó un control negativo de producción de sideróforos que consistía en un duplicado del cultivo al que se le añadió  $FeCl_3$  a una concentración final de 100  $\mu$ M. Tras una incubación a 20°C y 180 rpm durante 24 h (controles negativos) o 48 h (muestras), se midió la absorbancia de los cultivos a 660 nm. Posteriormente se centrifugó el cultivo, se descartó el pellet celular, se filtró el sobrenadante (excepto en los ensayos de determinación de concentración óptima de biperidilo y de sobreexpresión de *csrA1-5*, donde todavía no se había optimizado el protocolo) y se almacenó a -20°C.

## 5.9. Visualización de flagelos

### 5.9.1. Visualización de flagelos mediante microscopía óptica

Para estudiar la abundancia de flagelos en el microscopio óptico, se utilizó la tinción de Leifson modificada por Clark (1976). La solución de 1,2% de fucsina básica se preparó en 95% de etanol y se estabilizó durante toda la noche a 25°C, tras lo cual se mezcló con un volumen igual de una solución de NaCl 0,75% y 1,5% de ácido tánico preparados en agua destilada. El pH final del colorante se ajustó a 5,0 con NaOH 1 N. Las células de placas de *swarming* se recogieron con  $MgCl_2$  10 mM, se ajustaron a una  $DO_{660}=1,0$  y se fijaron con 1 ml de solución de paraformaldehído al 4% y pH 7,2 para cada ml de cultivo durante 20 min. La suspensión se centrifugó, lavó y resuspendió en 1 ml de agua destilada. Una gota de suspensión de cultivo se colocó en el centro del portaobjetos, se dejó correr a lo largo de este y se secó a temperatura ambiente. A continuación, se añadió 1 ml del colorante y se incubó durante 40 min en una cámara húmeda, tras lo cual el portaobjetos se lavó con agua corriente, se secó al aire, se montó con *Merkoglass* (Merck) y se examinó usando un microscopio óptico Axio Scope (Zeiss). El ensayo se realizó por triplicado y se observaron tres portaobjetos para cada condición.

### 5.9.2. Visualización de flagelos mediante microscopía electrónica de transmisión

La visualización de los flagelos mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM, *transmission electron microscopy*) se llevó a cabo gracias a una tinción negativa de las células *swarmers* realizada según el método descrito por Aizawa (2013). Las células se recogieron utilizando 1 ml de agua milliQ y se ajustaron a una  $DO_{660}=0,8$ . Las muestras se centrifugaron a 3.000xg durante 5 min, los sedimentos se lavaron dos veces con agua milliQ y se resuspendieron manteniendo el volumen inicial. Se tomaron 8  $\mu$ l de solución y se depositaron en la superficie de una rejilla de níquel cubierta con una película de Formvar al 0,25 (p/v) en

cloroformo. Inmediatamente se añadió un volumen de ácido fosfotúngstico al 1% (p/v) en agua y se eliminó el exceso de líquido utilizando un fragmento de papel de filtro Whatman. Las rejillas se observaron en un microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM-1011 con la asistencia del Servicio de Microscopía de la Estación Experimental del Zaidín (Granada).

## 5.10. Ensayos in planta

Para evaluar la capacidad infectiva de distintas cepas de Pto se llevaron a cabo ensayos de infección en tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker), un hospedador compatible, y ensayos de respuesta hipersensible en plantas de judía (*Phaseolus vulgaris* cv. Canadian Wonder), un hospedador no compatible. Las plantas se germinaron y cultivaron en una cámara con condiciones controladas de luz, temperatura y humedad: fotoperíodo de día largo (16/8 h de luz/oscuridad; 24/18°C día/noche) y una humedad relativa del 70%. Las macetas se rellenaron con sustrato universal (Compo Sana) y se colocaron en bandejas de polietileno a las que se le añadía agua corriente cada 3 días para el riego.

### 5.10.1. Infección en plantas de tomate

Las cepas bacterianas cultivadas a 28°C durante 48 h se resuspendieron en agua milliQ y se ajustaron a  $DO_{660}=0,1$  (correspondiente a  $10^8$  unidades formadoras de colonias (UFC)/ml). Siempre se comprobó la densidad celular del inóculo mediante siembra de diluciones seriadas en placas de LB con los antibióticos adecuados.

Los ensayos se realizaron con plantas de tomate de cuatro semanas de edad, que se regaron y pulverizaron con agua destilada estéril 1 h antes de realizar la inoculación con el objetivo estimular la apertura estomática y facilitar la infección. Las suspensiones bacterianas se pulverizaron sobre las partes abaxial y adaxial de las hojas de manera uniforme, inoculando los cinco folíolos de una hoja por cada planta y se utilizaron, al menos, seis plantas por experimento en tres ensayos independientes.

El seguimiento de la infección se realizó mediante la observación de la sintomatología y el tamaño de las poblaciones bacterianas en el interior de la hoja. La sintomatología de las hojas infectadas se fotografió en todos los puntos de toma de muestra.

Para monitorizar la evolución de las poblaciones bacterianas en el interior de la hoja, se tomaron muestras de hoja a las 3 h post-infección (0 dpi) y a los 3, 6 y 10 dpi. En cada toma de muestra se utilizaron una o dos plantas por cepa ensayada, en las cuales se cortaron con un sacabocados discos de hoja en los folíolos infectados. Se tomaron dos muestras por hoja y cada muestra contenía cinco discos de 10 mm de diámetro (1 disco/folíolo). La extracción de las bacterias del apoplasto vegetal se realizó por un método mecánico utilizando un agitador RW16 basic (IKA). Las muestras se maceraron en 1 ml de  $MgCl_2$  10 mM, se hicieron diluciones seriadas y se sembraron en medio LB con los antibióticos adecuados para determinar el número de UFC por

superficie de hoja. Los niveles de poblaciones celulares se expresaron en UFC/cm<sup>2</sup> ± error estándar y se representaron gráficamente.

#### 5.10.2. Respuesta hipersensible en plantas de judía

Para evaluar la respuesta hipersensible, se inocularon por infiltración plantas de judía de 3 semanas de edad. Las cepas bacterianas se resuspendieron en agua milliQ a partir de cultivos frescos crecidos en placa a 28°C durante 48 h y ajustados a DO<sub>660</sub>=0,01 (correspondiente a 10<sup>7</sup> UFC/ml). Siempre se comprobó la densidad celular del inóculo mediante siembra de diluciones seriadas en placas de LB con los antibióticos adecuados.

Las suspensiones bacterianas se infiltraron en la superficie abaxial de la hoja usando una jeringa de 2 ml con cono luer centrado (Codan) sin aguja. Se infiltró una hoja por planta, inoculando las cepas a comparar en la misma hoja. El ensayo se realizó por triplicado y se utilizaron al menos cuatro plantas por experimento, monitorizando la sintomatología durante 8 dpi.

### 6. Detección y cuantificación de sideróforos y ácido salicílico en sobrenadantes

Los sideróforos son moléculas con un grado variable de complejidad (Neilands, 1995) que, en algunos casos, presentan un cromóforo fluorescente. Los espectros de emisión de fluorescencia tras la excitación a una determinada longitud de onda dependen de la estructura del cromóforo y pueden aportar información sobre la identidad del sideróforo presente en un cultivo. Además, algunos sideróforos presentan color bajo luz visible por lo que es posible detectar su presencia y conocer su concentración mediante métodos espectrofotométricos.

Los sobrenadantes de ensayos de producción de sideróforos (sección 5.8 de este apartado), filtrados y almacenados a -20°C, se utilizaron para detectar y cuantificar pioverdina, yersiniabactina y ácido salicílico usando técnicas específicas para cada compuesto. Los experimentos de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) se realizaron en el servicio de instrumentación de la Estación Experimental del Zaidín (Granada), con la asistencia de la Dra. Lourdes Sánchez.

#### 6.1. Cuantificación de pioverdina

La concentración del sideróforo pioverdina se puede determinar espectrofotométricamente, ya que presenta un máximo de absorbancia a 405 nm (Hoegy *et al.*, 2014). La producción de pioverdina se expresó como la ratio  $DO_{405 \text{ sobrenadante}}/DO_{660 \text{ cultivo}}$ . Los valores de cada cepa se obtuvieron con los datos de, al menos, tres experimentos independientes.

## 6.2. Fluorimetría de sobrenadantes

Para intentar detectar la presencia de otros compuestos implicados en el metabolismo del hierro cuya presencia no se puede determinar espectrofotométricamente, se analizaron los patrones de fluorescencia de los sobrenadantes utilizando un fluorímetro PTI (Photon Technology International). Para ello, los sobrenadantes se midieron en cubetas de cuarzo de 3,5 ml de volumen (Hellma) excitando la muestra a 305 nm y midiendo el espectro de emisión de 250 a 650 nm. Para comparar distintas cepas, los valores de emisión se normalizaron dividiendo entre la  $DO_{660}$  del cultivo. Las gráficas se construyeron representando las unidades arbitrarias de fluorescencia normalizadas frente a longitud de onda de la emisión (320-590 nm), utilizando los datos de un experimento representativo de entre, al menos, tres experimentos independientes.

## 6.3. Detección y cuantificación de ácido salicílico por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC)

La HPLC es una técnica de que permite la separación de compuestos cuando una fase móvil (que contiene la muestra a analizar) se hace pasar por una columna cromatográfica (fase estacionaria). Estos equipos monitorizan la salida de los compuestos tras la cromatografía acoplado un detector de fluorescencia, luz UV o DAD (*diode array detector*), entre otros.

Los ensayos se realizaron en un HPLC Waters Alliance 2695 equipado con un PAD (*photodiode array detector*). Se utilizó una metodología similar a la descrita por Jones *et al.* (2007), con una preparación de las muestras semejante pero modificando la columna y la fase móvil. La columna utilizada fue una XBridge (Waters) C18 de 3,5  $\mu\text{m}$  de 2,1 $\times$ 100 mm con precolumna XBridge (Waters) (2,1 $\times$ 10 mm) mantenida a una temperatura de 35°C.

Las muestras se prepararon mezclando 1,8 ml de sobrenadante filtrado con 0,55 ml de ácido acético glacial para obtener un pH cercano a 2. Posteriormente se diluyeron 1:1 en metanol y se inyectaron 25  $\mu\text{l}$  desde un automuestreador termostatzado a 10°C. Para la separación cromatográfica se trabajó manteniendo la columna a 35 °C, y a un flujo de 0,3 ml/min. Las fases móviles fueron: una solución del 1% de ácido fórmico en agua (fase móvil A) y otra solución con 1% de ácido fórmico disuelto en metanol (fase móvil B). El método de elución empleado fue en gradiente, comenzando con una proporción 60:40 (A:B), hasta el minuto 4 donde cambia a 10:90 hasta el minuto 8 min, se mantiene durante 3 min y en el minuto 12 se vuelve a las condiciones iniciales, que se mantienen durante 3 min.

El ácido salicílico se detectó por fluorescencia y su tiempo de elución se determinó con respecto a un patrón del compuesto diluido en el mismo medio donde se habían crecido los cultivos, MMR\*. Los niveles de ácido salicílico se determinaron por extrapolación a partir de una curva de calibrado obtenida midiendo patrones en el rango de concentraciones desde 20 a 1000 ppb. La curva se ajustó mediante una regresión lineal ( $y = 1,61 \cdot 10^5 x + 2,25 \cdot 10^5$ , donde  $y$  representa el área del pico cromatográfico y  $x$  la concentración de ácido salicílico en ppb). Los valores se normalizaron utilizando la  $DO_{660}$  del cultivo.

#### 6.4. Detección y cuantificación de yersiniabactina por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS)

La espectrometría de masas es una técnica que permite la diferenciación e identificación de moléculas en función de la relación entre su masa y carga ( $m/z$ ). El proceso se inicia con la ionización de la muestra, tras lo cual los iones se separan y clasifican en función de su  $m/z$  y finalmente se miden en un detector. En este trabajo se utilizó la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas (*liquid chromatography-mass spectrometry*, LC-MS), donde se sometieron a espectrometría fracciones concretas de la muestra que se habían seleccionado previamente tras una cromatografía líquida.

Se utilizó un sistema Acquity UPLC H-Class (Waters) equipado con un detector de longitud de onda dual (Acquity TUV, Waters), acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (Quattro micro). Se utilizó una metodología similar a la descrita por Jones *et al.* (2007), con la misma preparación de las muestras pero pero utilizando la columna XBridge utilizada en las determinaciones por HPLC.

Las muestras se prepararon mezclando 1,8 ml de sobrenadante filtrado con 0,2 ml de  $\text{FeCl}_3$  10 mM, tras lo cual se filtraron y se inyectaron 25  $\mu\text{l}$  en el HPLC y 10  $\mu\text{l}$  en el LC-MS. Se trabajó a un flujo de 0,3 ml/min durante 35 min utilizando como fase móvil A una solución del 0,1% de ácido fórmico en agua y como fase móvil B, acetonitrilo. Las muestras se analizaron con un método de elución en gradiente donde las condiciones iniciales fueron 95:5 (A:B) hasta el minuto 7. Desde el minuto 7 al 20 se utiliza un gradiente lineal, para llegar a una proporción 30:70. Esta proporción se cambia a 20:80 desde el minuto 20 hasta el 22, y después se utiliza un gradiente lineal desde 20:80 hasta 95:5 (minuto 30), proporción que se mantiene hasta el minuto 35.

En primer lugar, se detectó la presencia de yersiniabactina por HPLC-PAD. Las muestras presentaron un máximo de absorción a  $\lambda=385$  nm con un tiempo de retención en la columna de 14,8 min, que se pudo identificar como yersiniabactina por presentar un espectro de absorbancia idéntico a lo descrito anteriormente por Jones *et al.* (2007). Posteriormente se analizaron las muestras por LC-MS con el mismo protocolo empleado en cromatografía líquida y utilizando como modo de ionización *electrospray* positivo (ESI+). Las muestras se inyectaron en modo Scan, donde se obtuvo un pico con un tiempo de retención de 15,5 min, del cual se extrajeron masas de relación  $m/z= 535,1$  y  $1069,0$ , correspondientes al monómero y al dímero de yersiniabactina acomplejada con Fe. Además se realizó una búsqueda específica del compuesto por *single ion recording* (SIR) con las masas anteriormente mencionadas, que confirmó la presencia del compuesto. Sus áreas se calcularon para obtener un valor de producción de yersiniabactina para cada cepa, que se normalizó por la  $\text{DO}_{660}$  del cultivo y se refirió a la cepa silvestre de cada experimento.

## 7. Ensayos *in silico*

### 7.1. Obtención y alineamiento de secuencias

Las secuencias se obtuvieron de las bases de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, *National Center for Biotechnology Information*) y de la Enciclopedia de los Genes y Genomas de Kioto (KEGG, *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*).

El alineamiento múltiple de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas se realizó utilizando la herramienta Clustal Omega accesible en línea en la página web del Instituto Europeo de Bioinformática (EMBL-EBI, Chojnacki *et al.* (2017)).

### 7.2. Creación de árboles filogenéticos

Para comparar la similitud de las proteínas CsrA presentes en distintas especies de *Pseudomonas*, se seleccionaron las cepas cuyo genoma completo estaba secuenciado y cerrado al inicio de esta tesis (según NCBI/genome). Se descargó el genoma completo de estas cepas y, utilizando las secuencias de CsrA de Pto DC3000 y *P. aeruginosa* PAO1 como patrón, se realizó una búsqueda de genes ortólogos utilizando el algoritmo BLAST (Altschul *et al.*, 1990). Las secuencias aminoacídicas encontradas se asignaron en función de su similitud a los grupos formados por CsrA1-5, RsmF u otros (% identidad <75).

El árbol filogenético se construyó a partir de secuencias de 73 cepas representativas de la diversidad global de proteínas CsrA en *Pseudomonas sp.* Utilizando la herramienta MEGAX (Kumar *et al.*, 2018), las secuencias se alinearon con Clustal Omega usando una matriz de distancias BLOSUM y se representaron las relaciones entre las secuencias por el método de *Neighbor-Joining* (Saitou y Nei, 1987). Las distancias se calcularon como sustituciones aminoacídicas por posición y se calcularon los valores de *bootstrap* utilizando 1000 réplicas.

### 7.3. Predicción de secuencias diana de CsrA

La búsqueda *in silico* de posibles genes diana de las proteínas CsrA se realizó utilizando el algoritmo CSRA\_TARGET (Kulkarni *et al.*, 2014). Las secuencias desde -200 pb a +50 pb del inicio de la región codificante de todos los genes del genoma de Pto DC3000 se descargaron de RSAT (Nguyen *et al.*, 2018) y se utilizaron para realizar la búsqueda de sitios de unión a CsrA. Para que un gen sea considerado una posible diana de CsrA según este algoritmo, su ARNm debe presentar motivos GGA cercanos al consenso, uno de los cuales debe estar localizado cerca de la secuencia SD y al menos dos que presenten una separación apropiada para la unión del dímero de CsrA. Los motivos GGA considerados son los sitios primarios (AAGGA, ACGGA, ATGGA, AGGGA y AGGA) y secundarios (CTGGA, AGAGA, CGGGA y TGGGA) de unión a CsrA cuyas secuencias habían sido determinadas previamente a partir de estudios *in vivo* e *in vitro*.

#### 7.4. Predicción de la estructura secundaria de los ARN

La estructura secundaria de las secuencias de ARN no codificantes y ARNm se predijo utilizando el servidor web Mfold (Zuker, 2003). Los resultados se transfirieron a la herramienta VARNA (Darty *et al.*, 2009) para su visualización.

#### 7.5. Búsqueda de secuencias en genomas bacterianos

La predicción de secuencias reguladoras en el genoma bacteriano o en secuencias concretas se realizó utilizando diversas herramientas como *Virtual footprint* (Münch *et al.*, 2005), para buscar posibles sitios de reconocimiento de factores sigma y reguladores transcripcionales o RSAT (Nguyen *et al.*, 2018), para la búsqueda de secuencias determinadas en genomas completos.

#### 7.6. Análisis estadísticos

Las comparaciones estadísticas entre distintas cepas o condiciones realizaron con un análisis de la varianza (ANOVA, *Analysis of variance*) de un solo factor con un test Tukey HSD post-hoc utilizando el *software* GraphPad Prism 6 (California Corporation) o el *software* R. Cuando se evaluaron diferencias entre dos grupos, los datos se analizaron con un test t utilizando las herramientas mencionadas anteriormente.

#### 7.7. Análisis de imágenes

El software de análisis de imágenes ImageJ (Schindelin *et al.*, 2012) se utilizó para medir áreas y longitudes a partir de fotografías de placas de cultivo.

#### 7.8. Visualización de datos de RNA-Seq

La visualización de datos de secuenciación masiva de ARN (RNA-Seq) se realizó gracias al *software* de acceso libre IGB (*Integrated Genome Browser*), utilizando archivos disponibles en el laboratorio ya procesados en formato .bedgraph.

## RESULTADOS



# Capítulo I. Diversidad y expresión de las proteínas CsrA

## 1. Diversidad de las proteínas CsrA en el género *Pseudomonas*

Al inicio de esta tesis doctoral, el cromosoma de Pto DC3000 contaba con 4 genes anotados que codificaban proteínas CsrA: PSPTO\_1629 (*csrA1*), PSPTO\_1844 (*csrA2*), PSPTO\_3566 (*csrA3*), y PSPTO\_3943, que nosotros denominamos *csrA4*. Realizando una búsqueda por homología de secuencia aminoacídica, se encontró otro gen (PSPTO\_5621) codificante para una proteína hipotética con un dominio CsrA según Pfam (PF02599), que se nombró *csrA5*. Dado que la función biológica de una proteína reside en su secuencia aminoacídica, se decidió realizar una comparación más exhaustiva a este nivel.

Las búsquedas en bases de datos permitieron determinar la homología entre las proteínas CsrA de Pto DC3000 y las variantes estudiadas en la bibliografía disponible. De esta manera, CsrA2 es ortólogo de CsrA de *E. coli* y con RsmA de *P. aeruginosa*, *P. putida* y *P. fluorescens*; CsrA3 presenta homología con RsmE de *P. putida* y *P. fluorescens*; y CsrA1 es ortólogo a RsmI de *P. putida* y *P. fluorescens* (Figura R1A). La proteína RsmF/RsmN de *P. aeruginosa* no muestra identidad con ninguna de las proteínas de Pto DC3000, mientras que CsrA4 y CsrA5 no se corresponden con ninguna variante descrita en la bibliografía hasta el momento.

**A**

```

Eco      CsrA  MLILTRRVGETLMIGD-EVTVTVLGVKGNQVRIGVNAPKEVSVHREEIYQRIQAEKSQQSSY
Pae PAO1  RsmA  MLILTRRVGETLMVGD-DVTVTVLGVKGNQVRIGVNAPKEVAVHREEIYQRIQEKDQEPNH
Ppu KT2440 RsmA  MLILTRRCAESLIIGDGEITVTVLGVKGNQVRIGVSAPKEVAVHREEIYLRKKEKDEEPSL
Pfl F113  RsmA  MLILTRRCAESLIIGDGEITVTVLGVKGNQVRIGVNAPKEVAVHREEIYLRKKEKDEEPSH
Pto DC3000 CsrA2 MLILTRRCAESLIIGDGEITVTVLGVKGNQVRIGVNAPKEVAVHREEIYLRKKEKDEEPSH
***** * ** * ***** * ***** * ***** * **

Ppu KT2440 RsmE  MLILTRKVGESIVIND-DIKVTILGVKGMQVRIGIDAPKDVQHREEIFKRIQAGSPAPEKHEDTH
Pfl F113  RsmE  MLILTRKVGESINIGD-DITITILGVSGQVRIGINAPKNVAVHREEIYQRIQAGLTAPDKPQTP
Pto DC3000 CsrA3 MLILTRKVGESINIGD-EITVTILGVQGLQVRLGINAPKNVSVHREEIYKRIQAE LAPNQDPQ
***** * * * * ***** * * * * ***** * * * * ***** * * * *

Ppu KT2440 RsmI  MLVIGREVGIVIGD-DIRIMVETRDGVVRFVAAAPREVPHRAEVYKRI---KASKQSKA
Pfl F113  RsmI  MLVLSRAVVELISIGD-DISVRVLSVSGGTVRFVVEAPRHVDVHRSEIYDKIQKRKALATRKACSV
Pto DC3000 CsrA1 MLVLTRDIGETFSIGD-DITVQILGVNNGQVRLGISAPKDIKVHRAEVYKRIANKLSQQAQTQP
*** * ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

**B**

```

Pto DC3000
CsrA2 MLILTRRCAESLIIGDGEITVTVLGVKGNQ--VRIGVNAPKEVAVH---REEIYLRKKE--KDEEPSH----- 100%
CsrA3 MLILTRKVGESINIGD-EITVTILGVQGLQ--VRLGINAPKNVSVH---REEIYKRIQAE LAPNQDPQ----- 64%
CsrA1 MLVLTRDIGETFSIGD-DITVQILGVNNGQ--VRLGISAPKDIKVH---RAEVYKRIANKLSQQAQTQP----- 64%
CsrA4 MLCLTRRFGESIIIGN-DIKITVISGRDQ--IRLGDAPAGLAVD---RSEIRTA LANPRNGSERHVG----- 55%
CsrA5 MLLLTRREGENIVIGD-GIQIQVLSVSED TG DVRIQIEAPDVVEAQGRTAGNEVTDHKPGPVITHKRRWRSLVTQ 49%
** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

Figura R1. Alineamiento múltiple de las proteínas CsrA de Pto DC3000, otras *Pseudomonas* y *E. coli*.

A. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de CsrA1, CsrA2 y CsrA3 con sus ortólogos en cepas cuya funcionalidad ha sido estudiada (Huertas-Rosales *et al.*, 2016; Martínez-Granero *et al.*, 2012; Pessi *et al.*, 2001; Romeo *et al.*, 1993). A la izquierda se indica la cepa seguida del nombre de la proteína correspondiente. Eco: *E. coli*, Pae: *P. aeruginosa*, Ppu: *P. putida*, Pfl: *P. fluorescens*. B. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de los parálogos de CsrA en Pto DC3000. A la derecha se indica el porcentaje de identidad con respecto a CsrA2. Los residuos importantes para la unión a ARN (Mercante *et al.*, 2006; Schubert *et al.*, 2007) se señalan en rojo (aminoácido conservado o del mismo tipo) y azul (no conservado). Los residuos conservados se indican con un asterisco (\*).

Posteriormente, se evaluó la similitud entre los parálogos de Pto DC3000 mediante un alineamiento múltiple y el cálculo de la identidad a nivel de secuencia aminoacídica entre ellos (Figura R1B). Como CsrA2 es el parálogo más similar a la única copia de CsrA que portan las bacterias no pertenecientes al género *Pseudomonas*, se consideró la versión ancestral a partir de la que surgieron las demás variantes. CsrA3 y CsrA1 muestran un 64% de identidad con respecto a CsrA2, seguidos de CsrA4, con un 55%. CsrA5 es el más divergente, tanto a nivel de identidad (49%) como de tamaño, 74 aminoácidos frente a los 62-64 del resto de parálogos (Figura R1). Por otro lado, los residuos importantes para la unión a los ARN determinados en RsmE de *P. protegens* y CsrA de *E. coli* están totalmente conservados en CsrA2 y CsrA3 (Figura R1, color rojo), mientras que CsrA1, CsrA4 y CsrA5 presentan 1, 3 y 5 cambios, respectivamente, en algunos de estos aminoácidos (Figura R1, color azul). Esto es relevante debido a que cambios en los aminoácidos críticos para la unión podrían modificar la afinidad de unión de CsrA, tanto al ARNm como a los ARN *rsm*, llegando a abolirla por completo (Heeb *et al.*, 2006; Schubert *et al.*, 2007).

Tras comprobar que el número y la variabilidad de las proteínas CsrA en Pto DC3000 eran mayores que en la mayoría de las cepas caracterizadas hasta el momento, se planteó la cuestión de si se trataba de una situación excepcional o, por el contrario, esta diversidad estaba extendida y podría tener un significado evolutivo. Para evaluarlo, se seleccionaron cepas de *Pseudomonas* cuyo genoma estaba secuenciado por completo en la base de datos NCBI/genomes en noviembre de 2017 y se descargaron sus genomas. Se realizaron búsquedas en dichos genomas empleando el algoritmo BLASTp de todas las proteínas homólogas a las cinco proteínas CsrA de Pto DC3000 y RsmF de *P. aeruginosa*. Las variantes encontradas se asignaron al grupo con el que presentaban mayor homología y cuando el porcentaje de identidad era bajo, se clasificaron en el grupo Otros (Apéndice D).

Las cepas se clasificaron según los grupos filogenéticos propuestos por Mulet *et al.* (2010), separando el grupo monofilético *P. protegens* de *P. fluorescens* como proponen Ramette *et al.* (2011). Las cepas cuya especie no estaba determinada o cuyo grupo filogenético de pertenencia no se conocía fueron excluidas. Se calculó la frecuencia de aparición de las distintas variantes en cada uno de los grupos expresándola como porcentaje (Tabla R1). La proteína CsrA2/RsmA está presente en la totalidad de las cepas analizadas, lo cual era esperable al tratarse de la variante ancestral. CsrA3/RsmE está conservada dentro del linaje *P. fluorescens*, estando ausente solamente en algunas cepas. El parálogo CsrA1/RsmI aparece en todos los grupos del linaje *P. fluorescens* excepto en el grupo de *P. protegens* y está representada mayoritariamente en *P. syringae* y *P. putida*. En cuanto a CsrA4, aparece únicamente en 2 cepas de *P. syringae* (10% del grupo). La variante RsmF/RsmN la porta, exclusivamente, el 96% de las cepas del grupo de *P. aeruginosa*. Algunas de las proteínas se encuentran codificadas en plásmidos (Tabla R1, asterisco), como ocurre frecuentemente con CsrA5. Esta proteína está presente únicamente en cepas del grupo *P. syringae* y además es habitual encontrarla en multicopia, siendo especialmente llamativo el caso de *P. syringae* pv. *actinidiae* con hasta 4 copias. Finalmente, las proteínas englobadas en la categoría "Otros" están presentes en casi todos los grupos con un porcentaje menor del 35%. La diversificación de las proteínas CsrA parece ser, por tanto, un suceso extendido dentro del género *Pseudomonas*,

donde prácticamente todos los grupos presentan más de una variante. No obstante, hay que ser prudentes con las conclusiones obtenidas de este análisis dada la disparidad de los grupos analizados: por ejemplo, *P. aeruginosa* comprende casi el 40% de todas las cepas estudiadas, mientras que *P. syringae* está representada únicamente con 20 cepas.

Tabla R1. Presencia de las distintas variantes de CsrA en el género *Pseudomonas*<sup>a</sup>

Linaje	CsrA1	CsrA2	CsrA3	CsrA4	CsrA5	RsmF	Otros <sup>b</sup>
Linaje <i>P. fluorescens</i>							
Grupo <i>P. fluorescens</i>	78	100	100*				5*
Grupo <i>P. syringae</i>	100	100	100	10	58*		5
Grupo <i>P. putida</i>	97	100	97				26
Grupo <i>P. protegens</i>		100	100				
Linaje <i>P. aeruginosa</i>							
Grupo <i>P. aeruginosa</i>		100				96	34
Grupo <i>P. oleovorans</i>		100					14
Grupo <i>P. stutzeri</i>		100					

<sup>a</sup> Frecuencia (expresada en porcentaje) de cada variante de CsrA sobre el total de cepas englobadas en cada grupo filogenético. La agrupación de las cepas se realizó según la clasificación establecida en el género (Mulet *et al.*, 2010; Ramette *et al.*, 2011). Se debe mencionar que los grupos incluyen distinto número de cepas. Los asteriscos (\*) indican que algunas de las copias están codificadas en un plásmido.

<sup>b</sup> Incluye múltiples variantes de CsrA, distintas a las indicadas, que están presentes en algunos miembros del grupo.

La similitud entre las secuencias se evaluó mediante la construcción de un árbol filogenético por el método de *Neighbor-Joining* utilizando como grupo externo (*outgroup*) la proteína CsrA de *E. coli* (Apéndice E). La selección de secuencias a incluir se realizó de manera que estuviesen representadas todas las especies y, de las especies mayoritarias, se eligió una cantidad de cepas representativa del total intentando incluir todas las variantes de CsrA presentes. Las secuencias de CsrA2 se agrupan en dos *clusters* que corresponden a los dos linajes principales del género, *P. fluorescens* y *P. aeruginosa* y además, el nivel de similitud es enormemente elevado incluso con la cepa utilizada como grupo externo, siendo idénticas las proteínas del linaje *P. aeruginosa*. Las secuencias de CsrA3 se agruparon en tres *clusters* correspondientes a los grupos *P. fluorescens/protegens*, *P. syringae* y *P. putida*. En el caso de CsrA1, las secuencias también se agruparon coincidiendo con los tres grupos donde está presente. CsrA4, CsrA5 y RsmF forman *clusters* diferenciados del resto de proteínas CsrA.

## 2. Expresión *in vivo* de las proteínas CsrA en Pto DC3000

Los efectos observados por la delección o sobreexpresión de una proteína deben considerarse en el contexto de sus niveles fisiológicos en la célula. Así, los niveles de expresión del gen que la codifica pueden servir como indicador de la relevancia que tiene su producto en unas determinadas condiciones. Por tanto, se decidió comenzar el estudio de las proteínas CsrA con el análisis de su expresión en los medios que se utilizarían posteriormente para realizar la caracterización fenotípica de los mutantes y complementantes.

## 2.1. Niveles de los ARNm de *csrA1-5*

Con la intención de obtener valores absolutos de expresión para todos los genes *csrA* y comparar la expresión entre ellos en la cepa silvestre cultivada en distintos medios, se cuantificaron los niveles de sus transcritos mediante RT-qPCR. Para realizar una cuantificación en valores absolutos, se utilizó una recta patrón relacionando las Ct obtenidas con la cantidad de ADN cromosómico de partida utilizado en cada punto. Por extrapolación, se calculó la abundancia de los transcritos en unidades equivalentes a ng/μl. Es necesario mencionar que esta aproximación asume una eficiencia de transcripción reversa uniforme entre las muestras. Todas las muestras de ARN estaban diluidas en la misma solución, su pureza era semejante y se realizaron reacciones de síntesis de ADNc en condiciones idénticas, por tanto se estaría cumpliendo este principio. Posteriormente, se normalizaron los valores utilizando los ng/μl calculados para *gyrA*, el gen de referencia utilizado rutinariamente en los experimentos de RT-qPCR (Figura R2).

Los niveles más altos de expresión correspondieron a *csrA2*, *csrA3* y *csrA5*, siendo similares en medio MMF (Figura R2). En medio LB, *csrA3* es el que presenta mayores niveles de ARN y *csrA2* y *csrA5* tienen una expresión menor y similar entre ellos. Por otro lado, en condiciones de *swarming* la expresión de *csrA5* decae, mientras que la de *csrA2* y *csrA3* es similar y más elevada. Cabe destacar que los niveles de *csrA3* son los más elevados en todos los medios, aunque su variabilidad en medio LB y condiciones de *swarming* es alta. Es posible que este gen tenga una expresión constante y se modulen sus niveles de manera rápida y brusca, probablemente dependiendo del estado fisiológico de la célula. El gen cuya expresión varía más dependiendo del medio es *csrA5*. En cuanto a *csrA1* y *csrA4*, sus niveles de expresión son bajos e indetectables, respectivamente, en todas las condiciones ensayadas.

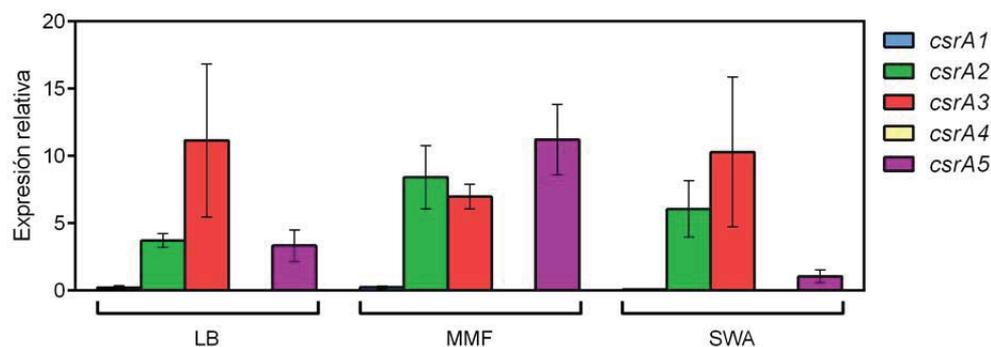


Figura R2. Expresión de los ARNm de *csrA1-5* en distintos medios.

Cuantificación de los niveles de *csrA1-5* en la cepa silvestre mediante RT-qPCR a partir de una curva patrón con ADN cromosómico. Se extrajo ARN total de cultivos crecidos a 28°C durante 3 días en placas de LB (LB) o a 20°C para cultivos de ensayos de auto-aglutinación (MMF) y ensayos de *swarming* (SWA). La gráfica muestra las medias de tres réplicas biológicas normalizadas utilizando el gen *housekeeping gyrA* y las barras de error representan la desviación típica.

Como los altos niveles de expresión de *csrA5* planteaban la duda de que la amplificación fuese inespecífica pero no se disponía del correspondiente mutante, se decidió determinar su expresión en los mutantes y

sobreexpresantes de *csrA2* y *csrA3* con respecto a la cepa silvestre (Figura R3). Se observó que los niveles de *csrA5* no descendieron en los mutantes, indicando que la amplificación obtenida es específica para este parólogo, pero sí lo hicieron en ambos complementantes, aunque únicamente la cepa *csrA3* (pBBR::*csrA3*) presenta diferencias significativas con respecto a la cepa silvestre.

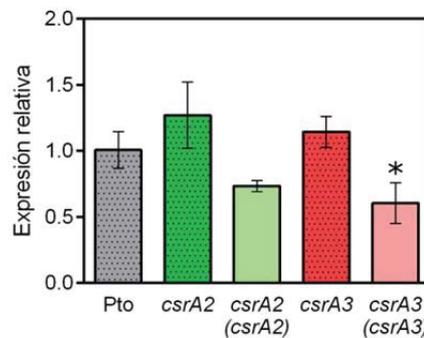


Figura R3. Niveles de expresión de *csrA5* en los mutantes *csrA2* y *csrA3*.

Las muestras de ARN total se obtuvieron de cultivos de las cepas con el plásmido pBBR1-MCS5 vacío (color oscuro punteado) o con pBBR::*csrA2* o pBBR::*csrA3* (color claro liso) crecidas a 28°C durante 3 días en placas de LB con tres réplicas biológicas independientes. La gráfica muestra la media de los resultados de RT-qPCR normalizados utilizando el gen *gyrA* y con respecto a la cepa silvestre y las barras de error se corresponden con la desviación típica. El asterisco señala la cepa que presenta diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) con respecto al silvestre según ANOVA.

La especificidad de amplificación por RT-qPCR de los transcritos de *csrA1*, *csrA2* y *csrA3* se corroboró en sus respectivos mutantes (Figura R4A) y la cuantificación de la alteración de los niveles de *csrA1-3* por su expresión en *trans* desde pBBR1-MCS5 se llevó a cabo estimando la expresión relativa de sus transcritos con respecto a la cepa silvestre (Figura R4). En condiciones de *swarming*, la expresión de *csrA1-3* desde el plásmido en sus correspondientes mutantes aumenta 14 veces los niveles de *csrA1*, 4 veces los de *csrA2* y 10 veces los de *csrA3*. Para estimar los niveles finales de cada uno de los transcritos en sus correspondientes complementantes, se multiplicaron los valores de expresión obtenidos previamente en la cepa silvestre por el número de veces que aumentaron en los complementantes (Figura R4B). De esta manera, el complementante *csrA3* fue la cepa que obtuvo unos valores más elevados (109,2 UR), por producirse un aumento notable a partir de unos niveles basales ya bastante elevados. En *csrA2* el aumento fue menor, con unos niveles basales semejantes a *csrA3* pero un incremento menor, llegando a un valor de 26,8 UR. El gen *csrA1* presentaba unos niveles basales muy bajos de expresión por lo que, a pesar de ser el que logra un mayor incremento con su expresión desde plásmido, alcanzaría solamente 1,4 UR finales. De esta manera, la sobreexpresión de *csrA1* desde pBBR1-MCS5 no consigue alcanzar niveles semejantes a los de *csrA2* o *csrA3*, por lo que podría no ser suficiente para causar efectos fenotípicos detectables. Se debe mencionar que estas afirmaciones se basan en los niveles de los transcritos de *csrA*, por lo que no tienen en cuenta las posibles diferencias en la traducción y/o vida media de las proteínas.

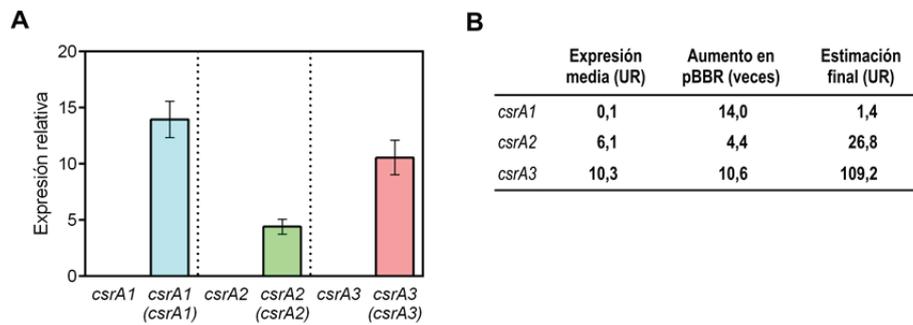


Figura R4. Aumento de los niveles de *csrA1-3* por su expresión en *trans*.

A. Expresión relativa de *csrA1*, *csrA2* y *csrA3* en sus respectivos mutantes y complementantes. Las muestras de ARN total se obtuvieron de cultivos de *swarming* con tres réplicas biológicas independientes. La gráfica muestra la media de los resultados de RT-qPCR normalizados utilizando el gen *gyrA* y con respecto a la cepa silvestre y las barras de error se corresponden con la desviación típica. B. Estimación de los niveles absolutos de expresión de los complementantes de *csrA1*, *csrA2* y *csrA3* con respecto a la cepa silvestre. La primera columna corresponde con los valores de expresión de cada gen en la cepa silvestre (Figura R2) en unidades relativas (UR), la segunda columna corresponde con el aumento de expresión mostrado por la sobreexpresión en cada uno de los mutantes (Figura R4A) y la tercera columna se obtuvo del producto de las anteriores.

## 2.2. Análisis de los promotores de *csrA*

Los estudios sobre regulación de las proteínas CsrA en *Pseudomonas* se han centrado fundamentalmente en su secuestro por los ARNnc *rsm*; sin embargo, sus niveles también dependen de su expresión génica. De hecho, la expresión del gen *csrA* de *E. coli* está sometida a una regulación muy compleja, pues se expresa desde 5 promotores diferentes dependientes de distintos factores  $\sigma$  ( $\sigma^{70}$  y  $\sigma^{38}$ /RpoS) y su ARNm contiene varias dianas de unión a CsrA (Yakhnin *et al.*, 2011). CsrA2 es su ortólogo en Pto DC3000 y los niveles de *csrA3* son elevados en esta cepa, por lo que ambos genes podrían presentar una regulación igualmente compleja.

La posible regulación de la expresión de los diferentes *csrA* se predijo mediante análisis *in silico* señalando las posibles secuencias de unión de reguladores conocidos y de CsrA en sus promotores. Además, se intentaron determinar sus puntos de inicio de la transcripción a partir de las secuencias de unión de factores  $\sigma$  predichas y de los patrones de lectura de RNA-seq. Para *csrA1*, *csrA2* y *csrA3*, también se determinaron los puntos de inicio de la transcripción experimentalmente utilizando la técnica de *primer extension*.

### 2.2.1. *csrA1*

El gen *csrA1* se encuentra en una región del cromosoma rodeado de genes que codifican proteínas de función desconocida por el momento. Las lecturas del RNA-seq en esa región mostraron unos niveles de expresión de *csrA1* bajos y, además, parecía que PSPTO\_1628 (proteína de membrana interna homóloga a YnfA de *E. coli*) y *csrA1* formaban parte del mismo ARNm (Figura R5A). Para determinar si se producía cotranscripción, se utilizó la técnica RT-PCR utilizando una pareja de oligonucleótidos que hibridan, uno en el interior de PSPTO\_1628 y otro en el de *csrA1*. Las muestras de ARN utilizadas habían sido extraídas de la cepa silvestre (muestra a evaluar) y del mutante *csrA1* (control negativo) en condiciones de *swarming*. Otros controles adicionales utilizados para la reacción de PCR fueron el ADN cromosómico de la cepa silvestre (positivo) y del mutante (negativo), así como los mismos ARN empleados sin la reacción de transcripción reversa (negativo). Además, se utilizaron oligonucleótidos

que hibridan en el interior del gen *csrA1* para detectar su expresión en las mismas muestras (Figura R5B). La expresión de *csrA1* se detectó en el control positivo, en el ADNc de la cepa silvestre y no en el mutante, mientras que los oligos que amplifican la región intergénica de PSPTO\_1628 y *csrA1* amplificaron en control positivo, la cepa silvestre y no en el mutante (Figura R5C). El desconocimiento de la función de PSPTO\_1628 limita la posibilidad de deducir el posible sentido biológico de la cotranscripción de estos dos genes y de asociar un papel a CsrA1. Se detectaron dos posibles regiones -10 de reconocimiento de  $\sigma^{70}$ : una por encima de PSPTO\_1628 y otra en la región intergénica PSPTO\_1628-*csrA1* (Figura R5B), esta última podría servir para iniciar la transcripción de *csrA1* independientemente de PSPTO\_1628. Sin embargo, en la *primer extension* se observaron productos de degradación de un ARN mayor (no mostrado), lo que sugiere que no se transcribe independientemente de PSPTO\_1628.

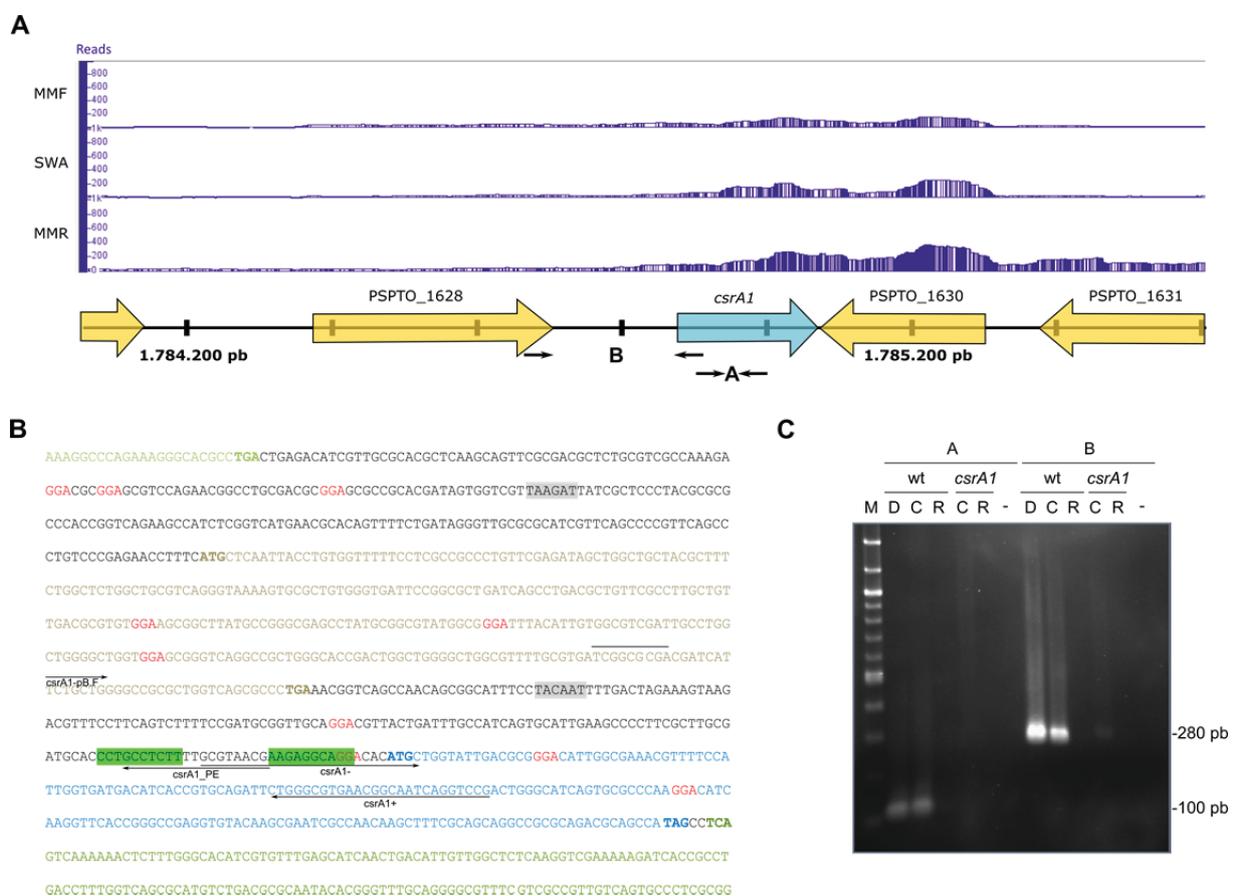


Figura R5. Expresión de *csrA1*.

A. Transcriptoma de Pto DC3000 en la región codificante para *csrA1* en distintos medios. En la parte inferior se representan los genes adyacentes con sus identificaciones y las coordenadas del cromosoma. B. Secuencia de ADN correspondiente al contexto genómico de *csrA1* (texto azul) y PSPTO\_1628 (texto marrón). Se detectaron dos posibles regiones -10 de reconocimiento de  $\sigma^{70}$  (gris) y se señalan todos los motivos GGA (texto rojo). En verde se marca una secuencia palindrómica que podría ser relevante para la estructura del ADN y/o del ARNm. C. Determinación de la expresión de *csrA1* (1) y de su co-transcripción con el gen PSPTO\_1628 (2) mediante RT-PCR. Se partió de muestras de ARN total de la cepa silvestre y del mutante *csrA1* obtenidas a partir de ensayos de *swarming*. Se muestran las amplificaciones del control positivo (ADN cromosómico de la cepa silvestre, D), del ADNc (C) de la cepa silvestre (wt) y *csrA1*, del ARN total (R) de la cepa silvestre (wt) y *csrA1*, y del control negativo (-, agua milliQ). La imagen corresponde a un gel de agarosa al 1,5% teñido con bromuro de etidio, donde se sometieron a electroforesis 10  $\mu$ l de cada una de las reacciones. Se utilizó como patrón el marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (NEB). A la derecha se indican los tamaños de los amplicones.

La ausencia de motivos GGA en la región 5'-UTR de PSPTO\_1628 podría sugerir que su expresión no está controlada por ningún CsrA. Sin embargo, la secuencia GGA que solapa con la SD de *csrA1* junto con la que se encuentra a +17 nt del ATG, podrían constituir un punto de regulación por CsrA al encontrarse a una distancia favorable para la unión cooperativa de dos monómeros (Mercante *et al.*, 2009). Además, se observa una secuencia palindrómica que podría ser relevante para la estructura del ADN y/o del ARNm.

### 2.2.2. *csrA2*

El contexto genómico de *csrA2* en Pto DC3000 incluye varios genes en la misma orientación: PSPTO\_1841 (treonina aldolasa), PSPTO\_1842 (alanil ARNt sintetasa) y PSPTO\_1843 (aspartato quinasa) en 5', y tRNA-Ser-1, tRNA-Arg-2 y tRNA-Arg-3 en 3' (Figura R6A y E), que sugieren una relación con el metabolismo de aminoácidos. Esta organización génica está muy conservada dentro del género *Pseudomonas*, aunque algunas cepas carecen de ciertos genes. Además, la secuencia aminoacídica de *csrA2* está enormemente conservada dentro del linaje *P. fluorescens* (sección 1 de este capítulo), por lo que se alinearon los promotores de varias de estas cepas, observándose una alternancia de regiones conservadas y no conservadas entre las que destaca el alto grado de homología entre todas las cepas cerca del inicio de la traducción (Apéndice F).

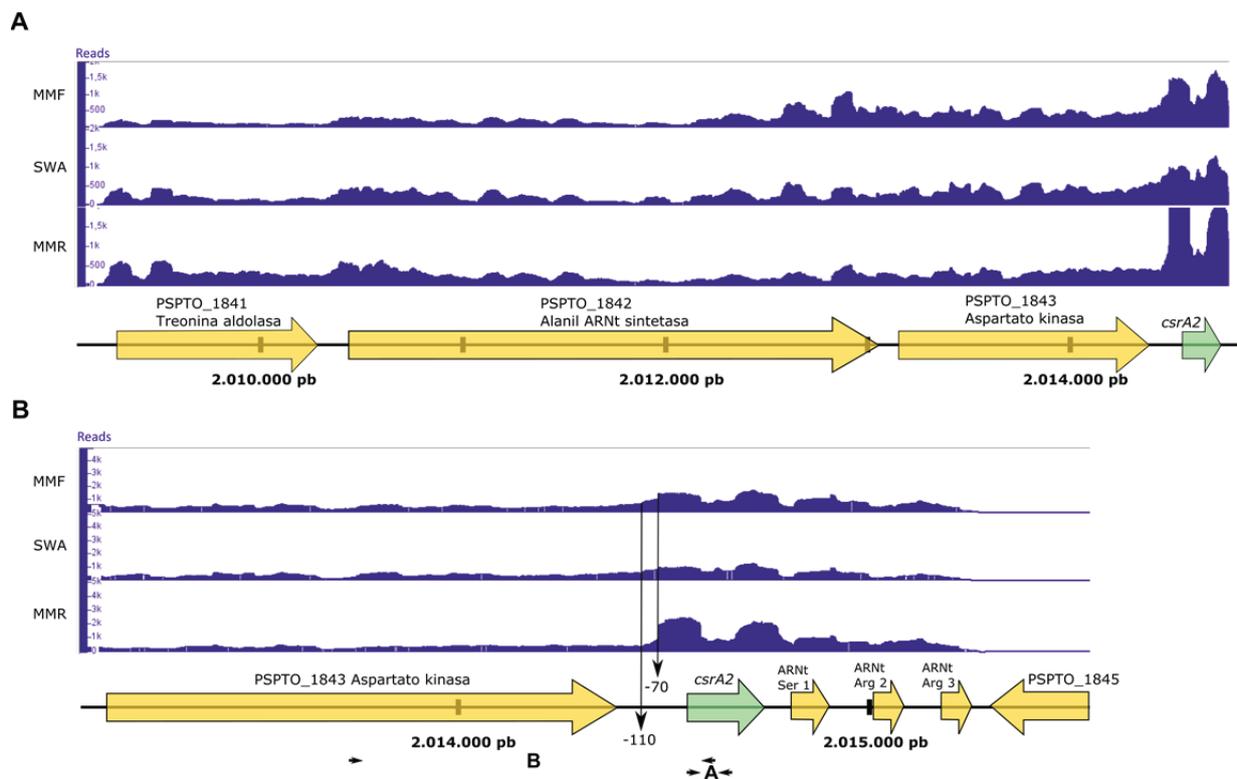


Figura R6. Transcriptoma de Pto DC3000 en la región adyacente a *csrA2*.

A. Detalle del transcriptoma de Pto DC3000 en distintos medios que abarca la región codificante de *csrA2* y los genes situados en 5' (PSPTO\_1841-1843). El patrón de expresión continuo entre los genes indica que podrían formar un parte del mismo transcrito. B. Detalle del transcriptoma de Pto DC3000 que abarca la región circundante a *csrA2*. Se señalan dos puntos de aumento de las lecturas y las regiones de hibridación de los oligonucleótidos utilizados para las reacciones A y B de RT-PCR (Figura R7A).

El patrón de expresión observado en los transcriptomas es continuo para los genes PSPTO\_1841-PSPTO\_1844 (*csrA2*), lo que indica que podrían formar parte de un mismo operón (Figura R6). Para determinar si PSPTO\_1843 y *csrA2* se cotranscriben se utilizó la técnica RT-qPCR, de forma similar a lo descrito para *csrA1*. Las muestras de ARN utilizadas provenían de la cepa silvestre y el mutante *csrA2* en condiciones de *swarming*. Se utilizaron como controles el ADN cromosómico de la cepa silvestre (positivo) y del mutante (negativo), así como los mismos ARN empleados (negativo). Además, se llevaron a cabo reacciones con un par de oligonucleótidos que hibridan dentro la ORF de *csrA2* para detectar su expresión. La amplificación de las muestras de ADNc pertenecientes a la cepa silvestre demuestra que *csrA2* se está expresando en esas condiciones y que, al menos parcialmente, se cotranscribe con PSPTO\_1843 (Figura R7A). En los controles negativos no se observa amplificación.

Sin embargo, los niveles de *csrA2* detectados son notablemente mayores que los del resto de genes del posible operón, indicando que podría presentar también algún promotor propio. Los resultados de *primer extension* revelan dos posibles puntos de inicio de transcripción (a -111 y a -82 pb del ATG, a 163 y 134 pb del punto de hibridación del oligonucleótido *csrA2i*, respectivamente), aunque se intuye también la presencia de bandas de mayor tamaño probablemente resultantes de la degradación de ARNm mayores producto de la cotranscripción con el gen situado en 5' mencionada anteriormente (Figura R7B). En los transcriptomas se observa un aumento de las lecturas a -70 pb del ATG (sobre todo en medio MMR) (Figura R6), lo que podría corresponder al ARNm transcrito desde -82 bp ligeramente degradado. Cerca de la posición -111 pb también se aprecia un ligero aumento de las lecturas en el transcriptoma, que podría ser o bien otro producto de degradación del ARNm largo o un inicio de la transcripción independiente. Posteriormente, se analizaron las secuencias situadas en 5' de los inicios de la transcripción determinados para *csrA2* con el objetivo intentar dilucidar que factores  $\sigma$  podrían estar implicados en su expresión (Figura R7C). Para inicio de la transcripción 1 fue imposible detectar un promotor porque la secuencia no es similar a ninguna de las propuestas para los factores  $\sigma$  de Pto DC3000 descrito, aunque podría tratarse de un promotor  $\sigma^{70}$  poco conservado. La alta similitud de secuencia con *P. syringae* CC1557 y *P. cichorii* en esa región sugiere que la expresión desde este punto está conservada en *Pseudomonas* fitopatógenas (Apéndice F). El inicio de transcripción 2 presenta un posible promotor  $\sigma^{38}$ /RpoS cuya secuencia de unión (CGATACA) es idéntica en *P. syringae* CC1557 y difiere de la determinada experimentalmente para *P. aeruginosa* (CAATACT), conservada en otras cepas del género, y *E. coli* (CTAAACT) (Apéndice F) (Stacey y Pritchett, 2016; Yakhnin *et al.*, 2011). En *P. aeruginosa* el promotor  $\sigma^{38}$ /RpoS solapa con un promotor AlgU, aunque es poco probable que ocurra algo semejante en Pto DC3000 debido a que la posible región -10 reconocida por AlgU (TCCAA) está muy poco conservada y la -35, ausente.

En cuanto a la posible regulación de *csrA2* por CsrA, destaca la ausencia de motivos GGA en la región situada en 5' del inicio de la traducción de *csrA2* (Figura R7C) y de los genes que posiblemente se transcriben con él (PSPTO\_1841-43, no mostrado), encontrándose únicamente el motivo contenido en la secuencia SD.

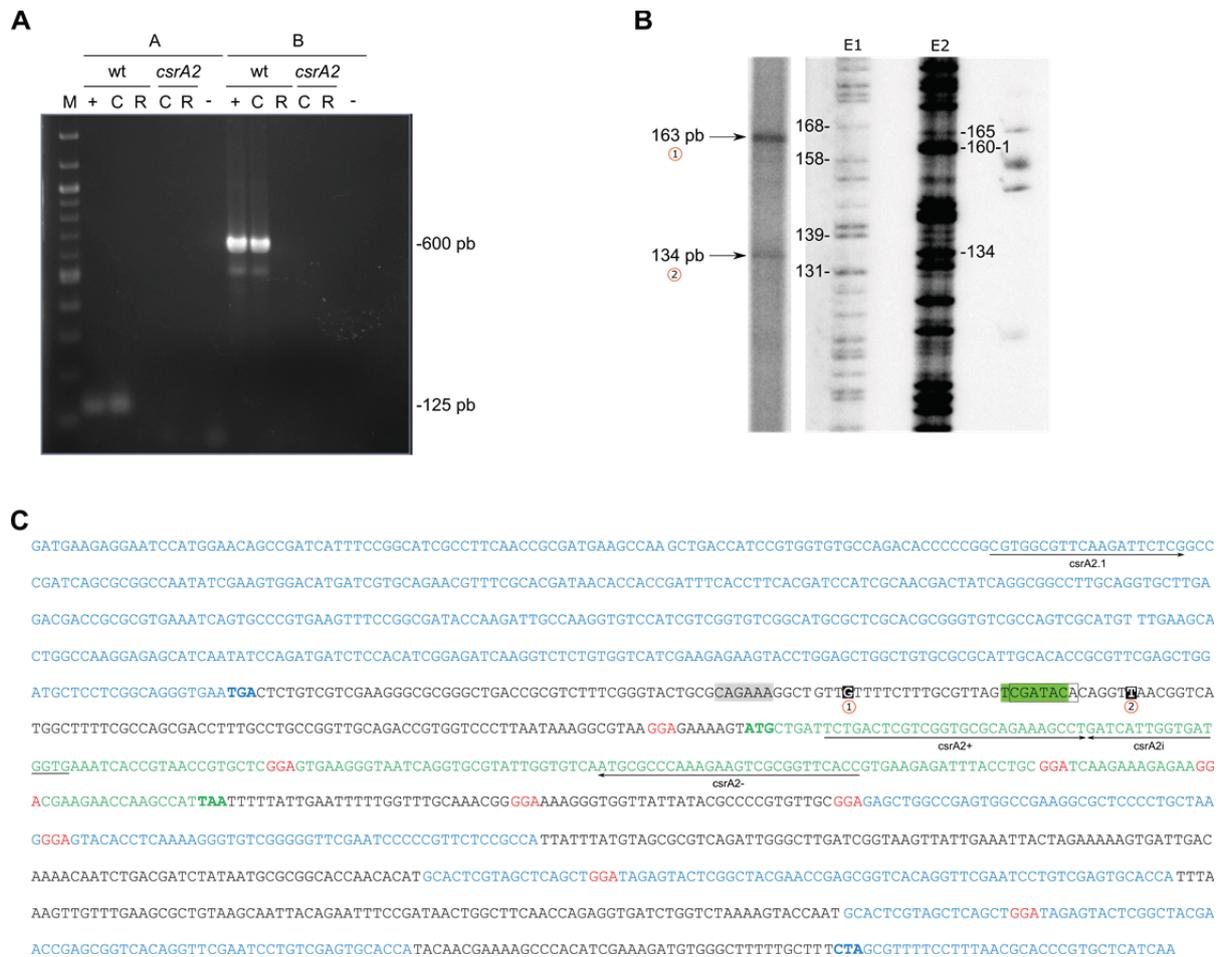


Figura R7. Expresión de *csrA2*.

A. Determinación de la expresión de *csrA2* (A) y de su cotranscripción con el gen PSPTO\_1843 (B) mediante RT-PCR. Se partió de muestras de ARN total de la cepa silvestre y del mutante *csrA2* obtenidas a partir de ensayos de *swarming*. Se muestran las amplificaciones del control positivo (ADN cromosómico de la cepa silvestre, D), del ADN complementario (C) de la cepa silvestre (wt) y *csrA2*, del ARN total (R) de la cepa silvestre (wt) y *csrA2*, y del control negativo (-, agua milliQ). La imagen corresponde a un gel de agarosa al 1,5% teñido con bromuro de etidio en el que se sometieron a electroforesis 10  $\mu$ l de cada reacción. Se utilizó como patrón el marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (NEB). A la derecha se indican los tamaños de los amplicones. B. Localización del inicio de la transcripción de *csrA2* mediante *primer extension* con el oligonucleótido *csrA2i*. En la primera calle se señala el tamaño de los productos obtenidos tras la reacción, estimado a partir de las reacciones de secuenciación situadas a la derecha (E1 y E2, Apéndice C). C. Secuencia de ADN correspondiente al contexto genómico de *csrA2* (texto verde). Se señalan dos posibles sitios de inicio de transcripción según los experimentos de *primer extension* (fondo negro), los motivos GGA (texto rojo) y los posibles promotores  $\sigma^{70}$  (fondo gris),  $\sigma^{38}$ /RpoS (recuadro negro) y AlgU (fondo verde).

### 2.2.3. *csrA3*

Posteriormente se analizó la región comprendida entre PSPTO\_3565 y PSPTO\_3567, que incluye *csrA3* (Figura R8A). En ella se pudieron predecir las posibles secuencias terminadoras de PSPTO\_3565 y *csrA3* por su localización y carácter palindrómico (Figura R8B). El patrón de lecturas observado por RNA-seq indica que el ARNm de *csrA3* presenta un tamaño considerable, donde las regiones no traducidas constituyen el 67% del transcrito, detectándose un aumento de las lecturas a -319 y -167 bp del ATG, lo que podría corresponder con puntos de inicio de la transcripción (Figura R8A). Los experimentos de *primer extension* detectaron dos posibles

puntos de inicio de la transcripción a -332 y -310 pb del ATG (a 167 y 146 pb del punto de hibridación del oligonucleótido *csrA3\_PE3*) (Figura R8C). El primero de ellos coincide con lo observado en el transcriptoma (Figura R8A) y con lo propuesto por Waite (2015), mientras que el aumento de las lecturas en -167 no pudo ser explicado por la presencia de un inicio de transcripción o región promotora asociados, por lo que podría corresponder a un producto de degradación. Para el inicio de transcripción 1 se puede predecir un promotor  $\sigma^{70}$  cuya secuencia está poco conservada y para el inicio de transcripción 2, un promotor  $\sigma^{38}$  (Figura R8C).

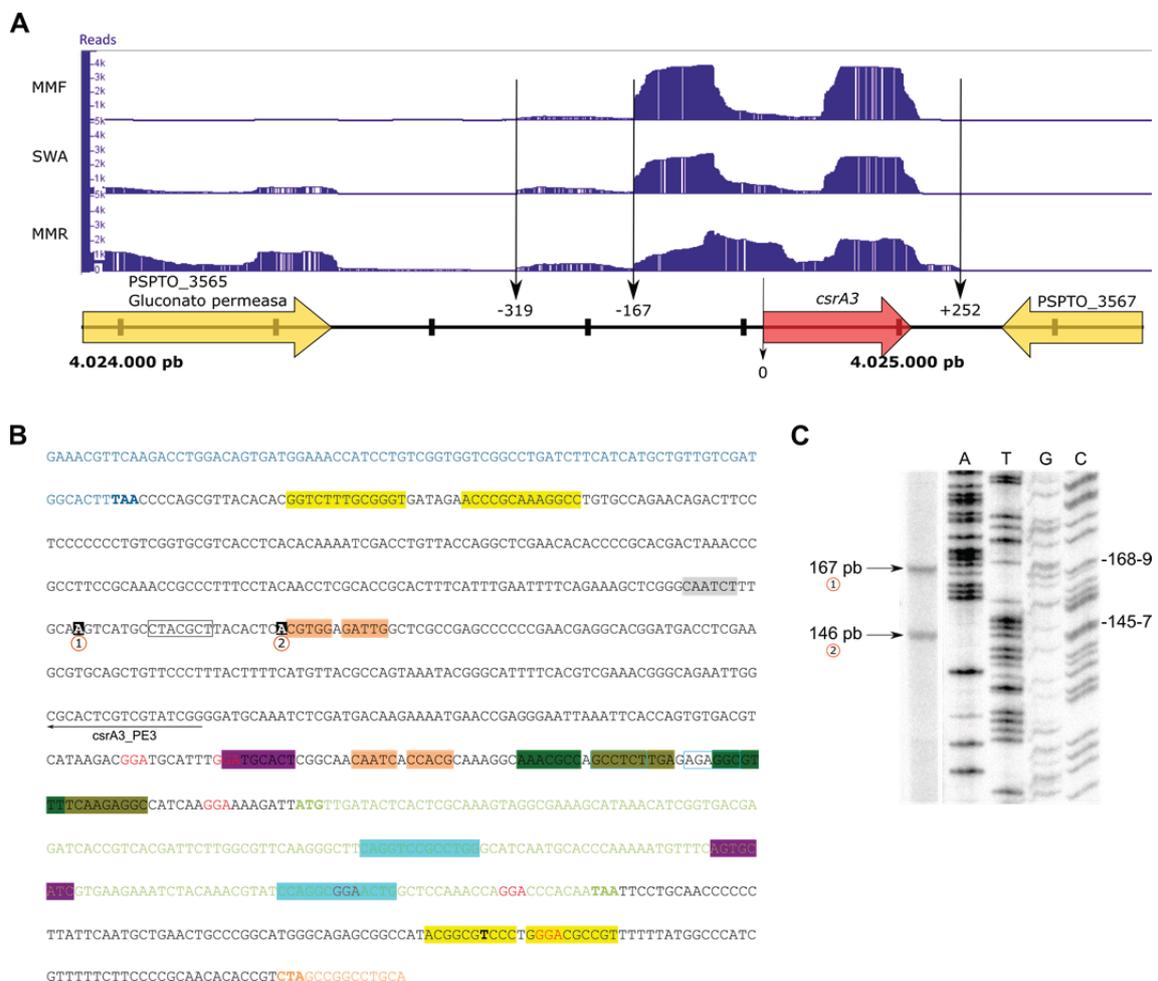


Figura R8. Expresión de *csrA3*.

A. Transcriptoma de Pto DC3000 en la región de *csrA3* en distintos medios y condiciones. Se señalan con flechas el punto de inicio de la traducción (0), dos posibles inicios de la transcripción (-167 y -319) y un posible punto de terminación (+252). En la parte inferior se representan los genes adyacentes con sus identificaciones y las coordenadas del cromosoma. B. Secuencia de ADN correspondiente al contexto genómico de *csrA3* (texto verde). Se señalan los posibles sitios de inicio de transcripción (fondo negro) y terminación (negrita), posibles motivos de unión de  $\sigma^{70}$  (fondo gris) y  $\sigma^{38}$  (recuadro negro), motivos GGA (texto rojo) y las secuencias predichas como terminadores de la transcripción (fondo amarillo). En otros colores y recuadros azules se señalan secuencias palindrómicas que podrían ser relevantes para la unión de otros reguladores o para la estructura del ADN/ARNm. C. Localización del inicio de la transcripción de *csrA3* mediante *primer extension* con el oligonucleótido *csrA3\_PE3*. En la primera calle se muestran los productos correspondientes al ADNc obtenidos tras la reacción y se indica la estimación de su tamaño obtenida a partir de las reacciones de secuenciación situadas a la derecha (ATGC, Apéndice C). Estos puntos y la región de hibridación del oligonucleótido empleado se señalan en la secuencia del apartado B de esta figura.

La secuencia determinada para el ARNm de *csrA3* destaca por la gran abundancia de regiones palindrómicas, lo que sugiere que podría estar altamente estructurado y sometido a regulación postranscripcional. Además, varias de esas secuencias son excluyentes, por lo que la temperatura o la unión de CsrA u otros reguladores podrían modificar la estructura del ARNm y, en consecuencia, su expresión. Además, los numerosos motivos GGA repartidos a lo largo de toda la secuencia sugieren que podría existir autorregulación, como ocurre en el caso de CsrA de *E. coli* (Yakhnin *et al.*, 2011).

#### 2.2.4. *csrA4*

El gen *csrA4* está contenido en una región del cromosoma que no se expresa en ninguna de las condiciones ensayadas (Figura R9). La región intergénica con el gen situado en 5' (PSPTO\_3942, una proteína hipotética) es corta (43 pb) y su ORF solapa parcialmente con la del gen situado en 3' (PSPTO\_3944, otra proteína hipotética). Además, la región que lo rodea contiene genes que codifican numerosas proteínas hipotéticas, proteínas truncadas, una proteína homóloga a las presentes en las colas de bacteriófagos (PSPTO\_3936) y una integrasa de bacteriófago (PSPTO\_3949). De hecho, la secuencia situada entre las posiciones 4.445.529 y 4.453.456 (PSPTO\_3932-PSPTO\_3941) del cromosoma está anotada en el genoma como un profago putativo o una región de profago defectiva. La nula expresión de este gen observada por RT-qPCR (sección 2.1 de este capítulo) y en transcriptómica (Figura R9) es coherente con su localización en una región crítica del cromosoma.

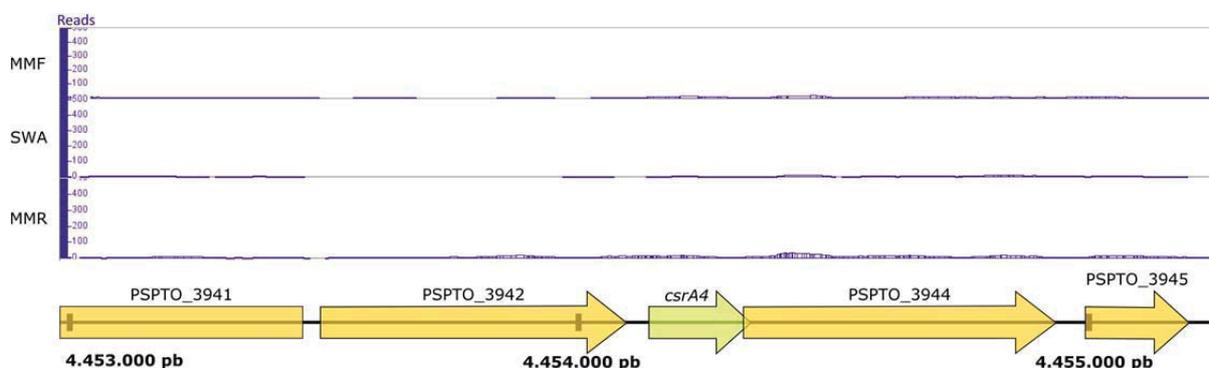


Figura R9. Expresión de *csrA4*.

Transcriptoma de Pto DC3000 en la región codificante para *csrA4* en distintos medios. En la parte inferior se representan los genes adyacentes con sus identificaciones y las coordenadas del cromosoma. Se pueden apreciar la escasa región intergénica entre PSPTO\_3942 y *csrA4* y el solapamiento de la ORF de *csrA4* con la del gen PSPTO\_3944.

#### 2.2.5. *csrA5*

En el caso de *csrA5*, los datos de transcriptómica permitieron verificar que se expresa y estimar un posible punto de inicio de la transcripción situado a -289 pb del ATG (Figura R10A). Además, el patrón de transcripción muestra la cotranscripción de *csrA5* con los genes situados en 3': PSPTO\_0853-0854. El análisis de la región promotora de *csrA5* permitió detectar una posible región -10 de unión de  $\sigma^{70}$  coherente con el inicio de la transcripción propuesto y varios motivos GGA, uno de los cuales solapa con la secuencia SD (Figura R10B).

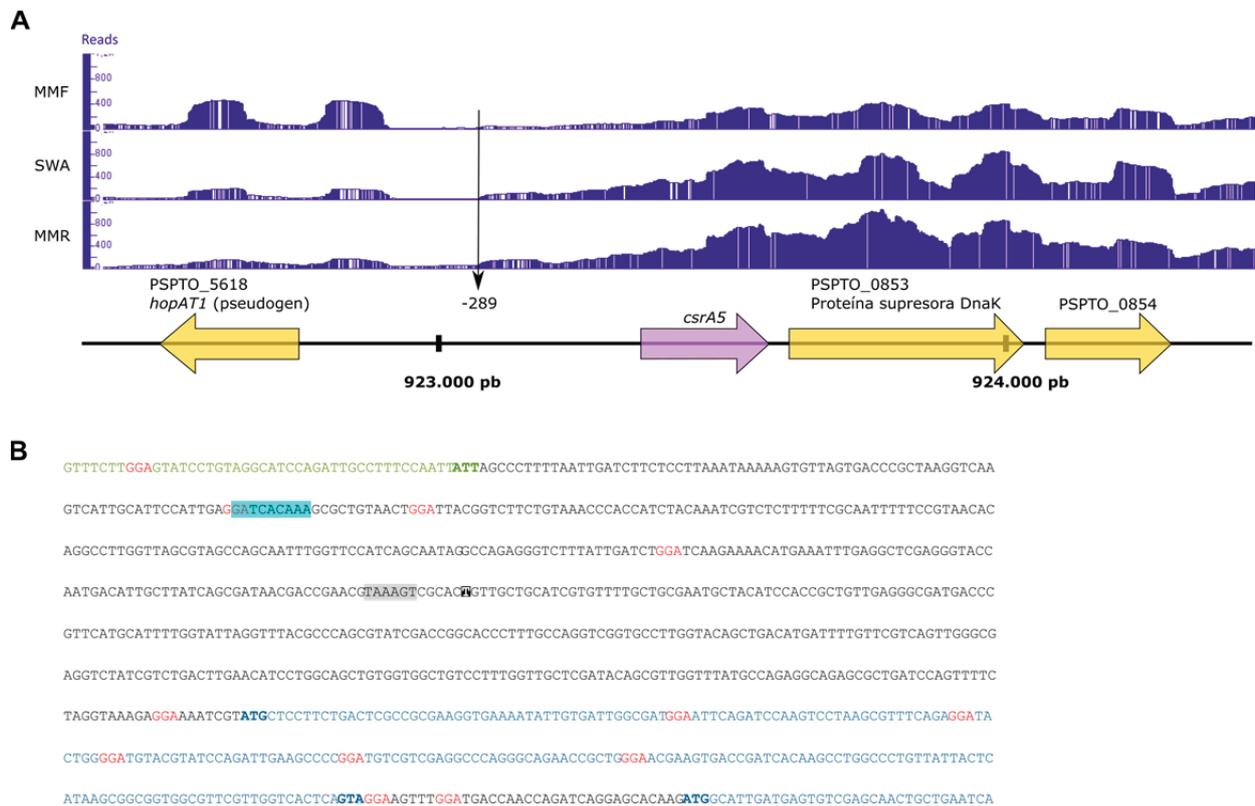


Figura R10. Expresión de *csrA5*.

A. Transcriptoma de Pto DC3000 en la región adyacente a *csrA5* en distintos medios y condiciones. En la parte inferior se representan los genes adyacentes con sus identificaciones y las coordenadas del cromosoma. La flecha indica un posible punto de inicio de la transcripción determinado a partir del perfil de lecturas situado a -289 pb del inicio de la traducción. B. Secuencia de ADN correspondiente al contexto genómico de *csrA5* (texto morado). Se detectaron una posible región -10 de  $\sigma^{70}$  (gris) varios y motivos GGA (texto rojo). El posible punto de iniciación de la transcripción está señalado con fondo negro.

En conjunto, los resultados obtenidos muestran una gran variabilidad entre los parálogos de *csrA* de Pto DC3000, tanto en sus niveles de expresión como en las secuencias de sus regiones promotoras. La expresión de *csrA1* es baja, llegando a ser casi indetectable por RT-qPCR. Los resultados de RNA-seq corroboraron la baja expresión y mostraron su cotranscripción con PSPTO\_1628, lo cual se demostró por RT-PCR, aunque no se descarta la existencia de algún promotor propio. En el caso de *csrA2*, se observa una expresión alta y también presenta cotranscripción con el gen situado en 5', así como promotores propios que se determinaron por *primer extension*. El gen *csrA3* presenta los niveles de expresión más altos en todas las condiciones ensayadas y se expresa independientemente de los genes situados en 5' y 3'. Su ARNm destaca por la longitud de sus regiones no traducidas, que constituyen el 69% del transcrito, lo que podría ser indicativo de una compleja regulación postranscripcional. La ausencia de expresión de *csrA4* observada por RT-qPCR y en los datos de RNA-seq en todas las condiciones, junto con el contexto genómico donde se encuentra, apuntan a que *csrA4* es un gen que ha perdido su promotor al copiarse o transferirse a la región crítica donde se encuentra. Con respecto a *csrA5*, los niveles de expresión determinados por RT-qPCR fueron dependientes de medio de cultivo llegando, en algunas condiciones, a ser semejantes a *csrA2* y *csrA3*, mientras que los transcriptomas mostraban una expresión menor. Este es el único caso donde los resultados de expresión obtenidos por RT-qPCR y RNA-seq no son concordantes.

Sí se debe mencionar que, en algunos casos, el tamaño de las regiones 5' y 3'-UTR determinado por *primer extension* o por análisis informático de la secuencia era mayor que el observado por RNA-seq, lo que probablemente indica que tuvo lugar un proceso de degradación del ARN durante la manipulación de esas muestras.

De los cinco genes que codifican proteínas CsrA en Pto DC3000, se ha demostrado que *csrA1* y *csrA2* forman parte de un operón con los genes situados en 5' y el patrón de expresión de RNA-seq de *csrA5* indica que este podría transcribirse junto a los dos genes en 3' del mismo. Esta característica no había sido descrita previamente ni estudiada en profundidad anteriormente, salvo en un estudio llevado a cabo en *Clostridium difficile* donde se había observado que *csrA* se localiza dentro del operón flagelar (Gu *et al.*, 2018). En cuanto a los factores  $\sigma$  implicados, los promotores que han podido ser determinados parecen depender de  $\sigma^{70}$  y/o  $\sigma^{38}$ , como se había descrito para CsrA de *E. coli* (Yakhnin *et al.*, 2011).

## Capítulo II. Estudio funcional de las proteínas CsrA en Pto DC3000

El estudio de la funcionalidad de las proteínas CsrA comenzó con el análisis del papel de CsrA1, CsrA2 y CsrA3 por diversos motivos: son las variantes más conservadas dentro del linaje *P. fluorescens* (Tabla R1), presentan menos cambios en los aminoácidos importantes para la unión a sus ARN diana (Figura R1) y tienen ortólogos funcionales descritos en la bibliografía (Vakulskas *et al.*, 2015).

Los mutantes de Pto DC3000 se construyeron por intercambio alélico con un plásmido suicida portador de una delección del gen generada por PCR solapante conservando la pauta de lectura (secciones 3.5 y 4.3.2 de materiales y métodos). El mutante *csrA2* fue construido durante este trabajo y el mutante *csrA3* fue construido por la Dra. J. Nogales en el laboratorio de la Dra. Gallegos, donde se ha desarrollado esta tesis doctoral. El mutante *csrA1* fue cedido por el Dr. C. Waite (Laboratorio del Prof. Martin Buck, Imperial College London) y contiene el gen *csrA1* delecionado y reemplazado por una cicatriz de 111 bp derivada del proceso de mutagénesis. La clonación de *csrA1*, *csrA2* y *csrA3* bajo el promotor *lac* del plásmido pBBR1-MCS5 permitió la sobreexpresión de los genes o la complementación de los correspondientes mutantes.

### 1. Crecimiento

Una vez obtenidos los mutantes, se realizaron curvas de crecimiento en los medios LB, MMR y MMF a 20 y 28°C. Curiosamente, las diferencias de crecimiento de la cepa silvestre entre 20 y 28°C son escasas, tanto en el tiempo de fase *lag* como en máximo de crecimiento (Figura R11A), probablemente debido a que en estos ensayos el volumen de cultivo es pequeño (200  $\mu$ l) y la carencia de oxígeno limita el crecimiento, haciendo que la influencia de la temperatura sea menor. En medio MMF, que simula el apoplasto vegetal, Pto DC3000 crece menos que en los otros medios, siendo mayor a 20°C que a 28°C (Figura R11A). Esto puede tener relación con que la infección se ve favorecida a bajas temperaturas (Hirano y Upper, 2000); en esas condiciones la bacteria induce la formación del T3SS y cambia su metabolismo para adaptarse a las fuentes de carbono presentes en la planta aprovechando mejor los nutrientes disponibles.

El crecimiento de los mutantes *csrA* fue similar al de la cepa silvestre en todas las condiciones excepto en MMF a 20°C (Figura R11A), donde el mutante *csrA3* muestra un retardo. Para estudiar más a fondo el efecto de *csrA* en estas condiciones, se ensayaron los mutantes y complementantes disponibles en ese momento. Tanto el mutante *csrA1* como su complementante muestran un patrón de crecimiento idéntico a la cepa silvestre (Figura R11B). Los mutantes *csrA2* y *csrA3* presentan un crecimiento ralentizado con respecto a la cepa silvestre y sus complementantes se multiplican más rápidamente, siendo las diferencias mayores para *csrA3* (Figura R11B). Estas diferencias no solo tienen lugar a nivel de tiempo requerido para alcanzar la fase *lag*, sino que también varía la densidad óptica alcanzada en fase estacionaria. Por tanto, CsrA1 no afecta al crecimiento en estas condiciones,

mientras que CsrA2 y CsrA3 favorecen el crecimiento, probablemente regulando diferencialmente la utilización de las distintas fuentes de carbono, como se ha descrito en otras cepas (Timmermans y Van Melderen, 2009).

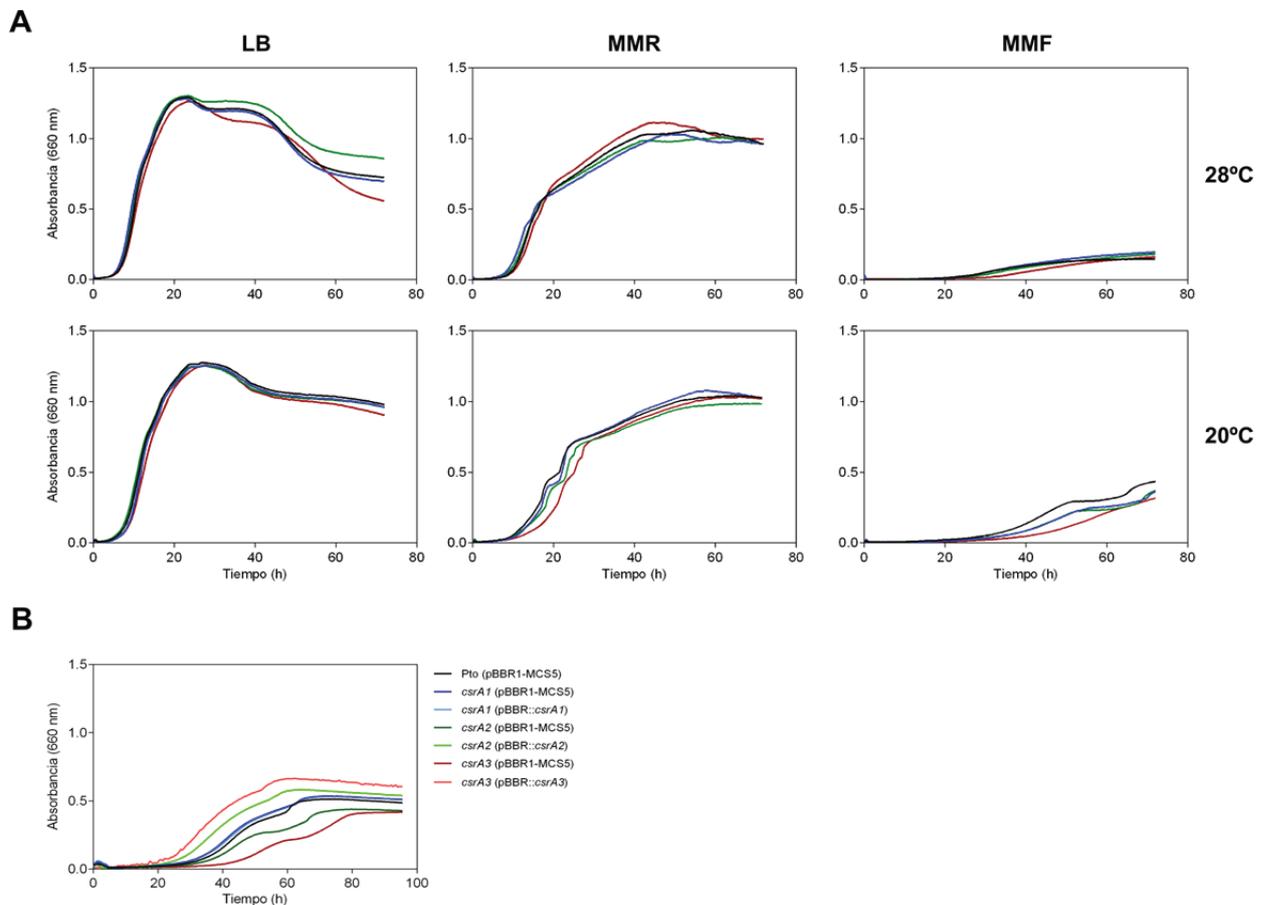


Figura R11. CsrA2 y CsrA3 estimulan el crecimiento en medio MMF a 20°C.

A. Curvas de crecimiento de Pto, *csrA1*, *csrA2* y *csrA3* en los medios de cultivo LB, MMR y MMF a 20°C y 28°C. Los cultivos se inocularon a  $DO_{660}=0,01$  y se incubaron durante 72 h en condiciones de agitación, midiendo la absorbancia a 660 nm cada 30 min en un Bioscreen C. Se eligió un experimento representativo de entre tres réplicas biológicas independientes. B. Curvas de crecimiento de Pto (pBBR1-MCS5), los mutantes *csrA1* (pBBR1-MCS5), *csrA2* (pBBR1-MCS5) y *csrA3* (pBBR1-MCS5) y sus complementantes [*csrA1* (pBBR::*csrA1*), *csrA2* (pBBR::*csrA2*) y *csrA3* (pBBR::*csrA3*)] en medio MMF a 20°C. Los cultivos se inocularon a  $DO_{660}=0,01$  y se incubaron durante 96 h en condiciones de agitación, midiendo la absorbancia a 660 nm cada 30 min en un Bioscreen C. Se eligió un experimento representativo de entre tres réplicas biológicas independientes.

## 2. Producción de alginato

El fenotipo más evidente mostrado por el mutante *csrA3* fue su aspecto mucoso cuando se incubaba a 28°C en placas de medio LB. Las cepas de *P. aeruginosa* que hiperproducen alginato presentan una mucosidad característica, por lo que se pensó que este EPS podría ser el responsable del fenotipo observado. Para comprobar esa hipótesis, se cuantificaron en primer lugar los niveles de alginato usando el método colorimétrico del carbazol para medir ácidos urónicos. Como se esperaba, el mutante *csrA3* presentaba una producción de alginato mayor que la cepa silvestre, mientras que *csrA1* y *csrA2* mostraban unos niveles similares a la misma (Figura R12A). Utilizando las mismas placas de cultivo, se tomaron muestras para la extracción de ARN y se evaluó por RT-qPCR la expresión génica de *algD*, el primer gen del operón de biosíntesis del alginato. Los niveles de ARNm de *algD* se vieron incrementados en el mutante y disminuidos en el complementante de *csrA3* (Figura R12B), indicando de nuevo que CsrA3 tenía un papel represor.

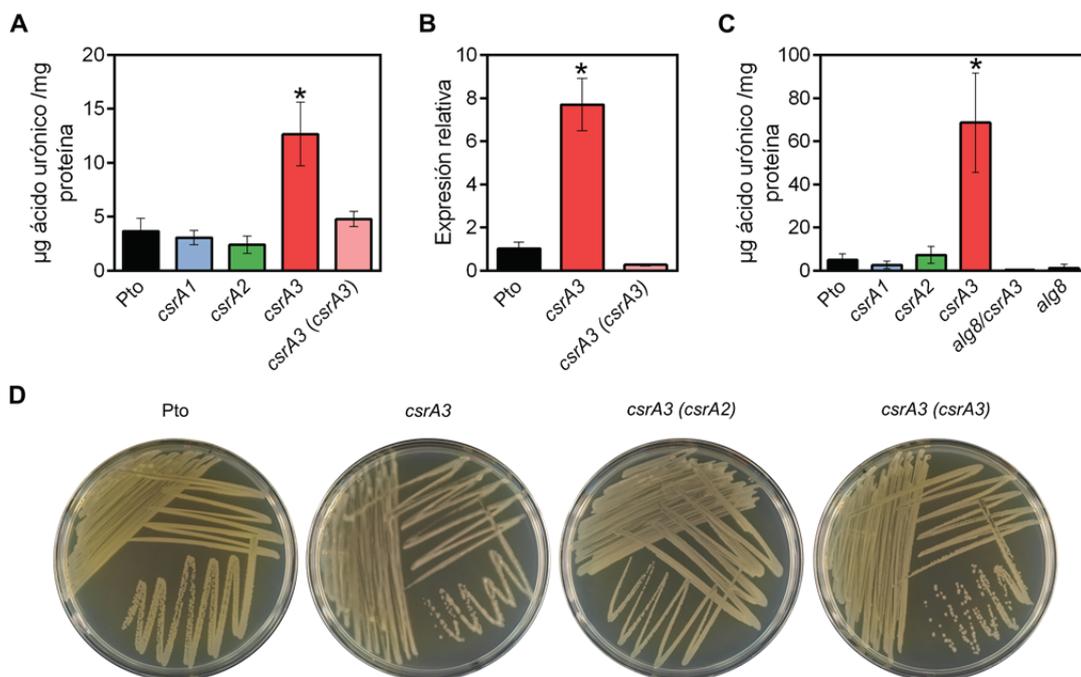


Figura R12. CsrA3 inhibe la producción de alginato.

A. Cuantificación de la producción de ácidos urónicos en los mutantes *csrA1*, *csrA2* y *csrA3* y la cepa *csrA3* complementada, crecidos en placas de medio LB durante 72 h a 28°C. Los valores representados son las medias de cuatro réplicas y las barras de error corresponden a la desviación estándar. B. Análisis del efecto de *csrA3* sobre los niveles de ARNm de *algD* utilizando RT-qPCR. Se obtuvo ARN total de células crecidas en placas de LB durante 3 días a 28°C. Los valores de expresión se normalizaron utilizando el gen *gyrA* y se refirieron a la cepa silvestre. C. Cuantificación de ácidos urónicos en los mutantes *csrA1*, *csrA2* y *csrA3* crecidos en placas de medio MMR durante 72 h a 20°C. Se utilizaron como control negativo los mutantes no productores de alginato *alg8* y *alg8/csrA3*. Los valores representados corresponden a las medias de cuatro réplicas y las barras de error, a la desviación estándar. D. Producción de alginato en la cepa silvestre con pBBR1-MCS5 (Pto) y el mutante *csrA3* con pBBR (*csrA3*), pBBR::*csrA2* [*csrA3* (*csrA2*)] o pBBR::*csrA3* [*csrA3* (*csrA3*)]. Las placas de medio LB se incubaron durante 48 h a 28°C y se fotografiaron. El alginato se aprecia debido a la mucosidad y color blanquecino de las colonias que lo producen.

La producción de alginato en Pto DC3000 es mucho menor que en otras cepas de *Pseudomonas*, independientemente de la temperatura y el medio de cultivo, por lo que su detección es difícil en algunas situaciones (Pérez-Mendoza *et al.*, 2014). La producción óptima de alginato en la cepa silvestre tiene lugar en placas de medio mínimo MMR crecidas durante 72 h a 20°C (Pérez-Mendoza *et al.*, 2014). Por tanto, se repitieron las mediciones de alginato en estas condiciones utilizando como control un mutante deficiente en producción de alginato (*alg8*, glicosiltransferasa) (Figura R12C). La tendencia de los resultados obtenidos fue similar a la observada en medio LB, aunque la producción del mutante *csrA3* sufrió un incremento mayor que el resto de cepas. Además, la mutación de *alg8* en un fondo mutante *csrA3* abolió totalmente la producción de alginato y el fenotipo mucoso, confirmando una vez más la identidad de este EPS.

Con el objetivo de evaluar si la regulación del alginato era una característica exclusiva de CsrA3, se procedió a la expresión de *csrA1* y *csrA2* desde un plásmido en el mutante *csrA3* utilizando la cepa complementante como control. Las colonias del mutante *csrA3* difieren de la cepa silvestre en su mucosidad y color blanquecino, características que revierten al fenotipo silvestre con la complementación (Figura R12D). La sobreexpresión de *csrA1* no tuvo ningún efecto (no mostrado), mientras que CsrA2 consiguió revertir parcialmente el fenotipo del mutante *csrA3* pero sin lograr tener la apariencia de la cepa silvestre o el complementante de *csrA3* (Figura R12D). Por tanto, los resultados observados podrían deberse a que CsrA3 sea la proteína CsrA mayoritaria en la célula en esas condiciones, que CsrA2 presente una afinidad menor por los genes diana responsables de la síntesis de alginato, o ambas posibilidades.

La biosíntesis de alginato está muy bien estudiada en *P. aeruginosa* donde destaca la compleja regulación ejercida a nivel transcripcional sobre *algD*, que codifica una GDP-manosa deshidrogenasa y es el primer gen del operón *algD-alg8-alg44-algKEGXLIJFA* (Hay *et al.*, 2014). El alineamiento de las secuencias nucleotídicas de *algD* de Pto DC3000 y *P. aeruginosa* revela una gran similitud en la parte codificante (78% de identidad) pero gran divergencia en la región promotora (48% de identidad), indicando que deben existir diferencias en la regulación de este operón entre las dos cepas, como ya habían mencionado Fakhr *et al.* (1999). En *P. syringae* pv. *syringae* y *Azotobacter vinelandii*, y a diferencia de *P. aeruginosa*, AlgR no es necesario para la transcripción de *algD* (Fakhr *et al.* (1999). El promotor de *algD* en Pto DC3000 presenta un 80% de identidad con el de *P. syringae* pv. *syringae*, por lo que se espera que AlgR tampoco sea necesario para su transcripción. El análisis de la región promotora de *algD* en Pto DC3000 detectó posibles sitios de unión del regulador transcripcional AmrZ y del factor  $\sigma$  ECF AlgU (Figura R13A). La secuencia de unión de este último permitió predecir un posible inicio de la transcripción situado a -471 pb del ATG. Los datos de transcriptómica confirmaron que la expresión de *algD* es mayor en medio MMR a 20°C y en presencia de altos niveles intracelulares de c-di-GMP (cepa con *pleD\**) (Figura R13B), en concordancia con lo observado previamente (Pérez-Mendoza *et al.*, 2014; Prada-Ramírez *et al.*, 2016). Además, las lecturas del ARNm de este gen empiezan a detectarse en la posición -458, cercana al punto de inicio de la transcripción propuesto, lo que podría indicar que el transcrito ha sufrido degradación o algún tipo de procesamiento en su extremo 5'.



CsrA3 puede ejercer su efecto represor directamente sobre la expresión de los genes que codifican la maquinaria biosintética o indirectamente a través de alguno de los reguladores que la controlan. En primer lugar, se evaluó la posibilidad de que la regulación de *algD* por CsrA fuese directa realizando una búsqueda de secuencias GGA en su región 5'-UTR. En *A. vinelandii* se había demostrado la unión de RsmA a un motivo GGA situado cerca del inicio de la traducción de *algD* (Manzo *et al.*, 2011), si bien la sonda utilizada fue corta y no formaba estructuras secundarias (Figura R13E). Pto DC3000 no presenta homología en esa región, aunque también porta una secuencia GGA en la SD (Figura R13C), que estaría situada en el ARNm entre dos bucles (Figura R13D) según las predicciones informáticas. Dicha estructura no se corresponde con las dianas de alta afinidad descritas para CsrA, por lo que es difícil predecir de forma fiable la existencia de regulación en ese punto.

A continuación, se estudió la posibilidad de que la regulación por CsrA3 tuviera lugar a través de AmrZ o AlgU, para lo que se cuantificaron los niveles de sus transcritos en el mutante *csrA3* con respecto a la cepa silvestre por RT-qPCR. CsrA es un regulador postranscripcional, pero su efecto represor sobre la traducción puede provocar un descenso en la transcripción y/o una disminución de la vida media del ARNm (Vakulskas *et al.*, 2015). Los niveles de *amrZ* y *algU* no estaban significativamente alterados en ninguno de los mutantes *csrA* ensayados (Figura R14A y B), pero estos experimentos se realizaron en condiciones de *swarming*, por lo que es posible que los bajos niveles de expresión en estas condiciones enmascaren el efecto de CsrA. En el caso de *amrZ*, su región promotora carece de motivos GGA, por lo que se descartó como posible diana de CsrA (Figura R14E), pero *algU* está regulado directamente por RsmA en *P. aeruginosa* mediante su unión a un motivo GGA de la secuencia SD (Kulkarni *et al.*, 2014). En Pto DC3000 dicho motivo está conservado, junto con otras dos posibles secuencias de unión situadas en 3' del ATG (Figura R14E), y el algoritmo de predicción de dianas de CsrA propuesto por estos mismos autores detecta esas tres secuencias como puntos de unión con alta afinidad (Apéndice G). Por tanto, para estudiar si CsrA regulaba postranscripcionalmente la expresión de *algU* en Pto DC3000, se realizaron fusiones (transcripcional y traduccional) de su promotor al gen '*lacZ*'. La actividad  $\beta$ -galactosidasa aumentó significativamente en el mutante *csrA3* con respecto al resto de cepas ensayadas (Figura R14C) y se observa un efecto tanto a nivel transcripcional como traduccional, lo que indica que CsrA3 reprime la expresión de *algU* en condiciones de *swarming*.

Dada la abundancia de componentes estructurales y reguladores implicados en la biosíntesis de alginato, es posible que existan otros puntos de regulación por CsrA. De hecho, el algoritmo de Kulkarni *et al.* (2014) detecta *algQ* como posible diana de CsrA, con 3 secuencias de unión con alta afinidad y una de baja afinidad (Figura R14E y Apéndice G). Este regulador transcripcional putativo promueve indirectamente la biosíntesis de alginato en *P. aeruginosa* mediante el secuestro del factor  $\sigma$  RpoD, dejando la ARN polimerasa libre para su unión a AlgU (Hay *et al.*, 2014), aunque en Pto DC3000 su función no se ha estudiado todavía.

Los resultados obtenidos muestran que la hiperproducción de alginato en el mutante *csrA3* es debida, al menos, a la ausencia de represión (directa, indirecta o ambas) sobre los genes *algD* y *algU*. Además, este fenotipo no se manifiesta en todas las condiciones, lo que indica que existen otras rutas de regulación implicadas.

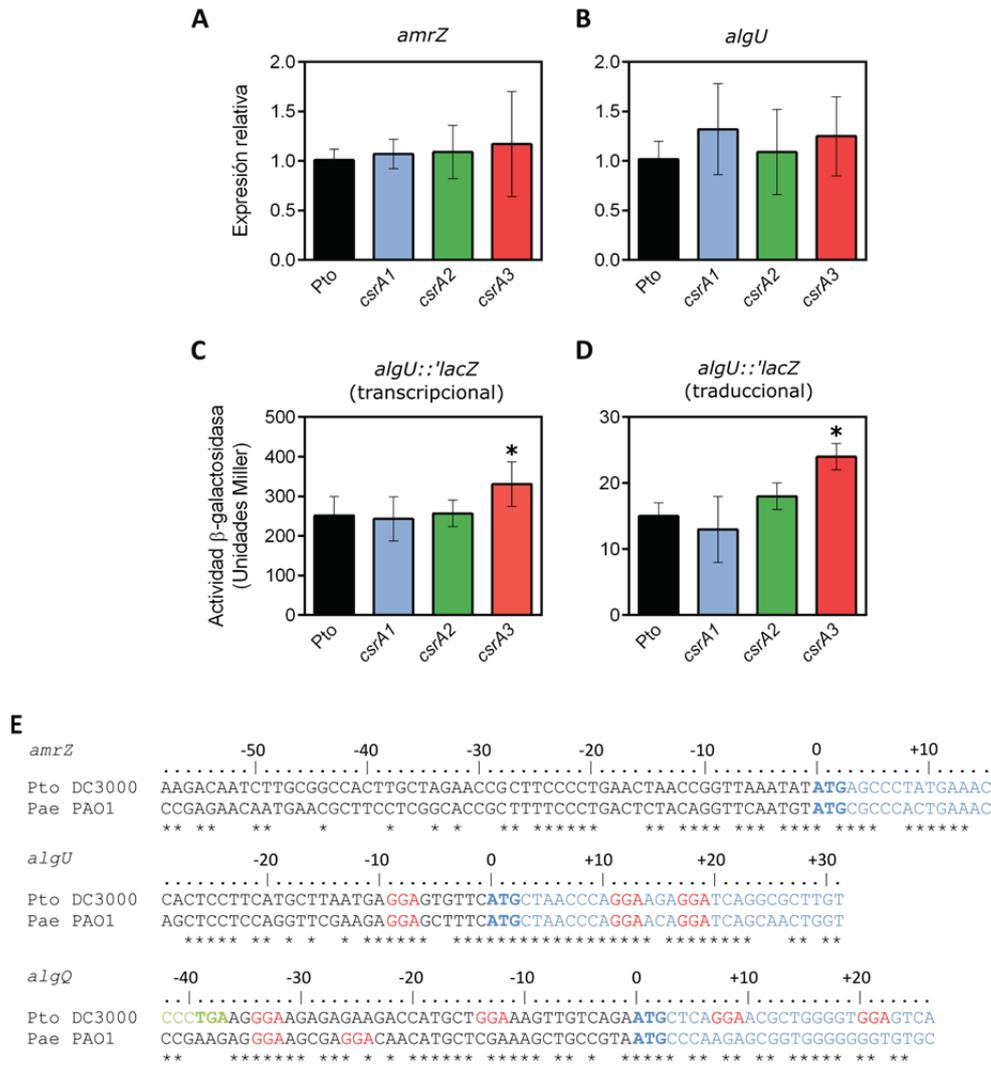


Figura R14. CsrA3 regula la expresión de AlgU.

A y B. Análisis del efecto de la mutación en *csrA1*, *csrA2* y *csrA3* sobre los niveles de *amrZ* (A) y *algU* (B) utilizando RT-qPCR. Se obtuvo ARN total de placas de *swarming* incubadas durante 24 h a 20°C. Los valores de expresión se normalizaron utilizando el gen *gyrA* y se refirieron a la cepa silvestre. Los valores corresponden a las medias de tres réplicas y las barras de error corresponden a la desviación estándar. Ninguna cepa presenta diferencias significativas según el análisis de varianza de un factor. C y D. Actividad del promotor de *algU* en la cepa silvestre y en los mutantes en *csrA1*, *csrA2* y *csrA3* en condiciones de *swarming* determinada midiendo la actividad β-galactosidasa de fusiones transcripcional (C) y traduccional (D) al gen '*lacZ*'. Los valores corresponden a las medias de tres réplicas y las barras de error a la desviación estándar. El asterisco señala la cepa que presenta diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) según el análisis de varianza de un factor. E. Alineamiento de la región adyacente al inicio de traducción en los genes *amrZ*, *algU* y *algQ* de Pto DC3000 comparándola con la correspondiente de *P. aeruginosa*. Se señalan en texto rojo los motivos GGA.

### 3. Motilidad

Dado que la ruta Gac-rsm regula la motilidad en Pto DC3000 (Chatterjee *et al.*, 2003; Vargas *et al.*, 2013) y otras cepas de *Pseudomonas* (Burrowes *et al.*, 2006; Heurlier *et al.*, 2004; Kay *et al.*, 2005; Martínez-Granero *et al.*, 2012; Navazo *et al.*, 2009), se realizaron ensayos de motilidad tipo *swimming* y *swarming* con los mutantes *gacA* y *csrA* para establecer si las proteínas CsrA contribuían a esos fenotipos.

La motilidad *swimming* de los tres mutantes *csrA* (*csrA1*, *csrA2* y *csrA3*) fue similar a la de la cepa silvestre, pero claramente distinta a la del mutante *gacA* (Figura R15A). Sin embargo, la sobreexpresión de *csrA2* y *csrA3* en sus respectivos mutantes redujo ligeramente este movimiento, mientras que la sobreexpresión de *csrA1* no tuvo un efecto apreciable (Figura R15A). Respecto a la motilidad tipo *swarming*, el comportamiento fue diferente entre los mutantes *csrA*: tanto el mutante *csrA1* como su complementante presentaron un fenotipo idéntico a la cepa silvestre, pero el movimiento en superficie de *csrA2* y *csrA3* fue significativamente mayor que el de la cepa parental, siendo *csrA3* el más rápido (Figura R15B). Por el contrario, las células del mutante *gacA* permanecieron en el sitio de inoculación. Este efecto negativo de CsrA2 y CsrA3 en la motilidad tipo *swarming* se confirmó mediante la sobreexpresión de los alelos correspondientes en un plásmido, que inhibió el *swarming* en diferente grado siendo en ambos casos menor que el de la cepa silvestre (Figura R15B).

La motilidad *swarming* se vio drásticamente afectada por las variaciones en los niveles intracelulares de CsrA2 y CsrA3, por lo que se decidió utilizar este ensayo para evaluar la funcionalidad de CsrA4 y CsrA5. Los genes *csrA4* y *csrA5* se clonaron en el vector de amplio rango de hospedador pBBR1-MCS5 bajo un promotor *P<sub>lac</sub>* con el objetivo de sobreexpresarlos. El aumento de sus niveles en la cepa silvestre causó un descenso significativo de la motilidad tipo *swarming*, menor que el observado previamente en los complementantes de *csrA2* y *csrA3* (Figura R16A y B). Estos resultados sugieren que tanto CsrA4 como CsrA5 serían funcionales en el caso de que se estuvieran expresando en Pto DC3000.

La motilidad *swarming* depende de la actividad flagelar y de la presencia de biosurfactantes (Nogales *et al.*, 2015). Tras haber observado la inhibición del *swarming* por parte de varias proteínas CsrA, se decidió determinar si su regulación se produce a nivel de la biosíntesis y/o la actividad flagelar, de la producción de biosurfactantes o de ambas funciones. Para ello, se realizaron experimentos que permitieron determinar estas características de manera independiente.

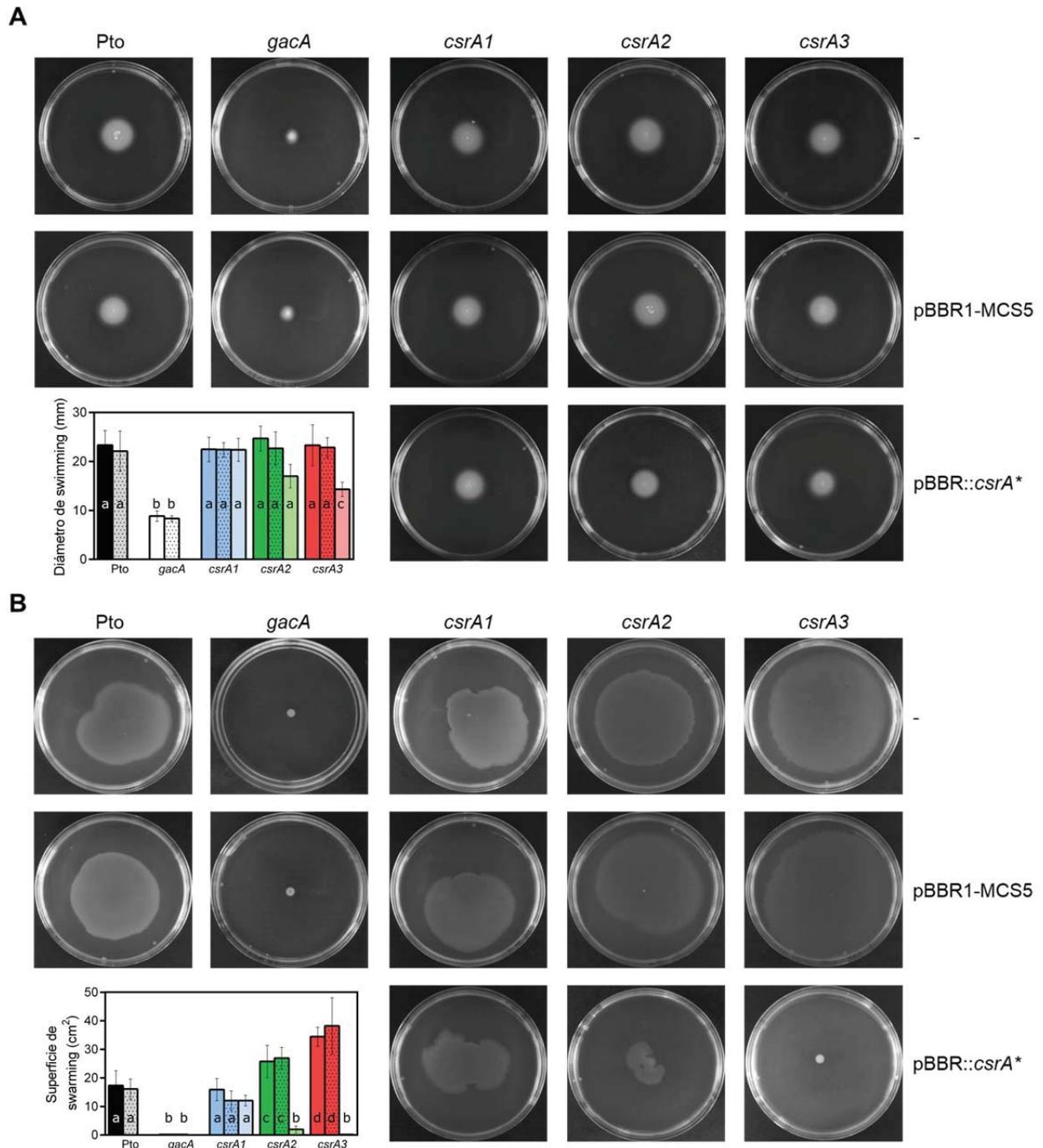


Figura R15. CsrA2 y CsrA3 inhiben la motilidad *swimming* y *swarming*.

A. Ensayos de *swimming*. 2  $\mu$ l de una suspensión bacteriana a  $DO_{660}=2,0$  de las cepas indicadas se pincharon en el centro de las placas de LB (0,3% agar) y se incubaron durante 48 horas a 20°C. La gráfica muestra los diámetros promedio de los halos producidos por las cepas sin plásmido (color oscuro liso), con pBBR1-MCS5 (color oscuro punteado) y complementadas con *csrA1*, *csrA2* o *csrA3* (color claro liso). Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres réplicas biológicas y las letras a-c representan las categorías con diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) establecidas por ANOVA de un factor. B. Ensayos de *swarming*. 2  $\mu$ l de una suspensión bacteriana a  $DO_{660}=2,0$  de las cepas indicadas se depositaron sobre la superficie de placas de con medio PAG (0,5% agar) y se incubaron durante 24 h a 20°C. La gráfica representa las medias de los diámetros de las cepas sin plásmido (color oscuro liso), con pBBR1-MCS5 (color oscuro punteado) y complementadas con *csrA1*, *csrA2* o *csrA3* (color claro liso). Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres réplicas biológicas y las letras a-d representan las categorías con diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) establecidas por ANOVA de un factor.

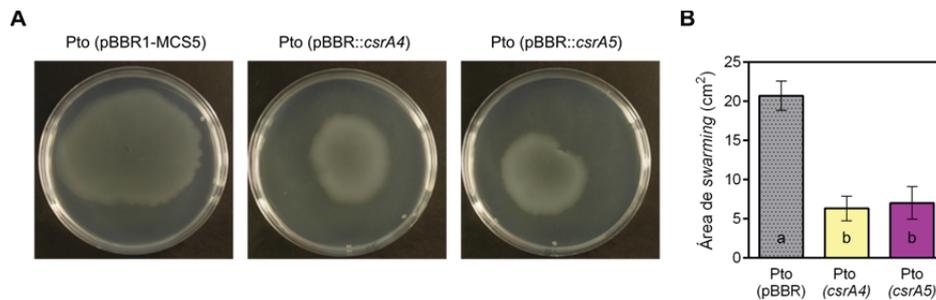


Figura R16. La sobreexpresión de CsrA4 y CsrA5 provoca una disminución de la motilidad *swarming*.

A. La motilidad *swarming* de la cepa silvestre y los sobreexpresantes de *csrA4* y *csrA5* se evaluó midiendo la superficie de la colonia en placas con medio PAG (0,5% agar) incubadas durante 24 h a 20°C tras ser inoculadas con 2  $\mu$ l de una suspensión bacteriana a  $DO_{660}=2,0$  depositados en la superficie de la placa. Las fotografías muestran el comportamiento más representativo de cada cepa. B. La gráfica representa las medias de los diámetros de *swarming* de Pto con el plásmido vacío (color oscuro punteado), con pBBR::*csrA4* o pBBR1::*csrA5* (color liso). Las barras de error corresponden con la desviación estándar de tres réplicas biológicas y las letras de a-b representan las categorías con diferencias significativas ( $p<0,01$ ) establecidas por ANOVA de un factor.

### 3.1. Síntesis de los flagelos

Los flagelos son esenciales para los movimientos *swimming* y *swarming* de Pto DC3000 (Nogales *et al.*, 2015; Vargas *et al.*, 2013), por lo que el aumento de la motilidad de los mutantes *csrA2* y *csrA3* podría deberse a que esas proteínas funcionaran como reguladores negativos de la biogénesis flagelar. Para comprobar si las proteínas CsrA regulaban la producción de flagelina, se midió la expresión de *fliC* en Pto DC3000, *gacA*, los mutantes *csrA* y las cepas complementadas. Dicha expresión se determinó en células *swarmers* mediante ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa utilizando una fusión traduccional a *'lacZ*. La expresión de *fliC* en los mutantes *csrA* y *gacA* fue similar a la de la cepa silvestre, y la complementación de los mutantes *csrA* no provocó cambios significativos en ninguno de ellos (Figura R17A).

Para corroborar que los flagelos no presentaban alteraciones, se recogieron células de las placas de *swarming* y se visualizaron utilizando microscopía óptica (Figura R17B). La tinción de Leifson (Clark, 1976) es una técnica que se basa en el engrosamiento de los flagelos mediante compuestos químicos para permitir su visualización mediante microscopía óptica. Las células de la cepa silvestre, los mutantes *csrA* y los complementantes de *csrA1* y *csrA2* mostraron un tamaño de alrededor de 3  $\mu$ m y varios flagelos, no apreciándose diferencias significativas entre ellos. Por otro lado, las células del mutante *gacA* y del complementante de *csrA3* poseían una morfología casi cocoide y, o no tenían ningún flagelo, o eran monoflageladas. Por tanto, CsrA3 parecía reprimir la síntesis de flagelos y promover el acortamiento celular. Sin embargo, cabía la posibilidad de que el menor número de flagelos observado se debiera a una ruptura de los mismos durante la manipulación de las muestras y no a un defecto en su biosíntesis. Para comprobar este aspecto, se decidió utilizar una técnica que protegiese mejor la integridad de las estructuras flagelares. La tinción negativa permitió visualizar las células por TEM observándose que las células de la cepa silvestre, el mutante *csrA3* y su complementante eran multiflageladas y su morfología flagelar era idéntica (Figura R17C), lo que indica que CsrA3 no regula la síntesis ni la morfología del flagelo. Mediante esta

técnica también se pudo comprobar que las células de la cepa *csrA3* complementada eran más cortas y con forma cocoide, diferentes de la cepa silvestre y el mutante *csrA3*.

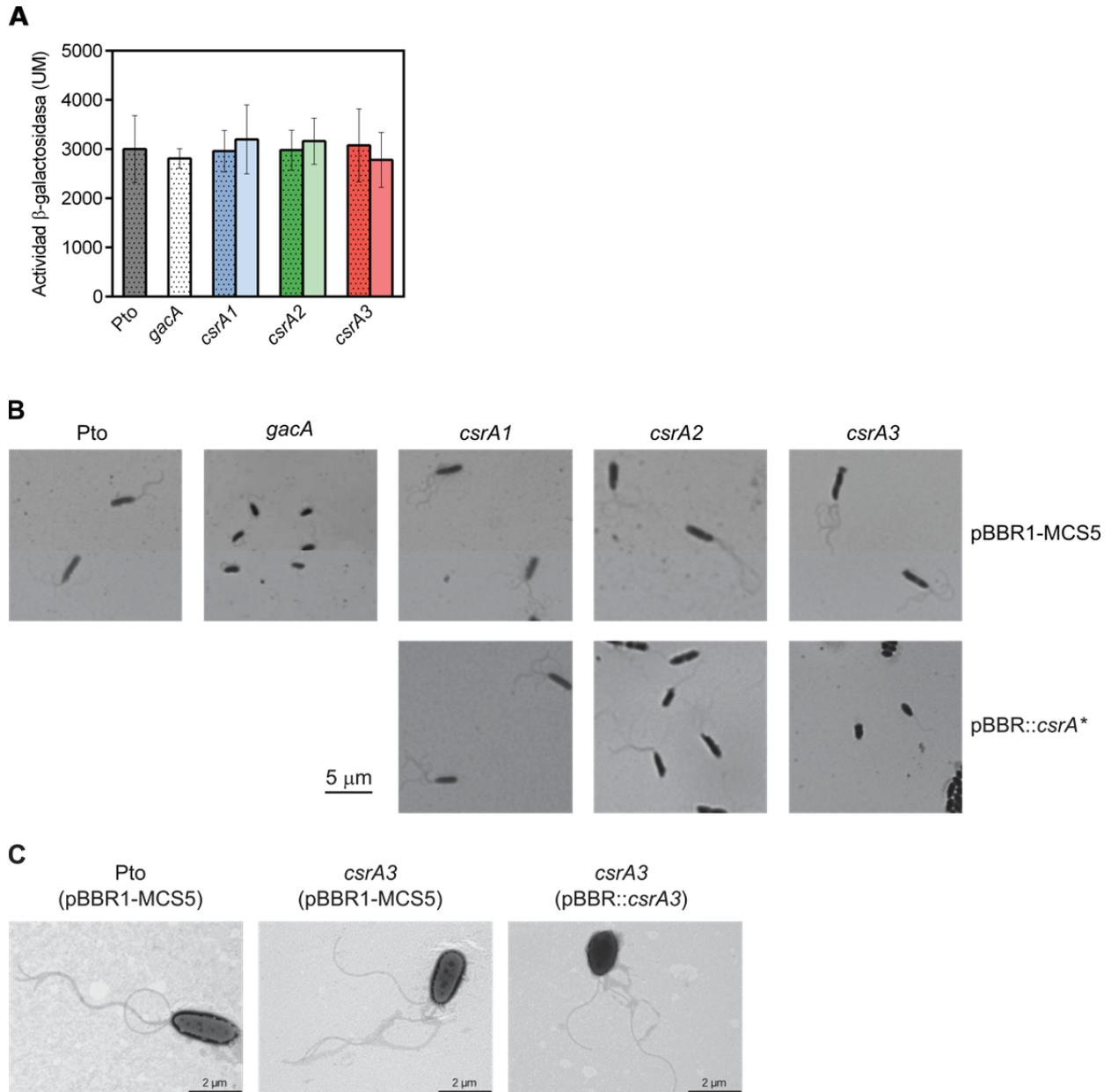


Figura R17. CsrA1, CsrA2 y CsrA3 no alteran la morfología y estructura del flagelo en *swarming*.

A. Actividad  $\beta$ -galactosidasa de una fusión traduccional al gen *lacZ* del promotor y región 5' no traducida de *fliC* medida en condiciones de *swarming*. La gráfica representa las medias de actividad  $\beta$ -galactosidasa (en unidades Miller) en las cepas con pBBR1-MCS5 (color oscuro punteado) y complementadas con *csrA1*, *csrA2* o *csrA3* (color claro liso) y las barras de error corresponden a la desviación estándar. Ninguna cepa presenta diferencias significativas según el análisis ANOVA de un factor. B. Flagelos observados por microscopía óptica tras realizar una tinción de Leifson. Se eligieron imágenes representativas de cada cepa a partir de muestras recogidas de placas de *swarming* en tres ensayos independientes. La barra representa 5  $\mu$ m. C. Flagelos observados por TEM tras realizar una tinción negativa. Se eligieron imágenes de representativas de las cepas ensayadas recogidas de placas de *swarming*. La barra representa 2  $\mu$ m.

### 3.2. Producción de siringafactina

Dado que el aumento del *swarming* de las cepas mutantes *csrA2* y *csrA3* no se debía a la alteración de la síntesis o el ensamblaje de los flagelos, este podría ser causado por un aumento en la producción del biosurfactante siringafactina, como se había demostrado previamente en un mutante *fleQ* (Nogales *et al.*, 2015). Para comprobar esta posibilidad, se evaluó la producción de siringafactina en la cepa silvestre, los mutantes y los complementantes, observando que el halo de surfactante generado por el mutante *csrA3* era 3,5 veces más grande que el de la cepa silvestre o el mutante *csrA1* (Figura R18). Además, un doble mutante *syfA/csrA3* no producía siringafactina ni era capaz de moverse en placas de *swarming*, aunque su motilidad *swimming* era similar a la de la cepa silvestre (Apéndice H). Por lo tanto, la mayor producción de siringafactina por el mutante *csrA3* parece ser la causa de su mayor motilidad *swarming*. El mutante *csrA2* exhibió un comportamiento intermedio, con un halo de siringafactina 1,6 veces más grande que el de la cepa silvestre. La sobreexpresión de *csrA2* y *csrA3* en sus respectivos mutantes causó una inhibición parcial y total, respectivamente, de la producción del biosurfactante, lo que sugiere que CsrA2 y, más eficazmente, CsrA3 regulan negativamente este proceso en Pto DC3000. Curiosamente, el mutante *gacA* produce ligeramente más siringafactina que el complementante de *csrA3*, ya que se aprecian gotas de aceite sobre sus colonias (Figura R18). Sin embargo, los fenotipos de ambas cepas en *swarming* son idénticos, probablemente porque sea necesario superar un determinado umbral en la producción de siringafactina para que se induzca este tipo de motilidad.

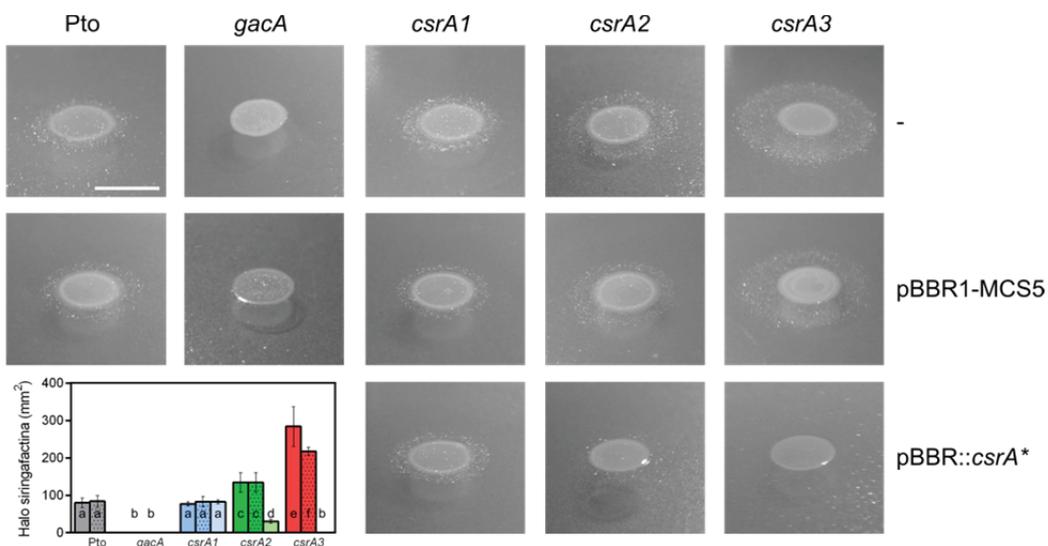


Figura R18. Efecto de CsrA1, CsrA2 y CsrA3 sobre la producción de siringafactina.

La producción de siringafactina en las cepas indicadas se calculó como la diferencia de superficie entre el halo y la colonia. La presencia de surfactante se reveló pulverizando aceite mineral sobre placas de LB incubadas durante 24 h a 20°C que habían sido inoculadas con 10 µl de una suspensión bacteriana a  $DO_{660}=1,0$ . La gráfica representa las medias de la producción de siringafactina en las cepas con pBBR1-MCS5 (color oscuro punteado) y complementadas con *csrA1*, *csrA2* o *csrA3* (color claro liso). Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres réplicas biológicas y las letras a-f representan las categorías con diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) establecidas por ANOVA).

Para esclarecer los mecanismos que regulan la producción de siringafactina, se empezó cuantificando mediante RT-qPCR la expresión del primer gen de su operón de síntesis (*syfA*) (Figura R19A). Los niveles de ARNm de *syfA* en *csrA1* fueron similares a los de la cepa silvestre, aumentaron 2 veces en *csrA2*, 4 veces en *csrA3*, y fueron insignificantes en el mutante *gacA*. La expresión génica en *trans* de los distintos *csrA* provocó una disminución de los niveles de ARNm de *syfA* con *csrA3* (8 veces) y con *csrA2* (1,25 veces), con respecto a la cepa silvestre. A continuación, se midió la expresión de *syfA* utilizando una fusión traduccional a *'lacZ* (Figura R19C), observando que la carencia de *csrA2* y *csrA3* causó un aumento significativo en la actividad de  $\beta$ -galactosidasa (3 y 5 veces, respectivamente), pero la expresión en *trans* de esos genes la reprimió drásticamente (11 veces con *csrA2* y 16 veces con *csrA3*). La expresión de *syfA* en el mutante *gacA* también disminuyó con respecto a la cepa silvestre (50 veces), mientras que la mutación de *csrA1* o su sobreexpresión no tuvieron ningún efecto. En resumen, estos resultados están de acuerdo con lo observado anteriormente en producción de siringafactina y confirman que CsrA3 y, en menor medida, CsrA2, están involucrados en su regulación. No obstante, esta regulación negativa podría ejercerse directamente sobre *syfA* o indirectamente a través de SyfR, el activador transcripcional tipo LuxR del operón *syfABCD* (Berti *et al.*, 2007; Nogales *et al.*, 2015). Por esa razón, se analizó la expresión de *syfR* mediante RT-qPCR y actividad  $\beta$ -galactosidasa, obteniéndose un patrón similar al de *syfA* (Figura R19B y D); es decir, CsrA3 y, en menor grado, CsrA2 inhiben la expresión, traducción y/o vida media de *syfR*, lo que a su vez impide la activación de la vía biosintética de la siringafactina.

Los genes *syfA* y *syfR* están situados de forma adyacente en el cromosoma y sus ORF son divergentes. Con el objetivo de predecir posibles sitios de unión de CsrA a sus ARNm, se exploró su región intergénica llegando a detectarse diversos motivos GGA cerca de los ATG de ambos genes (Figura R20A, texto rojo), aunque estos no habían sido seleccionados como posibles dianas de CsrA por el algoritmo de Kulkarni *et al.* (2014) (Apéndice G). Además, se observó la presencia de numerosas secuencias palindrómicas cuya función no se pudo determinar ni predecir. El punto de inicio de la transcripción de *syfA* no pudo ser determinado ni por *primer extension* ni a partir de los datos de transcriptómica debido a su baja expresión, que ya se había observado en experimentos de RT-qPCR (Figura R19 y R20). Sin embargo, las predicciones de la estructura de su ARNm tomando distintos fragmentos de su secuencia codificante y de la región 5'-UTR putativa mostraban siempre una estructura secundaria muy estable que contenía en un bucle una posible secuencia de unión de CsrA de alta afinidad y otra de menor afinidad en una región apareada próxima (Figura R20D).

En cuanto a *syfR*, los resultados de *primer extension* permitieron determinar el punto de inicio de la transcripción entre -134 y -131 nt desde el ATG. Además, en el transcriptoma comienzan a detectarse lecturas a -133 nt del ATG, confirmando ese punto como el inicio de la transcripción. En este caso, la predicción de la estructura secundaria del transcrito de *syfR* (Apéndice I) mostró que los tres motivos GGA presentes en el ARNm no estaban presentes en los bucles de horquillas y, por tanto, serían dianas de baja afinidad. Sin embargo, la abundancia (3) y posiciones (uno de ellos solapa con la SD y otro con el codón de inicio) de los motivos GGA convierten a *syfR* en un buen candidato para la regulación por CsrA.

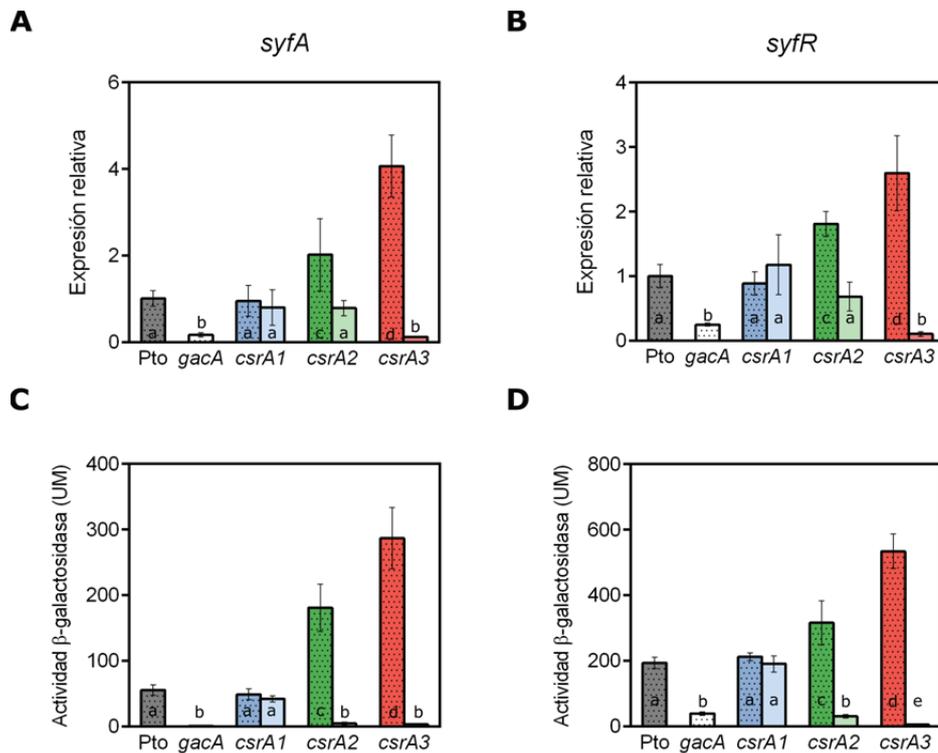


Figura R19. Efecto de CsrA1, CsrA2 y CsrA3 sobre la expresión de los genes de síntesis de siringafactina. A y B. Niveles de ARNm de *syfA* (A) y *syfR* (B) medidos mediante RT-qPCR en la cepa silvestre, los mutantes en *gacA*, *csrA1*, *csrA2* y *csrA3* y sus complementantes en condiciones de *swarming*. Los valores de expresión son las medias normalizadas utilizando el gen *gyrA* y referidas a la cepa silvestre de tres réplicas biológicas, las barras de error corresponden a la desviación estándar. Las letras a-d representan las categorías con diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) establecidas por ANOVA de un factor. C y D. Actividad β-galactosidasa de las fusiones traduccionales a *lacZ* de los promotores de *syfA* (C) y *syfR* (D) en la cepa silvestre, los mutantes en *gacA*, *csrA1*, *csrA2* y *csrA3* y sus complementantes en condiciones de *swarming*. Los valores son las medias de tres réplicas y las barras de error corresponden a la desviación estándar. Las letras a-e representan las categorías con diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) establecidas por ANOVA de un factor.

Los resultados obtenidos muestran que CsrA3 y CsrA2 disminuyen la expresión de los genes *syfA* y *syfR* en Pto DC3000. Esto, junto con la presencia de múltiples motivos de unión de CsrA en la región 5'-UTR de sus transcritos, sugieren que el sistema Gac-rsm ejerce un doble control sobre los genes de biosíntesis de siringafactina: directamente a través de la unión de CsrA2 y CsrA3 al transcrito *syfABCD* e indirectamente a través de la unión al ARNm de *syfR*.

En resumen, la ruta Gac-rsm de Pto DC3000 afecta moderadamente a la motilidad tipo *swimming* y drásticamente a la motilidad *swarming* debido a la represión ejercida por parte de las proteínas CsrA3 y CsrA2 sobre la producción de siringafactina. Las deficiencias mostradas por el mutante *gacA* y el mutante *csrA3* complementado en *swimming* no pueden explicarse por cambios en el ensamblaje o la morfología de los flagelos, ya que ambas cepas presentan una flagelación normal. Se debe tener en cuenta que la evaluación de la expresión de *fliC* y la visualización de los flagelos se realizaron utilizando células *swarmers* debido a la dificultad técnica que supone obtener células de placas de *swimming*. Por tanto, se puede especular que la ruta Gac-rsm quizás module la rotación flagelar.

A

```

ATCCACCAGTTGCAGCATGTGCCCGGCAAAATGTAGCGCAGCCGGTCTGGAGACGAGTTGAGCCAAGTGC
TAGGTGGTCAACGTCGTACACGGGCGCTTTACATCGCGTTCGGCCACGACCTCTGCTCAACTCGGTTGACG
                                     PsyfR_trad
TGATAAAAACGCGGATCGCTACTGTATTTCGGGGTATTGCGCCGTTCATCCTGAGCTTTCCTGATTCCG
ACTATTTTTGCGCCTAGCGATGACATAAGCCCCATAACCGGGCACAAGTAGGACTCGAAAGGACTAAGGC

ACCGCGCAACAAGGACCATGGTCGGCTCGTGCGCGGCAACTGCTGTTTGAATGACTGATAAGTCTGAT
TGGCGCGTTGTTCTGGTACCAGCCGAGCACGCGCCGTTGACGACAAACGTTACTGACTATTGACTACTA

TGTGACACTGGGTCTTTGGGTATTCAGCCTAAGCTTTTATCCTGCGTCTGTAGCGGAAAACAGGGACAGA
ACACTGTGACCCAGAAACCATAAGTCGGATTCGAAAATAGGACGACAGACATCGCCTTTGTCCCTGTCT

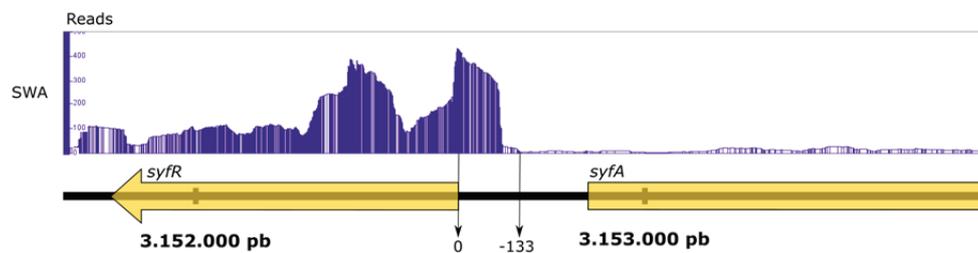
GTAGCAAGCGGATACACATGCCGCTGCCACGATTGATGGCTATACGCCAGTGTCCGGGTTTCAGGGCCA
CATCGTTCGCCTATGTGTACGGCGACGGTGCCTAACTCCGATATGCGGTCAAGGCCCAAAGTCCCGGT

TACATCGGCCAGTTGGCAGTGCCTAATCCGCGGATTATCTGCCAAGAAGGACCCTTGAGCCATGCGTGCCT
ATGTAGCCGGTCAACCGTCACGGATTAGCGCCTAATAGACGGTCTTCTCGAACTCGGTACGCACGGA

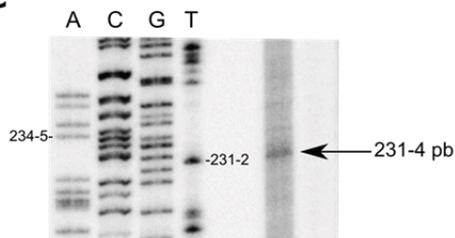
CTGTGCCCCAACATTCTCCCTGACCGCCGCCAGCGTGACATCTGGCTTGACCAGATCAGCCGTGGCGA
GACAGCGGGTTGTAAGAGGGACTGGCGCGGGTCGCACTGTAGACCGAACTGGTCTAGTCGGCACCGCT

```

B



C



D

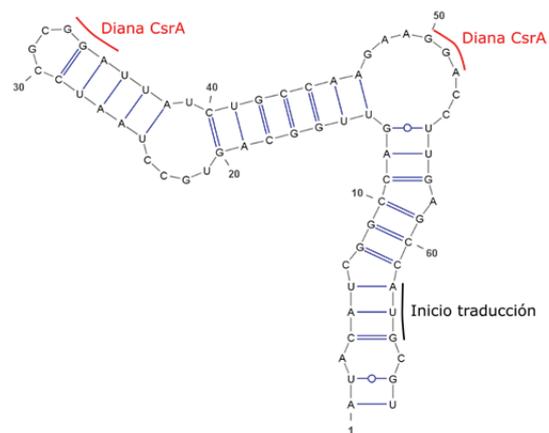


Figura R20. Las regiones promotoras de *syfA* y *syfR* contienen posibles sitios de unión a CsrA.

A. Región intergénica de los genes *syfA* (texto azul) y *syfR* (texto verde). Se señalan distintas secuencias palindrómicas (fondo de color), los codones de inicio (negrita en color), los motivos GGA (texto rojo), el posible punto de inicio de la transcripción de *syfR* (fondo negro) y el oligonucleótido utilizado en los experimentos de *primer extension* (PsyfR\_trad). Con fondos de otros colores y recuadro se señalan secuencias palindrómicas o complementarias. B. Transcriptoma de Pto DC3000 en la región intergénica *syfR-syfA* en condiciones de *swarming*. Se señalan con flechas el punto de inicio de la traducción (0) y el posible inicio de la transcripción (-133). En la parte inferior se representan los genes con sus identificaciones y las coordenadas del cromosoma. C. Localización del inicio de la transcripción de *syfR* mediante *primer extension*. Se señala con una flecha el producto correspondiente al ADNc obtenido tras la reacción y se indica la estimación de su tamaño obtenida a partir de las reacciones de secuenciación situadas a la izquierda (ACGT, Apéndice C). Este punto y la región de hibridación del oligonucleótido empleado se señalan en la secuencia del apartado A de esta figura. D. Predicción de la estructura del ARNm de *syfA* que comprende los nucleótidos -61 hasta +6 con respecto al inicio de traducción. Se señalan dos posibles dianas de CsrA y el inicio de la traducción.

#### 4. Virulencia

Para estudiar el papel de CsrA1, CsrA2 y CsrA3 en la virulencia de Pto DC3000 se utilizaron plantas de tomate como hospedador compatible. La infección se llevó a cabo por rociado y se monitoreó durante 10 días post-inoculación (dpi) mediante la cuantificación de las poblaciones bacterianas en el interior de la hoja y de la aparición y el desarrollo de síntomas. Las cepas ensayadas consiguieron acceder al apoplasto con igual eficiencia y lograron multiplicarse en él, alcanzando un máximo poblacional a los 3 dpi. Sin embargo, *csrA2* y *csrA3* se comportaron de manera diferente a la cepa silvestre y al mutante *csrA1*: *csrA2* inicialmente creció como el silvestre pero a 6 dpi su población había disminuido drásticamente, y *csrA3* no se multiplicó como las otras cepas y sus poblaciones fueron las más bajas en todo el ensayo (Figura R21A). La sintomatología observada en las hojas infectadas fue la típica descrita para esta cepa: lesiones acuosas que aparecen a los 2 o 3 dpi y posteriormente se tornan de color marrón y se rodean de halos cloróticos. La gravedad de los síntomas causados por todos los mutantes *csrA* se cuantificó como la extensión de las áreas necróticas, siendo en todos los casos similares a los de la cepa silvestre (alrededor del 6%). Estos resultados muestran que la pérdida de CsrA1 no modifica el crecimiento o la virulencia en planta; sin embargo, la pérdida de CsrA2 y, más significativamente, CsrA3 tiene un efecto sobre la colonización interna de la hoja pero no sobre los síntomas. Es decir, esas cepas parecen ser más virulentas que la silvestre a pesar de exhibir una tasa de crecimiento reducida en la planta. Para verificar esto, se ensayó el mutante *csrA3* complementado, observándose que restaura el crecimiento en la planta, llegando a un máximo a los 6 dpi y manteniendo sus poblaciones más elevadas que la cepa silvestre (Figura R21B). Sin embargo, los síntomas causados por esta cepa fueron mucho más leves que los causados por la cepa silvestre y solo se distinguieron pequeños halos de clorosis sin necrosis (Figura R21C). Por lo tanto, CsrA1, CsrA2 y CsrA3 no son necesarios para la patogenicidad de Pto DC3000 en las condiciones ensayadas; por el contrario, CsrA3 parece estar limitando la expresión de algunos factores de virulencia.

Previamente se había observado que Pto DC3000 era capaz de provocar una respuesta hipersensible (HR) en tabaco (*Nicotiana tabacum*), mientras que el mutante *gacA* no (Chatterjee *et al.*, 2003). En este trabajo se muestra que lo mismo ocurre en plantas de judía (*Phaseolus vulgaris* cv. Canadian Wonder): Pto DC3000 provocó una HR típica cuando se infiltró a  $10^7$  UFC/ml, pero los síntomas de la HR causados por el mutante *gacA* fueron significativamente menores (Figura R22A). En primer lugar, se ensayaron como controles varios mutantes en los factores de virulencia clave para Pto DC3000, la coronatina y el T3SS: el mutante *corS* no produce la toxina coronatina, el mutante *hrcQ<sub>b</sub>-U* no forma un T3SS funcional y el mutante defectivo en el factor  $\sigma$  HrpL carece de ambos. Se observa que la cepa silvestre y el mutante *corS* provocan la necrosis característica de la HR, mientras que los mutantes carentes del T3SS (*hrpL* y *hrcQ<sub>b</sub>-U*), incluso cuando eran capaces de producir coronatina (*hrcQ<sub>b</sub>-U*), no causaron ninguna sintomatología en la hoja (Figura R22A). De esta manera se corroboró que la presencia de un T3SS funcional es indispensable para que se produzca HR, como se había propuesto anteriormente (Collmer *et al.*, 2000).

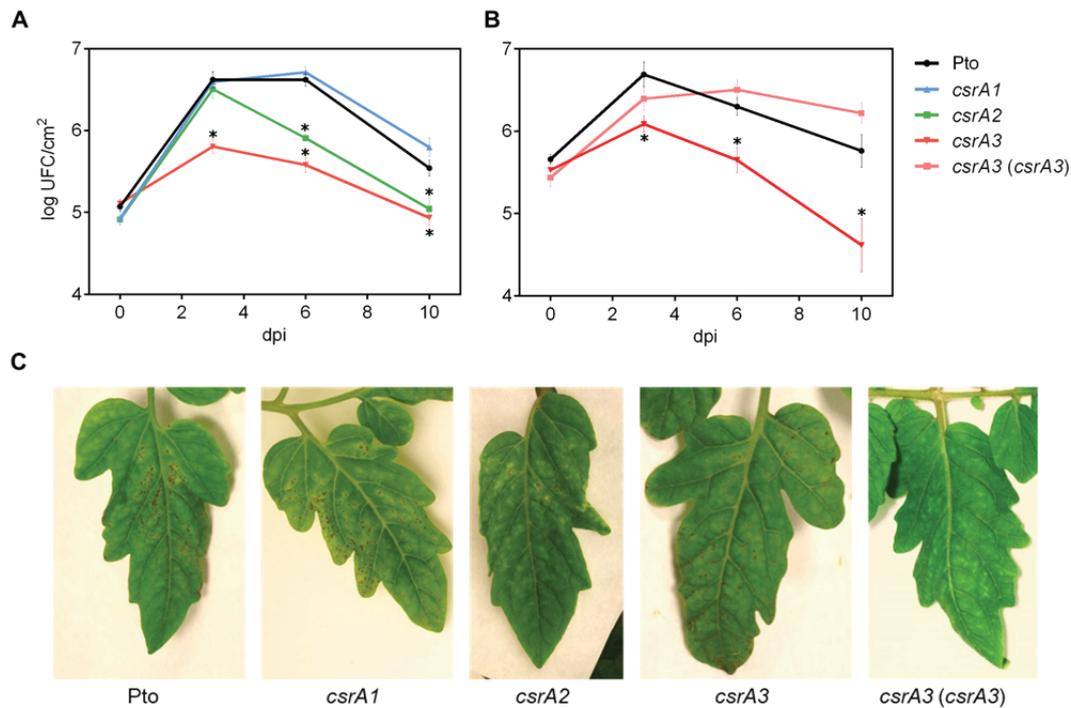


Figura R21. Efecto de CsrA1, CsrA2 y CsrA3 sobre la virulencia en plantas tomate.

A y B. Niveles poblacionales en el apoplasto de hojas de tomate inoculadas por pulverización con  $10^8$  UFC/ml con distintas cepas de Pto DC3000. La gráfica muestra las medias de las UFC obtenidas a 0, 3, 6 y 10 dpi perteneciente a tres ensayos independientes, con sus respectivas desviaciones típicas. Se señala con un asterisco los puntos que muestran diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) según ANOVA. Se ensayaron independientemente las cepas sin plásmido (A) Pto, *csrA1*, *csrA2* y *csrA3*, y las cepas con plásmido (B) Pto (pBBR1-MCS5), *csrA3* (pBBR1-MCS5) y *csrA3* (pBBR::*csrA3*). C. Sintomatología desarrollada a los 10 dpi por la cepa silvestre, los mutantes *csrA* y el complementante de *csrA3* en hojas de tomate inoculadas por pulverización con  $10^8$  UFC/ml.

Para determinar si el fenotipo observado con el mutante *gacA* estaba mediado por las proteínas CsrA, analizamos las lesiones causadas por los mutantes *csrA2* y *csrA3* y sus cepas complementadas en hojas de judía. Los mutantes *csrA2* y *csrA3* provocaron HR, siendo la necrosis asociada a la cepa *csrA3* más intensa que la observada con la cepa silvestre. La complementación de *csrA2* y *csrA3* provocó una disminución del área necrótica, más acusada en el caso de *csrA3* (Figura R22A). Estos resultados sugieren que las proteínas CsrA2 y CsrA3 ejercen una regulación negativa sobre la expresión del T3SS, la exportación de efectores a las células vegetales, o ambos, tanto en infecciones compatibles como incompatibles. Consistente con esto, los niveles relativos de ARNm de *hrpL* y *hrpA* en el mutante *csrA3* en condiciones de inducción fueron 3,6 y 2,5 veces mayores, respectivamente, que en la cepa silvestre y 1,4 y 1,9 veces en el mutante *csrA2*, mientras que la sobreexpresión de *csrA2* en el mutante los redujo 2,3 y 2,2 veces, y la sobreexpresión de *csrA3* en 1,6 y 3,0 veces con respecto a la cepa silvestre (Figura R22B).

En *P. syringae*, los componentes estructurales del T3SS provocan autoaglutinación entre las células cuando crecen en medio MMF (Ortiz-Martín *et al.*, 2010; Taira *et al.*, 1999) y la visualización de estos agregados constituye una evidencia indirecta de su presencia y correcto ensamblaje. Se ensayaron los mutantes *csrA2* y *csrA3* junto a sus respectivos complementantes utilizando como controles la cepa silvestre y el mutante carente de T3SS

*hrcQ<sub>b</sub>-U* (Figura R22C). La cepa silvestre formó grandes agregados bacterianos, que estaban ausentes en el mutante *hrcQ<sub>b</sub>-U*. Los agregados formados el mutante *csrA3* fueron más numerosos, significativamente más grandes en tamaño y más sólidos que los observados en la cepa silvestre, mientras que el complementante formó agregados pequeños y menos densos. En el caso del mutante *csrA2* y su complementante, se observó una tendencia similar a *csrA3* pero las variaciones fueron más sutiles.

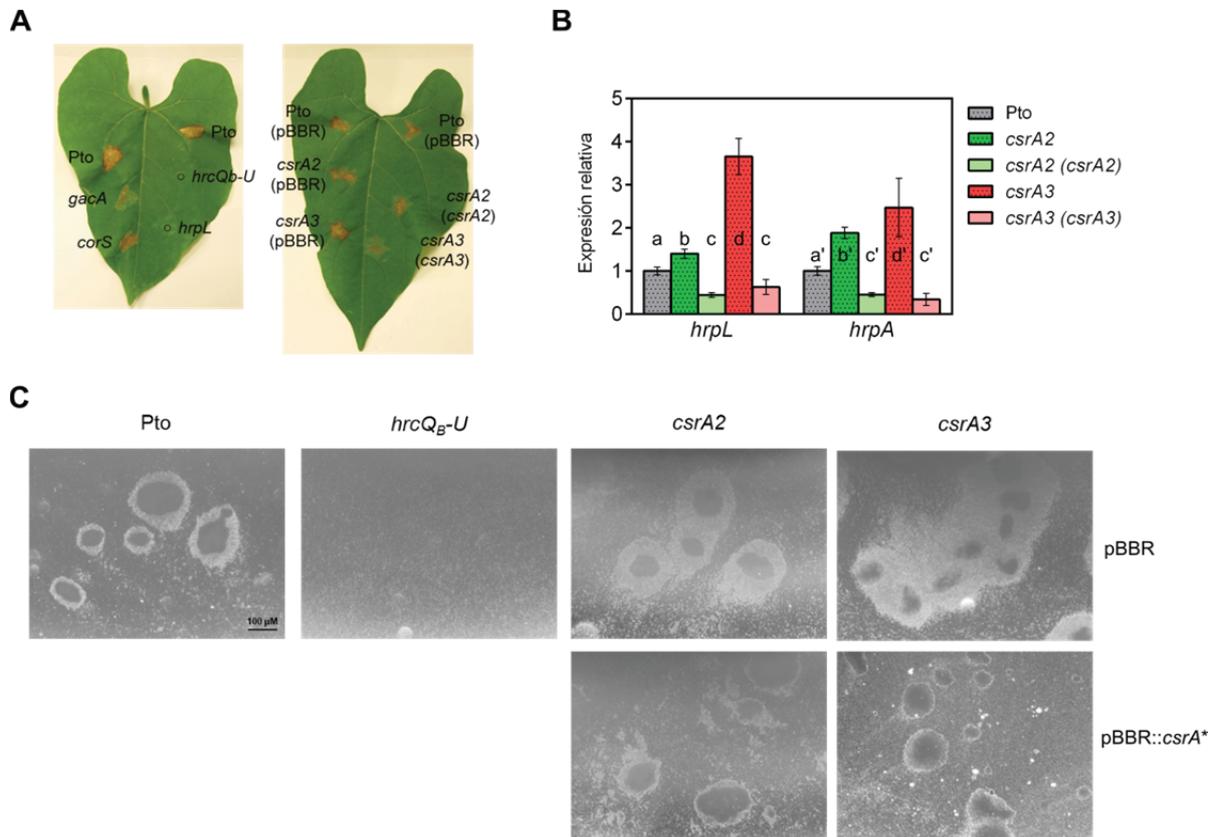


Figura R22. CsrA2 y CsrA3 reprimen la expresión del T3SS en Pto DC3000.

A. Respuesta hipersensible (HR) producida por la cepa silvestre y varios mutantes en la ruta Gac-rsm (*gacA*, *csrA2* y su complementante, *csrA3* y su complementante) frente a mutantes deficientes en síntesis de coronatina (*corS*), T3SS (*hrcQ<sub>b</sub>-U*) o ambos (*hrpL*). Se muestran fotografías de hojas de judía infiltradas con  $10^7$  UFC/ml a los 8 días post-inoculación. B. Niveles de ARN de *hrpA* y *hrpL* en la cepa silvestre, los mutantes *csrA2* y *csrA3* y sus respectivos complementantes. Los cultivos de los ensayos de autoaglutinación se emplearon para extraer ARN total y se determinó por RT-qPCR la abundancia relativa de cada gen normalizándola con el gen *gyrA* y refiriéndola a la cepa silvestre. La gráfica muestra las medias de expresión relativa para cada cepa y las barras de error representan la desviación típica de tres réplicas biológicas. Las letras a-d y a'-d' representan categorías ANOVA con diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) para *hrpL* y *hrpA*, respectivamente. C. Ensayos de autoaglutinación de Pto, del mutante *hrcQ<sub>b</sub>-U* y los mutantes *csrA2* y *csrA3* y sus respectivos complementantes. Los cultivos se inocularon en MMF a  $DO_{660}=0,5$  y se incubaron durante 24 h a 20°C y 100 rpm para facilitar la formación de aglutinados. Las microfotografías muestran el fenotipo representativo para la cada cepa en tres réplicas biológicas independientes. La barra representa 100  $\mu$ m.

En resumen, CsrA2 y CsrA3 regulan negativamente la infección en hospedadores compatibles y no compatibles controlando la expresión del T3SS. Además, se observa una relación opuesta entre crecimiento *in planta* y la producción de factores de virulencia en Pto DC3000, controlada fundamentalmente por CsrA3, aunque CsrA2 juega también un papel secundario.

La búsqueda de los posibles puntos de regulación por CsrA comenzó por *hrpL*, ya que su funcionalidad determina en último término la expresión de los genes relacionados con el T3SS. Sin embargo, la región 5'-UTR de *hrpL* no contiene ningún motivo GGA en su secuencia, por lo que se descartó este gen como posible diana de CsrA. La síntesis del T3SS es muy compleja y los niveles de HrpL en la bacteria están enormemente regulados, por lo que existen numerosos puntos sobre los que CsrA podría estar ejerciendo su regulación. El algoritmo de Kulkarni *et al.* (2014) predice múltiples genes relacionados con el T3SS como posibles dianas de CsrA: *hopO1-2*, *hopAT1*, *avrE1*, *hrpH*, *hrpV*, *hrcQ<sub>b</sub>* y *hrpO*, cuya posible regulación sería necesario analizar experimentalmente.

## 5. Sideróforos

La caracterización fenotípica del mutante *gacA* de Pto DC3000 realizada por Chatterjee *et al.* (2003) mostró que esta cepa producía menos pigmentos que la silvestre. La pigmentación de *Pseudomonas* suele deberse a cromóforos que son también fluorescentes al iluminarlos con luz UV y que forman parte de sistemas de captación de hierro denominados sideróforos. El sideróforo más extendido y mejor estudiado dentro de este género es la pioverdina, debido a que constituye un factor de virulencia importante en la cepa patógena *P. aeruginosa* (Meyer *et al.*, 1996). Este compuesto se caracteriza por presentar un máximo de absorbancia a 405 nm y emitir fluorescencia cuando se excita bajo luz UV. Previamente se había determinado que Pto DC3000 produce dos sideróforos (pioverdina y yersiniabactina), que se expresan en la cepa silvestre tanto en medios de laboratorio como en plantas de *Arabidopsis* (Jones *et al.*, 2007; Jones y Wildermuth, 2011). En base a estos datos, se pensó que la variación de pigmentación observada en el mutante *gacA* podía deberse a la regulación de la síntesis de pioverdina por la ruta Gac-rsm.

### 5.1. Producción de sideróforos en medio sólido

En nuestro laboratorio se había observado que el único medio donde se producía pigmentación era MMR, por lo que fue elegido para realizar los ensayos de producción de sideróforos. Además, el medio se preparó sin FeCl<sub>3</sub> (a partir de ahora MMR\*) para estimular aún más la producción de estos compuestos. En primer lugar se intentó corroborar que el pigmento producido por la cepa silvestre era pioverdina mediante su visualización en placas de cultivo con diluciones seriadas de las cepas bajo luz visible y UV. Como controles se utilizaron cepas deficientes en la producción de pioverdina (mutante *pvdI*), yersiniabactina (mutante *pchA*) o ambas (doble mutante *pchA/pvdI*) facilitadas por el grupo de la Dra. Wildermuth (Universidad de California) (Jones *et al.*, 2007; Jones y Wildermuth, 2011). Tras 48 h de incubación, la pigmentación y la fluorescencia no se detectaban en los mutantes carentes de pioverdina *pvdI* y *pchA/pvdI* (Figura R23). Sin embargo, al aumentar el tiempo de cultivo a 72 h se observó que el mutante *pvdI* era levemente fluorescente aunque su pigmentación no varió, mientras que el doble mutante no presentó fluorescencia en ningún caso (Figura R23 y Apéndice J). Por tanto, la fluorescencia observada bajo luz UV en MMR\* se debe mayoritariamente a la producción del sideróforo pioverdina, aunque también se detecta otro compuesto con menor fluorescencia que no está presente en el mutante doble. Además, la adición de FeCl<sub>3</sub> al

medio provocó la desaparición de la fluorescencia, confirmando de nuevo que la misma se inducía en condiciones de escasez de hierro (Apéndice J).

La capacidad de quelar hierro de las mismas cepas se evaluó utilizando MMR\* mezclado con solución CAS. El CAS contiene los indicadores *Chrome Azurol S* y bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HDTMA), que acomplejan con el hierro férrico produciendo una coloración azul. La coloración vira a naranja cuando un quelante (en este caso un sideróforo) secuestra el hierro de este complejo, lo que permite detectar y cuantificar la producción de sideróforos midiendo el halo naranja que se forma alrededor de la colonia. El halo producido por la cepa silvestre no se observa en el doble mutante *pchA/pvdI*, por lo que actividad quelante de hierro observada en este medio se debe a los sideróforos pioverdina y yersiniabactina. El mutante *pvdI* presenta una reducción del halo, mientras que el halo del mutante *pchA* es mayor que el de la cepa silvestre, probablemente por la mayor producción de pioverdina inducida por la ausencia de yersiniabactina o por presentar un mayor crecimiento.

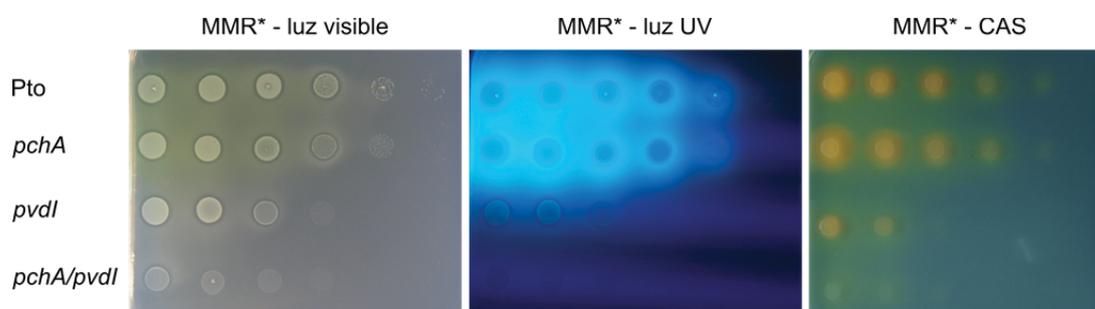


Figura R23. Pto DC3000 produce pioverdina y yersiniabactina en medio MMR\*.

Gotas de 5  $\mu$ l de diluciones seriadas (1:10) a partir de cultivos a  $DO_{660}=0,1$  de la cepa silvestre y los mutantes deficientes en producción de sideróforos crecidas a 20°C. Las placas de MMR\* se fotografiaron a los 3 días y las de MMR\* con CAS a los 2 días.

Posteriormente, se realizaron los mismos experimentos con distintos mutantes de la ruta Gac-rsm (Figura R24). El mutante *gacA* presentó una sutil disminución de la producción de pigmentos, fluorescencia y capacidad quelante del hierro. Los demás mutantes examinados no presentaron diferencias notables con la cepa silvestre en las condiciones ensayadas (Figura R24). En este caso también se confirmó la ausencia de fluorescencia en los cultivos en MMR\* con  $FeCl_3$  (Apéndice J).

En general, la observación de diferencias entre las cepas utilizando placas de cultivo sólido resulta ser poco resolutive, ya que no permite evaluar y cuantificar de manera independiente los dos sideróforos producidos por Pto DC3000. Por ese motivo, se decidió continuar el estudio de la producción de sideróforos utilizando sobrenadantes de cultivos en medio líquido.

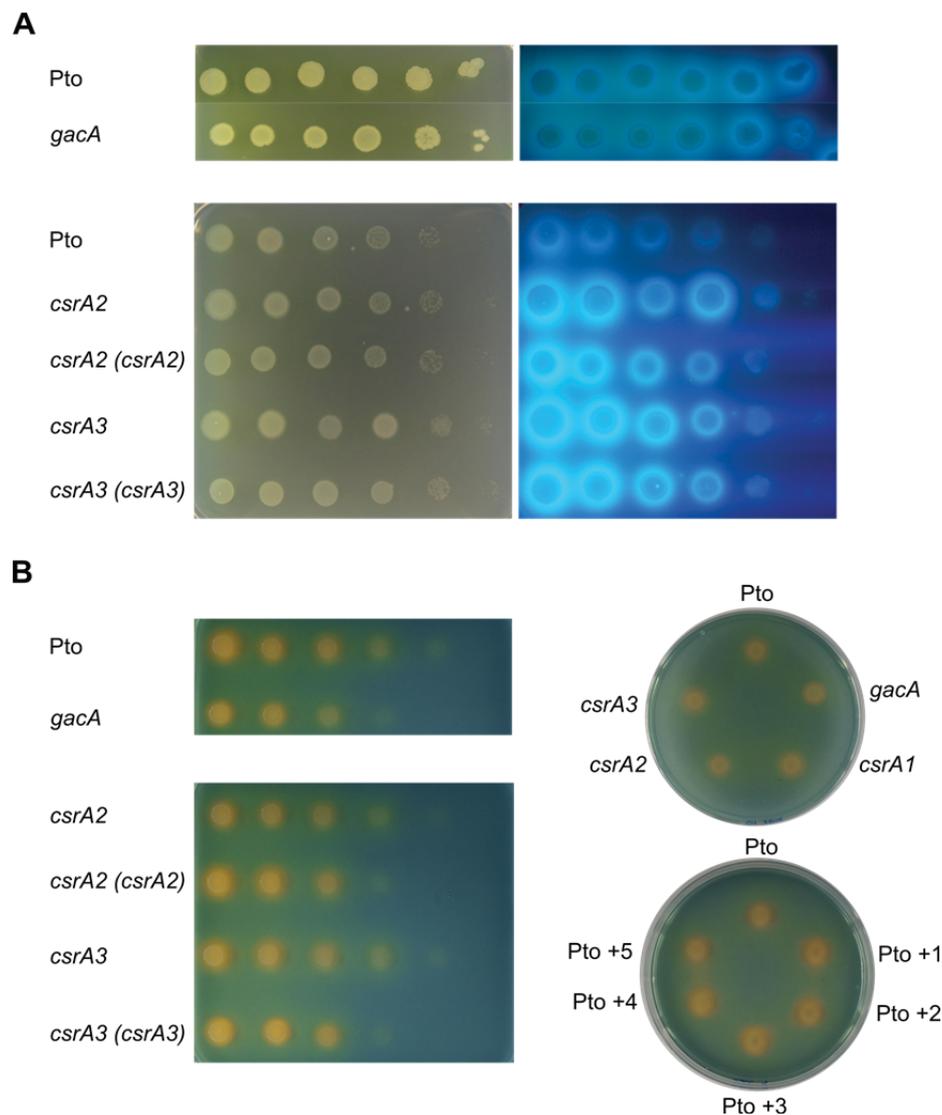


Figura R24. Efecto de GacA y CsrA sobre la producción de sideróforos en medio sólido.

A y B. Gotas de 5  $\mu$ l de diluciones seriadas (1:10) a partir de cultivos a  $DO_{660}=0,1$  de la cepa silvestre y mutante *gacA* (arriba); la cepa silvestre, *csrA2* y *csrA3* con el plásmido pBBR1-MCS5 vacío y los complementantes de *csrA2* y *csrA3* (abajo) crecidos a 20°C en MMR\* (A) o MMR\* con CAS (B). Las placas de MMR\* se fotografiaron a los 4 (arriba) o 2 (abajo) días bajo luz visible (izquierda) y luz ultravioleta (derecha) y las placas de MMR\* con CAS, a los 2 días bajo luz visible. C. Gotas de 5  $\mu$ l de cultivos a  $DO_{660}=0,1$  de la cepa silvestre y los mutantes *gacA*, *csrA1*, *csrA2* y *csrA3* con el plásmido pBBR1-MCS5 vacío (arriba) y la cepa silvestre con pBBR1-MCS5 y los sobreexpresantes de *csrA1-5* clonados en el mismo plásmido (abajo). Las placas de MMR\* con CAS se incubaron a 20°C y se fotografiaron a los 2 días bajo luz visible.

## 5.2. Producción de sideróforos en cultivos líquidos

Los ensayos de determinación de la producción de sideróforos requieren una estricta eliminación de las posibles trazas de hierro presentes en el material y los reactivos. Por tanto, el material de vidrio se limpió con HCl 5 N y se utilizó siempre material de plástico de un solo uso. Para eliminar las trazas de hierro aportadas por los reactivos se adicionó el compuesto bipyridilo al medio y en primer lugar, se determinó la cantidad idónea de este compuesto para mantener unas condiciones limitantes de hierro sin perjudicar el crecimiento de la bacteria. Para ello se incubaron la cepa silvestre y el mutante *csrA3* (seleccionado por ser la cepa que presentaba más

problemas de crecimiento) con concentraciones crecientes de biperidilo en medio MMR\*, utilizando como controles el medio sin biperidilo y con 24  $\mu\text{M}$  de  $\text{FeCl}_3$ . El aumento de la concentración de biperidilo provocó el descenso del crecimiento (Figura R25A). Para seleccionar la concentración idónea de este compuesto se consideraron tanto el crecimiento como la producción de pioverdina (máximo de absorbancia a 405 nm), intentando inducir su producción sin comprometer gravemente el primero. Para obtener datos cuantitativos de la producción de pioverdina se midió a 405 nm la absorbancia de los sobrenadantes de cultivos líquidos y se normalizó por la densidad celular del cultivo (absorbancia a 660 nm) (Figura R25B), de acuerdo a lo descrito anteriormente (Hoegy *et al.*, 2014). La concentración de biperidilo seleccionada fue 100  $\mu\text{M}$  porque permite el crecimiento de los cultivos líquidos a la vez que induce la ratio  $\text{DO}_{405}/\text{DO}_{660}$  más elevada (Figura R25A y B). Una concentración similar, 150  $\mu\text{M}$ , se había establecido como idónea para esta misma cepa en medio MOPS1 (Jones *et al.*, 2007).

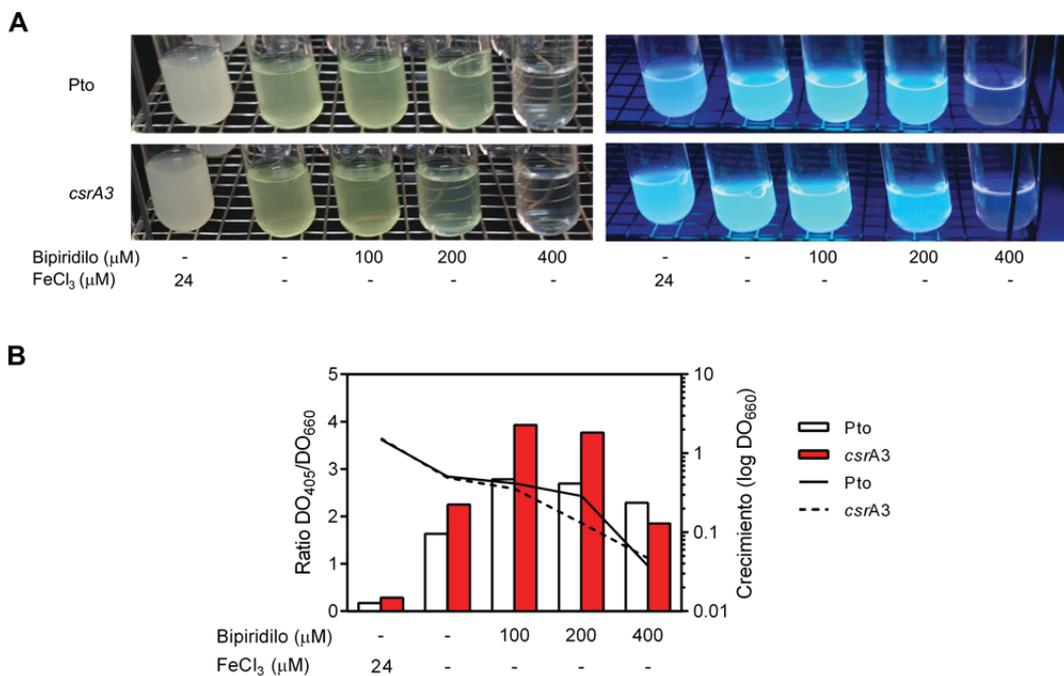


Figura R25. Determinación de la concentración adecuada de biperidilo.

A. Fotografías bajo luz visible (izquierda) y luz ultravioleta (derecha) de cultivos de la cepa silvestre y el mutante *csrA3* iniciados a  $\text{DO}_{660}=0,001$  e incubados a  $20^\circ\text{C}$  en MMR\* durante 4 días. B. La cepa silvestre y el mutante *csrA3* se incubaron con concentraciones variables de biperidilo y  $\text{FeCl}_3$  (eje de abscisas), evaluándose su crecimiento (absorbancia a 660 nm) y la tasa de producción de pioverdina (ratio  $\text{DO}_{405}/\text{DO}_{660}$ ).

La producción de sideróforos se evaluó en cultivos de MMR\* con 100  $\mu$ M de biperidilo, que se incubaron durante 48 h para permitir la acumulación de sideróforos y facilitar su detección y cuantificación. Para obtener un control del cultivo en abundancia de hierro se utilizó MMR\* con 50-100  $\mu$ M de  $\text{FeCl}_3$  y sin biperidilo. Este cultivo se recogió tras 24 h para evitar que llegara a condiciones de deficiencia de hierro, ya que el aporte de este compuesto permite un crecimiento más acelerado provocando su consumo rápido y una posterior deficiencia.

Los sobrenadantes se analizaron por espectrofotometría midiendo la absorbancia a 410 nm (característica de la pioverdina) y por fluorimetría, donde se excitaron a 305 nm (óptimo para pioverdina) y se midieron los espectros de emisión (Figura R26). La pioverdina solo se detectó espectrofotométricamente en la cepa silvestre y en el mutante en *pchA* con unos niveles similares, mientras que en los mutantes *pvdI* y *pchA/pvdI* (controles negativos) los niveles de pioverdina fueron indetectables. Los cultivos suplementados con hierro mostraron un patrón similar pero con una producción mucho menor (Figura R26).

En los ensayos de fluorescencia, la cepa silvestre mostró un máximo de emisión alrededor de 450 nm y se intuye otro menor a 410 nm que solapa parcialmente con el anterior (Figura R26B). El pico de emisión mayoritario cercano a 450 nm desaparece en el mutante deficiente en la síntesis de pioverdina *pvdI*, mientras que la mutación en el gen *pchA*, necesario para la biosíntesis de yersiniabactina, provoca la desaparición del máximo a 410 nm. Finalmente, la fluorescencia desaparece por completo en el doble mutante *pchA/pvdI*. Por tanto, el pico de emisión a 410 nm corresponde al sideróforo yersiniabactina o a algún precursor fluorescente implicado en su síntesis, como el ácido salicílico, mientras que el máximo a 450 nm corresponde al sideróforo pioverdina. Los cultivos crecidos en medio suplementado con hierro presentan tendencias similares en sus espectros a las correspondientes muestras sin hierro pero los niveles de fluorescencia disminuyen 15-25 veces (Figura R26B), lo cual es coherente con que los compuestos medidos sean sideróforos o productos implicados en su síntesis. Además, se realizaron los mismos experimentos con las cepas portadoras del plásmido pBBR1-MCS5, usado para complementar los mutantes *csrA*, y los efectos de las mutaciones en *pchA* y *pvdI* fueron similares a los observados en las cepas sin plásmido (Apéndice K).

Posteriormente, se comparó el comportamiento del mutante *gacA* con la cepa silvestre, observándose en los sobrenadantes de *gacA* una leve reducción del máximo de emisión a 450 nm y un aumento del pico a 410 nm (Figura R27). Al igual que se había observado en medio sólido, las diferencias entre las dos cepas son sutiles, pero sugieren que el mutante *gacA* está alterado en la producción de sideróforos.

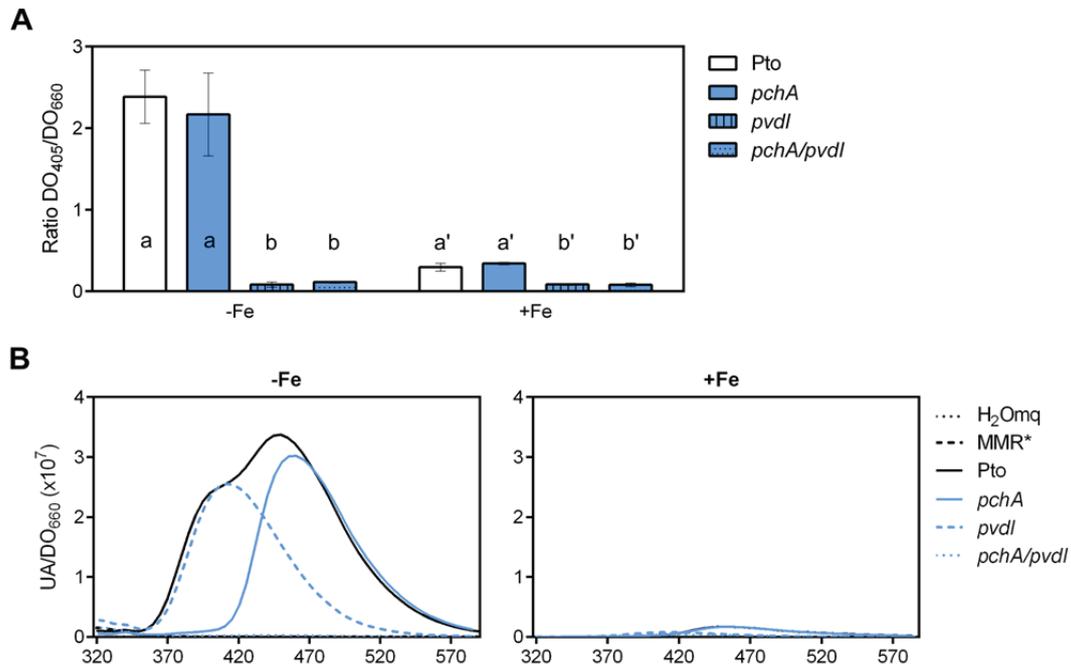


Figura R26. Detección de sideróforos en los sobrenadantes de Pto DC3000 y mutantes en *pchA* y *pvdI*. Los cultivos se ajustaron a  $DO_{660}=0,05$  y se incubaron a  $20^{\circ}C$  y en agitación en medio MMR\* durante 48 h (-Fe) o durante 24 h en MMR\* con  $100 \mu M$  de hierro (+Fe). A. Medidas de la producción de pioverdina en los sobrenadantes de las mismas cepas. Se representa la producción de pioverdina como la media de la absorbancia a 405 nm normalizada por la densidad celular del cultivo (absorbancia a 660 nm) correspondiente a tres experimentos independientes y las barras de error corresponden a la desviación típica. Las letras de a-d en MMR -Fe y a' y b' en MMR +Fe representan las categorías con diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) establecidas por ANOVA de un factor. B. Fluorescencia de los sobrenadantes de cultivos líquidos de las cepas indicadas, medio sin inocular (MMR\*) y agua milliQ ( $H_2O_{mq}$ ). Las gráficas corresponden al espectro de emisión desde 320 a 590 nm de las muestras excitadas a 305 nm, expresado en unidades arbitrarias (UA) normalizadas por la  $DO_{660}$  del cultivo. Se eligió un experimento representativo de entre tres réplicas biológicas independientes.

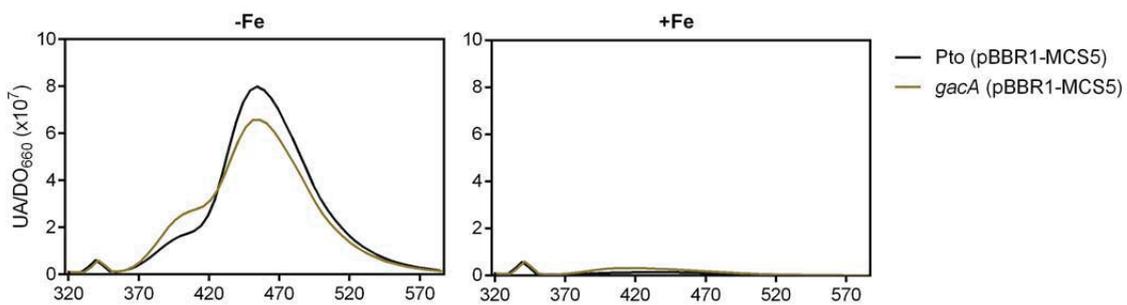


Figura R27. Espectro de fluorescencia del sobrenadante del mutante *gacA*. Fluorescencia de los sobrenadantes de cultivos líquidos de las cepas indicadas. Los cultivos se ajustaron a  $DO_{660}=0,05$  y se incubaron a  $20^{\circ}C$  y en agitación en medio MMR\* durante 48 h (-Fe) o durante 24 h en MMR\* con  $100 \mu M$  de hierro (+Fe). Las gráficas corresponden al espectro de emisión desde 320 a 590 nm de las muestras excitadas a 305 nm, expresada en unidades arbitrarias (UA) normalizadas por la  $DO_{660}$  del cultivo. Se eligió un experimento representativo de entre tres réplicas biológicas independientes.

Para determinar qué proteínas CsrA contribuyen al fenotipo observado en el mutante *gacA* provocando un efecto más significativo, se analizaron los sobrenadantes de la cepa silvestre sobreexpresando todas las variantes de *csrA* presentes en Pto DC3000 (Figura R28). Los espectros de fluorescencia de los sobreexpresantes de *csrA1*, *csrA4* y *csrA5* resultaron indistinguibles del de la cepa silvestre. Sin embargo, la sobreexpresión de *csrA2* y *csrA3* provocó un aumento del pico de emisión a 410 nm (yersiniabactina y/o precursores) y un descenso de la emisión a 450 nm (pioverdina) de forma más acusada que en el mutante *gacA*. Por tanto, se seleccionaron los mutantes *csrA2* y *csrA3* para continuar con su estudio.

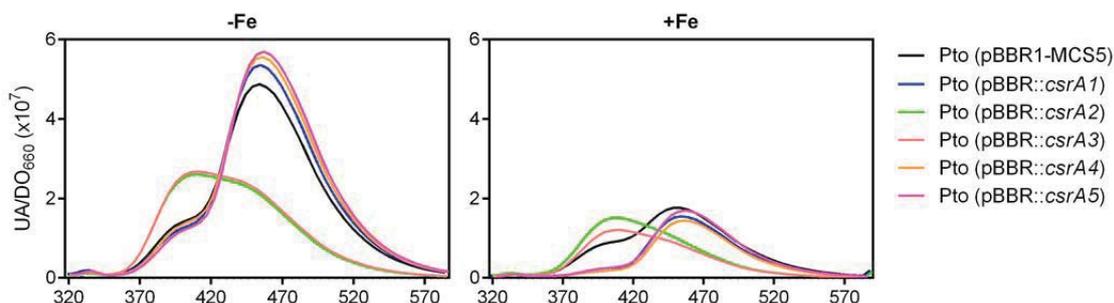


Figura R28. Espectros de fluorescencia de sobrenadantes de Pto DC3000 sobreexpresando distintos *csrA*. Los cultivos de las cepas indicadas se ajustaron a  $DO_{660}=0,05$  y se incubaron a  $20^{\circ}C$  y en agitación en medio MMR\* durante 48 h sin hierro (-Fe) o con  $50 \mu M$  de hierro (+Fe). Las gráficas muestran el espectro de emisión de los sobrenadantes de cultivos (sin filtrar) de las cepas indicadas excitadas a 305 nm, expresado en unidades arbitrarias (UA) normalizadas por la  $DO_{660}$  del cultivo. Se eligió un experimento representativo de entre tres réplicas biológicas independientes.

En primer lugar, se cuantificó espectrofotométricamente la producción de pioverdina en la cepa silvestre y en los mutantes *csrA2* y *csrA3*, que no reveló diferencias significativas entre ellos (Figura R29A). Sin embargo, ambos complementantes mostraron una reducción de la *ratio* de producción, que fue más acusada en el caso de *csrA3*. Al estudiar el patrón de fluorescencia de los sobrenadantes de esas cepas, el mutante *csrA2* se comportó como la cepa silvestre, mientras que en el mutante *csrA3* se observa un descenso de la emisión a 410 nm (Figura R29B). Los complementantes de *csrA2* y *csrA3* mostraron un desplazamiento del máximo hacia longitudes de onda menores solapando con el máximo a 410 nm, que es mayor que en la cepa silvestre, siguiendo un patrón similar al de sus correspondientes sobreexpresantes en la cepa silvestre (Figura R28). Los sobrenadantes de los cultivos crecidos en presencia de hierro no produjeron pioverdina (Figura R29A) y mostraron unos niveles menores de fluorescencia con un patrón similar a sus correspondientes cultivos sin hierro (Figura R28B).

Por tanto, las proteínas Csr2 y Csr3 reprimen la producción de pioverdina e inducen la ruta biosintética de la yersiniabactina en condiciones de deficiencia de hierro.

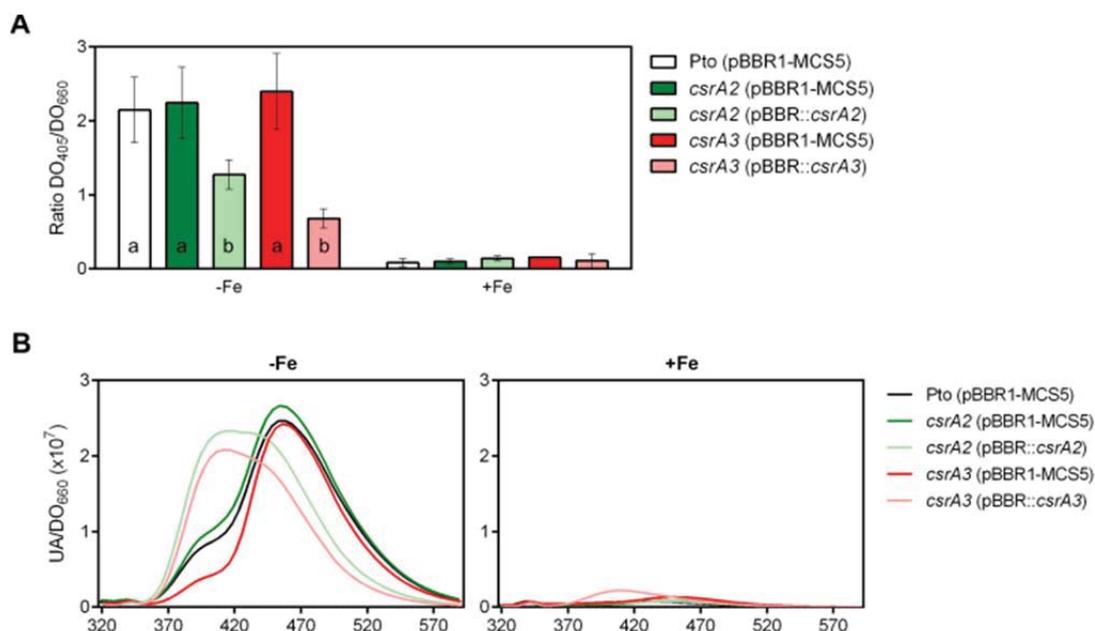


Figura R29. Efecto de Csr2 y Csr3 sobre la producción de sideróforos.

A. Medidas de la producción de pioverdina en sobrenadantes de la cepa silvestre y los mutantes *csrA2*, *csrA3* con sus respectivos complementantes. Los cultivos se ajustaron a  $DO_{660}=0,05$  y se incubaron en MMR\* durante 48 h (-Fe) o durante 24 h en MMR\* con  $100 \mu\text{M}$  de hierro (+Fe). Se representa la producción de pioverdina como la media de la absorbancia a 405 nm normalizada por la densidad celular del cultivo (absorbancia a 660 nm) correspondiente a tres experimentos independientes; las barras de error corresponden a la desviación típica. En MMR\*, las letras a-b representan las categorías con diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) establecidas por ANOVA. En MMR\* +Fe no se detectan diferencias significativas entre las muestras. B. Espectros de emisión de fluorescencia de los sobrenadantes de la cepa silvestre, los mutantes *csrA2* y *csrA3* sus correspondientes complementantes crecidos a  $20^\circ\text{C}$  durante 48 h en MMR\*. En la gráfica se muestra la emisión desde 320 a 590 nm expresada en unidades arbitrarias (UA) normalizadas por la  $DO_{660}$  del cultivo. Se eligió un experimento representativo de entre tres réplicas biológicas independientes.

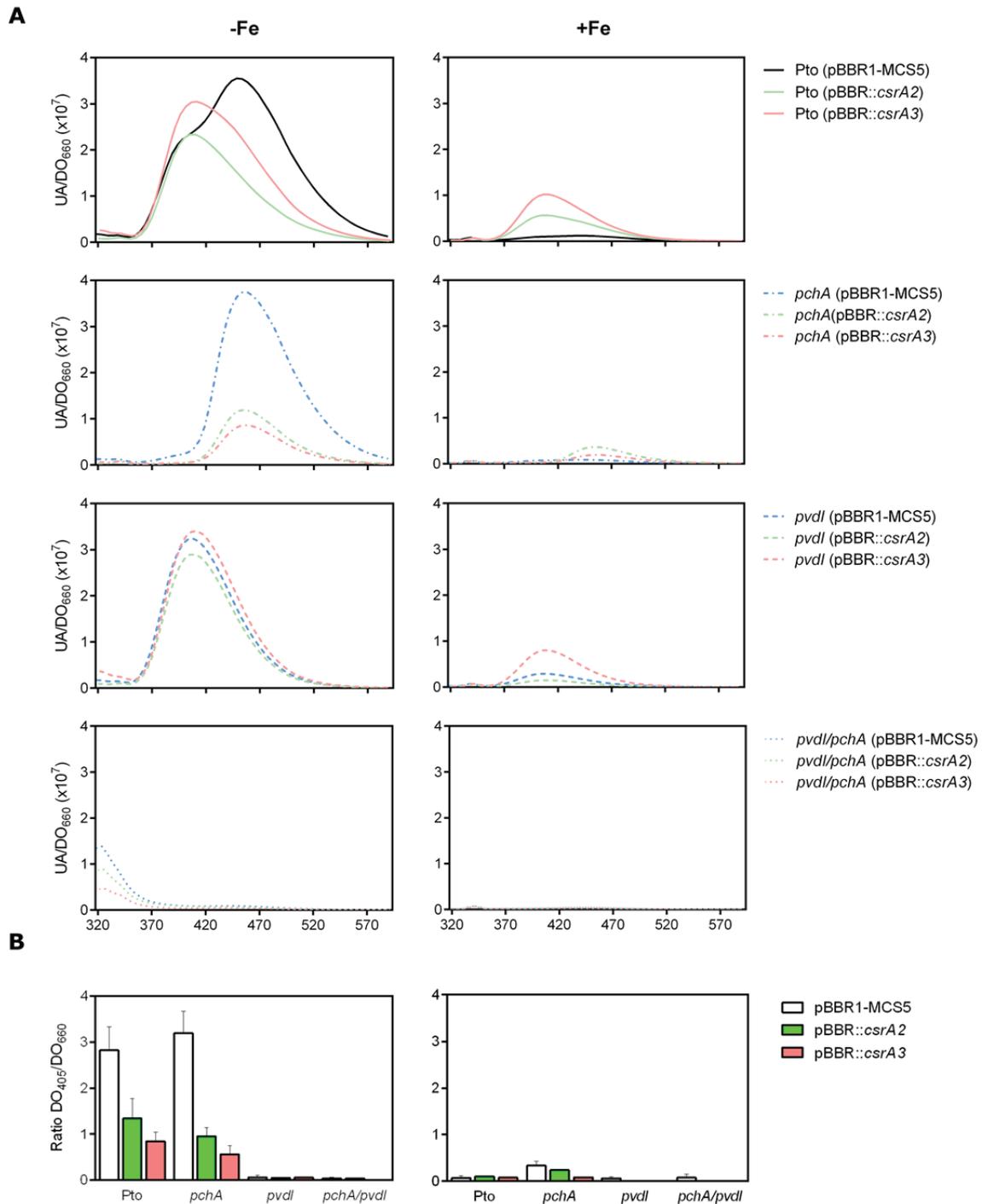
Sin embargo, estos ensayos no permiten distinguir si estas proteínas controlan ambas rutas o si ejercen su efecto sobre una de ellas y la otra se ve afectada de forma secundaria. Para analizar de manera independiente los efectos causados por Csr2 y Csr3 sobre los máximos a 410 y 450 nm, se procedió a sobreexpresarlos en los mutantes *pchA* y *pvdI*, ya que producen solo uno de ellos (Figura R30A). En el mutante *pchA*, ambas sobreexpresiones provocaron un descenso del máximo a 450 nm correspondiente al sideróforo pioverdina, de manera similar a lo ocurrido en la cepa silvestre; lo que se corroboró midiendo la producción de pioverdina espectrofotométricamente (Figura R30B). Esto indica que la represión de la síntesis de pioverdina por Csr3 y Csr2 es independiente de *pchA*. Por otro lado, ni Csr2 ni Csr3 provocan un aumento del máximo a 410 nm, de forma similar a lo observado anteriormente en la cepa silvestre sobreexpresando Csr2 y Csr3 o en los complementantes de *csrA2* y *csrA3* (Figura R29). En el doble mutante, utilizado como control negativo, no se observa emisión ni a 410 ni a 450 nm. En consonancia con lo observado anteriormente, todos los cultivos crecidos en abundancia de  $\text{FeCl}_3$  en el medio presentaron menor fluorescencia.

Con respecto al pico de emisión a 410 nm, cabe mencionar que, aunque variable entre experimentos, el valor máximo se obtuvo con la cepa silvestre, y el efecto de Csr2 y Csr3 varió en función de los niveles basales de

cada experimento. Cuando los niveles eran bajos, la expresión de CsrA2 y CsrA3 los aumentó notablemente (Figuras R28 y R29B), mientras que el aumento fue pequeño o imperceptible sobre niveles basales más elevados (Figura R30).

Durante los experimentos se observó que el mutante *pvdI* presentaba deficiencias en el crecimiento, por lo que se planteó la posibilidad de que la imposibilidad de detectar el efecto de CsrA2 y CsrA3 fuese una consecuencia secundaria de este problema y se decidió profundizar en este aspecto estudiando el crecimiento de cultivos con y sin hierro. La tasa de crecimiento del mutante *pvdI* fue muy reducida en condiciones limitantes de hierro, por lo que podía no ser fiable para evaluar el papel de CsrA sobre la producción del compuesto con el máximo de emisión a 410 (Figura R31). Sin embargo, el mutante fue capaz de crecer mejor en medio suplementado con hierro y, aunque la producción del compuesto es mucho menor en estas condiciones, en este caso sí se observa que la sobreexpresión de CsrA3 genera un pico mayor a 410 nm y también aumenta el crecimiento (Figura R30). El mutante *pchA* presenta un mayor crecimiento que la cepa silvestre en condiciones de deficiencia de hierro (Figura R31), como ya había sido observado anteriormente por Jones *et al.* (2007). Curiosamente, esta cepa crece peor que la silvestre cuando el medio se suplementa con hierro, indicando que las variaciones de crecimiento no están producidas por la ausencia del sideróforo sino por una alteración de la señalización. Por otro lado, el crecimiento del doble mutante coincide con el efecto combinado de los fenotipos observados para los mutantes simples, en medio con y sin hierro (Figura R31). El papel de CsrA2 y CsrA3 como promotores del crecimiento de la bacteria se pudo apreciar prácticamente en todas las cepas y medios ensayados, siendo mayor el efecto de CsrA3, lo que indica que regula procesos más importantes para el crecimiento que la presencia de sideróforos (Figura R30).

En resumen, los resultados obtenidos permiten establecer que CsrA2 y CsrA3 regulan la producción de pioverdina y yersiniabactina y/o precursores de forma independiente, reprimiendo la síntesis de pioverdina y activando la síntesis de yersiniabactina y/o alguno de sus precursores fluorescentes. Asimismo, se demuestra que el aumento de la tasa de crecimiento de las cepas que sobreexpresan CsrA3 y CsrA2 no está relacionado con la producción de sideróforos.



**Figura R30. Efecto de CsrA2 y CsrA3 en los mutantes deficientes en la producción de pioverdina y yersiniabactina.**

Espectros de emisión de fluorescencia (**A**) y ratios de producción de pioverdina (**B**) de los sobrenadantes de la cepa silvestre y los mutantes *pchA*, *pvdI* y *pchA/pvdI* portando los plásmidos pBBR1-MCS5, pBBR::*csrA2* y pBBR::*csrA3* crecidos a 20°C durante 48 h en MMR\* (-Fe) o durante 24 h en MMR\* con 100  $\mu$ M de hierro (+Fe). **A**. En la gráfica se muestra la emisión desde 320 a 590 nm expresada en unidades arbitrarias (UA) normalizadas por la DO<sub>660</sub> del cultivo. Se eligió un experimento representativo de entre tres réplicas biológicas independientes. **B**. Se representa la producción de pioverdina como la media de la absorbancia a 405 nm normalizada por la densidad celular del cultivo (absorbancia a 660 nm), las barras de error corresponden a la desviación típica.

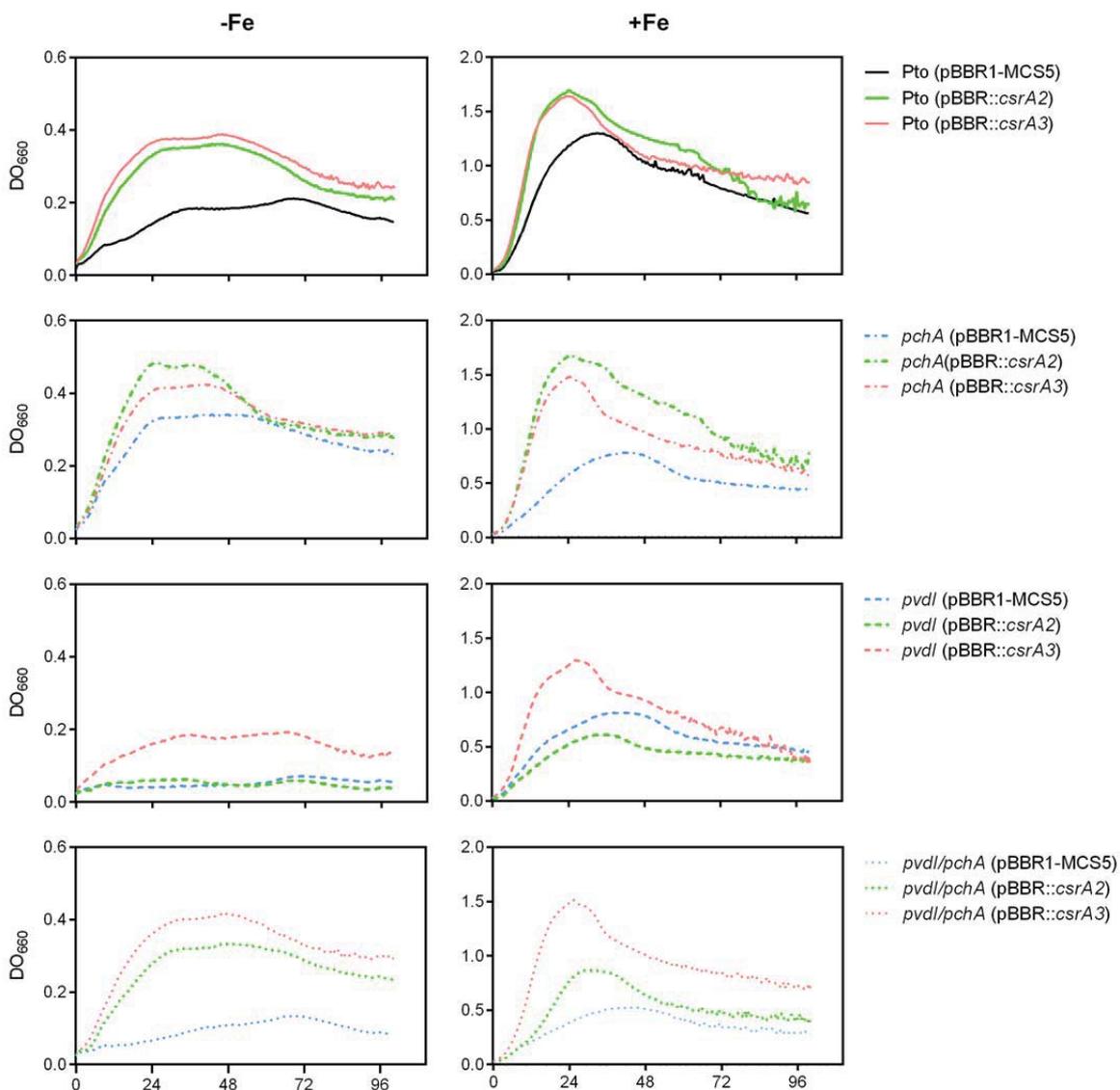


Figura R31. Curvas de crecimiento de los mutantes en sideróforos sobreexpresando CsrA2 y CsrA3. Curvas de crecimiento de Pto y los mutantes *pchA*, *pvdI* y *pchA/pvdI* portando los plásmidos pBBR1-MCS5, pBBR::*csrA2* y pBBR::*csrA3* en medio MMR\* (-Fe) y MMR\* suplementado con 60  $\mu$ M de FeCl<sub>3</sub> a 20°C. Los cultivos se inocularon a DO<sub>660</sub>=0,05 y se incubaron durante 96 h en condiciones de agitación, midiendo la absorbancia a 660 nm cada 30 min en un Bioscreen C.

### 5.3. Identificación del compuesto detectado a 410 nm

El mutante *pchA* carece del enzima que cataliza la transformación de corismato a isocorismato, precursor necesario para la síntesis de ácido salicílico (SA) y que, a su vez, es precursor de la yersiniabactina (Pelludat *et al.*, 2003). En los sobrenadantes de los cultivos del mutante *pchA* desaparece el máximo de emisión a 410 nm que se observa en los sobrenadantes de las cepas con este gen intacto. Se plantearon varias posibilidades: que se tratase del SA, ya que este compuesto es fluorescente; que fuera yersiniabactina, dado que el mutante *pvdI* la produce en las condiciones ensayadas (Figura R23) y en su sobrenadante se detectó el máximo a 410 nm (Figura R26B); que se debiese a una mezcla de ambos, o que fueran otros precursores de la yersiniabactina. Por tanto, se

intentaron desarrollar protocolos para detectar de forma diferencial yersiniabactina y SA en los sobrenadantes de distintas cepas, particularmente en aquellas que presentaban el pico de emisión a 410 nm.

En primer lugar, se evaluó el espectro de fluorescencia del SA disuelto en MMR\* con un protocolo similar al utilizado para los sobrenadantes de los cultivos celulares analizados anteriormente. El máximo de emisión del SA fue de 410 nm, lo que permitió relacionarlo con la presencia de este compuesto o alguna molécula que lo contenga en su estructura y además, la adición de hierro provocó un descenso en la fluorescencia que también se había observado en los sobrenadantes de cultivos (no mostrado).

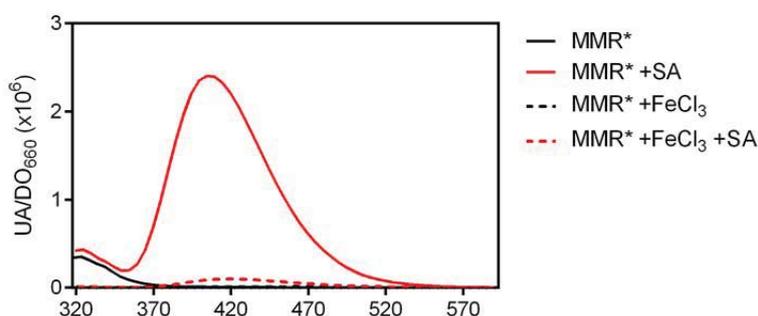


Figura R32. Espectros de fluorescencia del ácido salicílico en medio MMR.

Espectros de emisión de fluorescencia de MMR\* con 10  $\mu$ M de SA disuelto en MMR\* en ausencia y presencia de 1 mM FeCl<sub>3</sub> tras excitar las muestras a 305 nm. En la gráfica se muestra la emisión desde 320 a 590 nm expresada en unidades arbitrarias (UA) normalizadas por la DO<sub>660</sub> del cultivo.

La detección y cuantificación diferencial de SA y yersinabactina se llevó a cabo utilizando técnicas de cromatografía líquida y espectrometría de masas. El SA se detectó por HPLC utilizando su espectro de fluorescencia y se cuantificó su producción por extrapolación a partir de una recta patrón del compuesto puro diluido en medio de cultivo (Figuras R33 y R35). En el caso de la yersiniabactina, como no se disponía de un patrón, se detectó su presencia por comparación con los controles negativos utilizando HPLC con un detector de UV y se confirmó su identidad primero por su espectro de absorbancia y después por LC-MS, coincidiendo con lo observado previamente por Jones *et al.* (2007) (Figura R34). La producción de yersiniabactina se cuantificó midiendo el área de la señal detectada en el cromatograma de LC-MS correspondiente este compuesto y refiriéndola al total producido por la cepa silvestre (Figura R35).

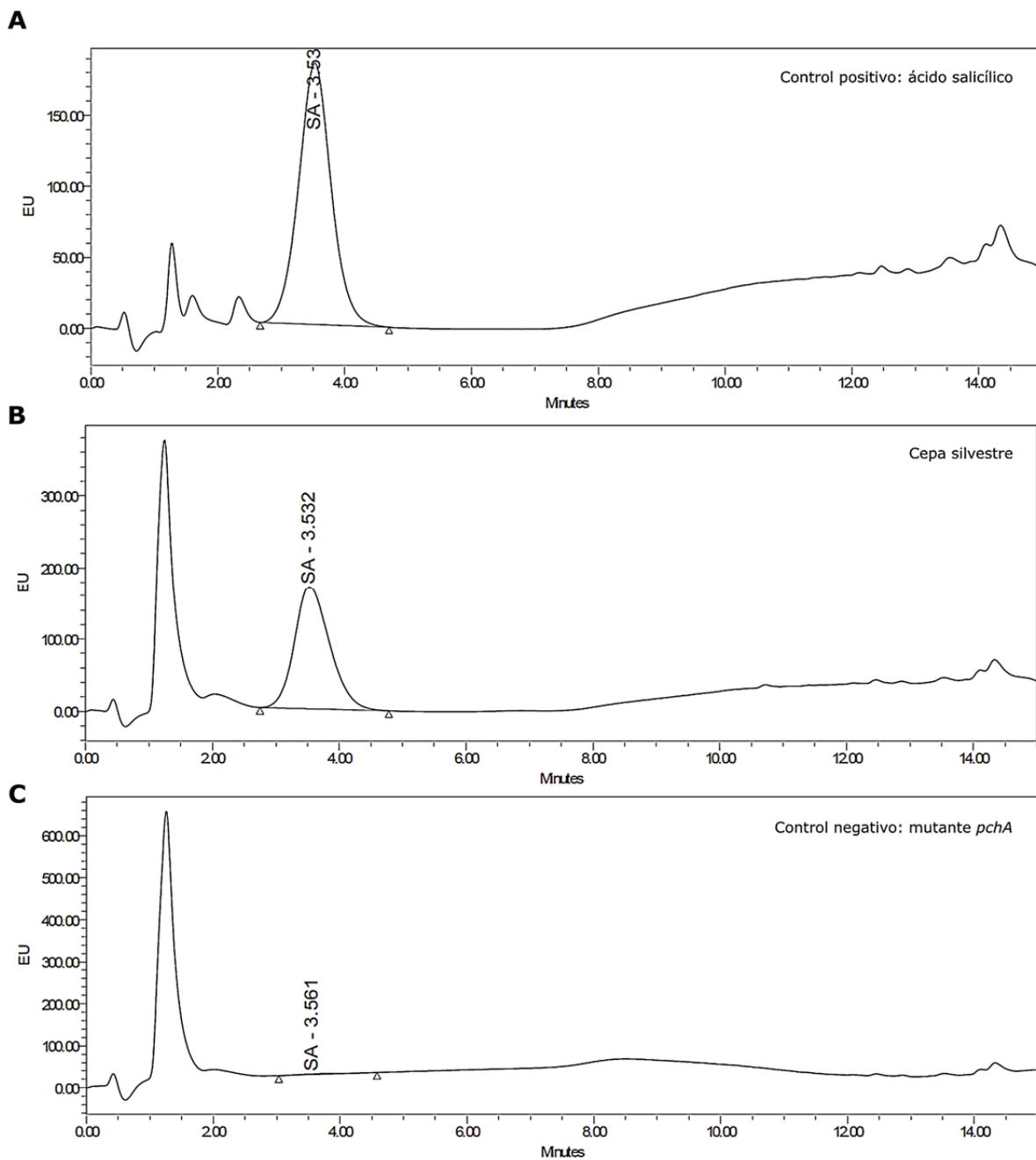


Figura R33. Detección de ácido salicílico en sobrenadantes de cultivos.

Las muestras utilizadas fueron los mismos sobrenadantes analizados en los experimentos de fluorimetría (Figura R29 y Apéndice K), que se llevaron a pH~2,0 añadiendo ácido acético glacial para estabilizar el compuesto y se inyectaron en un HPLC con detector de fluorescencia. Se muestra la señal de fluorescencia obtenida durante la cromatografía expresada en unidades arbitrarias (EU) de un control positivo (A) de SA diluido en MMR\*, sobrenadante de un cultivo de la cepa silvestre (B) y un control negativo (C) consistente en el sobrenadante de un mutante defectivo en la producción de SA. El tiempo de retención determinado para el compuesto fue de 3,5 min.

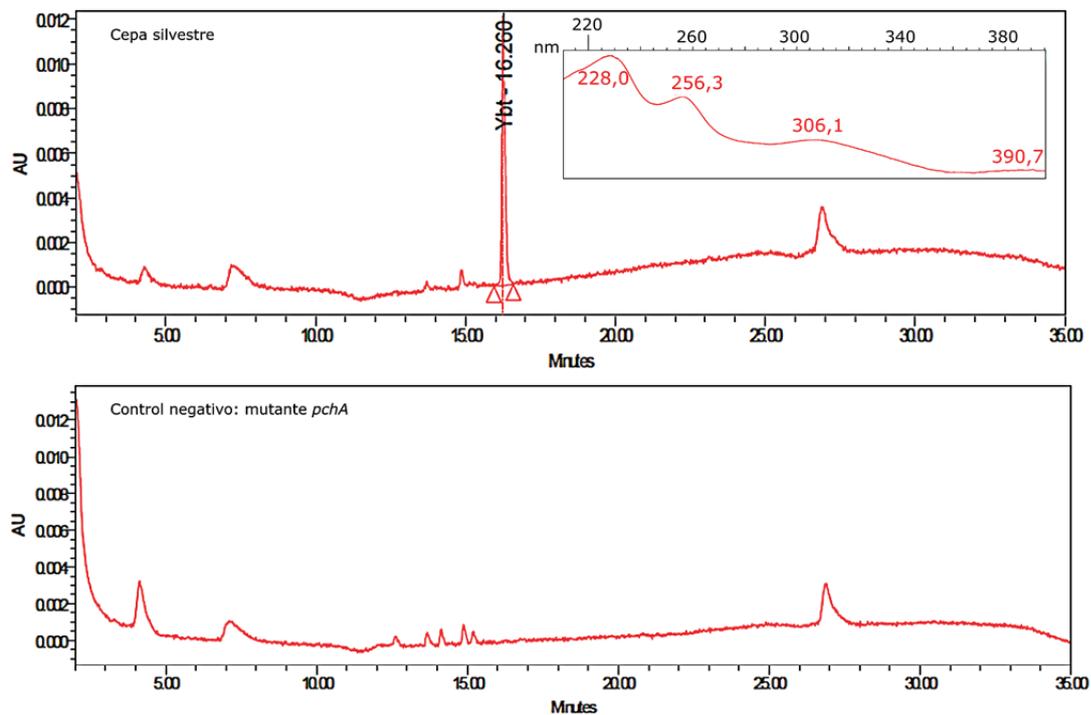
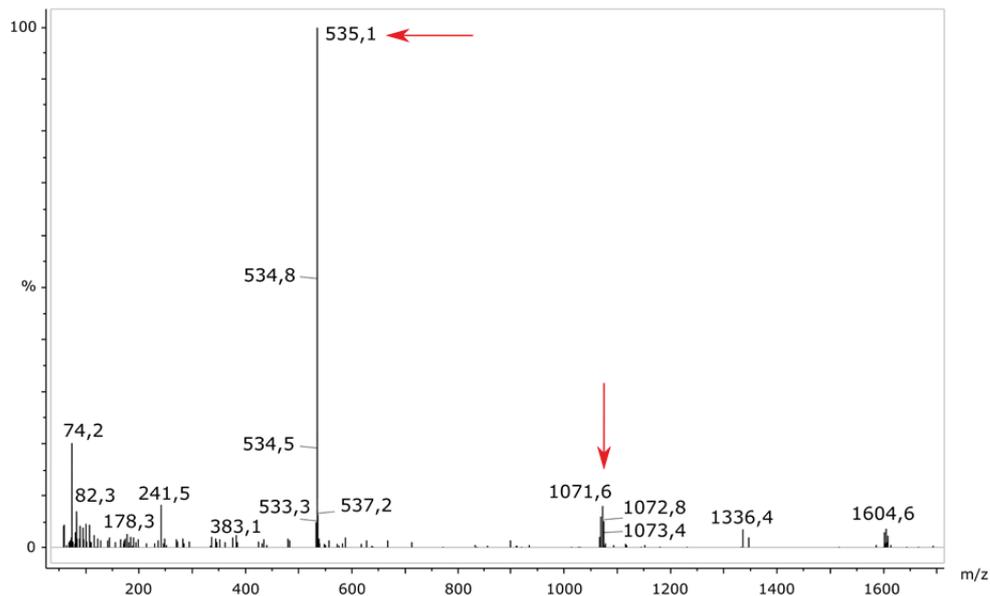
**A****B**

Figura R34. Detección de yersiniabactina en sobrenadantes de cultivos.

Las muestras utilizadas fueron los mismos sobrenadantes analizados en los experimentos de fluorimetría (Figura R29 y Apéndice K). El compuesto se estabilizó para su medida añadiendo  $\text{FeCl}_3$  a una concentración final de 1 mM y se analizó por HPLC con detector DAD acoplado a LC-MS. A. Se muestra la señal de absorbancia a 385 nm obtenida durante la cromatografía, expresada en unidades arbitrarias (AU), de los sobrenadante de la cepa silvestre (arriba) y un control negativo (abajo) consistente en el sobrenadante de un mutante defectivo en la producción de SA. El tiempo de retención determinado para el compuesto fue de 16,3 min y su identidad se confirmó por su espectro de absorbancia (arriba, esquina superior derecha). B. Patrón de m/z obtenido por LC-MS del compuesto detectado. Las m/z= 535 y 1069 (flecha) se corresponden respectivamente con el monómero y el dímero de yersiniabactina asociada a hierro.

La mayor variación en el pico a 410 nm con respecto a la cepa silvestre se había observado en el mutante *csrA3* y su complementante, por lo que se cuantificó la producción de SA y yersiniabactina de estas cepas junto a la silvestre y los mutantes *pchA*, *pvdI* y *pchA/pvdI* utilizados como controles (Figura R35A y B). Ambos compuestos se detectaron en todas las cepas, excepto en los mutantes en *pchA* (simple o doble), presentando el mutante *pvdI* una producción similar a de la cepa silvestre. Otro control utilizado fue medio MMR\* con y sin 10  $\mu\text{M}$  de SA, donde solo se detectó SA en el medio al que se le había añadido y no se detectó yersiniabactina en ninguno de ellos (Figura R35C). La producción de yersiniabactina no se vio afectada en el mutante *csrA3* ni en su complementante, mientras que los niveles de SA fueron menores en el mutante y mayores en el complementante con respecto a la cepa silvestre. De estos resultados se concluye que el compuesto con un máximo de emisión a 410 nm cuya producción inducen CsrA2 y CsrA3 se corresponde con el SA, ya que la producción de yersiniabactina no se ve alterada por dichas proteínas.

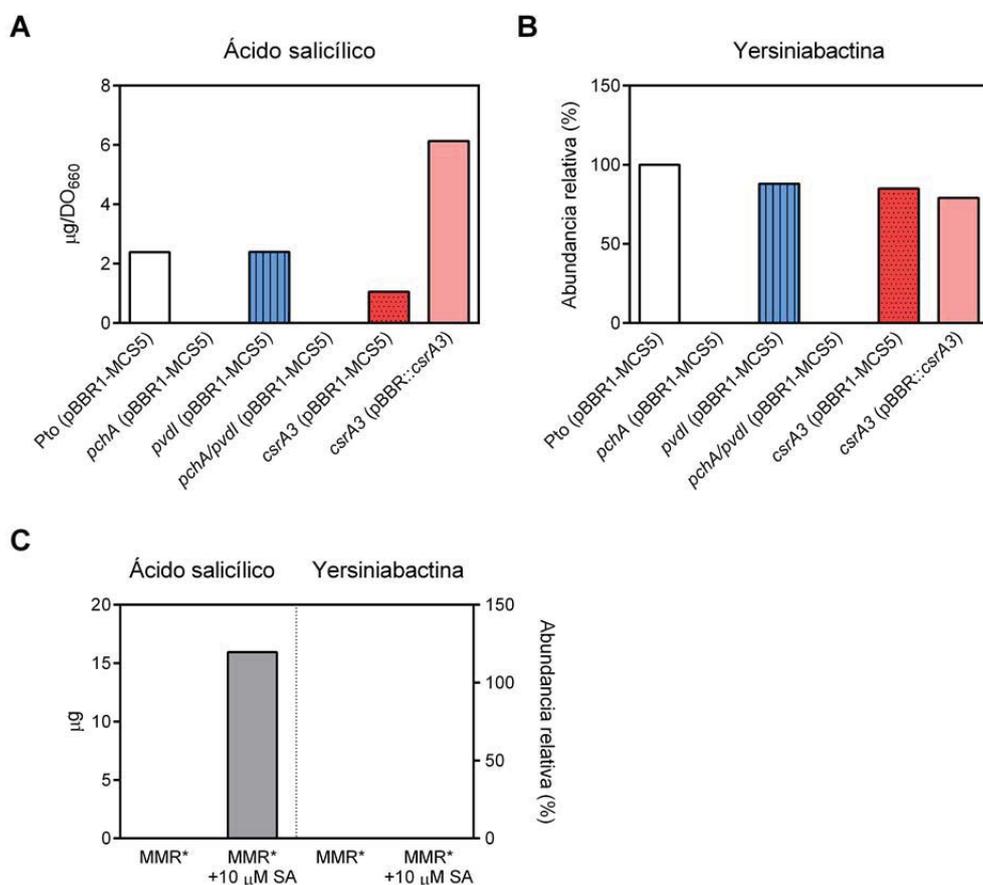


Figura R35. CsrA3 induce la acumulación de ácido salicílico, pero no de yersiniabactina.

Las gráficas muestran la cuantificación de SA (A) y yersiniabactina (B) en la cepa silvestre, el mutante *csrA3* y su correspondiente complementante utilizando como controles mutantes deficientes en la síntesis de sideróforos *pchA*, *pvdI* y *pchA/pvdI*. Los resultados mostrados son las cuantificaciones de ambos compuestos en la misma muestra, utilizando muestras de un ensayo representativo de tres réplicas biológicas independientes. C. Control de detección de SA y yersiniabactina en medio MMR\* solo y MMR\* con SA siguiendo los mismos protocolos que para los sobrenadantes.



## Capítulo III. Los ARN no codificantes *rsm*

Los 7 ARN tipo *rsm* de Pto DC3000 presentan un tamaño pequeño (112 a 132 nt) y están repartidos por el genoma, excepto *rsmX3* y *rsmX4*, que están situados en tándem. La enorme similitud existente entre las variantes de *rsmX* (Figura R36) ha llevado a otros autores a proponer que su papel es el ajuste fino del sistema, con *rsmY* y *rsmZ* actuando de manera menos específica (Moll *et al.*, 2010). *rsmY* y *rsmZ* son muy similares a los presentes en las otras cepas del género *Pseudomonas* y son los ARN *rsm* de mayor tamaño (126 y 132 nt, respectivamente). Estos dos ARN presentan mayor número de motivos GGA en su secuencia (8) que los *rsmX* (5-7); solo *rsmX4* presenta una abundancia relativa (0,061) similar a *rsmY* y *rsmZ* (0,063 y 0,061, respectivamente) (Tabla R2). Sin embargo, el número de motivos GGA en bucles, que unirían CsrA con alta afinidad, es muy similar para todos los ARN. La estructura secundaria predicha para todos los *rsm* de Pto DC3000, con los motivos GGA señalados, se incluye en el Apéndice L.

```

rsmZ -----UG-UGCCAACGGACAGGCACAGGCC--AUCAAGGAUGACGGUCAAGCAUCGCG-GGAAGCGAUUCA
rsmY ---AUGGACGUAGCGCAAGGAGCGCAACAAGACAUAACAGGGACA-----CGUAGGGAAGC---CUG
rsmX3 --AACAAACUGGUGAACAAAGGAGUUC-ACCAGG---AUCAGGGACGAUCG----ACCAUCGCCGCGGAGGCAGCCG
rsmX4 --AUCAAGUGGUGAACAGGGAGUUC-ACCAGG---AUCAAGGAUGAUCG----ACCAUCGCCUCGGAGGCGGCCG
rsmX5 --AUCAACUGGUGAACAG-GAGUUC-ACCAGG---GUCAAAGGAUGACCG----ACCAUUGCCUUGGAGGCAGCCG
rsmX1 --AUCAACUGCAGCGCAAGGAGCGUUGCAGAG---GUCACGGGAUGAUC----ACCAUUGCCGCGGAGGCUACUG
rsmX2 UCAACAGCUGCAGCGAAGGAA-CGCCGCAGCG---AUCAGGGACGAUCG----ACCAUUGCCAGGA-GGCUACUG
      *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

```

```

rsmZ UCAGGACGAUGACAAGGAAUACAGGGAUUAAAGGACAA--AAUGUGGGCGGGU--CAUACCGCCCCUUUUUUUU--
rsmY CCAGGACGGCGGGU-----GAAAGGGAUUCAGGGAACAGUCUGGAAGCCCGCUUAGGCGGGUUUUUUUU
rsmX3 ACAGGGAGUUGGAU-----G-----GUCUUGGUACAA-----ACCCGCUUCGCGGGUUUUUUUU---
rsmX4 ACAGGAGUUCGGGAU-----G-----GUUCUUGGAAAA-----ACCCGCUUCGCGGGUUUUUUUU---
rsmX5 ACAGGGAGUCGGGAU-----G-----GU-CUUGGGAU-----ACCCGCUUCGCGGGUUUUUUUU---
rsmX1 ACAGGACGUCGGGAU-----G-----GUUUUGAUAGAAA-----AACGACCCGCUUCGCGGGUUUUUUUU--
rsmX2 ACAGGACGUUGGAU-----G-----GUCAUGUU-GCAA-----UACCACCGCUUCGCGGGUUUUUUUU---
      **** *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

```

Figura R36. Secuencia de los ARN *rsm* presentes en Pto DC3000.

Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de los ARN *rsm* de Pto DC3000, con los motivos GGA indicados en rojo. Los asteriscos señalan los nucleótidos que están conservados en todos los ARN (rojo) o en todos los parálogos de *rsmX* (negro).

Tabla R2. Características de los ARN *rsm* de Pto DC3000.

Nombre	Longitud (nt)	Coordenadas (5'→3')	Nº total motivos GGA	Nº motivos GGA en bucles	Abundancia de motivos GGA*
<i>rsmX1</i>	120	3.244.374 <sup>c</sup> – 3.244.255 <sup>c</sup>	5	4	0,042
<i>rsmX2</i>	119	4.170.369 <sup>c</sup> – 4.170.253 <sup>c</sup>	5	4	0,042
<i>rsmX3</i>	114	6.144.830 – 6.144.943	6	4	0,053
<i>rsmX4</i>	114	6.145.122 – 6.145.235	7	5	0,061
<i>rsmX5</i>	112	6.198.149 <sup>c</sup> – 6.198.038 <sup>c</sup>	6	4	0,054
<i>rsmY</i>	126	555.344 – 555.469	8	5	0,063
<i>rsmZ</i>	132	1.728.435 – 1.728.566	8	5	0,061

<sup>c</sup>transcripción desde la hebra complementaria, \*frecuencia calculada como el número de motivos GGA por nucleótido.

## 1. Regulación de la expresión de los ARN *rsm*

Como se ha mencionado anteriormente, el número de motivos de unión con alta afinidad a CsrA que presentan los ARN *rsm* es muy similar, por lo que es probable que sean equivalentes funcionalmente como sus ortólogos en otras bacterias (Kay *et al.*, 2005; Lenz *et al.*, 2005). Por tanto, el sentido biológico de su variabilidad podría radicar más en su expresión diferencial que en sus distintas afinidades por CsrA. Para intentar dilucidar qué papel juega cada uno de ellos y cuál podría ser la señal inductora que activa la ruta Gac-rsm, se evaluó la expresión de estos ARN en distintas condiciones. El hecho de que los ARN *rsmX* presenten una enorme similitud entre ellos, dificulta su detección de manera independiente mediante RT-qPCR, por lo que se decidió abordar el estudio de su expresión midiendo la actividad  $\beta$ -galactosidasa de fusiones transcripcionales de sus promotores al gen '*lacZ*'. En otras *Pseudomonas* se había determinado que los niveles de *rsm* aumentaban en la fase exponencial tardía o en estacionaria, por lo que se empezó a trabajar con cultivos en fase estacionaria tras su incubación durante 3 días en placas de LB, MMR y MMF. Además, se evaluó en paralelo la expresión de los mismos en el mutante *gacA* para conocer su nivel de dependencia de este activador.

De forma general se observa un perfil de actividad de los promotores de los ARN *rsm* similar para los distintos medios ensayados (Figura R37). En función de sus niveles en LB y MMF se pueden establecer tres categorías: la primera formada por *rsmX3*, *rsmX5* y *rsmY*, que presentan una expresión más elevada; la segunda por *rsmX2* y *rsmX4*, con una expresión media; y finalmente, *rsmX1* y *rsmZ*, de expresión más baja. En medio MMR, el patrón fue distinto, con los promotores de *rsmX3*, *rsmX5* y *rsmY* presentando una actividad alta, *rsmX1*, *rsmX2* y *rsmX4* con expresión media y *rsmZ* con expresión baja. Los mayores niveles se detectaron en medio LB, seguido de MMR y MMF. Por tanto, la expresión de *rsm* se ve favorecida en condiciones de cultivo ricas nutricionalmente, mientras que está limitada en cultivos crecidos a partir de una sola fuente de carbono más difícil de metabolizar para Pto DC3000, como es la fructosa (MMF). Estos resultados indican que los niveles de *rsm* aumentan con la densidad poblacional del cultivo, como ya había sido descrito en otras bacterias (Gudapaty *et al.*, 2001; Heeb *et al.*, 2002; Janssen *et al.*, 2018a; Lalaouna *et al.*, 2012b; Lenz *et al.*, 2005; Nakatsu *et al.*, 2019).

La mutación en *gacA* provocó un descenso drástico en los niveles de todos los *rsm*, excepto *rsmX5* y *rsmZ*, que se mantienen similares (Figura R37), por lo que en esta cepa presenta se ha producido una reducción del *pool* total de *rsm* en la célula. Los niveles de *rsmX5* y *rsmZ* no presentaron diferencias significativas con respecto a la cepa silvestre en ninguno de los tres medios ensayados, mientras que *rsmX1* únicamente sufrió un descenso significativo en MMR (6,3 veces). El resto de ARN *rsm* descendieron de 3,7-5,0 veces en LB, de 8,0-12,1 veces en MMR y de 2,8-34,2 veces en MMF. Los niveles de *rsmX3* fueron los más dependientes de *gacA* en LB y MMR, descendiendo 5,0 veces en LB y 12,1 en MMR con respecto a la cepa silvestre. En MMF, el ARN más afectado por la mutación en *gacA* fue *rsmX4*, con una disminución de sus niveles de 34,2 veces. Curiosamente, el efecto de la mutación en *gacA* no fue equivalente en los distintos medios, sino que los niveles de los ARN dependientes de GacA descendieron proporcionalmente más en MMR que en LB y MMF. Esto indica que en medio MMR los

niveles basales de expresión de *rsm* son menores cuando GacA no está activo y que la señalización por GacS/GacA actúa como principal modulador de la expresión de los *rsm* dependientes del RR.

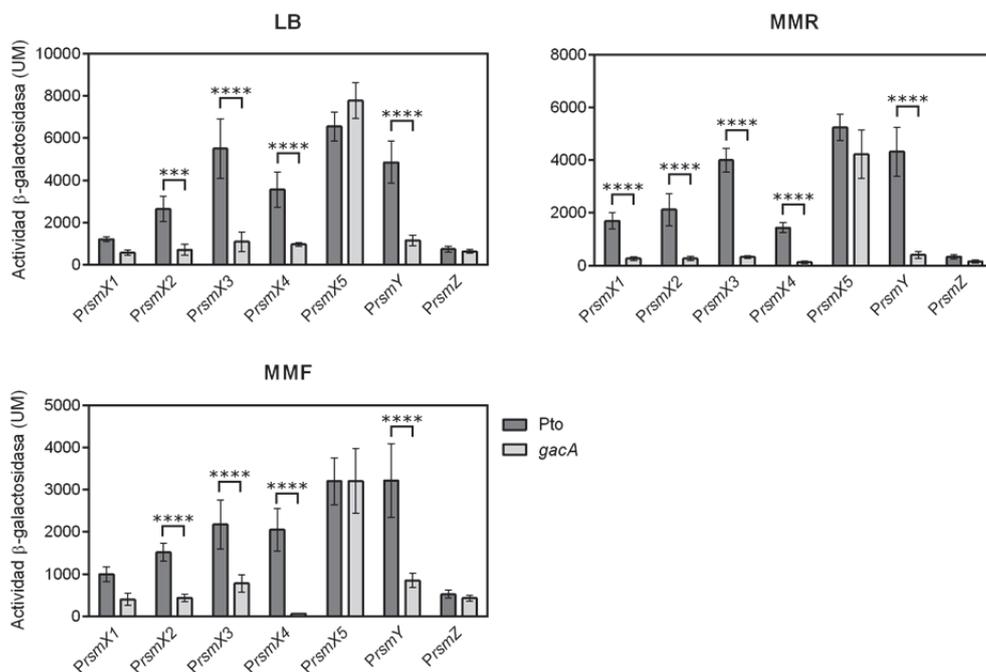


Figura R37. Actividad de los promotores de los ARN *rsm* de Pto DC3000 en medios sólidos. Actividad β-galactosidasa de fusiones transcripcionales al gen *lacZ* de los promotores de todos los ARN *rsm* de Pto DC3000 medidos a partir de cultivos en medio sólido LB, MMR y MMF incubados 3 días a 20°C. Las gráficas representan las medias de actividad β-galactosidasa (en unidades Miller) de la cepa silvestre (gris oscuro) y el mutante *gacA* (gris claro), con sus respectivas las barras de error que corresponden a la desviación estándar. Las diferencias entre las dos cepas se analizaron estadísticamente utilizando un test t para cada promotor y medio ensayado. Se consideraron significativas las diferencias con  $p < 0,1$  y los asteriscos representan  $p < 0,01$  (\*\*\*) y  $p < 0,01$  (\*\*\*\*).

A continuación, se evaluó la expresión de las mismas construcciones en función de la densidad celular, utilizando cultivos crecidos en medio líquido. Para ello, se realizaron diluciones seriadas de las suspensiones bacterianas en una placa multipocillo y se incubaron para reproducir varios puntos de la curva de crecimiento.

En medio LB, la expresión de los promotores de *rsmX1-4*, *rsmY* y *rsmZ* aumentó de manera prácticamente lineal al aumentar la densidad óptica (Figura R38), cesando el aumento de *rsmX1*, *rsmX4*, *rsmY* y *rsmZ* tras alcanzar densidades celulares 4,0, mientras que para *rsmX2* y *rsmX3* siguió aumentando. Por su parte, la actividad del promotor de *rsmX5* mantuvo unos niveles prácticamente constantes y elevados a lo largo de toda la curva de crecimiento. En MMR, todos los promotores muestran niveles reducidos de actividad a bajas densidades ópticas y sufren un incremento considerable con la densidad óptica, que es especialmente notorio a partir de  $DO_{660} \sim 4,0$ , sin que se llegue a observar una meseta a mayores densidades celulares (Figura R39). En cuanto a MMF, la expresión aumenta de forma lineal con la densidad celular, aunque en el caso de *rsmX2-4* y *rsmZ*, se reduce a partir de  $DO_{660} \sim 4,0$  (Figura R40).

Los resultados obtenidos para la cepa silvestre muestran que existen patrones diferentes de expresión de los distintos promotores de *rsm* en función de medio de cultivo, tanto en los niveles de expresión como en la relación con la densidad celular. Este aspecto podría depender del tipo de fuente de carbono presente, relación carbono/nitrógeno, de la presencia de compuestos concretos o de otras características del medio como el pH. Al igual que se observó en medio sólido, la actividad de los promotores de *rsm* fue mayor en LB, seguido de MMR y MMF, y también se pueden establecer categorías de genes en función de su expresión: alta para *rsmX3*, *rsmX5* y *rsmY*, variable para *rsmX2* y *rsmX4*, y baja para *rsmX1* y *rsmZ*. El hecho de que la expresión de los promotores *rsm* sea similar tanto en cultivo sólido como en líquido sugiere que la detección de superficie no está implicada en la expresión de estos ARN, a diferencia de lo que ocurre en *P. aeruginosa* (Jean-Pierre *et al.*, 2016).

La mutación en *gacA* provocó un efecto equivalente en todos los medios ensayados. La actividad de los promotores de *rsmX2*, *rsmX3*, *rsmX4* y *rsmY* descendió drásticamente, mientras que los niveles de *rsmX1* y *rsmZ* se vieron menos afectados. En el caso de *rsmX5*, no se observan diferencias en el mutante *gacA* con respecto a la cepa silvestre y la actividad de su promotor aumenta en mayor medida a altas densidades celulares, llegando incluso a superarla.

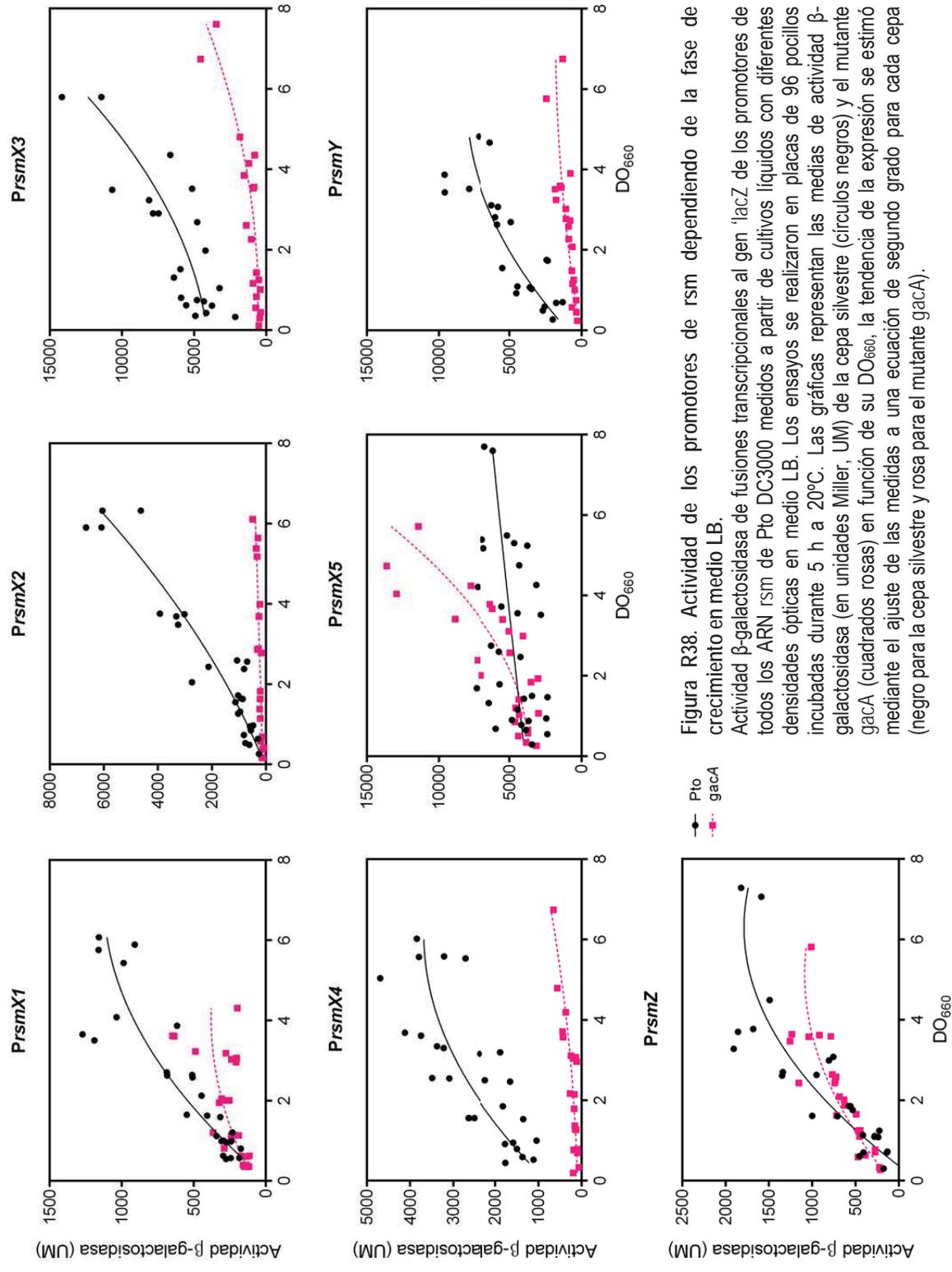


Figura R38. Actividad de los promotores de rsm dependiendo de la fase de crecimiento en medio LB. Actividad β-galactosidasa de fusiones transcripcionales al gen 'lacZ' de los promotores de todos los ARN rsm de Pto DC3000 medidos a partir de cultivos líquidos con diferentes densidades ópticas en medio LB. Los ensayos se realizaron en placas de 96 pocillos incubadas durante 5 h a 20°C. Las gráficas representan las medias de actividad β-galactosidasa (en unidades Miller, UM) de la cepa silvestre (círculos negros) y el mutante gacA (cuadrados rosas) en función de su DO<sub>660</sub>, la tendencia de la expresión se estimó mediante el ajuste de las medidas a una ecuación de segundo grado para cada cepa (negro para la cepa silvestre y rosa para el mutante gacA).

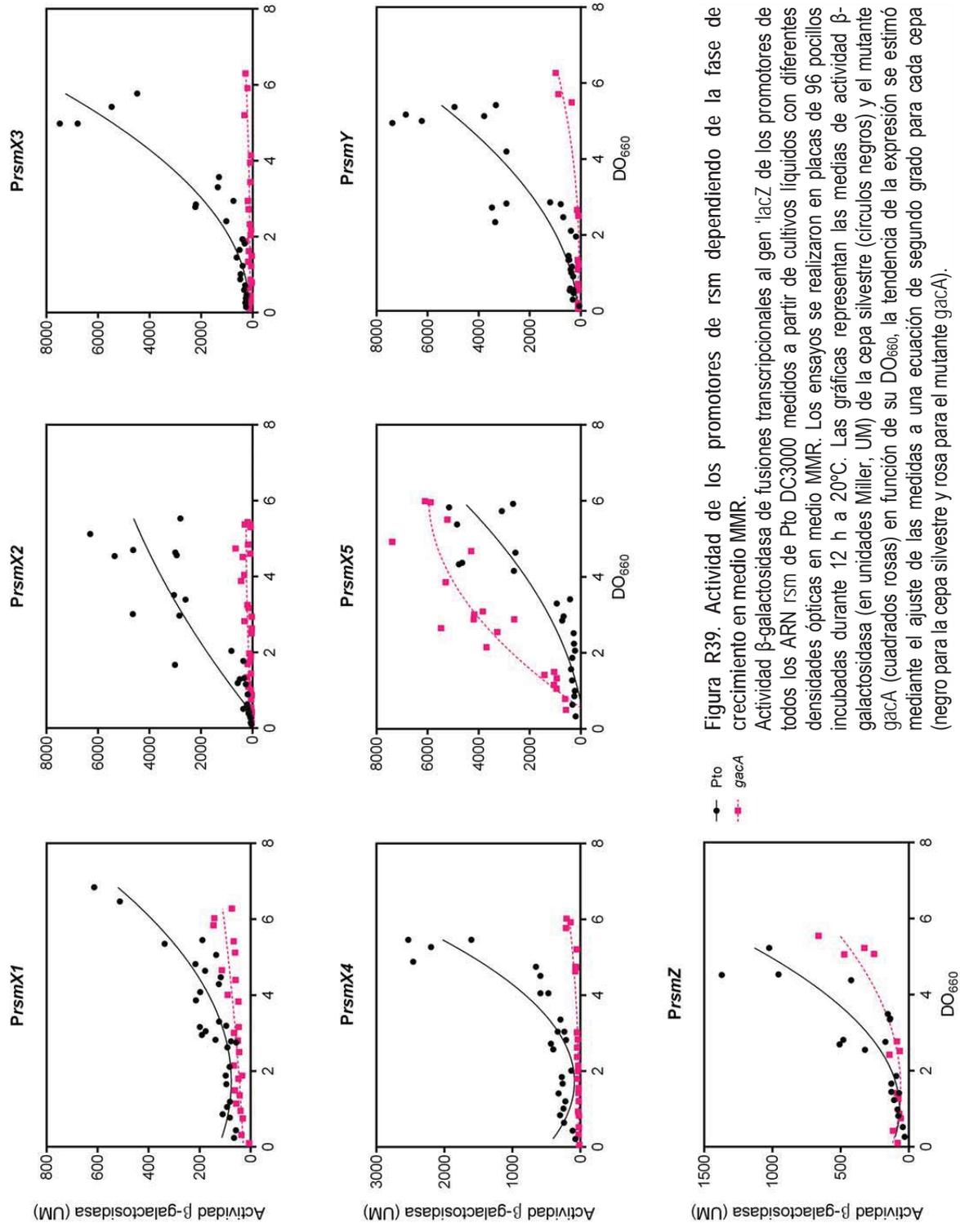


Figura R39. Actividad de los promotores de rsm dependiendo de la fase de crecimiento en medio MMR. Actividad  $\beta$ -galactosidasa de fusiones transcripcionales al gen 'lacZ' de los promotores de todos los ARN rsm de Pto DC3000 medidos a partir de cultivos líquidos con diferentes densidades ópticas en medio MMR. Los ensayos se realizaron en placas de 96 pocillos incubadas durante 12 h a 20°C. Las gráficas representan las medias de actividad  $\beta$ -galactosidasa (en unidades Miller, UM) de la cepa silvestre (círculos negros) y el mutante gacA (cuadrados rosas) en función de su DO<sub>660</sub>; la tendencia de la expresión se estimó mediante el ajuste de las medidas a una ecuación de segundo grado para cada cepa (negro para la cepa silvestre y rosa para el mutante gacA).

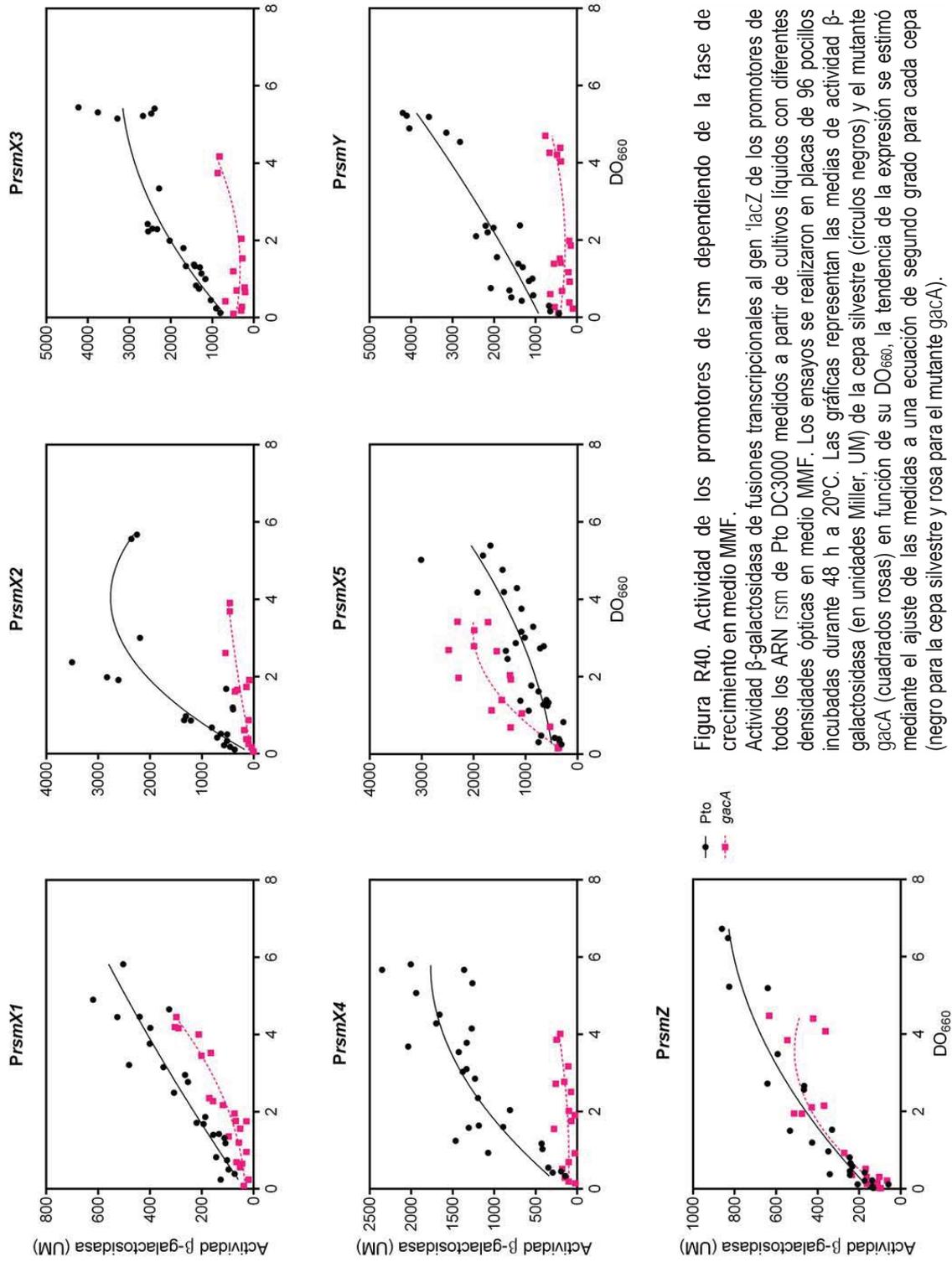


Figura R40. Actividad de los promotores de rsm dependiendo de la fase de crecimiento en medio MMF. Actividad β-galactosidasa de fusiones transcripcionales al gen 'lacZ' de los promotores de todos los ARN rsm de Pto DC3000 medidos a partir de cultivos líquidos con diferentes densidades ópticas en medio MMF. Los ensayos se realizaron en placas de 96 pocillos incubadas durante 48 h a 20°C. Las gráficas representan las medias de actividad β-galactosidasa (en unidades Miller, UM) de la cepa silvestre (círculos negros) y el mutante gacA (cuadrados rosas) en función de su DO<sub>660</sub>; la tendencia de la expresión se estimó mediante el ajuste de las medidas a una ecuación de segundo grado para cada cepa (negro para la cepa silvestre y rosa para el mutante gacA).

Los niveles de actividad observados experimentalmente para los promotores de *rsm* pueden relacionarse con el grado de conservación de sus regiones -35 y -10 con respecto a las secuencias consenso de  $\sigma^{70}$ , mientras que la regulación por GacA depende de la secuencia de la caja Gac (Tabla R3). Cabe mencionar que las regiones promotoras de *rsm* están poco conservadas, con la excepción de la caja Gac y las regiones -10 y -35 (Apéndice M). Los ARN con menores niveles de expresión presentan secuencias poco conservadas en las regiones -10 y -35, en el caso de *rsmX1*, y la región -35 en *rsmZ*. Los promotores de *rsmX3*, *rsmX5* y *rsmY*, con una actividad más elevada, presentan unas regiones -10 cuyas secuencias son similares a la consenso y ricas en A y T (TAATAT en *rsmX3* y *rsmX5*, y TAATCT en *rsmY*). La expresión menor de *rsmX2* y *rsmX4* podría explicarse por la presencia de G en su región -10, ya que la región -35 es idéntica a la de los *rsmX* de mayor expresión *rsmX3* y *rsmX5*. De hecho, las regiones -35 de los promotores de *rsmX4* y *rsmX5* son idénticas y sus regiones -10 difieren únicamente en un nucleótido G/T.

La secuencia de unión de GacA en el promotor de *rsmY* es idéntica a la consenso propuesta para *P. aeruginosa* PAO1: TGTAAGN<sub>6</sub>CTTACA (motivo a, N<sub>6</sub> y motivo b) y, como era esperable, su dependencia de GacA fue elevada. Además, en Pto DC3000 se observan otros nucleótidos conservados ambos lados de los motivos a y b: GTGTAAGCAN<sub>2</sub>TGCTTACAC, que también podrían favorecer a la unión de GacA a la caja Gac por aumentar la palindromía. Debido a la alta dependencia de GacA del promotor de *rsmY*, esta secuencia se consideró la óptima para la activación por este RR en Pto DC3000. Las cajas Gac del resto de promotores de *rsm* son palíndromos imperfectos que presentan distintas variaciones con respecto a la consenso, aunque la expresión de algunos de ellos es altamente dependiente de GacA. Los promotores de *rsmX* tienen el motivo b de la caja Gac muy conservado, mientras que el motivo a presenta gran variabilidad. La alta dependencia de GacA de los promotores de *rsmX2-4* podría deberse a que las T situadas en posición 1 y 3 del motivo a sean clave para la unión de GacA o a que la variación en la secuencia con respecto a *rsmY* observada en la parte central del motivo (N<sub>6</sub>) permita una mejor unión del activador. En el caso de *rsmX1*, su menor dependencia de GacA con respecto a *rsmX2-4* podría deberse a que la presencia de una A en posición 18 es un requerimiento para la unión de GacA con alta afinidad. En el caso de *rsmX5*, la actividad de su promotor es totalmente independiente de GacA, lo cual puede explicarse por la degeneración del motivo a y la pérdida casi total de la palindromía. La única diferencia en su caja Gac, con respecto a sus parálogos altamente dependientes de este activador, es la sustitución de la primera T por una C, lo que apunta a ese nucleótido como un punto clave para la unión de GacA. Al contrario que los promotores de *rsmX*, *rsmZ* presenta en su caja Gac un motivo a conservado y un motivo b (CGCACG) muy diferente de la secuencia consenso (CTTACA), lo que podría explicar su baja dependencia de GacA. Otra diferencia fundamental con el resto de *rsm* es que la caja Gac del promotor de *rsmZ* está situada más lejos del inicio de la transcripción (a -171 nt en vez de entre -55 y -57) y que a 5 nt en 3' se encuentra una secuencia idéntica a del motivo a de la caja Gac.

En resumen, la regulación de GacA depende de la conservación de las secuencias de la caja Gac, donde los nucleótidos T1 y T3 en el motivo a y los nucleótidos correspondientes (A7 y A5) en b parecen ser esenciales para el reconocimiento por GacA. Sorprendentemente, la secuencia entre los dos motivos de

unión a GacA en todos los promotores *rsmX* es idéntica (GAAAGG), mientras que la secuencia aguas abajo del motivo b es variable, lo que sugiere que esta divergencia ha permitido la coexistencia de distintos ARN *rsm* con una dependencia diferente de GacA.

Tabla R3. Comparación de las regiones promotoras de los distintos *rsm* de Pto DC3000.

	Caja Gac		Promotor	
	Distancia a +1 $\alpha$	Secuencia	-35	-10
PrsmX1	-74	GTATAGCGAAAGGCTTACGC	TCCACT	CAATCT
PrsmX2	-73	GTATGGCGAAAGGCTTACAT	TTGGCT	TAGGAT
PrsmX3	-75	GTATAGCGAAAGGCTTACAC	TTGGCT	TAATAT
PrsmX4	-75	GTATAGCGAAAGGCTTACAC	TTGGCT	TAAGAT
PrsmX5	-75	GCATGGCGAAAGGCTTACAC	TTGGCT	TAATAT
PrsmY	-75	GTGTAAGCATTTGCTTACAC	TTGACC	TAATCT
PrsmZ	-189	TGTAAGTCATCGCAGC	TTGGG	TACTAT
Consenso*	-	TGTAAGNNNNNCTTACA	TTGACC	TATAAT

$\alpha$ Desde el último nucleótido del motivo. \*Secuencia consenso propuesta para *P. aeruginosa*. Negrita: nucleótidos que interaccionan con GacA, motivos a y b. Subrayado: nucleótidos conservados con respecto a la secuencia consenso.

## 2. Función biológica de *rsmY* y *rsmZ*

Los primeros ARN reguladores de la ruta Gac-*rsm* descritos en *Pseudomonas sp.* fueron *rsmY* y *rsmZ* (Brencic *et al.*, 2009; Heeb *et al.*, 2002; Valverde *et al.*, 2003). Estos son los ARN principales para el secuestro de las proteínas RsmA/RsmF en *P. aeruginosa* y RsmA/RsmE en *P. protegens* CHA0, mientras que otras variantes de *rsm* parecen jugar un papel menos importante a nivel fisiológico (Janssen *et al.*, 2018a; Kay *et al.*, 2005). Con objeto de valorar la funcionalidad de *rsmY* y *rsmZ* se ensayaron los mutantes sencillos carentes de cada uno de ellos y un doble mutante.

Las mutaciones simples en *rsmY* y *rsmZ* provocaron cambios de escasa magnitud en la fisiología de *P. protegens* CHA0 y *P. fluorescens* F113, mientras que su sobreexpresión fue capaz de compensar los efectos pleiotrópicos de las mutaciones en *gacA* y *gacS* (Aarons *et al.*, 2000; Heeb *et al.*, 2002; Kay *et al.*, 2005; Valverde *et al.*, 2003). Por tanto, se decidió sobreexpresar estos ARN desde un plásmido en la cepa silvestre y en un mutante *gacA* para estudiar su efecto sobre fenotipos modulados por la ruta Gac-*rsm* en Pto DC3000, como son la motilidad y la virulencia.

### 2.1. Motilidad

En primer lugar, se analizó la motilidad *swimming*, observándose que la delección de *rsmY* y *rsmZ* no causaba variaciones significativas en este fenotipo (Figura R41A y B). Sin embargo, la sobreexpresión en *trans* de *rsmY* y *rsmZ* en la cepa silvestre provocó un incremento pequeño pero significativo del halo de *swimming*, pero no alteró significativamente el fenotipo del mutante *gacA* ni a las 48 h (Figura R41C y D) ni a los 5 días (no mostrado). Por

tanto, parece que los niveles de *rsmY* y *rsmZ* logrados desde el plásmido no son suficientes para complementar la deficiencia en *swimming* del mutante *gacA*.

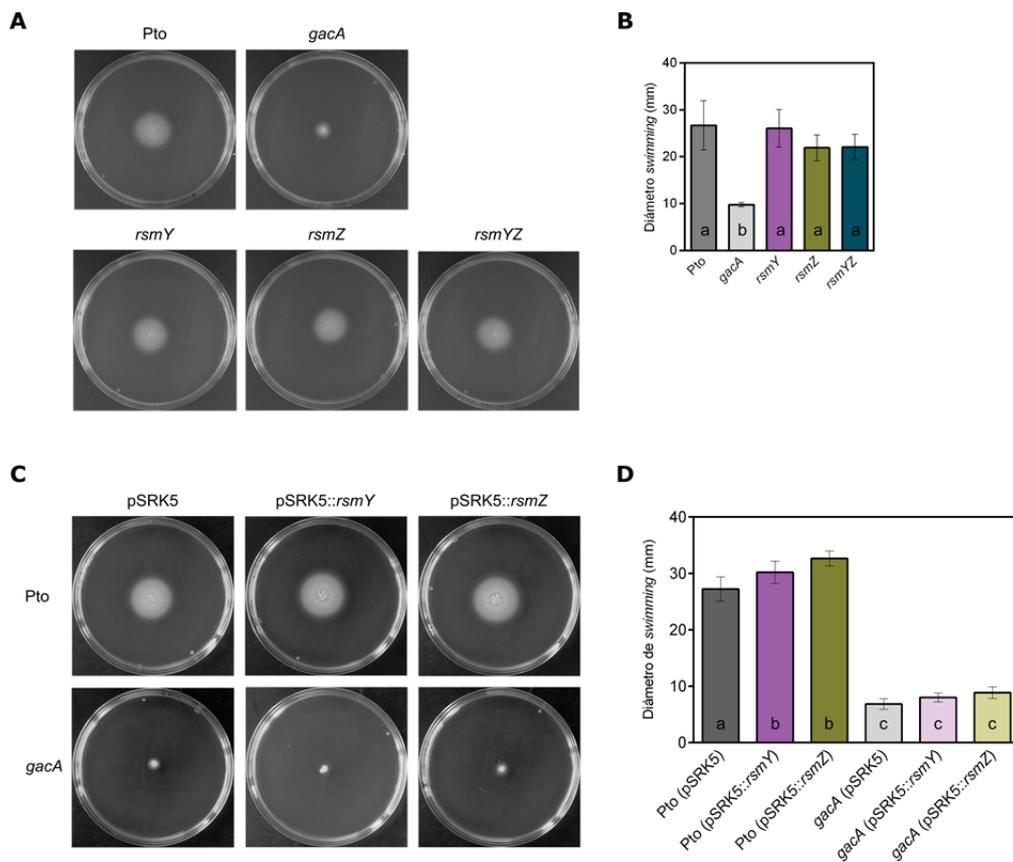


Figura R41. Efecto de *rsmY* y *rsmZ* sobre la motilidad *swimming*.

A y C. Ensayos de *swimming* donde 2  $\mu$ l de una suspensión bacteriana a  $DO_{660}=2,0$  de las cepas indicadas se pincharon en el centro de las placas de LB (0,3% agar) y se incubaron durante 48 horas a 20°C. B y D. Las gráficas muestran los diámetros promedio de los halos producidos cada cepa. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres réplicas biológicas y las letras a-c representan las categorías con diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) establecidas por ANOVA de un factor.

En cuanto al *swarming*, la delección de *rsmZ* no causó variaciones significativas, pero los mutantes *rsmY* y el *rsmYZ* sufrieron una reducción moderada de este tipo de motilidad, sin llegar a los niveles del mutante *gacA* (Figura R42A y B).

La sobreexpresión de *rsmY* y *rsmZ* provocó un aumento significativo del *swarming* tanto en la cepa silvestre como en el mutante *gacA*, que fue mayor con *rsmZ* en ambos casos (Figura R42C y D). Sin embargo, las diferencias de los sobreexpresantes con respecto al mutante *gacA* no se hicieron patentes hasta después de las 48 h de incubación. Esto indica que la acumulación de *rsmY* y *rsmZ* es lenta, incluso desde el promotor constitutivo del plásmido, y solo cuando se sobrepasa un umbral, probablemente cuando se distorsiona el equilibrio *rsmY*CsrA y *rsmZ*CsrA, se puede detectar un efecto en determinados comportamientos bacterianos.

En este caso se observa que el papel de *rsmY* es más relevante a nivel fisiológico y constituye una evidencia indirecta de que los niveles de *rsmY* son mayores en la cepa silvestre (ver sección III.1). Sin embargo, la

sobreexpresión de *rsmZ* produce un efecto mayor recuperando la motilidad tipo *swarming* aunque de forma alterada con respecto al silvestre. Asumiendo que la expresión de los dos ARN desde el plásmido en el mutante *gacA* es similar, esto indicaría que *rsmZ* tiene una mayor capacidad para secuestrar las proteínas CsrA.

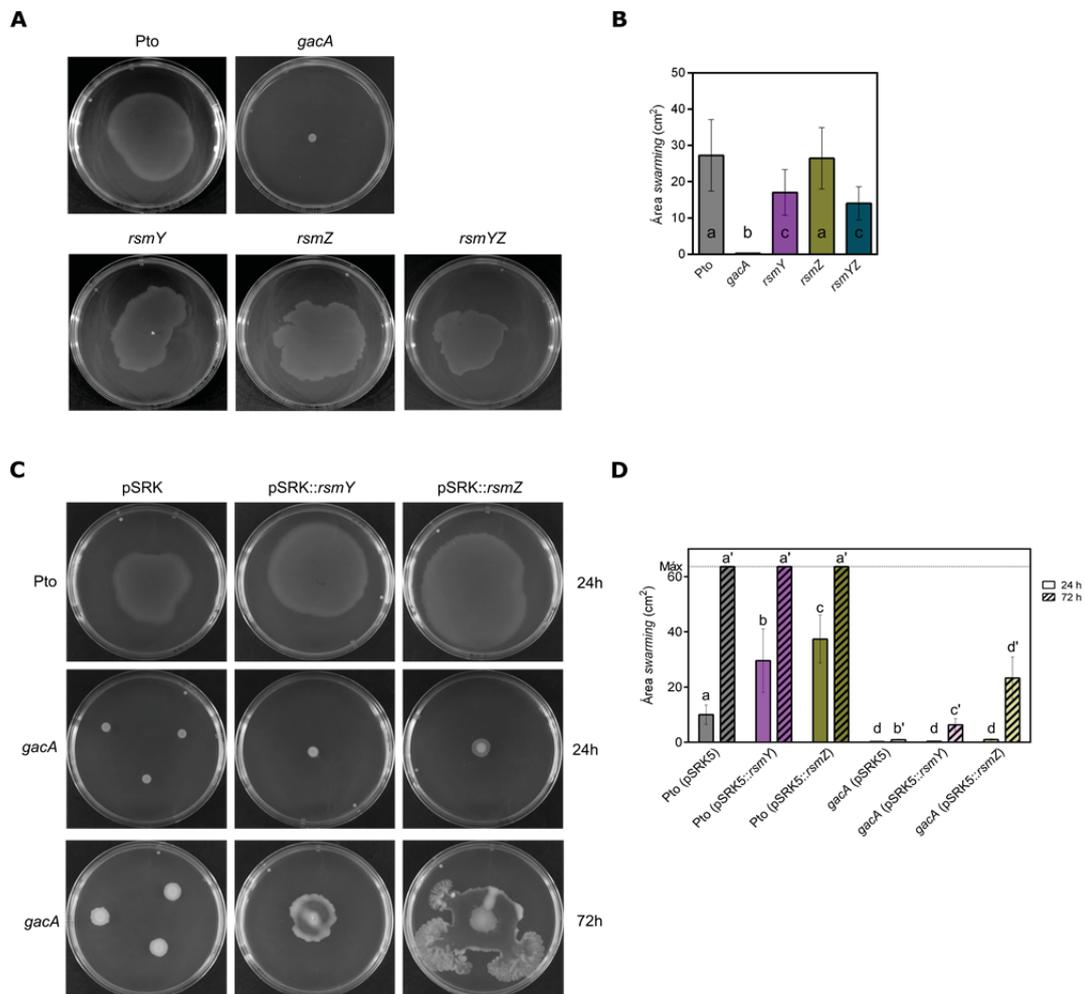


Figura R42. Papel de *rsmY* y *rsmZ* en el *swarming*.

A y C. Ensayos de *swarming* donde 2  $\mu$ l de una suspensión bacteriana a  $DO_{660}=2,0$  de las cepas indicadas se depositaron sobre la superficie de placas de con medio PAG (0,5% agar) y se incubaron durante 24 h a 20°C. B y D. La gráficas representan las medias de los diámetros de cada cepa. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres réplicas biológicas y las letras a-d o a'-d' representan las categorías con diferencias significativas ( $p<0,01$ ) establecidas por ANOVA de un factor.

En este fenotipo se observa que la mutación de *rsmY* es más relevante a nivel fisiológico, pero la sobreexpresión de *rsmZ* causa un mayor efecto sobre el mutante *gacA*. Esto está en consonancia con lo observado a lo largo de este capítulo: los niveles de *rsmY* son más elevados que los de *rsmZ* en la cepa silvestre (Figuras R40-42) y su ausencia provoca un efecto mayor; por lo que su sobreexpresión revierte el fenotipo *gacA* en mayor medida. Sin embargo, Ge *et al.* (2019) han determinado que la afinidad de cada proteína CsrA (1-4) por *rsmY* y *rsmZ* es similar utilizando ensayos de movilidad electroforética, por lo que es probable que la causa sea la diferente estabilidad/vida media de esos ARN.

Dado el efecto causado por la variación de los niveles de *rsmY* y *rsmZ* sobre el *swarming*, se procedió a estudiar si esto se debía al control de la síntesis de siringafactina. Tras 24 h de incubación, la producción de siringafactina fue similar a la de la cepa silvestre en los mutantes sencillos y en el doble (Figura R43 A y B) y significativamente mayor únicamente en la cepa que sobreexpresa *rsmZ* (Figura R43 C y D). A las 48 h no existieron diferencias significativas entre la cepa silvestre y sus sobreexpresantes, ni entre *gacA* y su correspondiente sobreexpresante de *rsmY*. Sin embargo, la sobreexpresión de *rsmZ* revierte el fenotipo de *gacA* llegando a alcanzar al de la cepa silvestre.

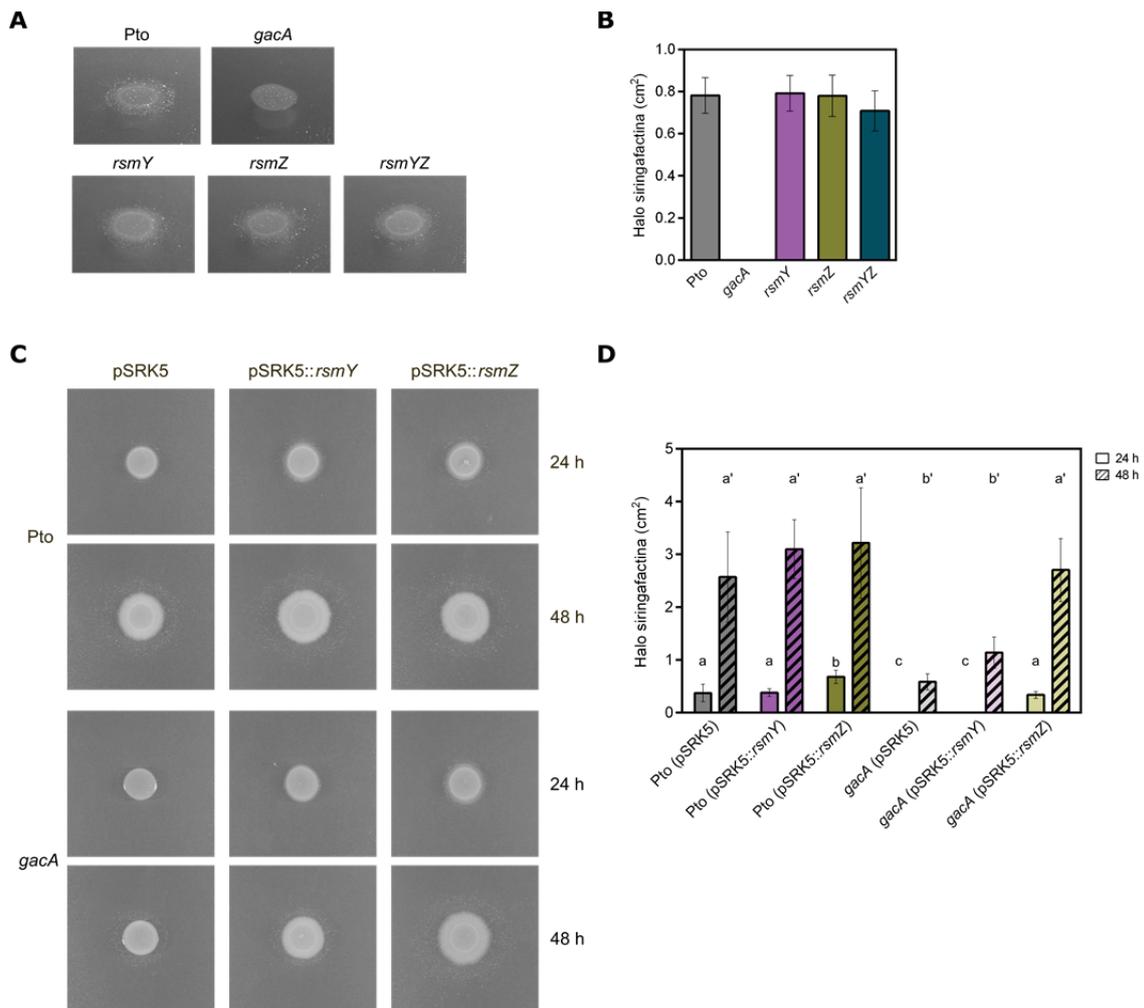


Figura R43. Papel de *rsmY* y *rsmZ* en la producción de siringafactina.

La producción de siringafactina se evaluó sobre placas de LB incubadas durante 24 y 48 h a 20°C sobre las que se inocularon 10  $\mu$ l de una suspensión bacteriana a  $DO_{660}=1,0$  de cada cepa. A y C. La presencia de surfactante se reveló pulverizando aceite mineral sobre placas tras lo cual se fotografiaron y su producción se calculó como la diferencia de superficie entre el halo y la colonia. B y D. Las gráficas representan las medias de la producción de siringafactina de las cepas indicadas. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres réplicas biológicas y las letras a-c o a'-b' representan las categorías con diferencias significativas ( $p<0,01$ ) establecidas por ANOVA.

Curiosamente, los resultados de producción de siringafactina no se correlacionan exactamente con los fenotipos de *swarming* como se había observado anteriormente (sección II.3.2), ya que es posible detectar la disminución del *swarming* en las cepas que carecen de *rsmY* (Figura R42A y B), pero no se aprecian diferencias significativas en la producción de siringafactina (Figura R43A y B). Probablemente estén implicados otros factores regulados por la ruta Gac-rsm distintos de la producción de siringafactina que contribuyen al *swarming*. A pesar de ello, este ensayo también permitió determinar que el aumento de los niveles de *rsmZ* causó un mayor efecto que el logrado con *rsmY*.

## 2.2. Virulencia

Para estudiar el impacto de *rsmY* y *rsmZ* en la virulencia Pto DC3000, llevamos a cabo ensayos de infección en plantas de tomate comparando la capacidad de los mutantes *gacA*, *rsmY*, *rsmZ* y *rsmYZ* con respecto a la cepa silvestre para multiplicarse en los tejidos de las hojas de tomate. Para ello, se analizaron las poblaciones bacterianas y el desarrollo de los síntomas de la enfermedad durante 10 días después de la inoculación por rociado (Figura R44). Todos los mutantes entraron en las hojas de tomate y crecieron en el apoplasto, donde sus poblaciones alcanzaron un máximo a los 3 dpi. Sin embargo, *gacA* se comportó de manera diferente al resto, ya que no se multiplicó como los demás, por lo que sus poblaciones fueron las más bajas a lo largo del ensayo (Figura R44A). Los síntomas de la enfermedad causados por la cepa silvestre y todos los mutantes analizados fueron similares: pequeñas lesiones acuosas que aparecieron 2-3 días después de la inoculación que rápidamente se volvieron marrones con el tejido circundante tornándose clorótico (Figura R44C). La gravedad de los síntomas (cuantificada como la extensión de las áreas necróticas) causada por todos los mutantes, excepto *gacA*, fue similar a la del silvestre (no mostrado). En resumen, estos resultados muestran que la pérdida de *rsmY* y *rsmZ* no modifica el crecimiento o la virulencia en planta, pero GacA sí es necesario para la colonización interna de las hojas y el desarrollo de síntomas, como se había observado anteriormente (Chatterjee *et al.*, 2003; Willis *et al.*, 1990).

Posteriormente evaluó si la sobreexpresión de *rsmY* o *rsmZ* podría restaurar la virulencia en el mutante *gacA* utilizando los mismos ensayos. La expresión en *trans* de *rsmY* y *rsmZ* en el mutante *gacA* provocó una recuperación de las poblaciones en hoja y de los síntomas de la infección, sin llegar por completo a los niveles de la cepa silvestre, ya que los niveles poblacionales en el apoplasto fueron intermedios entre el mutante y la cepa silvestre en todos los puntos de la infección muestreados (Figura R44). En este caso también se monitoreó la estabilidad del plásmido durante el curso de la infección (Tabla R4). Las cepas portadoras del plásmido sin inserto sufrieron una pérdida del mismo a lo largo del ensayo, llegando a estar presente únicamente en el 50% de la población silvestre y en el 23% de la población del mutante *gacA*. Sin embargo, los plásmidos con *rsmY* y *rsmZ* se conservaron en el 93 y 97%, respectivamente, de la población de *gacA*, indicando que el aumento de los niveles de estos ARN supone una ventaja adaptativa para las bacterias que colonizan el apoplasto. En este caso, también se observó una mejor complementación de la deficiencia mutante de *gacA* por *rsmZ* a nivel de la persistencia del plásmido en la población pero no de las poblaciones alcanzadas en la hoja.

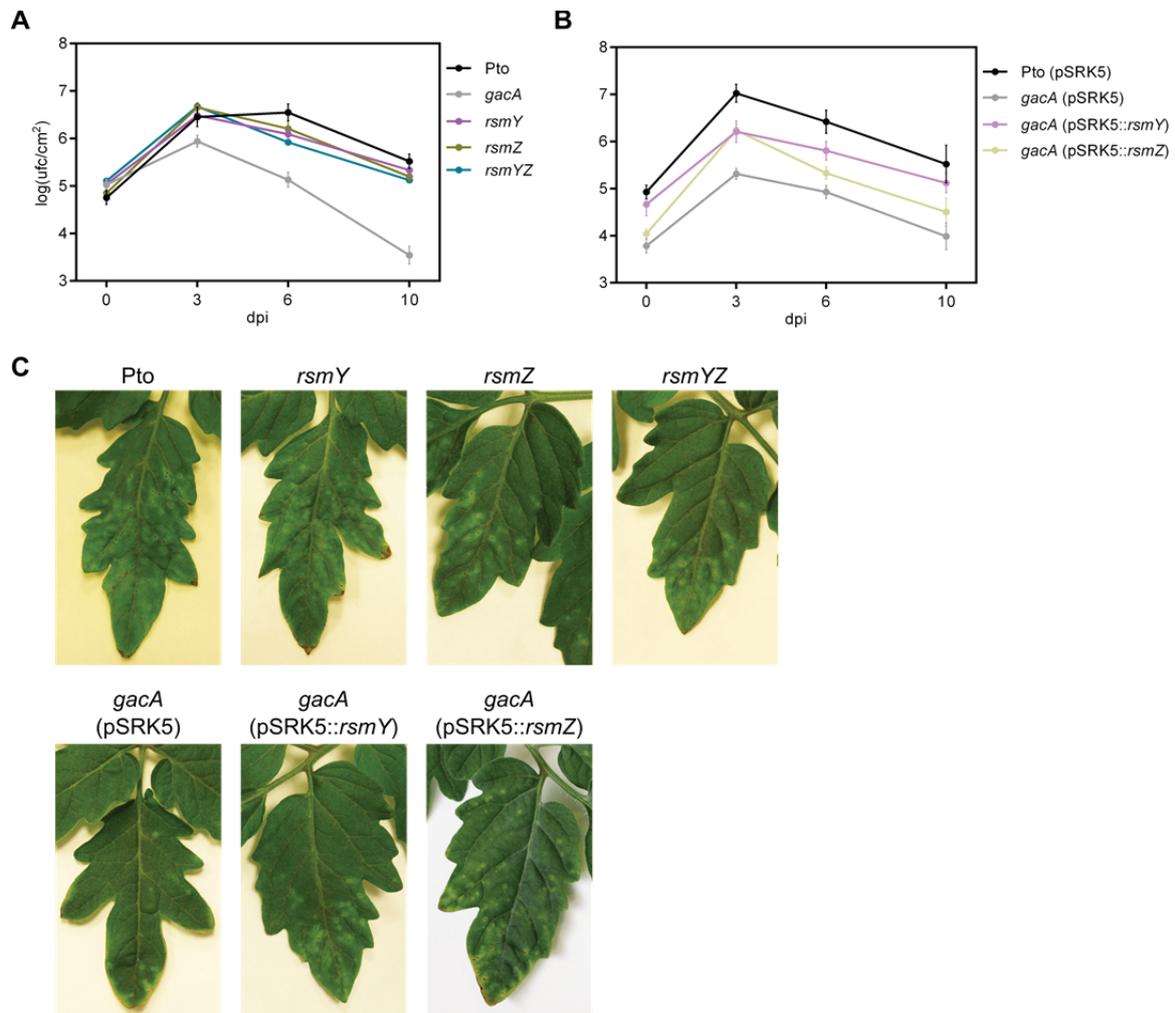


Figura R44. Papel de *rsmY* y *rsmZ* en la infección de tomate.

A y B. Niveles poblacionales en el apoplasto de la cepa silvestre y varios mutantes y sobreexpresantes de *rsmY* y *rsmZ* en hojas de tomate inoculadas por rociado con  $10^8$  UFC/ml. La gráfica muestra las medias de las UFC por  $\text{cm}^2$  de hoja obtenidas a 0, 3, 6 y 10 dpi perteneciente a tres ensayos independientes, con sus respectivas desviaciones típicas. C. Sintomatología desarrollada a los 10 dpi por las cepas ensayadas en hojas de tomate inoculadas por pulverización con  $10^8$  UFC/ml.

Tabla R4. Porcentaje de células portadoras del plásmido en distintos puntos de la infección\*.

	0 dpi	3 dpi	6 dpi	10 dpi
Pto (pSRK)	81±13%	40±19%	51±19%	50±20%
<i>gacA</i> (pSRK)	78±22%	51±13%	33±12%	23±11%
<i>gacA</i> (pSRK:: <i>rsmY</i> )	83±15%	78±17%	84±31%	97±15%
<i>gacA</i> (pSRK:: <i>rsmZ</i> )	100±21%	86±19%	109±23%	93±15%

\*Expresado como la media ± desviación estándar

**DISCUSIÓN**



La bacteria fitopatogena modelo Pto DC3000 cuenta con una ruta Gac-rsm compleja en la que participan cinco proteínas CsrA y siete ARN *rsm* que controlan virulencia, motilidad, producción de metabolitos secundarios, metabolismo del carbono y *quorum sensing* (Chatterjee *et al.*, 2003; Ge *et al.*, 2019; Vargas *et al.*, 2013). Para caracterizar el sistema Gac-rsm en *P. syringae* pv. tomato DC3000, en primer lugar se identificaron los genes que codifican sus componentes. Con respecto a las proteínas CsrA, además de los cuatro genes anotados en el genoma de Pto DC3000 al inicio de esta tesis doctoral, se identificó un quinto: PSPTO\_5621 (Kulkarni *et al.*, 2006). Los siete ARN reguladores *rsm*: *rsmX1-rsmX5*, *rsmY* y *rsmZ*, ya se habían descrito previamente (Chatterjee *et al.*, 2003; Moll *et al.*, 2010; Valverde *et al.*, 2003; Vargas *et al.*, 2013).

#### *Diversidad de las proteínas CsrA en el género Pseudomonas*

Las bacterias con CsrA suelen tener dos o tres parálogos como máximo (Kay *et al.*, 2005; Kay *et al.*, 2006; Romeo y Babitzke, 2018; Vakulskas *et al.*, 2015), pero Pto DC3000 tiene cinco. Se planteó la cuestión de si esta característica era común dentro del género, por lo que se compararon CsrA1-5 de Pto DC3000 con los genes *csrA/rsmA* presentes en 250 cepas de *Pseudomonas* cuyo genoma total había sido secuenciado y cerrado al inicio de esta tesis doctoral. Se observó que los ortólogos de CsrA3 están presentes en bacterias ambientales y asociadas a plantas que pertenecen al linaje *P. fluorescens* (Tabla R1). Las proteínas tipo CsrA1 están presentes en el linaje *P. fluorescens* con excepción del grupo *P. protegens*, pero sus secuencias son más diversas que las de CsrA2 y CsrA3. CsrA4 y CsrA5 solo aparecen en el grupo *P. syringae* (taxid: 136849). CsrA2/RsmA es el más similar a CsrA de *E. coli* y otras  $\gamma$ -proteobacterias (Heeb *et al.*, 2006; Vakulskas *et al.*, 2015), y por lo tanto, se propone como la proteína ancestral a partir de la cual surgieron el resto de variantes. Además, CsrA5 presenta múltiples copias en plásmidos y/o en el cromosoma de varias cepas fitopatógenas foliares (Apéndice D), por lo que una posible hipótesis es que se trate de un evento de transferencia horizontal. En cualquier caso, los análisis de las múltiples proteínas CsrA/RsmA demuestran de nuevo la excepcional plasticidad genómica de este género bacteriano (Rumbaugh, 2014).

#### *Expresión de las proteínas CsrA en Pto DC3000*

A pesar del amplio repertorio de genes CsrA con los que cuenta esta bacteria, solo se expresaron algunos de ellos en las condiciones ensayadas (cultivos de *swarming*, MMR y MMF). Los transcritos de *csrA2*, *csrA3* y *csrA5* presentaron unos niveles significativos, mientras que *csrA1* se detectó a bajos niveles y *csrA4* fue indetectable (Figura R2). El promotor de *csrA2* Pto DC3000 está poco conservado con respecto al de su ortólogo *csrA* de *E. coli*, sin embargo, el alineamiento de sus secuencias junto a las de otras cepas de *Pseudomonas* mostró un promotor  $\sigma_{38}$ /RpoS bastante conservado en todas ellas (Apéndice F). En *E. coli*, dicho promotor es uno de los más fuertes de los cinco que se han detectado, todos ellos dependientes de  $\sigma_{70}$  y/o RpoS. Además, se demostró experimentalmente que responde a  $\sigma_{70}$  y RpoS y que CsrA lo activa de manera indirecta, lo que resulta en una acumulación de la proteína a altas densidades celulares (Yakhnin *et al.*, 2011). Al mismo tiempo, CsrA promueve la transcripción de los ARNnc *csrB* y *csrC*, activa la expresión del *uvrY* (*gacA*) actuando a nivel transcripcional y

postranscripcional y es necesario para la transición de actividad fosfatasa a quinasa de BarA (GacS) (Camacho *et al.*, 2015). De esta manera, a altas densidades celulares los niveles de CsrA y *csrB/C* son altos, por lo que el sistema puede responder rápida y consistentemente cuando las condiciones así lo requieran (Romeo y Babitzke, 2018). Además, se ha demostrado que la retroalimentación negativa que ejerce CsrA sobre su propia actividad debido a la inducción de la transcripción de *csrB/C* provoca que el mecanismo de secuestro sea efectivo a lo largo de la curva de crecimiento, de manera que *csrB/C* puedan causar una reducción rápida de la actividad de CsrA sin necesitar de su dilución a través del crecimiento (Adamson y Lim, 2013).

En la bacteria fitopatógena *Pectobacterium carotovorum*, RpoS también está implicado en la expresión de *rsmA* (Mukherjee *et al.*, 1998) desde el promotor conservado mencionado anteriormente. En *P. aeruginosa* la misma región promotora contiene secuencias solapantes para el reconocimiento de AlgU y RpoS y, aunque no se ha podido demostrar la expresión de *rsmA* desde este último, se cree que podría ser activo en condiciones diferentes a las estudiadas (Stacey y Pritchett, 2016). En el caso de *P. protegens* CHA0, los niveles de la proteína RsmA no se vieron afectados por la mutación en *rpoS*, por lo que la relación entre estos dos factores podría ser específica de cepa (Heeb *et al.*, 2005). Sin embargo, en esta cepa la expresión de RpoS está regulada positivamente por GacA y negativamente por RsmA (Heeb *et al.*, 2005), al contrario de lo observado en *Pseudomonas sp.* M18 (Ge *et al.*, 2007). Curiosamente, en muchas especies bacterianas, las actividades reguladoras de CsrA/RsmA y RpoS parecen ser opuestas (Romeo *et al.*, 2013). Las evidencias con las que se cuenta actualmente en torno a la regulación de la expresión de *csrA/rsmA/csrA2* indican que está muy relacionada e interconectada con RpoS, por lo que sería interesante profundizar en su estudio en Pto DC3000 y evaluar si podría estar implicado en la expresión de otros parálogos. De hecho, en este trabajo se han recopilado evidencias de la posible expresión de *csrA3* desde un promotor *rpoS* (Figura R8).

Un aspecto novedoso descubierto en este trabajo es la cotranscripción de *csrA1* y *csrA2* con los genes situados en 5' y posiblemente de *csrA5* con los genes en 3' (Figuras R5, R6, R7 y R10), un fenómeno que solo había sido descrito previamente en *Clostridium difficile* (Gu *et al.*, 2018). La cotranscripción podría significar que ambos son necesarios para los procesos que controlan y/o que se necesitan determinados niveles de ambos para que los procesos funcionen correctamente (Yin *et al.*, 2010). De esta manera, se podría especular que el sentido biológico es que los genes contrascriptos intervengan en procesos para los que son beneficiosos altos niveles de CsrA. Por ejemplo, *csrA2* forma parte de un operón que incluye la aspartato quinasa (PSPTO\_1843) y, probablemente, una treonina aldolasa (PSPTO\_1841) y una alanil ARNt sintasa (PSPTO\_1842) (Figuras R6 y R7). En *Streptococcus mutans* el metabolismo de la alanina es indispensable para el crecimiento, ya que este aminoácido está involucrado en el peptidoglicano de la pared celular (Qiu *et al.*, 2016). Teniendo en cuenta que *csrA2* promueve la multiplicación en Pto DC3000 bajo ciertas condiciones (Figura R11), sería factible que los genes con los que se cotranscribe estuvieran implicados en ese proceso.

### *Funciones controladas por las proteínas CsrA en Pto DC3000*

Para empezar con el estudio del complejo sistema Gac-rsm en Pto DC3000, se examinaron las consecuencias fisiológicas de eliminar las tres proteínas CsrA más conservadas en el género *Pseudomonas*: CsrA1, CsrA2 y CsrA3. Con respecto a la producción de alginato, los resultados presentados en este trabajo, junto con la presencia de un posible sitio de unión de CsrA en la secuencia SD de *algD* (Kulkarni *et al.*, 2006; Kulkarni *et al.*, 2014) sugieren que el sistema Gac-rsm regula *algD* postranscripcionalmente a través de CsrA3 y, en menor medida, CsrA2. Además, también se observó la represión de CsrA3 sobre la expresión de *algU* con fusiones transcripcionales y postranscripcionales. Este gen contiene un motivo GGA en la secuencia SD y dos en 3' del ATG y había sido predicho por el algoritmo de Kulkarni *et al.* (2014) como posible diana de CsrA, por lo que es probable que sea una diana directa del mismo. Por tanto, el efecto observado sobre *algD* podría deberse a un efecto indirecto de AlgU, a una regulación directa, a la regulación de otro regulador o a varias de las opciones anteriores. Sin embargo, la mayor magnitud del efecto de CsrA3 sobre *algD* que sobre AlgU apunta a una regulación directa, aunque serían necesarios más ensayos para corroborar esta hipótesis. Además, no se puede descartar que haya otros genes involucrados en la producción de alginato que sean también dianas de CsrA3. De la misma manera que lo observado en este trabajo sobre *algD*, Ge *et al.* (2019) han observado un aumento de los niveles del transcrito del gen biosintético *algK* con la mutación en *rsmA3* (*csrA3*), que se hace más fuerte en el doble mutante *rsmA23* (*csrA2/3*). En este trabajo se había propuesto este gen como posible diana de CsrA, ya que lo detectaba el algoritmo de Kulkarni *et al.* (2014) por presentar 3 secuencias de unión con alta afinidad y una de baja afinidad (Figura R14E y Apéndice G). En el trabajo de Ge *et al.* (2019), se vio una reducción del transcrito del regulador transcripcional AlgQ en el mutante simple *rsmA3* (*csrA3*) que se hizo más evidente tras la mutación conjunta con *rsmA2* (*csrA2*) y *rsmA4* (*csrA4*). El papel de AlgQ en *P. aeruginosa* es secuestrar el factor  $\sigma$  RpoD, dejando la ARN polimerasa libre para su unión a AlgU (Hay *et al.*, 2014), por lo que una disminución en sus niveles causaría un efecto negativo sobre la producción de alginato. Podría tratarse de un mecanismo donde, por un lado CsrA3 promueve la actividad de AlgQ para que comience la síntesis de alginato pero al mismo tiempo la reprime para que no exceda un determinado nivel. Sin embargo, sería interesante estudiar el papel de AlgQ en Pto DC3000, ya que su función podría ser distinta a la descrita en *P. aeruginosa*.

En *Azotobacter vinelandii*, así como en varias especies de *Pseudomonas*, la mutación en el TCS GacS/GacA también provoca una reducción de la síntesis de alginato o de la expresión de *algD* (Lalaouna *et al.*, 2012b; Liao *et al.*, 1994; Manzo *et al.*, 2011; Willis *et al.*, 2001). Por el contrario, la mutación en *rsmA* de *P. aeruginosa* aumenta los niveles de *algD* y *alg8* (Burrowes *et al.*, 2006), o en *Azotobacter vinelandii*, RsmA se une a la región 5'-UTR y reprime la traducción de *algD* (Manzo *et al.*, 2011). De la misma manera, es probable que CsrA3 de Pto DC3000 se una al ARNm de *algD* actuando como un represor traduccional y que los ARN *rsm* que se expresan en esas condiciones, cuya transcripción está activada por GacA, se unan a CsrA3 contrarrestando su actividad represora. En *P. fluorescens* F113 se demostró la unión directa de RsmA al ARNm policistrónico *algU-mucA-mucB-mucD* (Martínez-Granero *et al.*, 2012). En *E. coli*, se demostró que CsrA reprime la traducción de *rpoE* (ortólogo a *algU*) y

RpoE activa la transcripción de *csrB* y *csrC*, resultando en una regulación recíproca de esos sistemas reguladores (Yakhnin *et al.*, 2017). Por otro lado, en *P. aeruginosa* la transcripción de *rsmA* depende de AlgU y de AlgR, un regulador de respuesta que forma parte del TCS AlgZ/R, necesario para la transcripción de genes relacionados con la síntesis de alginato y con otros procesos implicados en virulencia (Hay *et al.*, 2014; Stacey y Pritchett, 2016; Stacey *et al.*, 2017). Este TCS también está presente en Pto DC3000, sin embargo sería poco probable que regulase la transcripción de algún *csrA*, ya que esta cepa no posee un promotor AlgU.

La motilidad es otro fenotipo controlado por el sistema Gac-rsm en varias cepas de *Pseudomonas*, algunas veces actuando como inhibidor y otras como activador. Un mutante *gacA* de *P. aeruginosa* exhibe una motilidad *swarming* más rápida y mayor producción de FliC (flagelina) y FliD (proteína del extremo flagelar) (Kay *et al.*, 2006). De manera similar, los mutantes *gacS* y *gacA* de *P. fluorescens* F113 presentan mayores halos de *swimming* que la cepa silvestre (Martínez-Granero *et al.*, 2012; Navazo *et al.*, 2009). Sin embargo, DC3000 y otros mutantes *gacS* y *gacA* de *P. syringae* están afectados en *swimming* y *swarming* (Chatterjee *et al.*, 2003; Kinscherf y Willis, 1999; Kinscherf y Willis, 2002; Vargas *et al.*, 2013). En este trabajo se muestra que CsrA2 y CsrA3 regulan negativamente la motilidad *swarming* en Pto DC3000, de forma similar a lo que ocurre con RsmA en *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis* o *Pectobacterium wasabiae*. En todos esos casos, los mutantes fueron mejores *swimmers*, mientras que la sobreexpresión de *rsmA/csrA* inhibió el *swarming* (Ang *et al.*, 2001; Koiv *et al.*, 2013; Liaw *et al.*, 2003). Curiosamente, este efecto es contrario a lo observado en *P. aeruginosa* PAO1, cuyo mutante *rsmA* mostró motilidad *swimming* y *swarming* reducida (Burrowes *et al.*, 2006; Heurlier *et al.*, 2004), *P. fluorescens* F113, donde la sobreexpresión de RsmA o RsmE resultó en una motilidad *swimming* aumentada (Martínez-Granero *et al.*, 2012), o *P. putida* KT2440, cuyos mutantes carentes de una o varias de sus tres proteínas RsmA presentaron *swimming* y *swarming* reducidos (Huertas-Rosales *et al.*, 2016). Además, la sobreexpresión del gen *rsmA* de *P. aeruginosa* en diferentes cepas de *P. syringae* inhibió la motilidad *swarming* (Kong *et al.*, 2012). Entonces, aunque los componentes de la ruta Gac-rsm estén presentes en bacterias relacionadas filogenéticamente y el fenotipo controlado sea el mismo, el resultado de su regulación puede ser opuesto. Por tanto, identificar los ARNm diana reconocidos por las proteínas CsrA y su modo de acción es esencial para establecer el resultado final de la regulación.

En este trabajo, primero se verificó que la ausencia de funcionalidad flagelar no era la responsable del fenotipo de *swarming* mostrado por las cepas que sobreexpresan *csrA2* y *csrA3*, para lo cual se realizaron ensayos de motilidad *swimming*. Los mutantes presentaron flagelos funcionales en esas condiciones y únicamente la sobreexpresión de *csrA3* disminuyó ligeramente el *swimming*. También se estudiaron la producción de flagelos y expresión de flagelina en condiciones de *swarming*, observando que eran similares a las de la cepa silvestre. Esto está en concordancia con la observación de que la regulación negativa de CsrA3 y CsrA2 sobre la motilidad *swarming* tiene lugar sobre la expresión de *syfR* y *syfABCD* y sobre la producción de siringafactina. Los mutantes se desplazaron rápidamente en las placas de *swarming* y produjeron cantidades elevadas de siringafactina. De la misma manera, la expresión de *syfR* y *syfA* en los mutantes *csrA2* y *csrA3* fue mayor que en la cepa silvestre,

mientras que la sobreexpresión provocó el efecto contrario. Así, se determinó que *fliC* no está bajo el control de CsrA3 y CsrA2 en Pto DC3000 (al menos en condiciones de *swarming*), pero sí la producción del biosurfactante siringafactina. Se debe mencionar que la siringafactina es esencial para la motilidad *swarming* de esta bacteria (Berti *et al.*, 2007; Burch *et al.*, 2010; Nogales *et al.*, 2015). Por tanto, CsrA3 tiene un papel principal en la represión del fenotipo de *swarming* en Pto D3000, CsrA2 también interviene pero de manera menos efectiva y CsrA1 no participa. Este es el primer estudio que demuestra que la producción de siringafactina está regulada por las proteínas CsrA en esta cepa, aunque ya se había descrito previamente que la producción de siringafactina estaba controlada por Gac-rsm (Hockett *et al.*, 2013). Además, la producción de lipopéptidos en *P. entomophila* y *P. fluorescens* SS101 también está regulada por el sistema Gac-rsm (Song *et al.*, 2014; Vallet-Gely *et al.*, 2010). Concretamente, RsmA1 y RsmA2 (ortólogos de CsrA2 y CsrA3, respectivamente) de *P. entomophila* están implicados en el control de la producción de entolisina (Vallet-Gely *et al.*, 2010) y RsmA y RsmE (ortólogos de CsrA2 y CsrA3, respectivamente) pero no CsrA (similar a CsrA1), están involucrados en la regulación de la biosíntesis de masetólido en *P. fluorescens* SS101 (Song *et al.*, 2014).

El análisis de la región 5'-UTR de *syfA* reveló la presencia de dos sitios de unión para las proteínas CsrA (GGA y AGGA, el último solapando con la SD). La 5'-UTR de *syfR* también contiene sitios de unión: un GGA y dos AGGA, uno solapando con la SD y otro con el ATG. Esta situación es similar a la de *P. fluorescens* SS101, donde GacS controla la expresión de los genes del masetólido A a través de un regulador de tipo LuxR (Song *et al.*, 2014). Por tanto, se propone que el sistema Gac-rsm ejerce un doble control sobre los genes de biosíntesis de siringafactina en Pto DC3000, directamente por la unión al transcrito *syfABCD* e indirectamente a través del regulador *syfR*.

Con respecto a la virulencia, la habilidad del mutante *csrA3* para colonizar el hospedador está severamente reducida, aunque los síntomas observados fueron similares a los provocados por la cepa silvestre. En *Pectobacterium wasabiae* se observó un comportamiento similar (disminución en la tasa de crecimiento e incremento en virulencia) tras mutar el gen *rsmA2* (Koiv *et al.*, 2013). El mutante *rsmA2* también tenía una mayor propensión a realizar *swarming* y producía más enzimas para la degradación de la pared celular vegetal que la cepa silvestre; sin embargo, a pesar de su eficiente maceración de los tejidos, las poblaciones de *rsmA2* en el hospedador estaban reducidas. Nuestro modelo actual es que, en ausencia de CsrA3, Pto DC3000 adquiere un fenotipo hipervirulento caracterizado por un *swarming* aumentado, así como una mayor expresión del T3SS y exportación de efectores a las células vegetales. Sin embargo, la falta de control sobre estos procesos tan costosos energéticamente, en los que están involucrados numerosos componentes y rutas reguladoras, puede resultar en una tasa de crecimiento disminuida y una desventaja adaptativa. Por el contrario, la cepa que sobreexpresa *csrA3* fue capaz de crecer en el apoplasto pero no provocó síntomas de enfermedad. Esto es consistente con el comportamiento del mutante *lemA (gacS)* de *P. syringae* pv. *syringae*, que no estaba alterado en su habilidad para colonizar las hojas de su hospedador pero no era virulento (Willis *et al.*, 1990). Por tanto, CsrA3 es importante para la colonización endofítica y el fenotipo de la enfermedad ya que estimula el crecimiento

en planta y limita el desarrollo de síntomas. Es decir, la transición entre un fenotipo centrado en el crecimiento y otro centrado en el desarrollo de síntomas parece estar bajo el control de CsrA3. Por tanto, se propone que CsrA3 funciona como un regulador central del estilo de vida de Pto DC3000, reprimiendo la expresión de factores de virulencia y promoviendo la división celular coordinada bajo condiciones de no inducción (por ejemplo, en medio de laboratorio y, probablemente, en estadíos tardíos de la infección). Cuando la bacteria detecta la planta, se activa el TCS GacS/GacA y se libera la represión por CsrA del *swarming* y del T3SS, entre otros, induciendo el fenotipo infectivo. No obstante, se necesita un estudio en mayor profundidad para descubrir nuevos rasgos regulados selectivamente por esta proteína y para elucidar cómo están enlazados regulatoriamente el crecimiento y la virulencia.

La síntesis de sideróforos es otro fenotipo controlado por la ruta Gac-rsm en Pto DC3000. Este fenotipo se ha estudiado gracias a que se pudo asociar la producción de pioverdina con la fluorescencia mayoritaria producida por Pto DC3000. La producción de este compuesto, en su forma no asociada a hierro (apopioverdina) se pudo cuantificar espectrofotométricamente como se había descrito previamente gracias a su máximo de absorbancia característico a 405 nm (Hoegy *et al.*, 2014) y a la observación durante esta tesis de un máximo de fluorescencia a 450 nm cuando se excitaban a 305 nm los sobrenadantes de cultivos deficientes en hierro. De las cinco proteínas CsrA de Pto DC3000, únicamente CsrA2 y CsrA3 provocaron una represión de la síntesis de este compuesto. En los mismos sobrenadantes se detectó otro compuesto fluorescente, con un máximo de emisión a 410 nm, cuya producción se inducía por CsrA2/3. Mediante ensayos de HPLC y LC-MS se identificó el compuesto como SA, precursor del sideróforo yersiniabactina, y se confirmó que este último también se producía pero no estaba afectado.

Chatterjee *et al.* (2003) ya habían descrito que el mutante *gacA* de Pto DC3000 no producía el pigmento verde característico de la cepa silvestre. En este trabajo se ha identificado dicho pigmento como la pioverdina y se ha confirmado su regulación por la ruta Gac-rsm. Ge *et al.* (2019) observaron un papel represor de CsrA2, CsrA3 y parcialmente CsrA4 sobre la producción de este compuesto, lo que concuerda con los resultados obtenidos en esta tesis doctoral. Sin embargo, los mutantes dobles y triples con las complementaciones presentaron fenotipos contradictorios probablemente derivados de problemas de crecimiento en algunas cepas.

Los patógenos de animales necesitan los sideróforos para poder sobrevivir en el ambiente pobre en hierro que se encuentran en el hospedador, de modo que estos son considerados factores de virulencia (Khan *et al.*, 2018). En algunas de estas bacterias se ha descrito que la homeostasis del hierro y la síntesis de sideróforos están reguladas por la ruta Gac-rsm. Así, CsrA mantiene la homeostasis del hierro en *E. coli* mediante la represión de los genes que codifican las proteínas de almacenamiento de hierro durante la fase exponencial del crecimiento para asegurar que este compuesto está disponible para permitir el crecimiento (Pourciau *et al.*, 2019). En esta misma especie, se observó una represión directa de los genes biosintéticos del sideróforo enteroquelina por CsrA, así como su biosíntesis y transporte de también de manera indirecta (Berndt *et al.*, 2019; Potts *et al.*, 2017). En *Salmonella*, CsrA promueve la expresión de los genes involucrados en la síntesis y transporte de enterobactina y

salmochelina, sus dos sideróforos primarios, así como de la expresión de otros genes de importación de sideróforos exógenos (Potts *et al.*, 2019). En *P. aeruginosa*, el mutante *rsmA* presenta mayor expresión del factor  $\sigma$  PvdS, de los genes de síntesis de pioquelina y pioverdina, así como de los genes que codifican los receptores que importan estas moléculas coordinadas con hierro del exterior celular (Burrowes *et al.*, 2006). A pesar de tener relevancias distintas en la infección, parece que la regulación de la producción de sideróforos por la ruta Gac-rsm está conservada en bacterias pertenecientes a distintos grupos y con diferentes nichos ecológicos.

La aparente ausencia de función de estos compuestos durante la infección en plantas (Jones *et al.*, 2007; Jones y Wildermuth, 2011) podría deberse a que se trata de un medio con hierro suficiente para que la bacteria no sienta su carencia, sin embargo podrían jugar un papel relevante en la supervivencia del microorganismo en el medio ambiente. Su síntesis implica un coste metabólico elevado, como ocurre con el T3SS, por lo que la regulación por CsrA sería un mecanismo secundario a su regulación por el factor  $\sigma$  correspondiente, como PvdS en el caso de pioverdina. Se necesitan más estudios para poder determinar los genes diana concretos sobre los que actúan CsrA2 y CsrA3 para regular la homeostasis del hierro en Pto DC3000.

La fluorescencia del SA detectado en los sobrenadantes desapareció con la adición de Fe, lo que implica que se produce una coordinación entre ambos y plantea la cuestión de si este compuesto podría actuar como sideróforo en Pto DC3000. Resulta curioso que la bacteria produzca este compuesto, dado que es una molécula de señalización vegetal cuya función es activar la defensa contra patógenos microbianos y la toxina coronatina producida por Pto DC3000 bloquea su producción en la planta (Zheng *et al.*, 2012). Es probable, por tanto, que el aumento de SA observado sea resultado de una desregulación en la ruta Gac-rsm provocada como consecuencia de unos niveles de CsrA2/3 en la célula muy por encima de los fisiológicos. Un escenario posible es que CsrA2/3 induzcan la producción de yersiniabactina mediante el aumento de SA, pero que la tasa de síntesis de SA sea mucho mayor que la capacidad de la maquinaria biosintética de la yersiniabactina para utilizarlo, aunque serían necesarios otros estudios para evaluar esta hipótesis.

En general, el TCS GacS/GacA funciona en conjunción con los reguladores postranscripcionales CsrA para permitir que Pto DC3000 sienta y se adapte a cambios en el ambiente. Hemos demostrado que las proteínas CsrA2 y CsrA3 ejercen funciones redundantes pero no equivalentes ya que la pérdida de CsrA2 y, sobre todo, CsrA3, altera la expresión de una variedad de sistemas importantes para la motilidad, síntesis de EPS, crecimiento y virulencia. Particularmente, la síntesis de alginato, la producción de siringafactina y la virulencia están desreprimidos considerablemente, mientras que el crecimiento en planta está perjudicado. Los ensayos fenotípicos, junto con los análisis de secuencia nos han permitido proponer una serie de genes diana para las proteínas CsrA. Esto proporciona la base para futuros ensayos de interacción proteína-ARN que permitirán un mejor conocimiento de los papeles y modos de acción de los diferentes parálogos de Pto DC3000.

Los primeros intentos de predecir los genes diana de CsrA se centraban en la búsqueda de patrones similares a los motivos de unión en sus ARN antagonistas (Kulkarni *et al.*, 2006; Kulkarni *et al.*, 2014), sin embargo, sucesivos estudios han revelado nuevos modos de unión e incluso el papel de CsrA en la expresión diferencial de genes cotranscritos (Dugar *et al.*, 2016; Sahr *et al.*, 2017). La variabilidad de modos de acción que posee CsrA para ejercer su regulación (Romeo y Babitzke, 2018; Vakulskas *et al.*, 2015), junto la flexibilidad de su unión a los ARNm diana (Leistra *et al.*, 2018) dificulta la predicción de los genes que regula. Recientemente se han comenzado a utilizar métodos integrados de transcriptómica (Potts *et al.*, 2019) o una combinación de transcriptómica, coimmunoprecipitación y proteómica (Sahr *et al.*, 2017) que han aportado buenos resultados en la determinación de dianas directas de CsrA/RsmA.

Finalmente, resulta curioso que la proteína CsrA1, con una alta distribución en el linaje *P. fluorescens* haya perdido su función en Pto D3000 y otras cepas de este grupo (*P. entomophila* y *P. fluorescens*) (Martínez-Granero *et al.*, 2012; Vallet-Gely *et al.*, 2010), pero la haya conservado en *P. putida* (Huertas-Rosales *et al.*, 2016). En estos casos el aminoácido en posición 7, que es de tipo básico en CsrA2 y CsrA3 (y sus ortólogos), es ácido o apolar. Este residuo está situado en la región de interacción con el ARNm (Vakulskas *et al.*, 2015), por lo que puede ser esencial para el reconocimiento del mismo. De hecho, CsrA4 y CsrA5, que contienen más cambios en residuos importantes para la unión situados más cerca del extremo N-terminal, mantienen su capacidad de represión del fenotipo *swarming*. El hecho de que CsrA4, cuya afinidad por los ARN *rsm* es baja (Ge *et al.*, 2019), y CsrA5, que presenta una secuencia aminoacídica poco conservada con respecto a las otras proteínas CsrA, provoquen una disminución del *swarming* podría indicar que este fenotipo es muy sensible a variaciones en los niveles de estas proteínas. En vista a los resultados obtenidos, parece que las bacterias del género *Pseudomonas* favorecen la multiplicación y retención de variantes de CsrA, incluso aunque algunas de ellas no se expresen (CsrA4) o no sean funcionales (CsrA1), lo que podría ser beneficioso para usarlas como reserva genética para la aparición de nuevas funciones.

#### *Expresión y función de los ARN rsm de Pto DC3000*

El número de ARN *rsm* por cepa es variable, suelen ser dos en Enterobacteriaceae (*csrB* y *csrC*) y tres o cuatro en bacterias del género *Pseudomonas*: *rsmX*, *rsmY* y *rsmZ* en *P. protegens* y *rsmV*, *rsmW*, *rsmY* y *rsmZ* en *P. aeruginosa* (Janssen *et al.*, 2018a; Sonnleitner y Haas, 2011; Vakulskas *et al.*, 2015). Pto DC3000 destaca por su número excepcionalmente alto, siete, sobrepasado únicamente por *Azotobacter vinelandii*, que tiene ocho (Hernández-Eligio *et al.*, 2012; Manzo *et al.*, 2011). Además, la presencia de cinco variantes de *rsmX* en varios patovares de *P. syringae* planteó la cuestión de qué beneficios podría aportar la posesión de ARNnc aparentemente redundantes, ya que comparten una gran homología entre ellos, a nivel de secuencia y de estructura (Moll *et al.*, 2010). Los ARNnc homólogos pueden actuar de diferentes maneras para ejercer su regulación dado que sus funciones pueden ser redundantes, aditivas o independientes (Waters y Storz, 2009). Los ARNnc redundantes pueden ser ventajosos porque provocan un efecto de dosis génica, resultando en una producción fuerte y rápida de los mismos en determinadas condiciones (Kay *et al.*, 2006). Pero también pueden

actuar de forma aditiva y, a través de su regulación diferencial, modular finamente los fenotipos controlados por la ruta Gac-rsm (Tu y Bassler, 2007). Sin embargo, la complejidad de la regulación del sistema Gac-rsm en Pto DC3000 se extiende más allá de los ARN *rsmX*, y las diferencias en los niveles de expresión absolutos y temporales, así como en sus afinidades de unión por las proteínas CsrA parecen aportar un mecanismo regulador que controla de forma precisa la respuesta del sistema Gac-rsm en función de señales ambientales.

Debido a la gran similitud de secuencia entre los *rsmX*, que dificultaba el empleo de otras técnicas, la aproximación utilizada para evaluar la expresión de todos los ARN *rsm* de la bacteria fue la medida de la actividad de los promotores bajo diferentes condiciones. Los patrones de expresión muestran que los siete  $P_{rsm}$  varían con el medio de cultivo y la densidad celular, pero no entre cultivos crecidos sobre una superficie o de forma plantónica, sugiriendo que la detección de superficie no está involucrada en la expresión de estos ARN en las condiciones ensayadas como se había descrito para *P. aeruginosa* (Jean-Pierre *et al.*, 2016). De manera similar a lo que ocurre en otras *Pseudomonas*, donde la expresión de *rsm* fluctúa con las condiciones de cultivo pero sus niveles suelen ser máximos en fase estacionaria (Heeb *et al.*, 2002; Humair *et al.*, 2010; Janssen *et al.*, 2018a; Jean-Pierre *et al.*, 2016; Kay *et al.*, 2005; Lalaouna *et al.*, 2012a; Nakatsu *et al.*, 2019), en Pto DC3000 la expresión de todos los ARN *rsm* aumenta con la densidad celular, como se había observado previamente (Nakatsu *et al.*, 2019). Esto es particularmente significativo en el medio manitol-glutamato (MMR), donde los promotores de *rsm* exhibieron una actividad mínima a bajas densidades ópticas que se indujo en fases tardías de crecimiento. La expresión de los *rsm* concuerda con el modelo propuesto para *P. protegens CHA0*, donde la señal detectada por GacS/GacA se acumula en la fase estacionaria y aumenta la actividad de la ruta. La síntesis de las moléculas señal que inducen la cascada Gac-rsm en esta cepa depende de GacA, de los tres ARN *rsm* de la cepa y de las proteínas RsmA y RsmE y la percepción de la señal necesita un GacS funcional (Heeb *et al.*, 2002; Kay *et al.*, 2005; Valverde *et al.*, 2003; Zuber *et al.*, 2003). Por este mecanismo, la ruta Gac-rsm autoregula positivamente su actividad en función de los incrementos en las densidades celulares por un patrón de autoinducción similar a la regulación por QS (Whitehead *et al.*, 2001). La ruta Gac-rsm es un mecanismo para ‘apagar’ o ‘encender’ la producción de compuestos una vez que se llega a una determinada densidad celular, una especie de QS alternativo. Este sistema se activa a altas densidades celulares y es cuando se controlan los niveles de CsrA. Se ha propuesto que GacA actúa al menos por dos vías: una que opera a través de *rsm* y CsrA para regular directamente genes diana a nivel postranscripcional y la otra que actúa de forma indirecta por la estimulación de la producción de AHL y afecta a los genes diana activados por éstas moléculas (Chancey *et al.*, 1999; Pessi y Haas, 2001).

Sin embargo, se observaron diferencias en los niveles de transcripción de los siete ARN, tanto en la cepa silvestre como en el mutante *gacA*. La expresión de los promotores fue alta para *rsmX3*, *rsmX5* y *rsmY*, baja para *rsmX1* y *rsmZ* y variable para *rsmX2* y *rsmX4*. De forma general, se pudieron asociar los niveles de expresión con la conservación de las secuencias de las regiones -35 y -10 de sus promotores, mientras que la dependencia de

GacA observada se pudo explicar por la cantidad y posición de los residuos conservados en la caja Gac presente en los promotores que regula con respecto a la secuencia consenso.

En *P. aeruginosa*, la transcripción de *rsmY* y *rsmZ* es fuertemente dependiente de GacA, mientras que la actividad de  $P_{rsmV}$  y  $P_{rsmW}$  no (Brencic *et al.*, 2009; Janssen *et al.*, 2018a; Miller *et al.*, 2016). En Pto DC3000,  $P_{rsmY}$ ,  $P_{rsmX2}$ ,  $P_{rsmX3}$  y  $P_{rsmX4}$  son altamente dependientes de la activación por GacA,  $P_{rsmX1}$  y  $P_{rsmZ}$  son parcialmente dependientes, y  $P_{rsmX5}$  no depende de GacA, de hecho parece estar reprimido por este regulador como ocurre con *rsmW* de *P. aeruginosa* (Janssen *et al.*, 2018a). Por otro lado, la expresión de  $P_{rsmX5}$  en medio LB no sigue la tendencia mencionada anteriormente, sino que su expresión es alta incluso a bajas densidades celulares. En *P. aeruginosa* los ARN *rsm* más dependientes de GacA, *rsmY* y *rsmZ*, son los primarios (Janssen *et al.*, 2018a), mientras que en Pto D3000 los ARN más expresados son *rsmY* y *rsmX3*, que dependen de GacA, pero no *rsmX5*. *rsmX5* parece expresarse constitutivamente en medio LB, por lo que puede que sea beneficioso tener unos niveles basales altos de *rsm* desde bajas densidades celulares en esas condiciones

Cuando una cepa posee varios ARN *rsm*, es común que la relevancia de los mismos a efectos fenotípicos sea diferente y parece que se ha favorecido que la transcripción de algunas de esas variantes sea independiente o poco dependiente de GacA. Por ejemplo, *rsmV* y *rsmW* de *P. aeruginosa* (Janssen *et al.*, 2018a; Miller *et al.*, 2016), *rsmY* de *P. fluorescens* SS101 (Song *et al.*, 2014) o *rsmY* de *P. brassicacearum* (Lalaouna *et al.*, 2012b). La existencia de ARNs *rsm* independientes de la señalización por GacS/GacA permite la entrada e integración de otras señales en el sistema. Otro mecanismo que permite la expresión diferencial de estos ARN es el control por diferentes factores de transcripción, como es el caso de P<sub>s</sub>rA y AlgR, que promueven la transcripción de *rsmZ*, también dependiente de GacA, en *P. protegens* CHA0 (Heeb *et al.*, 2002; Humair *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2017) o HptB y MvaT, que disminuyen los niveles de *rsmZ* en *P. aeruginosa* (Brencic *et al.*, 2009; Jean-Pierre *et al.*, 2016). *rsmW* de *P. aeruginosa* es dependiente de temperatura y se cotranscribe con PA4570 desde un promotor *rpoH*. Las diferencias observadas en los patrones de expresión entre *rsmV*, *rsmW*, *rsmY* y *rsmZ* de *P. aeruginosa* son consistentes con la hipótesis de que los ARN pueden jugar distintos papeles en el secuestro de RsmA/RsmF en base a su patrón temporal de expresión.

Con respecto a la funcionalidad de *rsmY* y *rsmZ* en Pto DC3000, se observó que los mutantes *rsmY*, *rsmZ* y *rsmYZ* eran indistinguibles de la cepa silvestre en todos los fenotipos analizados excepto el *swarming*, lo que sugiere que son redundantes funcionamente. Esto ocurre en muchas bacterias, como *E. coli*, *S. enterica*, *V. choleare* o *P. fluorescens*, donde se requiere la delección de todos los ARN *rsm* presentes para obtener un fenotipo distinguible de la cepa silvestre (Butz *et al.*, 2019; Fortune *et al.*, 2006; Kay *et al.*, 2005; Weilbacher *et al.*, 2003). Sin embargo, la sobreexpresión artificial de uno de esos ARNs suprime los efectos negativos de las mutaciones de *gacS* y *gacA* sobre la expresión de los genes diana (Heeb *et al.*, 2002; Kay *et al.*, 2005; Valverde *et al.*, 2003). En Pto DC3000 *rsmY* y, principalmente, *rsmZ* son capaces de complementar parcialmente el fenotipo del mutante *gacA* en *swarming*, producción de biosurfactante y patogénesis (aumentando las poblaciones en planta y la virulencia). El hecho de que la complementación sea parcial y se necesite tiempo para que el efecto sea apreciable

indica que ni *rsmY* ni *rsmZ* pueden contrarrestar por sí solos el fenotipo de *gacA*. La complementación fue más efectiva en los ensayos de infección, lo que se corroboró con la persistencia del plásmido que expresaba los ARN durante la infección. Sin embargo, se demostró recientemente que el mutante *gacA* utilizado en este trabajo también tiene afectada la expresión del gen situado en 3' de *gacA*: *uvrC*, que está implicado en la reparación de daños causados por la luz UV, y que es la deficiencia en *uvrC* y no en *gacA* lo que provoca que la infección de *A. thaliana* sea menos exitosa que la de la cepa silvestre (O'Malley *et al.*, 2019a; O'Malley *et al.*, 2019b). Es posible que en la infección de tomate ocurra algo similar, ya que el fenotipo del mutante *gacA*, menores niveles poblacionales en la hoja y menor virulencia que la cepa silvestre, no es similar al del sobreexpresante de *csrA3*, como cabría esperar. En la cepa que sobreexpresa CsrA3 estarían secuestrados; sin embargo el mutante *gacA* expresa algunos *rsm* (*rsmX1*, *rsmZ* y, sobre todo, *rsmX5*), por lo que la relación *rsm*/CsrA es diferente en ambas cepas y, por tanto, sus fenotipos podrían ser distintos. Por tanto, se requiere la realización de más experimentos para evaluar de forma fiable el comportamiento del mutante *gacA*.

Moll *et al.* (2010) habían propuesto que *rsmY* y *rsmZ* eran determinantes para ajustar la respuesta mayoritaria de la ruta Gac-rsm y las múltiples copias de *rsmX* se podrían encargar del ajuste fino del sistema. Nuestros resultados contradicen esta hipótesis, ya que a nivel de expresión hay *rsmX* (3 y 5) que alcanzan niveles de expresión semejantes a *rsmY* y se demostró *in vitro* que la afinidad de cada proteína CsrA (1-4) es muy similar para *rsmX1*, *rsmX5*, *rsmY* y *rsmZ* (Ge *et al.*, 2019). El motivo por el que se favorece la coexistencia de varios ARN *rsm* no está claro, pero varios autores han sugerido que podría deberse a que son importantes para la naturaleza dinámica y la robustez de la red reguladora *rsm*, así como para aportar especificidad y diversidad fenotípica a las distintas especies de *Pseudomonas* (Janssen *et al.*, 2018a; Miller *et al.*, 2016). En cualquier caso, aunque el número de ARN *rsm*/*csr* puede variar de una especie a otra, todos ejercen la misma función de antagonizar las proteínas CsrA/RsmA. Esto lleva a la pregunta de por qué existen múltiples ARN *rsm* (y proteínas CsrA) en Pto DC3000 cuando tienen la misma función. En principio, esta distribución puede permitir una respuesta reguladora más eficiente por un efecto de dosis génica y los ARN *rsm* pueden ser redundantes bajo ciertas condiciones. Así la sobreexpresión de *rsmZ* compensa parcialmente la ausencia de *rsmX2*, *rsmX3*, *rsmX4* y *rsmY* en un mutante *gacA*. Además, la existencia de múltiples *rsm* y CsrA redundantes permite la regulación diferencial de su síntesis y/o estabilidad en respuesta a diferentes estímulos ambientales, lo cual es característico de circuitos regulatorios de este tipo. En Pto DC3000 se han estudiado las afinidades *in vitro* de *rsmX1*, *rsmX5*, *rsmY* y *rsmZ* por los parálogos CsrA1, CsrA2, CsrA3 y CsrA4, mostrando que cada proteína une a todos los *rsm* estudiados con la misma afinidad, pero dicha afinidad es distinta entre parálogos (Ge *et al.*, 2019). Por consiguiente, existe una diferencia funcional en la capacidad de CsrA para unir las distintas moléculas de *rsm*. Sin embargo, se debe ser cauto con los datos obtenidos *in vitro*, ya que los parálogos de *rsm* pueden presentar estructuras diferentes con comportamientos distintos con respecto a su vida media o a la afinidad por CsrA en función de las condiciones fisiológicas (temperatura, pH, etc.). Asimismo, es necesario mencionar que no solo se produce competencia entre los ARN *rsm* y los ARNm diana de CsrA, sino también entre distintos ARNm (Romeo y Babitzke, 2018). En

conjunto, los resultados presentados en este trabajo sugieren que los ARN *rsm* de Pto DC3000 no son completamente redundantes y que las diferencias en su regulación, estabilidad y función contribuyen a la versatilidad de la ruta. El estudio de las funciones de cada uno de los siete ARN *rsm* bajo otras condiciones ambientales revelará en el futuro más diferencias en sus funciones.

Este trabajo supone un avance en el conocimiento de la fisiología de *P. syringae* pv. tomato DC3000 en la relación con su interacción con la planta y el funcionamiento de su compleja ruta Gac-rsm. Se han determinado múltiples procesos celulares regulados por esta ruta, entre ellos la virulencia, y se ha profundizado en el estudio de la expresión y función específica de las proteínas CsrA y sus ARN reguladores *rsm*, apreciándose como un sistema dinámico con múltiples posibilidades de integración de señales y respuesta a condiciones específicas. De hecho, la ruta Gac-rsm juega un papel esencial en la virulencia de muchas bacterias y es clave para el establecimiento de infecciones exitosas. Este sistema parecen controlar el cambio entre distintos estados fisiológicos en el proceso infeccioso, por ejemplo el paso de un estado de colonización a otro de persistencia (Lucchetti-Miganeh *et al.*, 2008). En Pto DC3000, se regulan de forma opuesta un fenotipo centrado en el crecimiento frente a otro centrado en la producción de factores de virulencia. Sin duda, todavía quedan muchas sorpresas que revelar antes de que se llegue a un entendimiento completo del funcionamiento de la ruta Gac-rsm y su interconexión con el resto de mecanismos reguladores de la bacteria.

## CONCLUSIONES



1. La presencia de múltiples variantes de CsrA es un suceso extendido dentro del género *Pseudomonas*, especialmente en el linaje de *Pseudomonas fluorescens*. Los parálogos CsrA1 y CsrA3, además de la variante ancestral CsrA2, están presentes en la mayoría de las cepas a excepción del grupo *Pseudomonas protegens*, que no posee CsrA1.
2. El análisis del genoma de Pto DC3000 detectó cuatro parálogos de CsrA previamente anotados, CsrA1 (PSPTO\_1629), CsrA2 (PSPTO\_1844), CsrA3 (PSPTO\_3566) y CsrA4 (PSPTO\_3943), así como un nuevo parálogo denominado CsrA5 (PSPTO\_5621).
3. En medios de laboratorio y medio que simula el apoplasto vegetal, se detectaron los ARNm de *csrA2*, *csrA3* y *csrA5* con unos niveles semejantes entre ellos, mientras que *csrA1* presentó unos niveles bajos y *csrA4* fue indetectable.
4. Las regiones promotoras de los genes *csrA* son variables y su expresión parece ser compleja: *csrA1* y *csrA2* se expresan formando un operón con los genes situados en 5' y parecen presentar inicios de la transcripción propios; *csrA3* posee al menos tres inicios de la transcripción; *csrA4* se encuentra en una región críptica del genoma y *csrA5* se cotranscribe con los genes situados en 3'.
5. La mutación y sobreexpresión de *csrA1* no causaron variaciones detectables en los fenotipos de Pto DC3000 estudiados. La pérdida de función puede ser debida a un residuo básico en la posición 7 de la proteína que es básico en CsrA funcionales y está implicado en la unión a los ARNm diana.
6. En Pto DC3000 los parálogos CsrA3 y CsrA2 son los más relevantes para su fisiología, con CsrA3 jugando un papel primario y CsrA2, secundario, tanto a nivel de expresión como de funcionalidad.
7. Las proteínas CsrA2 y CsrA3 promueven un metabolismo centrado en el crecimiento y la multiplicación celular y reprimen la virulencia, motilidad *swarming* (a través de la síntesis de siringafactina) y la producción del EPS alginato.
8. CsrA2 y CsrA3 reprimen la producción del sideróforo pioverdina y aumentan la producción de ácido salicílico, precursor del sideróforo yersiniabactina, sin alterar los niveles de este último.
9. Las proteínas CsrA4 y CsrA5 son funcionales, su sobreexpresión causa un efecto sobre la motilidad *swarming*, reduciéndola, aunque no alteran la producción de sideróforos.
10. La pioverdina se puede detectar por fluorimetría por la medición directa de sobrenadantes celulares de Pto DC3000 crecidos en deficiencia de hierro, excitando a 305 nm y midiendo la absorbancia a 450 nm.
11. El ácido salicílico se puede detectar por fluorimetría por la medición directa de sobrenadantes celulares de Pto DC3000 crecidos en deficiencia de hierro, excitando a 305 nm y midiendo la absorbancia a 410 nm.

12. La actividad de los promotores de los ARN *rsm* es variable en sus niveles de expresión, en su patrón a lo largo de la curva de crecimiento y dependencia de GacA. Sin embargo, la expresión fue máxima a altas densidades celulares en todos los casos y los niveles absolutos alcanzados fueron mayores en medios de cultivo ricos.
13. Los niveles de expresión fueron altos para *rsmX3*, *rsmX5* y *rsmY*, variables para *rsmX2* y *rsmX4* y bajos para *rsmX1* y *rsmZ*. La similitud de las regiones promotoras a la reconocida por  $\sigma_{70}$  determinó la expresión de los ARN, siendo mayor cuanto más conservado está el promotor.
14. La dependencia de GacA fue alta para *rsmX2-4* y *rsmY*, menor para *rsmX1* y baja para *rsmZ*, mientras que *rsmX5* fue independiente. El efecto de este regulador está determinado por la secuencia a la que se une para promover la transcripción, siendo más fuerte cuanto más similar fue a la secuencia consenso, especialmente en la región 5' del motivo.
15. La mutación en *rsmZ* y *rsmY* causa alteraciones leves o indetectables en la fisiología de Pto DC3000, mientras que su sobreexpresión promueve la motilidad *swarming* y el correcto desarrollo de la infección en plantas de tomate, rescatando parcialmente el fenotipo de un mutante *gacA*.

## BIBLIOGRAFÍA



- Aarons, S., Abbas, A., Adams, C., Fenton, A., & O'Gara, F. (2000). A regulatory RNA (PrrB RNA) modulates expression of secondary metabolite genes in *Pseudomonas fluorescens* F113. *J Bacteriol*, *182*(14), 3913-3919. doi: 10.1128/jb.182.14.3913-3919.2000
- Abisado, R. G., Benomar, S., Klaus, J. R., Dandekar, A. A., & Chandler, J. R. (2018). Bacterial Quorum Sensing and Microbial Community Interactions. *MBio*, *9*(3), e02331-02317. doi: 10.1128/mBio.02331-17
- Adamson, D. N., & Lim, H. N. (2013). Rapid and robust signaling in the CsrA cascade via RNA-protein interactions and feedback regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *110*(32), 13120-13125. doi: 10.1073/pnas.1308476110
- Agrios, A. G. (2005). *Plant Pathology*. Amsterdam: Elsevier Academic Press.
- Ahmadi, M. K., Fawaz, S., Jones, C. H., Zhang, G., & Pfeifer, B. A. (2015). Total Biosynthesis and Diverse Applications of the Nonribosomal Peptide-Polyketide Siderophore Yersiniabactin. *Appl Environ Microbiol*, *81*(16), 5290-5298. doi: 10.1128/AEM.01373-15
- Aizawa, S. (2013). *The Flagellar World*: Academic Press.
- Alarcón-Chaidez, F. J., Keith, L., Zhao, Y., & Bender, C. L. (2003). RpoN ( $\sigma$ 54) is required for plasmid-encoded coronatine biosynthesis in *Pseudomonas syringae*. *Plasmid*, *49*(2), 106-117. doi: S0147619X02001555 [pii]
- Alfano, J. R., Charkowski, A. O., Deng, W. L., Badel, J. L., Petnicki-Ocwieja, T., van Dijk, K., & 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 U S A*, *97*(9), 4856-4861.
- Alfano, J. R., & Collmer, A. (1997). The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins, and death. *J Bacteriol*, *179*(18), 5655-5662.
- Alfano, J. R., & Collmer, A. (2004). Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annu Rev Phytopathol*, *42*, 385-414. doi: 10.1146/annurev.phyto.42.040103.110731
- Ali-Ahmad, A., Fadel, F., Sebban-Kreuzer, C., Ba, M., Pelissier, G. D., Bornet, O., Guerlesquin, F., Bourne, Y., Bordi, C., & Vincent, F. (2017). Structural and functional insights into the periplasmic detector domain of the GacS histidine kinase controlling biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci Rep*, *7*(1), 11262. doi: 10.1038/s41598-017-11361-3
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, *215*(3), 403-410. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- Andrews, S. C., Robinson, A. K., & Rodriguez-Quinones, F. (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev*, *27*(2-3), 215-237. doi: 10.1016/S0168-6445(03)00055-X
- Ang, S., Horng, Y. T., Shu, J. C., Soo, P. C., Liu, J. H., Yi, W. C., Lai, H. C., Luh, K. T., Ho, S. W., & Swift, S. (2001). The role of RsmA in the regulation of swarming motility in *Serratia marcescens*. *J Biomed Sci*, *8*(2), 160-169. doi: 10.1007/bf02256408
- Arnold, D. L., Lovell, H. C., Jackson, R. W., & Mansfield, J. W. (2011). *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola: from 'has bean' to supermodel. *Mol.Plant Pathol.*, *12*(7), 617-627. doi: 10.1111/j.1364-3703.2010.00697.x [doi]
- Arrebola, E., Carrion, V. J., Cazorla, F. M., Perez-Garcia, A., Murillo, J., & de Vicente, A. (2012). Characterisation of the mgo operon in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* UMAF0158 that is required for mangotoxin production. *BMC Microbiol*, *12*, 10. doi: 10.1186/1471-2180-12-10
- Ausmees, N., Mayer, R., Weinhouse, H., Volman, G., Amikam, D., Benziman, M., & Lindberg, M. (2001). Genetic data indicate that proteins containing the GGDEF domain possess diguanylate cyclase activity. *FEMS Microbiol.Lett.*, *204*(1), 163-167. doi: S0378-1097(01)00394-9 [pii]
- Badel, J. L., Shimizu, R., Oh, H. S., & Collmer, A. (2006). A *Pseudomonas syringae* pv. tomato *avrE1/hopM1* mutant is severely reduced in growth and lesion formation in tomato. *Mol. Plant Microbe Interact.*, *19*(2), 99-111. doi: 10.1094/MPMI-19-0099 [doi]

- Baker, C. M., Chitrakar, R., Obulareddy, N., Panchal, S., Williams, P., & Melotto, M. (2010). Molecular battles between plant and pathogenic bacteria in the phyllosphere. *Braz.J.Med.Biol.Res.*, *43*(8), 698-704. doi: S0100-879X2010007500060 [pii]
- Baker, C. S., Morozov, I., Suzuki, K., Romeo, T., & Babitzke, P. (2002). CsrA regulates glycogen biosynthesis by preventing translation of glgC in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, *44*(6), 1599-1610.
- Balleza, E., Lopez-Bojorquez, L. N., Martinez-Antonio, A., Resendis-Antonio, O., Lozada-Chavez, I., Balderas-Martinez, Y. I., Encarnacion, S., & Collado-Vides, J. (2009). Regulation by transcription factors in bacteria: beyond description. *FEMS Microbiol Rev*, *33*(1), 133-151. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00145.x
- Baltrus, D. A., McCann, H. C., & Guttman, D. S. (2017). Evolution, genomics and epidemiology of *Pseudomonas syringae*: Challenges in Bacterial Molecular Plant Pathology. *Mol Plant Pathol*, *18*(1), 152-168. doi: 10.1111/mpp.12506
- Baltrus, D. A., Nishimura, M. T., Romanchuk, A., Chang, J. H., Mukhtar, M. S., Cherkis, K., Roach, J., Grant, S. R., Jones, C. D., & Dangl, J. L. (2011). Dynamic evolution of pathogenicity revealed by sequencing and comparative genomics of 19 *Pseudomonas syringae* isolates. *PLoS Pathog*, *7*(7), e1002132. doi: 10.1371/journal.ppat.1002132
- Barahona, E., Navazo, A., Yousef-Coronado, F., Aguirre de, C. D., Martínez-Granero, F., Espinosa-Urgel, M., Martín, M., & Rivilla, R. (2010). Efficient rhizosphere colonization by *Pseudomonas fluorescens* f113 mutants unable to form biofilms on abiotic surfaces. *Environ.Microbiol.*, *12*(12), 3185-3195. doi: EMI2291 [pii];10.1111/j.1462-2920.2010.02291.x [doi]
- Baraquet, C., & Harwood, C. S. (2016). FleQ DNA binding consensus sequence revealed by studies of FleQ-dependent regulation of biofilm gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, *198*(1), 178-186. doi: 10.1128/JB.00539-15
- Bartoli, C., & Roux, F. (2017). Genome-Wide Association Studies In Plant Pathosystems: Toward an Ecological Genomics Approach. *Front Plant Sci*, *8*, 763. doi: 10.3389/fpls.2017.00763
- Bastiaansen, K. C., Otero-Asman, J. R., Luirink, J., Bitter, W., & Llamas, M. A. (2015). Processing of cell-surface signalling anti-sigma factors prior to signal recognition is a conserved autoproteolytic mechanism that produces two functional domains. *Environ Microbiol*, *17*(9), 3263-3277. doi: 10.1111/1462-2920.12776
- Battesti, A., Majdalani, N., & Gottesman, S. (2011). The RpoS-mediated general stress response in *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol*, *65*, 189-213. doi: 10.1146/annurev-micro-090110-102946
- Bender, C. L., Alarcón-Chaidez, F., & Gross, D. C. (1999). *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.*, *63*(2), 266-292.
- Berge, O., Monteil, C. L., Bartoli, C., Chandeysson, C., Guilbaud, C., Sands, D. C., & Morris, C. E. (2014). A user's guide to a data base of the diversity of *Pseudomonas syringae* and its application to classifying strains in this phylogenetic complex. *PLoS One*, *9*(9), e105547. doi: 10.1371/journal.pone.0105547
- Berndt, V., Beckstette, M., Volk, M., Dersch, P., & Bronstrup, M. (2019). Metabolome and transcriptome-wide effects of the carbon storage regulator A in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Sci Rep*, *9*(1), 138. doi: 10.1038/s41598-018-36932-w
- Berti, A. D., Greve, N. J., Christensen, Q. H., & 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*(17), 6312-6323. doi: 10.1128/JB.00725-07
- Bertram, R., & Schuster, C. F. (2014). Post-transcriptional regulation of gene expression in bacterial pathogens by toxin-antitoxin systems. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, *4*, 6-6. doi: 10.3389/fcimb.2014.00006
- Bhagirath, A. Y., Pydi, S. P., Li, Y., Lin, C., Kong, W., Chelikani, P., & Duan, K. (2017). Characterization of the direct interaction between hybrid sensor kinases PA1611 and RetS that controls biofilm formation and the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS Infect Dis*, *3*(2), 162-175. doi: 10.1021/acsinfecdis.6b00153

- Bi, S., & Sourjik, V. (2018). Stimulus sensing and signal processing in bacterial chemotaxis. *Current Opinion in Microbiology*, *45*, 22-29. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.02.002>
- Blumer, C., Heeb, S., Pessi, G., & Haas, D. (1999). Global GacA-steered control of cyanide and exoprotease production in *Pseudomonas fluorescens* involves specific ribosome binding sites. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, *96*(24), 14073-14078.
- Bordi, C., Lamy, M. C., Ventre, I., Termine, E., Hachani, A., Fillet, S., Roche, B., Blevés, S., Mejean, V., Lazdunski, A., & Filloux, A. (2010). Regulatory RNAs and the HptB/RetS signalling pathways fine-tune *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Mol.Microbiol.*, *76*(6), 1427-1443. doi: [MMI7146 \[pii\];10.1111/j.1365-2958.2010.07146.x \[doi\]](https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07146.x)
- Bossi, L., & Figueroa-Bossi, N. (2016). Competing endogenous RNAs: a target-centric view of small RNA regulation in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, *14*, 775. doi: [10.1038/nrmicro.2016.129](https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.129)
- Bouillet, S., Ba, M., Houot, L., Iobbi-Nivol, C., & Bordi, C. (2019). Connected partner-switches control the life style of *Pseudomonas aeruginosa* through RpoS regulation. *Sci Rep*, *9*(1), 6496. doi: [10.1038/s41598-019-42653-5](https://doi.org/10.1038/s41598-019-42653-5)
- Boureau, T., Routtu, J., Roine, E., Taira, S., & Romantschuk, M. (2002). Localization of hrpA-induced *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 in infected tomato leaves. *Mol.Plant Pathol.*, *3*(6), 451-460. doi: [MPP139 \[pii\];10.1046/j.1364-3703.2002.00139.x \[doi\]](https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2002.00139.x)
- Bradford, M. 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. doi: [10.1006/abio.1976.9999](https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999)
- Braun, V., & Braun, M. (2002). Iron transport and signaling in *Escherichia coli*. *FEBS Lett*, *529*(1), 78-85. doi: [10.1016/s0014-5793\(02\)03185-x](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(02)03185-x)
- Braun, Y., Smirnova, A. V., Schenk, A., Weingart, H., Burau, C., Muskhelishvili, G., & Ullrich, M. S. (2008). Component and protein domain exchange analysis of a thermoresponsive, two-component regulatory system of *Pseudomonas syringae*. *Microbiology*, *154*(Pt 9), 2700-2708. doi: [10.1099/mic.0.2008/018820-0](https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/018820-0)
- Brencic, A., & Lory, S. (2009). Determination of the regulon and identification of novel mRNA targets of *Pseudomonas aeruginosa* RsmA. *Mol Microbiol*, *72*(3), 612-632. doi: [10.1111/j.1365-2958.2009.06670.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06670.x)
- Brencic, A., McFarland, K. A., McManus, H. R., Castang, S., Mogno, I., Dove, S. L., & Lory, S. (2009). The GacS/GacA signal transduction system of *Pseudomonas aeruginosa* acts exclusively through its control over the transcription of the RsmY and RsmZ regulatory small RNAs. *Mol Microbiol*, *73*(3), 434-445. doi: [10.1111/j.1365-2958.2009.06782.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06782.x)
- Bronstein, P. A., Filiatrault, M. J., Myers, C. R., Rutzke, M., Schneider, D. J., & Cartinhour, S. W. (2008). Global transcriptional responses of *Pseudomonas syringae* DC3000 to changes in iron bioavailability *in vitro*. *BMC.Microbiol.*, *8*, 209. doi: [1471-2180-8-209 \[pii\];10.1186/1471-2180-8-209 \[doi\]](https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-209)
- Brooks, D. M., Hernández-Guzmán, G., Kloek, A. P., Alarcón-Chaidez, F., Sreedharan, A., Rangaswamy, V., Peñaloza-Vázquez, A., Bender, C. L., & 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*(2), 162-174. doi: [10.1094/MPMI.2004.17.2.162 \[doi\]](https://doi.org/10.1094/MPMI.2004.17.2.162)
- Brown, M. S., Ye, J., Rawson, R. B., & Goldstein, J. L. (2000). Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell*, *100*(4), 391-398. doi: [10.1016/s0092-8674\(00\)80675-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80675-3)
- Browning, D. F., & Busby, S. J. (2004). The regulation of bacterial transcription initiation. *Nat Rev Microbiol*, *2*(1), 57-65. doi: [10.1038/nrmicro787](https://doi.org/10.1038/nrmicro787)
- Browning, D. F., & Busby, S. J. (2016). Local and global regulation of transcription initiation in bacteria. *Nat Rev Microbiol*, *14*(10), 638-650. doi: [10.1038/nrmicro.2016.103](https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.103)
- Browning, D. F., Grainger, D. C., & Busby, S. J. (2010). Effects of nucleoid-associated proteins on bacterial chromosome structure and gene expression. *Curr Opin Microbiol*, *13*(6), 773-780. doi: [10.1016/j.mib.2010.09.013](https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.09.013)

- Buck, M., Gallegos, M. T., Studholme, D. J., Guo, Y., & Gralla, J. D. (2000). The bacterial enhancer-dependent sigma(54) (sigma(N)) transcription factor. *J Bacteriol*, *182*(15), 4129-4136. doi: 10.1128/jb.182.15.4129-4136.2000
- 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., & Collmer, A. (2003). The complete genome sequence of the *Arabidopsis* and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(18), 10181-10186.
- Bultreys, A., Gheysen, I., & de Hoffmann, E. (2006). Yersiniabactin production by *Pseudomonas syringae* and *Escherichia coli*, and description of a second yersiniabactin locus evolutionary group. *Appl Environ Microbiol*, *72*(6), 3814-3825. doi: 10.1128/AEM.00119-06
- Bultreys, A., Gheysen, I., Wathélet, B., Schafer, M., & Budzikiewicz, H. (2004). The pyoverdins of *Pseudomonas syringae* and *Pseudomonas cichorii*. *Z Naturforsch C*, *59*(9-10), 613-618.
- Burch, A. Y., Browne, P. J., Dunlap, C. A., Price, N. P., & Lindow, S. E. (2011). Comparison of biosurfactant detection methods reveals hydrophobic surfactants and contact-regulated production. *Environ. Microbiol.*, *13*(10), 2681-2691. doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02534.x [doi]
- Burch, A. Y., Do, P. T., Sbodio, A., Suslow, T. V., & Lindow, S. E. (2016). High-Level Culturability of Epiphytic Bacteria and Frequency of Biosurfactant Producers on Leaves. *Appl Environ Microbiol*, *82*(19), 5997-6009. doi: 10.1128/AEM.01751-16
- Burch, A. Y., Shimada, B. K., Browne, P. J., & Lindow, S. E. (2010). Novel high-throughput detection method to assess bacterial surfactant production. *Appl Environ Microbiol*, *76*(16), 5363-5372. doi: 10.1128/AEM.00592-10
- Burch, A. Y., Shimada, B. K., Mullin, S. W., Dunlap, C. A., Bowman, M. J., & Lindow, S. E. (2012). *Pseudomonas syringae* coordinates production of a motility-enabling surfactant with flagellar assembly. *J. Bacteriol.*, *194*(6), 1287-1298. doi: JB.06058-11 [pii];10.1128/JB.06058-11 [doi]
- Burch, A. Y., Zeisler, V., Yokota, K., Schreiber, L., & Lindow, S. E. (2014). The hygroscopic biosurfactant syringafactin produced by *Pseudomonas syringae* enhances fitness on leaf surfaces during fluctuating humidity. *Environ. Microbiol.*, *16*(7), 2086-2098. doi: 10.1111/1462-2920.12437 [doi]
- Burdon, J. J., Thrall, P. H., & Ericson, L. (2013). Genes, communities & invasive species: understanding the ecological and evolutionary dynamics of host-pathogen interactions. *Curr Opin Plant Biol*, *16*(4), 400-405. doi: 10.1016/j.pbi.2013.05.003
- Burgess, R. R. (2001). Sigma Factors. In S. Brenner & J. H. Miller (Eds.), *Encyclopedia of Genetics* (pp. 1831-1834). New York: Academic Press.
- Burrowes, E., Baysse, C., Adams, C., & O'Gara, F. (2006). Influence of the regulatory protein RsmA on cellular functions in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, as revealed by transcriptome analysis. *Microbiology*, *152*(Pt 2), 405-418. doi: 152/2/405 [pii];10.1099/mic.0.28324-0 [doi]
- Burrows, P. C., Severinov, K., Ishihama, A., Buck, M., & Wigneshweraraj, S. R. (2003). Mapping sigma 54-RNA polymerase interactions at the -24 consensus promoter element. *J Biol Chem*, *278*(32), 29728-29743. doi: 10.1074/jbc.M303596200
- Bush, M., & Dixon, R. (2012). The role of bacterial enhancer binding proteins as specialized activators of sigma54-dependent transcription. *Microbiol Mol Biol Rev*, *76*(3), 497-529. doi: 10.1128/MMBR.00006-12
- Butcher, B. G., Bronstein, P. A., Myers, C. R., Stodghill, P. V., Bolton, J. J., Markel, E. J., Filiatrault, M. J., Swingle, B., Gaballa, A., Helmann, J. D., Schneider, D. J., & Cartinhour, S. W. (2011). Characterization of the Fur regulon in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *J Bacteriol*, *193*(18), 4598-4611. doi: 10.1128/JB.00340-11
- Butz, H. A., Mey, A. R., Ciosek, A. L., & Payne, S. M. (2019). *Vibrio cholerae* CsrA Directly Regulates *varA* To

- Increase Expression of the Three Nonredundant Csr Small RNAs. *MBio*, 10(3), e01042-01019. doi: 10.1128/mBio.01042-19
- 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., & 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(4), 622-638. doi: MMI6795 [pii];10.1111/j.1365-2958.2009.06795.x [doi]
- Cain, J. A., Solis, N., & Cordwell, S. J. (2014). Beyond gene expression: The impact of protein post-translational modifications in bacteria. *Journal of Proteomics*, 97, 265-286. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.08.012>
- Camacho, M. I., Alvarez, A. F., Chavez, R. G., Romeo, T., Merino, E., & Georgellis, D. (2015). Effects of the global regulator CsrA on the BarA/UvrY two-component signaling system. *J Bacteriol*, 197(5), 983-991. doi: 10.1128/JB.02325-14
- Castillo-Lizardo, M. G., Aragón, I. M., Carvajal, V., Matas, I. M., Pérez-Bueno, M. L., Gallegos, M. T., Barón, M., & Ramos, C. (2015). Contribution of the non-effector members of the HrpL regulon, *iaaL* and *matE*, to the virulence of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 in tomato plants. *BMC. Microbiol*, 15, 165. doi: 10.1186/s12866-015-0503-8 [doi];10.1186/s12866-015-0503-8 [pii]
- Cezard, C., Farvacques, N., & Sonnet, P. (2015). Chemistry and biology of pyoverdines, *Pseudomonas* primary siderophores. *Curr Med Chem*, 22(2), 165-186.
- Cha, J. Y., Lee, D. G., Lee, J. S., Oh, J. I., & Baik, H. S. (2012). GacA directly regulates expression of several virulence genes in *Pseudomonas syringae* pv. tabaci 11528. *Biochem Biophys Res Commun*, 417(2), 665-672. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.11.124
- Chaban, B., Hughes, H. V., & Beeby, M. (2015). The flagellum in bacterial pathogens: For motility and a whole lot more. *Semin Cell Dev Biol*, 46, 91-103. doi: 10.1016/j.semcdb.2015.10.032
- Chambonnier, G., Roux, L., Redelberger, D., Fadel, F., Filloux, A., Sivaneson, M., de, B. S., & Bordi, C. (2016). The hybrid histidine kinase LadS forms a multicomponent signal transduction system with the GacS/GacA two-component system in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS. Genet.*, 12(5), e1006032. doi: 10.1371/journal.pgen.1006032 [doi];PGENETICS-D-15-02043 [pii]
- Chancey, S. T., Wood, D. W., & Pierson, L. S., 3rd. (1999). Two-component transcriptional regulation of N-acyl-homoserine lactone production in *Pseudomonas aureofaciens*. *Appl Environ Microbiol*, 65(6), 2294-2299.
- Chang, J. H., Urbach, J. M., Law, T. F., Arnold, L. W., Hu, A., Gombar, S., Grant, S. R., Ausubel, F. M., & Dangel, J. L. (2005). A high-throughput, near-saturating screen for type III effector genes from *Pseudomonas syringae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(7), 2549-2554. doi: 0409660102 [pii];10.1073/pnas.0409660102 [doi]
- Chatterjee, A., Cui, Y., Yang, H., Collmer, A., Alfano, J. R., & 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(12), 1106-1117. doi: 10.1094/MPMI.2003.16.12.1106 [doi]
- Cheng, X., de Bruijn, I., van der Voort, M., Loper, J. E., & Raaijmakers, J. M. (2013). The Gac regulon of *Pseudomonas fluorescens* SBW25. *Environ Microbiol Rep*, 5(4), 608-619. doi: 10.1111/1758-2229.12061
- Chevalier, S., Bouffartigues, E., Bazire, A., Tahrioui, A., Duchesne, R., Tortuel, D., Maillot, O., Clamens, T., Orange, N., Feuilloley, M. G. J., Lesouhaitier, O., Dufour, A., & Cornelis, P. (2019). Extracytoplasmic function sigma factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1862(7), 706-721. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2018.04.008>
- Choi, K. H., Kumar, A., & 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(3), 391-397. doi: 10.1016/j.mimet.2005.06.001

- Chojnacki, S., Cowley, A., Lee, J., Foix, A., & Lopez, R. (2017). Programmatic access to bioinformatics tools from EMBL-EBI update: 2017. *Nucleic Acids Res*, 45(W1), W550-W553. doi: 10.1093/nar/gkx273
- Clark, W. A. (1976). A simplified Leifson flagella stain. *J Clin Microbiol*, 3(6), 632-634.
- Cody, Y. S., & Gross, D. C. (1987). Outer membrane protein mediating iron uptake via pyoverdinpss, the fluorescent siderophore produced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *J Bacteriol*, 169(5), 2207-2214. doi: 10.1128/jb.169.5.2207-2214.1987
- Coggan, K. A., & Wolfgang, M. C. (2012). Global regulatory pathways and cross-talk control *Pseudomonas aeruginosa* environmental lifestyle and virulence phenotype. *Curr. Issues Mol. Biol.*, 14(2), 47-70. doi: v14/47 [pii]
- Collmer, A., Badel, J. L., Charkowski, A. O., Deng, W. L., Fouts, D. E., Ramos, A. R., Rehm, A. H., Anderson, D. M., Schneewind, O., van Dijk, K., & Alfano, J. R. (2000). *Pseudomonas syringae* Hrp type III secretion system and effector proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(16), 8770-8777.
- Colvin, K. M., Gordon, V. D., Murakami, K., Borlee, B. R., Wozniak, D. J., Wong, G. C., & Parsek, M. R. (2011). The Pel polysaccharide can serve a structural and protective role in the biofilm matrix of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog.*, 7(1), e1001264. doi: 10.1371/journal.ppat.1001264 [doi]
- Colvin, K. M., Irie, Y., Tart, C. S., Urbano, R., Whitney, J. C., Ryder, C., Howell, P. L., Wozniak, D. J., & Parsek, M. R. (2012). The Pel and Psl polysaccharides provide *Pseudomonas aeruginosa* structural redundancy within the biofilm matrix. *Environ. Microbiol.*, 14(8), 1913-1928. doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02657.x [doi]
- Cornelis, G. R. (2006). The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol*, 4(11), 811-825. doi: 10.1038/nrmicro1526
- Cornelis, P. (2010). Iron uptake and metabolism in pseudomonads. *Appl Microbiol Biotechnol*, 86(6), 1637-1645. doi: 10.1007/s00253-010-2550-2
- Crick, F. (1970). Central Dogma of Molecular Biology. *Nature*, 227(5258), 561-563. doi: 10.1038/227561a0
- Cunnac, S., Chakravarthy, S., Kvitko, B. H., Russell, A. B., Martin, G. B., & Collmer, A. (2011). Genetic disassembly and combinatorial reassembly identify a minimal functional repertoire of type III effectors in *Pseudomonas syringae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(7), 2975-2980. doi: 10.1073/pnas.1013031108
- Cunnac, S., Lindeberg, M., & Collmer, A. (2009). *Pseudomonas syringae* type III secretion system effectors: repertoires in search of functions. *Curr Opin Microbiol*, 12(1), 53-60. doi: 10.1016/j.mib.2008.12.003
- Cuppels, D. A. (1986). Generation and characterization of Tn5 insertion mutations in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Appl Environ Microbiol*, 51(2), 323-327.
- Danson, A. E., Jovanovic, M., Buck, M., & Zhang, X. (2019). Mechanisms of sigma(54)-Dependent Transcription Initiation and Regulation. *J Mol Biol*. doi: 10.1016/j.jmb.2019.04.022
- Darty, K., Denise, A., & Ponty, Y. (2009). VARNA: Interactive drawing and editing of the RNA secondary structure. *Bioinformatics*, 25(15), 1974-1975. doi: 10.1093/bioinformatics/btp250
- Das, P., Mukherjee, S., & Sen, R. (2008). Genetic regulations of the biosynthesis of microbial surfactants: an overview. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 25, 165-185.
- Dasgupta, N., Wolfgang, M. C., Goodman, A. L., Arora, S. K., Jyot, J., Lory, S., & Ramphal, R. (2003). A four-tiered transcriptional regulatory circuit controls flagellar biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.*, 50(3), 809-824.
- Defoirdt, T. (2018). Quorum-Sensing Systems as Targets for Antivirulence Therapy. *Trends in Microbiology*, 26(4), 313-328. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.10.005>
- Defoirdt, T., Boon, N., Sorgeloos, P., Verstraete, W., & Bossier, P. (2008). Quorum sensing and quorum quenching in *Vibrio harveyi*: lessons learned from in vivo work. *The ISME Journal*, 2(1), 19-26. doi: 10.1038/ismej.2007.92

- Deng, W., Marshall, N. C., Rowland, J. L., McCoy, J. M., Worrall, L. J., Santos, A. S., Strynadka, N. C. J., & Finlay, B. B. (2017). Assembly, structure, function and regulation of type III secretion systems. *Nat Rev Microbiol*, *15*(6), 323-337. doi: 10.1038/nrmicro.2017.20
- Dillon, S. C., & Dorman, C. J. (2010). Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression. *Nat Rev Microbiol*, *8*(3), 185-195. doi: 10.1038/nrmicro2261
- Domínguez-Cuevas, P., & Marqués, S. (2004). Compiling Sigma-70-Dependent Promoters. In J.-L. Ramos (Ed.), *Virulence and Gene Regulation* (pp. 319-343). Boston, MA: Springer US.
- Dubey, A. K., Baker, C. S., Romeo, T., & Babitzke, P. (2005). RNA sequence and secondary structure participate in high-affinity CsrA-RNA interaction. *RNA*, *11*(10), 1579-1587. doi: 10.1261/rna.2990205
- Dugar, G., Svensson, S. L., Bischler, T., Waldchen, S., Reinhardt, R., Sauer, M., & Sharma, C. M. (2016). The CsrA-FliW network controls polar localization of the dual-function flagellin mRNA in *Campylobacter jejuni*. *Nat. Commun.*, *7*, 11667. doi: ncomms11667 [pii];10.1038/ncomms11667 [doi]
- Duss, O., Michel, E., Diarra Dit, K. N., Schubert, M., & Allain, F. H. (2014a). Molecular basis for the wide range of affinity found in Csr/Rsm protein-RNA recognition. *Nucleic Acids Res.*, *42*(8), 5332-5346. doi: gku141 [pii];10.1093/nar/gku141 [doi]
- Duss, O., Michel, E., Yulikov, M., Schubert, M., Jeschke, G., & Allain, F. H. (2014b). Structural basis of the non-coding RNA RsmZ acting as a protein sponge. *Nature*, *509*(7502), 588-592. doi: nature13271 [pii];10.1038/nature13271 [doi]
- Eoh, H., & Rhee, K. Y. (2014). Allostery and compartmentalization: old but not forgotten. *Current Opinion in Microbiology*, *18*, 23-29. doi: https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.01.007
- Fakhr, M. K., Penaloza-Vazquez, A., Chakrabarty, A. M., & Bender, C. L. (1999). Regulation of alginate biosynthesis in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *J. Bacteriol.*, *181*(11), 3478-3485.
- Falke, J. J., & Piasta, K. N. (2014). Architecture and signal transduction mechanism of the bacterial chemosensory array: Progress, controversies, and challenges. *Current Opinion in Structural Biology*, *29*, 85-94. doi: https://doi.org/10.1016/j.sbi.2014.10.001
- Farias, G. A., Olmedilla, A., & Gallegos, M. T. (2019). Visualization and characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 pellicles. *Microb Biotechnol.* doi: 10.1111/1751-7915.13385
- Feil, H., Feil, W. S., Chain, P., Larimer, F., DiBartolo, G., Copeland, A., Lykidis, A., Trong, S., Nolan, M., Goltsman, E., Thiel, J., Malfatti, S., Loper, J. E., Lapidus, A., Detter, J. C., Land, M., Richardson, P. M., Kyrpides, N. C., Ivanova, N., & Lindow, S. E. (2005). Comparison of the complete genome sequences of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a and pv. *tomato* DC3000. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*(31), 11064-11069. doi: 10.1073/pnas.0504930102
- Feklistov, A., Sharon, B. D., Darst, S. A., & Gross, C. A. (2014). Bacterial sigma factors: a historical, structural, and genomic perspective. *Annu Rev Microbiol*, *68*, 357-376. doi: 10.1146/annurev-micro-092412-155737
- Fernandez, M., Morel, B., Corral-Lugo, A., Rico-Jimenez, M., Martin-Mora, D., Lopez-Farfan, D., Reyes-Darias, J. A., Matilla, M. A., Ortega, A., & Krell, T. (2016). Identification of ligands for bacterial sensor proteins. *Curr Genet*, *62*(1), 143-147. doi: 10.1007/s00294-015-0528-4
- 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., & 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*(11), 1167-1179. doi: 10.1094/MPMI-19-1167 [doi]
- Ferreiro, M. D., Nogales, J., Farias, G. A., Olmedilla, A., Sanjuan, J., & Gallegos, M. T. (2018). Multiple CsrA Proteins Control Key Virulence Traits in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Mol Plant Microbe Interact*, *31*(5), 525-536. doi: 10.1094/MPMI-09-17-0232-R
- Figueroa-Bossi, N., Schwartz, A., Guillemardet, B., D'Heygere, F., Bossi, L., & Boudvillain, M. (2014). RNA remodeling by bacterial global regulator CsrA promotes Rho-dependent transcription termination. *Genes Dev*, *28*(11), 1239-1251. doi: 10.1101/gad.240192.114

- Filiatrault, M. J., Stodghill, P. V., Myers, C. R., Bronstein, P. A., Butcher, B. G., Lam, H., Grills, G., Schweitzer, P., Wang, W., Schneider, D. J., & Cartinhour, S. W. (2011). Genome-wide identification of transcriptional start sites in the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato str. DC3000. *PLoS One*, *6*(12), e29335. doi: 10.1371/journal.pone.0029335 [doi];PONE-D-11-13421 [pii]
- Firoved, A. M., Boucher, J. C., & Deretic, V. (2002). Global Genomic Analysis of AlgU ( $\sigma$ E)-Dependent Promoters (Sigmulon) in *Pseudomonas aeruginosa* and Implications for Inflammatory Processes in Cystic Fibrosis. *J Bacteriol*, *184*(4), 1057-1064. doi: 10.1128/jb.184.4.1057-1064.2002
- Folkesson, A., Jelsbak, L., Yang, L., Johansen, H. K., Ciofu, O., Hoiby, N., & Molin, S. (2012). Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. *Nat Rev Microbiol*, *10*(12), 841-851. doi: 10.1038/nrmicro2907
- Fortune, D. R., Suyemoto, M., & Altier, C. (2006). Identification of CsrC and characterization of its role in epithelial cell invasion in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun*, *74*(1), 331-339. doi: 10.1128/iai.74.1.331-339.2006
- 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., vanDijk, K., Tang, X., & Collmer, A. (2002). Genomewide identification of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 promoters controlled by the HrpL alternative sigma factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *99*(4), 2275-2280. doi: 10.1073/pnas.032514099 [doi];99/4/2275 [pii]
- Fouts, D. E., Badel, J. L., Ramos, A. R., Rapp, R. A., & 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*(1), 43-52. doi: 10.1094/MPMI.2003.16.1.43
- Frangipani, E., Visaggio, D., Heeb, S., Kaefer, V., Cámara, M., Visca, P., & Imperi, F. (2014). The Gac/Rsm and cyclic-di-GMP signalling networks coordinately regulate iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol*, *16*(3), 676-688. doi: 10.1111/1462-2920.12164
- Franza, T., & Expert, D. (2013). Role of iron homeostasis in the virulence of phytopathogenic bacteria: an 'a la carte' menu. *Mol Plant Pathol*, *14*(4), 429-438. doi: 10.1111/mpp.12007
- Galán, J. E., Lara-Tejero, M., Marlovits, T. C., & Wagner, S. (2014). Bacterial type III secretion systems: specialized nanomachines for protein delivery into target cells. *Annu Rev Microbiol*, *68*, 415-438. doi: 10.1146/annurev-micro-092412-155725
- Galperin, M. Y. (2004). Bacterial signal transduction network in a genomic perspective. *Environ Microbiol*, *6*(6), 552-567. doi: 10.1111/j.1462-2920.2004.00633.x
- Galperin, M. Y. (2005). A census of membrane-bound and intracellular signal transduction proteins in bacteria: bacterial IQ, extroverts and introverts. *BMC Microbiol*, *5*, 35. doi: 10.1186/1471-2180-5-35
- Galperin, M. Y. (2018). What bacteria want. *Environ Microbiol*, *20*(12), 4221-4229. doi: 10.1111/1462-2920.14398
- Galperin, M. Y., Higdon, R., & Kolker, E. (2010). Interplay of heritage and habitat in the distribution of bacterial signal transduction systems. *Mol Biosyst*, *6*(4), 721-728.
- Garibaldi, A., Minuto, A., Scortichini, M., & Gullino, M. L. (2007). First Report of *Syringae* Leaf Spot Caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on Tomato in Italy. *Plant Dis*, *91*(11), 1518. doi: 10.1094/PDIS-91-11-1518B
- Ge, Y., Lee, J. H., Liu, J., Yang, H. W., Tian, Y., Hu, B., & Zhao, Y. (2019). Homologues of the RNA binding protein RsmA in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 exhibit distinct binding affinities with non-coding small RNAs and have distinct roles in virulence. *Mol Plant Pathol*, *20*(9), 1217-1236. doi: 10.1111/mpp.12823
- Ge, Y., Yang, S., Fang, Y., Yang, R., Mou, D., Cui, J., & Wen, L. (2007). RpoS as an intermediate in RsmA-dependent regulation of secondary antifungal metabolites biosynthesis in *Pseudomonas* sp. M18. *FEMS Microbiol Lett*, *268*(1), 81-87. doi: 10.1111/j.1574-6968.2006.00562.x

- Geng, X., Jin, L., Shimada, M., Kim, M. G., & Mackey, D. (2014). The phytotoxin coronatine is a multifunctional component of the virulence armament of *Pseudomonas syringae*. *Planta*. doi: 10.1007/s00425-014-2151-x [doi]
- Goodman, A. L., Kulasekara, B., Rietsch, A., Boyd, D., Smith, R. S., & Lory, S. (2004). A signaling network reciprocally regulates genes associated with acute infection and chronic persistence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Dev Cell*, 7(5), 745-754. doi: 10.1016/j.devcel.2004.08.020
- Goodman, A. L., Merighi, M., Hyodo, M., Ventre, I., Filloux, A., & Lory, S. (2009). Direct interaction between sensor kinase proteins mediates acute and chronic disease phenotypes in a bacterial pathogen. *Genes Dev*, 23(2), 249-259. doi: 10.1101/gad.1739009
- Gottesman, S. (1984). Bacterial regulation: global regulatory networks. *Annu Rev Genet*, 18, 415-441. doi: 10.1146/annurev.ge.18.120184.002215
- Gottesman, S. (2019). Trouble is coming: Signaling pathways that regulate general stress responses in bacteria. *J Biol Chem*, 294(31), 11685-11700. doi: 10.1074/jbc.REV119.005593
- Gottesman, S., & Storz, G. (2011). Bacterial small RNA regulators: versatile roles and rapidly evolving variations. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(12), a003798. doi: 10.1101/cshperspect.a003798
- Grenga, L., Little, R. H., & Malone, J. G. (2017). Quick change: post-transcriptional regulation in *Pseudomonas*. *FEMS Microbiol Lett*, 364(14). doi: 10.1093/femsle/fnx125
- Groisman, E. A. (2016). Feedback Control of Two-Component Regulatory Systems. *Annual Review of Microbiology*, 70(1), 103-124. doi: 10.1146/annurev-micro-102215-095331
- Gu, H., Qi, H., Chen, S., Shi, K., Wang, H., & Wang, J. (2018). Carbon storage regulator CsrA plays important roles in multiple virulence-associated processes of *Clostridium difficile*. *Microb Pathog*, 121, 303-309. doi: 10.1016/j.micpath.2018.05.052
- Gudapaty, S., Suzuki, K., Wang, X., Babitzke, P., & Romeo, T. (2001). Regulatory interactions of Csr components: the RNA binding protein CsrA activates *csrB* transcription in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 183(20), 6017-6027. doi: 10.1128/JB.183.20.6017-6027.2001
- Gur, E., Biran, D., & Ron, E. Z. (2011). Regulated proteolysis in Gram-negative bacteria--how and when? *Nat Rev Microbiol*, 9(12), 839-848. doi: 10.1038/nrmicro2669
- Gurung, J., Khyriem, A. B., Banik, A., Lyngdoh, W. V., Choudhury, B., & Bhattacharyya, P. (2013). Association of biofilm production with multidrug resistance among clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* from intensive care unit. *Indian J Crit Care Med*, 17(4), 214-218. doi: 10.4103/0972-5229.118416
- Guttman, D. S., Morgan, R. L., & Wang, P. W. (2008). The Evolution of the Pseudomonads. In M. B. Fatmi, A. Collmer, N. S. Iacobellis, J. W. Mansfield, J. Murillo, N. W. Schaad & M. Ullrich (Eds.), *Pseudomonas syringae Pathovars and Related Pathogens – Identification, Epidemiology and Genomics* (pp. 307-319). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Haapalainen, M., van, G. K., Pirhonen, M., & Taira, S. (2009). Soluble plant cell signals induce the expression of the type III secretion system of *Pseudomonas syringae* and upregulate the production of pilus protein HrpA. *Mol.Plant Microbe Interact.*, 22(3), 282-290. doi: 10.1094/MPMI-22-3-0282 [doi]
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, 166(4), 557-580.
- Hannauer, M., Braud, A., Hoegy, F., Ronot, P., Boos, A., & Schalk, I. J. (2012). The PvdRT-OpmQ efflux pump controls the metal selectivity of the iron uptake pathway mediated by the siderophore pyoverdine in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol*, 14(7), 1696-1708. doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02674.x
- Hawver, L. A., Jung, S. A., & Ng, W.-L. (2016). Specificity and complexity in bacterial quorum-sensing systems. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(5), 738-752. doi: 10.1093/femsre/fuw014
- Hay, I. D., Wang, Y., Moradali, M. F., Rehman, Z. U., & Rehm, B. H. (2014). Genetics and regulation of bacterial alginate production. *Environ Microbiol*, 16(10), 2997-3011. doi: 10.1111/1462-2920.12389

- Hazelbauer, G. L., Falke, J. J., & Parkinson, J. S. (2008). Bacterial chemoreceptors: high-performance signaling in networked arrays. *Trends in Biochemical Sciences*, 33(1), 9-19. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2007.09.014>
- Heeb, S., Blumer, C., & Haas, D. (2002). Regulatory RNA as Mediator in GacA/RsmA-Dependent Global Control of Exoproduct Formation in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *J Bacteriol*, 184(4), 1046-1056. doi: 10.1128/jb.184.4.1046-1056.2002
- Heeb, S., & Haas, D. (2001). Regulatory roles of the GacS/GacA two-component system in plant-associated and other Gram-negative bacteria. *Mol.Plant Microbe Interact.*, 14(12), 1351-1363. doi: 10.1094/MPMI.2001.14.12.1351 [doi]
- Heeb, S., Kuehne, S. A., Bycroft, M., Crivii, S., Allen, M. D., Haas, D., Camara, M., & Williams, P. (2006). Functional analysis of the post-transcriptional regulator RsmA reveals a novel RNA-binding site. *J Mol Biol*, 355(5), 1026-1036. doi: 10.1016/j.jmb.2005.11.045
- Heeb, S., Valverde, C., Gigot-Bonnefoy, C., & Haas, D. (2005). Role of the stress sigma factor RpoS in GacA/RsmA-controlled secondary metabolism and resistance to oxidative stress in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *FEMS Microbiol Lett*, 243(1), 251-258. doi: 10.1016/j.femsle.2004.12.008
- Hengge, R. (2009). Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nat Rev Microbiol*, 7(4), 263-273. doi: 10.1038/nrmicro2109
- Hengge, R., Grundling, A., Jenal, U., Ryan, R., & Yildiz, F. (2016). Bacterial signal transduction by cyclic di-GMP and other nucleotide second messengers. *J Bacteriol*, 198(1), 15-26. doi: 10.1128/JB.00331-15
- Hernández-Eligio, A., Moreno, S., Castellanos, M., Castañeda, M., Núñez, C., Muriel-Millán, L. F., & Espín, G. (2012). RsmA post-transcriptionally controls PhbR expression and polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiology*, 158(Pt 8), 1953-1963. doi: mic.0.059329-0 [pii];10.1099/mic.0.059329-0 [doi]
- Heurlier, K., Williams, F., Heeb, S., Dormond, C., Pessi, G., Singer, D., Camara, M., Williams, P., & Haas, D. (2004). Positive control of swarming, rhamnolipid synthesis, and lipase production by the posttranscriptional RsmA/RsmZ system in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol*, 186(10), 2936-2945. doi: 10.1128/jb.186.10.2936-2945.2004
- Hirano, S. S., & 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(3), 624-653.
- Hockett, K. L., Burch, A. Y., & Lindow, S. E. (2013). Thermo-regulation of genes mediating motility and plant interactions in *Pseudomonas syringae*. *PLoS.One.*, 8(3), e59850. doi: 10.1371/journal.pone.0059850 [doi];PONE-D-12-40537 [pii]
- Hoegy, F., Mislin, G. L., & Schalk, I. J. (2014). Pyoverdine and pyochelin measurements. *Methods Mol Biol*, 1149, 293-301. doi: 10.1007/978-1-4939-0473-0\_24
- Holmqvist, E., & Vogel, J. (2018). RNA-binding proteins in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 16(10), 601-615. doi: 10.1038/s41579-018-0049-5
- Holmqvist, E., Wright, P. R., Li, L., Bischler, T., Barquist, L., Reinhardt, R., Backofen, R., & Vogel, J. (2016). Global RNA recognition patterns of post-transcriptional regulators Hfq and CsrA revealed by UV crosslinking *in vivo*. *EMBO J.*, 35(9), 991-1011. doi: embj.201593360 [pii];10.15252/embj.201593360 [doi]
- Hor, J., Gorski, S. A., & Vogel, J. (2018). Bacterial RNA Biology on a Genome Scale. *Molecular cell*, 70(5), 785-799. doi: 10.1016/j.molcel.2017.12.023
- Hrabak, E. M., & Willis, D. K. (1992). The *lemA* gene required for pathogenicity of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on bean is a member of a family of two-component regulators. *J.Bacteriol.*, 174(9), 3011-3020.
- Hsu, J. L., Chen, H. C., Peng, H. L., & Chang, H. Y. (2008). Characterization of the histidine-containing phosphotransfer protein B-mediated multistep phosphorelay system in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Biol Chem*, 283(15), 9933-9944. doi: 10.1074/jbc.M708836200
- Huang, H. C., Schuurink, R., Denny, T. P., Atkinson, M. M., Baker, C. J., Yucel, I., Hutcheson, S. W., & Collmer, A. (1988). Molecular cloning of a *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* gene cluster that

- enables *Pseudomonas fluorescens* to elicit the hypersensitive response in tobacco plants. *J Bacteriol*, 170(10), 4748-4756.
- Huertas-Rosales, O., Ramos-González, M. I., & Espinosa-Urgel, M. (2016). Self-regulation and interplay of Rsm family proteins modulate the lifestyle of *Pseudomonas putida*. *Appl Environ Microbiol*, 82(18), 5673-5686. doi: 10.1128/AEM.01724-16
- Huertas-Rosales, O., Romero, M., Heeb, S., Espinosa-Urgel, M., Cámara, M., & Ramos-González, M. I. (2017). The *Pseudomonas putida* CsrA/RsmA homologues negatively affect c-di-GMP pools and biofilm formation through the GGDEF/EAL response regulator CfcR. *Environ Microbiol*, 19(9), 3551-3566. doi: 10.1111/1462-2920.13848
- Humair, B., Wackwitz, B., & Haas, D. (2010). GacA-controlled activation of promoters for small RNA genes in *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76(5), 1497-1506. doi: AEM.02014-09 [pii];10.1128/AEM.02014-09 [doi]
- Hutcheson, S. W., Bretz, J., Sussan, T., Jin, S., & 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(19), 5589-5598. doi: 10.1128/JB.183.19.5589-5598.2001 [doi]
- Huynh, T. V., Dahlbeck, D., & Staskawicz, B. J. (1989). Bacterial blight of soybean: regulation of a pathogen gene determining host cultivar specificity. *Science*, 245(4924), 1374-1377.
- Irie, Y., Starkey, M., Edwards, A. N., Wozniak, D. J., Romeo, T., & Parsek, M. R. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix polysaccharide Psl is regulated transcriptionally by RpoS and post-transcriptionally by RsmA. *Mol. Microbiol.*, 78(1), 158-172. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07320.x [doi]
- Irving, S. E., & Corrigan, R. M. (2018). Triggering the stringent response: signals responsible for activating (p)ppGpp synthesis in bacteria. *Microbiology*, 164(3), 268-276. doi: <https://doi.org/10.1099/mic.0.000621>
- Jacob, F., & Monod, J. (1961). Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J Mol Biol*, 3, 318-356. doi: 10.1016/s0022-2836(61)80072-7
- Janssen, K. H., Diaz, M. R., Gode, C. J., Wolfgang, M. C., & Yahr, T. L. (2018a). RsmV, a small noncoding regulatory RNA in *Pseudomonas aeruginosa* that sequesters RsmA and RsmF from target mRNAs. *J Bacteriol*, 200(16). doi: 10.1128/JB.00277-18
- Janssen, K. H., Diaz, M. R., Golden, M., Graham, J. W., Sanders, W., Wolfgang, M. C., & Yahr, T. L. (2018b). Functional analyses of the RsmY and RsmZ small noncoding regulatory RNAs in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 200(11). doi: 10.1128/JB.00736-17
- Jarrell, K. F., & McBride, M. J. (2008). The surprisingly diverse ways that prokaryotes move. *Nature Reviews Microbiology*, 6, 466. doi: 10.1038/nrmicro1900
- Jean-Pierre, F., Tremblay, J., & Deziel, E. (2016). Broth versus surface-grown cells: differential regulation of RsmY/Z small RNAs in *Pseudomonas aeruginosa* by the Gac/HptB system. *Front Microbiol*, 7, 2168. doi: 10.3389/fmicb.2016.02168
- Jenal, U., & Malone, J. (2006). Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria. *Annu Rev Genet*, 40, 385-407. doi: 10.1146/annurev.genet.40.110405.090423
- Jennings, L. K., Storek, K. M., Ledvina, H. E., Coulon, C., Marmont, L. S., Sadovskaya, I., Secor, P. R., Tseng, B. S., Scian, M., Filloux, A., Wozniak, D. J., Howell, P. L., & Parsek, M. R. (2015). Pel is a cationic exopolysaccharide that cross-links extracellular DNA in the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(36), 11353-11358. doi: 10.1073/pnas.1503058112
- Jiménez-Fernández, A., López-Sánchez, A., Jiménez-Díaz, L., Navarrete, B., Calero, P., Platero, A. I., & Govantes, F. (2016). Complex interplay between FleQ, cyclic diguanylate and multiple sigma factors coordinately regulates flagellar motility and biofilm development in *Pseudomonas putida*. *PLoS One*, 11(9), e0163142. doi: 10.1371/journal.pone.0163142 [doi];PONE-D-15-56230 [pii]
- Jimenez, P. N., Koch, G., Thompson, J. A., Xavier, K. B., Cool, R. H., & Quax, W. J. (2012). The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 76(1), 46-65. doi: 10.1128/MMBR.05007-11

- 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., & 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*(18), 6488-6498. doi: 10.1128/JB.187.18.6488-6498.2005
- Jones, A. M., Lindow, S. E., & Wildermuth, M. C. (2007). Salicylic acid, yersiniabactin, and pyoverdinin production by the model phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000: synthesis, regulation, and impact on tomato and *Arabidopsis* host plants. *J Bacteriol.*, *189*(19), 6773-6786. doi: JB.00827-07 [pii];10.1128/JB.00827-07 [doi]
- Jones, A. M., & Wildermuth, M. C. (2011). The phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 has three high-affinity iron-scavenging systems functional under iron limitation conditions but dispensable for pathogenesis. *J Bacteriol*, *193*(11), 2767-2775. doi: 10.1128/JB.00069-10
- Jones, J. D., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, *444*(7117), 323-329. doi: 10.1038/nature05286
- Jovanovic, M., James, E. H., Burrows, P. C., Rego, F. G., Buck, M., & Schumacher, J. (2011). Regulation of the co-evolved HrpR and HrpS AAA+ proteins required for *Pseudomonas syringae* pathogenicity. *Nat. Commun.*, *2*, 177. doi: ncomms1177 [pii];10.1038/ncomms1177 [doi]
- Jovanovic, M., Lawton, E., Schumacher, J., & Buck, M. (2014). Interplay among *Pseudomonas syringae* HrpR, HrpS and HrpV proteins for regulation of the type III secretion system. *FEMS Microbiol. Lett.*, *356*(2), 201-211. doi: 10.1111/1574-6968.12476 [doi]
- Jung, K., Fabiani, F., Hoyer, E., & Lassak, J. (2018). Bacterial transmembrane signalling systems and their engineering for biosensing. *Open biology*, *8*(4), 180023. doi: 10.1098/rsob.180023
- Jung, K., Fried, L., Behr, S., & Heermann, R. (2012). Histidine kinases and response regulators in networks. *Curr Opin Microbiol*, *15*(2), 118-124. doi: 10.1016/j.mib.2011.11.009
- Kalia, D., Merey, G., Nakayama, S., Zheng, Y., Zhou, J., Luo, Y., Guo, M., Roembke, B. T., & Sintim, H. O. (2013). Nucleotide, c-di-GMP, c-di-AMP, cGMP, cAMP, (p)ppGpp signaling in bacteria and implications in pathogenesis. *Chem.Soc.Rev.*, *42*(1), 305-341. doi: 10.1039/c2cs35206k [doi]
- Kavita, K., de Mets, F., & Gottesman, S. (2018). New aspects of RNA-based regulation by Hfq and its partner sRNAs. *Current Opinion in Microbiology*, *42*, 53-61. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.10.014>
- Kay, E., Dubuis, C., & Haas, D. (2005). Three small RNAs jointly ensure secondary metabolism and biocontrol in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*(47), 17136-17141. doi: 10.1073/pnas.0505673102
- Kay, E., Humair, B., Denervaud, V., Riedel, K., Spahr, S., Eberl, L., Valverde, C., & Haas, D. (2006). Two GacA-dependent small RNAs modulate the quorum-sensing response in *Pseudomonas aeruginosa*. *J.Bacteriol.*, *188*(16), 6026-6033. doi: 188/16/6026 [pii];10.1128/JB.00409-06 [doi]
- Kazmierczak, M. J., Wiedmann, M., & Boor, K. J. (2005). Alternative sigma factors and their roles in bacterial virulence. *Microbiol Mol Biol Rev*, *69*(4), 527-543. doi: 10.1128/MMBR.69.4.527-543.2005
- Kearns, D. B. (2010). A field guide to bacterial swarming motility. *Nat Rev Microbiol*, *8*(9), 634-644. doi: 10.1038/nrmicro2405
- Keith, R. C., Keith, L. M., Hernandez-Guzman, G., Uppalapati, S. R., & Bender, C. L. (2003). Alginate gene expression by *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 in host and non-host plants. *Microbiology*, *149*(Pt 5), 1127-1138. doi: 10.1099/mic.0.26109-0
- Khan, A., Singh, P., & Srivastava, A. (2018). Synthesis, nature and utility of universal iron chelator - Siderophore: A review. *Microbiol Res*, *212-213*, 103-111. doi: 10.1016/j.micres.2017.10.012
- Kim, B. J., Schneider, D. J., Cartinhour, S. W., & Shuler, M. L. (2010). Complex responses to culture conditions in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 continuous cultures: the role of iron in

- cell growth and virulence factor induction. *Biotechnol. Bioeng.*, 105(5), 955-964. doi: 10.1002/bit.22609 [doi]
- Kinscherf, T. G., & Willis, D. K. (1999). Swarming by *Pseudomonas syringae* B728a requires *gacS* (*lemA*) and *gacA* but not the acyl-homoserine lactone biosynthetic gene *ahlI*. *J. Bacteriol.*, 181(13), 4133-4136.
- Kinscherf, T. G., & Willis, D. K. (2002). Global regulation by *gidA* in *Pseudomonas syringae*. *J. Bacteriol.*, 184(8), 2281-2286. doi: 10.1128/jb.184.8.2281-2286.2002
- Klement, Z., Bozso, Z., Kecskes, M. L., Besenyei, E., Arnold, C., & Ott, P. G. (2003). Local early induced resistance of plants as the first line of defence against bacteria. *Pest Manag Sci*, 59(4), 465-474. doi: 10.1002/ps.694
- Koh, E. I., Robinson, A. E., Bandara, N., Rogers, B. E., & Henderson, J. P. (2017). Copper import in *Escherichia coli* by the yersiniabactin metallophore system. *Nat Chem Biol*, 13(9), 1016-1021. doi: 10.1038/nchembio.2441
- Koike, S. T., Alger, E. I., Ramos-Sepulveda, L., & Bull, C. T. (2017). First Report of Bacterial Leaf Spot Caused by *Pseudomonas syringae* pv. tomato on Kale in California. *Plant Disease*, 101(3), 504-504. doi: 10.1094/pdis-10-16-1460-pdn
- Koiv, V., Andresen, L., Broberg, M., Frolova, J., Somervuo, P., Auvinen, P., Pirhonen, M., Tenson, T., & Mae, A. (2013). Lack of RsmA-mediated control results in constant hypervirulence, cell elongation, and hyperflagellation in *Pectobacterium wasabiae*. *PLoS One*, 8(1), e54248. doi: 10.1371/journal.pone.0054248
- Kong, H. S., Roberts, D. P., Patterson, C. D., Kuehne, S. A., Heeb, S., Lakshman, D. K., & Lydon, J. (2012). Effect of overexpressing *rsmA* from *Pseudomonas aeruginosa* on virulence of select phytotoxin-producing strains of *P. syringae*. *Phytopathology*, 102(6), 575-587. doi: 10.1094/PHYTO-09-11-0267 [doi]
- Kong, W., Chen, L., Zhao, J., Shen, T., Surette, M. G., Shen, L., & Duan, K. (2013). Hybrid sensor kinase PA1611 in *Pseudomonas aeruginosa* regulates transitions between acute and chronic infection through direct interaction with RetS. *Mol. Microbiol.*, 88(4), 784-797. doi: 10.1111/mmi.12223 [doi]
- Kortmann, J., & Narberhaus, F. (2012). Bacterial RNA thermometers: molecular zippers and switches. *Nat Rev Microbiol*, 10(4), 255-265. doi: 10.1038/nrmicro2730
- Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R. M., 2nd, & Peterson, K. M. (1995). Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene*, 166(1), 175-176.
- Kulkarni, P. R., Cui, X., Williams, J. W., Stevens, A. M., & Kulkarni, R. V. (2006). Prediction of CsrA-regulating small RNAs in bacteria and their experimental verification in *Vibrio fischeri*. *Nucleic Acids Res*, 34(11), 3361-3369. doi: 10.1093/nar/gkl439
- Kulkarni, P. R., Jia, T., Kuehne, S. A., Kerkering, T. M., Morris, E. R., Searle, M. S., Heeb, S., Rao, J., & Kulkarni, R. V. (2014). A sequence-based approach for prediction of CsrA/RsmA targets in bacteria with experimental validation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nucleic Acids Res.*, 42(11), 6811-6825. doi: gku309 [pii];10.1093/nar/gku309 [doi]
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Nnyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol*, 35(6), 1547-1549. doi: 10.1093/molbev/msy096
- Kvitko, B. H., Park, D. H., Velasquez, A. C., Wei, C. F., Russell, A. B., Martin, G. B., Schneider, D. J., & Collmer, A. (2009). Deletions in the repertoire of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 type III secretion effector genes reveal functional overlap among effectors. *PLoS Pathog.*, 5(4), e1000388. doi: 10.1371/journal.ppat.1000388 [doi]
- Lalaouna, D., Fochesato, S., Barakat, M., Ortet, P., & Achouak, W. (2012a). Multiple transcription-activating sequences regulate the RsmZ regulatory small RNA of *Pseudomonas brassicacearum*. *J. Bacteriol*, 194(18), 4888-4893. doi: 10.1128/JB.00408-12

- Lalaouna, D., Fochesato, S., Sanchez, L., Schmitt-Kopplin, P., Haas, D., Heulin, T., & Achouak, W. (2012b). Phenotypic switching in *Pseudomonas brassicacearum* involves GacS- and GacA-dependent Rsm small RNAs. *Appl Environ Microbiol*, *78*(6), 1658-1665. doi: 10.1128/AEM.06769-11
- Lam, H. N., Chakravarthy, S., Wei, H. L., BuiNguyen, H., Stodghill, P. V., Collmer, A., Swingle, B. M., & Cartinhour, S. W. (2014). Global analysis of the HrpL regulon in the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 reveals new regulon members with diverse functions. *PLoS One*, *9*(8), e106115. doi: 10.1371/journal.pone.0106115 [doi];PONE-D-14-23838 [pii]
- Lan, L., Deng, X., Xiao, Y., Zhou, J. M., & 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*(6), 682-696. doi: 10.1094/MPMI-20-6-0682 [doi]
- Lapouge, K., Schubert, M., Allain, F. H., & Haas, D. (2008). Gac/Rsm signal transduction pathway of gamma-proteobacteria: from RNA recognition to regulation of social behaviour. *Mol.Microbiol.*, *67*(2), 241-253. doi: MMI6042 [pii];10.1111/j.1365-2958.2007.06042.x [doi]
- Lapouge, K., Sineva, E., Lindell, M., Starke, K., Baker, C. S., Babitzke, P., & Haas, D. (2007). Mechanism of hcnA mRNA recognition in the Gac/Rsm signal transduction pathway of *Pseudomonas fluorescens*. *Mol Microbiol*, *66*(2), 341-356. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.05909.x
- Laue, H., Schenk, A., Li, H., Lambertsen, L., Neu, T. R., Molin, S., & Ullrich, M. S. (2006). Contribution of alginate and levan production to biofilm formation by *Pseudomonas syringae*. *Microbiology*, *152*(Pt 10), 2909-2918. doi: 10.1099/mic.0.28875-0
- Laville, J., Voisard, C., Keel, C., Maurhofer, M., Defago, G., & Haas, D. (1992). Global control in *Pseudomonas fluorescens* mediating antibiotic synthesis and suppression of black root rot of tobacco. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, *89*(5), 1562-1566.
- Lee, D. J., Minchin, S. D., & Busby, S. J. W. (2012). Activating Transcription in Bacteria. *Annual Review of Microbiology*, *66*(1), 125-152. doi: 10.1146/annurev-micro-092611-150012
- Leistra, A. N., Gelderman, G., Sowa, S. W., Moon-Walker, A., Salis, H. M., & Contreras, L. M. (2018). A Canonical Biophysical Model of the CsrA Global Regulator Suggests Flexible Regulator-Target Interactions. *Sci Rep*, *8*(1), 9892. doi: 10.1038/s41598-018-27474-2
- Leneveu-Jenvrin, C., Bouffartigues, E., Maillot, O., Cornelis, P., Feuilloley, M. G. J., Connil, N., & Chevalier, S. (2015). Expression of the translocator protein (TSPO) from *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 requires the stress regulatory sigma factors AlgU and RpoH. *Frontiers in Microbiology*, *6*, 1023-1023. doi: 10.3389/fmicb.2015.01023
- Lenz, D. H., Miller, M. B., Zhu, J., Kulkarni, R. V., & Bassler, B. L. (2005). CsrA and three redundant small RNAs regulate quorum sensing in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol*, *58*(4), 1186-1202. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04902.x
- Leonard, S., Hommais, F., Nasser, W., & Reverchon, S. (2017). Plant-phytopathogen interactions: bacterial responses to environmental and plant stimuli. *Environ Microbiol*, *19*(5), 1689-1716. doi: 10.1111/1462-2920.13611
- Li, C. M., Brown, I., Mansfield, J., Stevens, C., Boureau, T., Romantschuk, M., & 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*(8), 1909-1915. doi: 10.1093/emboj/21.8.1909 [doi]
- Li, M., Yan, J., & Yan, Y. (2017). The *Pseudomonas* transcriptional regulator AlgR controls LipA expression via the noncoding RNA RsmZ in *Pseudomonas protegens* Pf-5. *Biochem Biophys Res Commun*, *487*(1), 173-180. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.04.034
- Liao, C. H., McCallus, D. E., & Fett, W. F. (1994). Molecular characterization of two gene loci required for production of the key pathogenicity factor pectate lyase in *Pseudomonas viridiflava*. *Mol Plant Microbe Interact*, *7*(3), 391-400.
- Liaw, S. J., Lai, H. C., Ho, S. W., Luh, K. T., & Wang, W. B. (2003). Role of RsmA in the regulation of swarming motility and virulence factor expression in *Proteus mirabilis*. *J Med Microbiol*, *52*(Pt 1), 19-28. doi: 10.1099/jmm.0.05024-0

- Lin, N. C., Abramovitch, R. B., Kim, Y. J., & Martin, G. B. (2006). Diverse AvrPtoB homologs from several *Pseudomonas syringae* pathovars elicit Pto-dependent resistance and have similar virulence activities. *Appl Environ Microbiol*, *72*(1), 702-712. doi: 10.1128/AEM.72.1.702-712.2006
- Lin, N. C., & Martin, G. B. (2005). An *avrPto/avrPtoB* mutant of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 does not elicit Pto-mediated resistance and is less virulent on tomato. *Mol Plant Microbe Interact*, *18*(1), 43-51. doi: 10.1094/MPMI-18-0043
- Lindeberg, M., Cunnac, S., & Collmer, A. (2009). The evolution of *Pseudomonas syringae* host specificity and type III effector repertoires. *Mol Plant Pathol*, *10*(6), 767-775. doi: 10.1111/j.1364-3703.2009.00587.x
- Lindeberg, M., Cunnac, S., & Collmer, A. (2012). *Pseudomonas syringae* type III effector repertoires: last words in endless arguments. *Trends Microbiol*, *20*(4), 199-208. doi: 10.1016/j.tim.2012.01.003
- Lindeberg, M., Myers, C. R., Collmer, A., & Schneider, D. J. (2008). Roadmap to new virulence determinants in *Pseudomonas syringae*: insights from comparative genomics and genome organization. *Mol.Plant Microbe Interact.*, *21*(6), 685-700.
- Lindgren, P. B., Frederick, R., Govindarajan, A. G., Panopoulos, N. J., Staskawicz, B. J., & Lindow, S. E. (1989). An ice nucleation reporter gene system: identification of inducible pathogenicity genes in *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. *EMBO J*, *8*(5), 1291-1301.
- Lindgren, P. B., Peet, R. C., & Panopoulos, N. J. (1986). Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. "phaseolicola" controls pathogenicity of bean plants and hypersensitivity of nonhost plants. *J Bacteriol*, *168*(2), 512-522.
- Liu, M. Y., Gui, G., Wei, B., Preston, J. F., 3rd, Oakford, L., Yuksel, U., Giedroc, D. P., & Romeo, T. (1997). The RNA molecule CsrB binds to the global regulatory protein CsrA and antagonizes its activity in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, *272*(28), 17502-17510.
- Liu, M. Y., Yang, H., & Romeo, T. (1995). The product of the pleiotropic *Escherichia coli* gene *csrA* modulates glycogen biosynthesis via effects on mRNA stability. *J Bacteriol*, *177*(10), 2663-2672. doi: 10.1128/jb.177.10.2663-2672.1995
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, *25*(4), 402-408. doi: 10.1006/meth.2001.1262
- Liyanage, H., Palmer, D. A., Ullrich, M., & Bender, C. L. (1995). Characterization and transcriptional analysis of the gene cluster for coronafacic acid, the polyketide component of the phytotoxin coronatine. *Appl.Environ.Microbiol*, *61*(11), 3843-3848.
- Llamas, M. A., Imperi, F., Visca, P., & Lamont, I. L. (2014). Cell-surface signaling in *Pseudomonas*: stress responses, iron transport, and pathogenicity. *FEMS Microbiol Rev.*, *38*(4), 569-597. doi: 10.1111/1574-6976.12078 [doi]
- Lonetto, M. A., Donohue, T. J., Gross, C. A., & Buttner, M. J. (2019). Discovery of the extracytoplasmic function  $\sigma$  factors. *Molecular Microbiology*, *112*(2), 348-355. doi: 10.1111/mmi.14307
- Louden, B. C., Haarmann, D., & Lynne, A. M. (2011). Use of Blue Agar CAS Assay for Siderophore Detection. *J Microbiol Biol Educ*, *12*(1), 51-53. doi: 10.1128/jmbe.v12i1.249
- Lucchetti-Miganeh, C., Burrowes, E., Baysse, C., & Ermel, G. (2008). The post-transcriptional regulator CsrA plays a central role in the adaptation of bacterial pathogens to different stages of infection in animal hosts. *Microbiology*, *154*(Pt 1), 16-29. doi: 10.1099/mic.0.2007/012286-0
- Mackie, G. A. (2012). RNase E: at the interface of bacterial RNA processing and decay. *Nature Reviews Microbiology*, *11*, 45. doi: 10.1038/nrmicro2930
- Mah, T. F., Pitts, B., Pellock, B., Walker, G. C., Stewart, P. S., & O'Toole, G. A. (2003). A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature*, *426*(6964), 306-310. doi: 10.1038/nature02122
- Mann, E. E., & Wozniak, D. J. (2012). *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. *FEMS Microbiol.Rev.*, *36*(4), 893-916. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00322.x [doi]
- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., Dow, M., Verdier, V., Beer, S. V., Machado, M. A., Toth, I., Salmond, G., & Foster, G. D. (2012). Top 10 plant pathogenic

- bacteria in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol*, 13(6), 614-629. doi: 10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x
- Manzo, J., Cocotl-Yanez, M., Tzontecomani, T., Martinez, V. M., Bustillos, R., Velasquez, C., Goiz, Y., Solis, Y., Lopez, L., Fuentes, L. E., Nunez, C., Segura, D., Espin, G., & Castaneda, M. (2011). Post-transcriptional regulation of the alginate biosynthetic gene *algD* by the Gac/Rsm system in *Azotobacter vinelandii*. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 21(3-4), 147-159. doi: 10.1159/000334244
- Marden, J. N., Diaz, M. R., Walton, W. G., Gode, C. J., Betts, L., Urbanowski, M. L., Redinbo, M. R., Yahr, T. L., & Wolfgang, M. C. (2013). An unusual CsrA family member operates in series with RsmA to amplify posttranscriptional responses in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(37), 15055-15060. doi: 10.1073/pnas.1307217110
- Markel, E., Butcher, B. G., Myers, C. R., Stodghill, P., Cartinhour, S., & Swingle, B. (2013). Regulons of three *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 iron starvation sigma factors. *Appl Environ Microbiol*, 79(2), 725-727. doi: 10.1128/AEM.02801-12
- Markel, E., Maciak, C., Butcher, B. G., Myers, C. R., Stodghill, P., Bao, Z., Cartinhour, S., & Swingle, B. (2011). An extracytoplasmic function sigma factor-mediated cell surface signaling system in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 regulates gene expression in response to heterologous siderophores. *J Bacteriol*, 193(20), 5775-5783. doi: 10.1128/JB.05114-11
- Markel, E., Stodghill, P., Bao, Z., Myers, C. R., & Swingle, B. (2016). AlgU controls expression of virulence genes in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *J Bacteriol*, 198(17), 2330-2344. doi: 10.1128/JB.00276-16
- Marshall, B., Stintzi, A., Gilmour, C., Meyer, J. M., & Poole, K. (2009). Citrate-mediated iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa*: involvement of the citrate-inducible FecA receptor and the FeoB ferrous iron transporter. *Microbiology*, 155(Pt 1), 305-315. doi: 10.1099/mic.0.023531-0
- Martinez-Antonio, A., & Collado-Vides, J. (2003). Identifying global regulators in transcriptional regulatory networks in bacteria. *Curr Opin Microbiol*, 6(5), 482-489.
- Martínez-Granero, F., Navazo, A., Barahona, E., Redondo-Nieto, M., Rivilla, R., & Martín, M. (2012). The Gac-Rsm and SadB signal transduction pathways converge on AlgU to downregulate motility in *Pseudomonas fluorescens*. *PLoS One*, 7(2), e31765. doi: 10.1371/journal.pone.0031765
- Mascher, T. (2013). Signaling diversity and evolution of extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Curr Opin Microbiol*, 16(2), 148-155. doi: 10.1016/j.mib.2013.02.001
- Mascher, T., Helmann, J. D., & Uden, G. (2006). Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 70(4), 910-938. doi: 10.1128/MMBR.00020-06
- May, T. B., & Chakrabarty, A. M. (1994). Isolation and assay of *Pseudomonas aeruginosa* alginate. *Methods Enzymol*, 235, 295-304.
- McDonald, B. A., & Stukenbrock, E. H. (2016). Rapid emergence of pathogens in agro-ecosystems: global threats to agricultural sustainability and food security. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 371(1709). doi: 10.1098/rstb.2016.0026
- Melotto, M., Panchal, S., & Roy, D. (2014). Plant innate immunity against human bacterial pathogens. *Front Microbiol*, 5, 411. doi: 10.3389/fmicb.2014.00411
- Melotto, M., Underwood, W., & He, S. Y. (2008). Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases. *Annu.Rev.Phytopathol.*, 46, 101-122. doi: 10.1146/annurev.phyto.121107.104959 [doi]
- Melotto, M., Zhang, L., Oblessuc, P. R., & He, S. Y. (2017). Stomatal defense a decade later. *Plant Physiol*, 174(2), 561-571. doi: 10.1104/pp.16.01853
- Mercante, J., Edwards, A. N., Dubey, A. K., Babitzke, P., & Romeo, T. (2009). Molecular geometry of CsrA (RsmA) binding to RNA and its implications for regulated expression. *J Mol Biol*, 392(2), 511-528. doi: 10.1016/j.jmb.2009.07.034
- Mercante, J., Suzuki, K., Cheng, X., Babitzke, P., & Romeo, T. (2006). Comprehensive alanine-scanning mutagenesis of *Escherichia coli* CsrA defines two subdomains of critical functional importance. *J Biol Chem*, 281(42), 31832-31842. doi: 10.1074/jbc.M606057200

- Meyer, A. S., & Baker, T. A. (2011). Proteolysis in the *Escherichia coli* heat shock response: a player at many levels. *Curr Opin Microbiol*, *14*(2), 194-199. doi: 10.1016/j.mib.2011.02.001
- Meyer, J. M., Neely, A., Stintzi, A., Georges, C., & Holder, I. A. (1996). Pyoverdinin is essential for virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*, *64*(2), 518-523.
- Meyer, M. M. (2017). The role of mRNA structure in bacterial translational regulation. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, *8*(1), e1370. doi: 10.1002/wrna.1370
- Miller, C. L., Romero, M., Karna, S. L., Chen, T., Heeb, S., & Leung, K. P. (2016). RsmW, *Pseudomonas aeruginosa* small non-coding RsmA-binding RNA upregulated in biofilm versus planktonic growth conditions. *BMC Microbiol*, *16*(1), 155. doi: 10.1186/s12866-016-0771-y
- Miller, J. H. (1972). *Experiments in molecular genetics* (3ª Edición ed.): Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Molina-Henares, M. A., Ramos-González, M. I., Daddaoua, A., Fernández-Escamilla, A. M., & Espinosa-Urgel, M. (2016). FleQ of *Pseudomonas putida* KT2440 is a multimeric cyclic diguanylate binding protein that differentially regulates expression of biofilm matrix components. *Res Microbiol*. doi: 10.1016/j.resmic.2016.07.005
- Moll, S., Schneider, D. J., Stodghill, P., Myers, C. R., Cartinhour, S. W., & 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*(5), 508-516. doi: 12687 [pii]
- Monteil, C. L., Cai, R., Liu, H., Llonet, M. E., Leman, S., Studholme, D. J., Morris, C. E., & Vinatzer, B. A. (2013). Nonagricultural reservoirs contribute to emergence and evolution of *Pseudomonas syringae* crop pathogens. *New Phytol*, *199*(3), 800-811. doi: 10.1111/nph.12316
- Morimoto, Y. V., & Minamino, T. (2014). Structure and function of the bi-directional bacterial flagellar motor. *Biomolecules*, *4*(1), 217-234. doi: 10.3390/biom4010217
- Morris, C. E., Monteil, C. L., & Berge, O. (2013). The life history of *Pseudomonas syringae*: linking agriculture to earth system processes. *Annu Rev Phytopathol*, *51*, 85-104. doi: 10.1146/annurev-phyto-082712-102402
- Morris, C. E., Sands, D. C., Vinatzer, B. A., Glaux, C., Guilbaud, C., Buffiere, A., Yan, S., Dominguez, H., & Thompson, B. M. (2008). The life history of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* is linked to the water cycle. *ISME J*, *2*(3), 321-334. doi: 10.1038/ismej.2007.113
- Morris, E. R., Hall, G., Li, C., Heeb, S., Kulkarni, R. V., Lovelock, L., Silistre, H., Messina, M., Camara, M., Emsley, J., Williams, P., & Searle, M. S. (2013). Structural rearrangement in an RsmA/CsrA ortholog of *Pseudomonas aeruginosa* creates a dimeric RNA-binding protein, RsmN. *Structure*, *21*(9), 1659-1671. doi: S0969-2126(13)00257-8 [pii];10.1016/j.str.2013.07.007 [doi]
- Mukherjee, A., Cui, Y., Ma, W., Liu, Y., Ishihama, A., Eisenstark, A., & Chatterjee, A. K. (1998). RpoS (sigma-S) controls expression of *rsmA*, a global regulator of secondary metabolites, harpin, and extracellular proteins in *Erwinia carotovora*. *J Bacteriol*, *180*(14), 3629-3634.
- Mulet, M., Lalucat, J., & García-Valdés, E. (2010). DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. *Environ. Microbiol*, *12*(6), 1513-1530. doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02181.x
- Münch, R., Hiller, K., Grote, A., Scheer, M., Klein, J., Schobert, M., & Jahn, D. (2005). Virtual Footprint and PRODORIC: an integrative framework for regulon prediction in prokaryotes. *Bioinformatics*, *21*(22), 4187-4189. doi: 10.1093/bioinformatics/bti635
- Nakatsu, Y., Matsui, H., Yamamoto, M., Noutoshi, Y., Toyoda, K., & Ichinose, Y. (2019). Quorum-dependent expression of *rsmX* and *rsmY*, small non-coding RNAs, in *Pseudomonas syringae*. *Microbiol Res*, *223-225*, 72-78. doi: 10.1016/j.micres.2019.04.004
- Navazo, A., Barahona, E., Redondo-Nieto, M., Martínez-Granero, F., Rivilla, R., & Martín, M. (2009). Three independent signalling pathways repress motility in *Pseudomonas fluorescens* F113. *Microb. Biotechnol*, *2*(4), 489-498. doi: 10.1111/j.1751-7915.2009.00103.x [doi]
- Nealson, K. H., Platt, T., & Hastings, J. W. (1970). Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J Bacteriol*, *104*(1), 313-322.
- Neilands, J. B. (1995). Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J Biol Chem*, *270*(45), 26723-26726.

- Nelson, D. L., Cox, M. M., & Lehninger, A. L. (2005). *Lehninger principles of biochemistry*. New York: W.H. Freeman.
- Nguyen, H. P., Yeam, I., Angot, A., & Martin, G. B. (2010). Two virulence determinants of type III effector AvrPto are functionally conserved in diverse *Pseudomonas syringae* pathovars. *New Phytol*, *187*(4), 969-982. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.03175.x
- Nguyen, N. T. T., Contreras-Moreira, B., Castro-Mondragon, J. A., Santana-Garcia, W., Ossio, R., Robles-Espinoza, C. D., Bahin, M., Collombet, S., Vincens, P., Thieffry, D., van Helden, J., Medina-Rivera, A., & Thomas-Chollier, M. (2018). RSAT 2018: regulatory sequence analysis tools 20th anniversary. *Nucleic Acids Res*, *46*(W1), W209-W214. doi: 10.1093/nar/gky317
- Nicaise, V., Roux, M., & Zipfel, C. (2009). Recent advances in PAMP-triggered immunity against bacteria: pattern recognition receptors watch over and raise the alarm. *Plant Physiol*, *150*(4), 1638-1647. doi: 10.1104/pp.109.139709
- Niehus, R., Picot, A., Oliveira, N. M., Mitri, S., & Foster, K. R. (2017). The evolution of siderophore production as a competitive trait. *Evolution*, *71*(6), 1443-1455. doi: 10.1111/evo.13230
- Nilsson, M., Chiang, W. C., Fazli, M., Gjermansen, M., Givskov, M., & Tolker-Nielsen, T. (2011). Influence of putative exopolysaccharide genes on *Pseudomonas putida* KT2440 biofilm stability. *Environ.Microbiol*, *13*(5), 1357-1369. doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02447.x [doi]
- Nogales, J., Vargas, P., Farias, G. A., Olmedilla, A., Sanjuán, J., & Gallegos, M. T. (2015). FleQ coordinates flagellum-dependent and -independent motilities in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Appl. Environ. Microbiol*, *81*(21), 7533-7545. doi: AEM.01798-15 [pii];10.1128/AEM.01798-15 [doi]
- Normand, P., Caumette, P., Goulas, P., Pujic, P., & Wisniewski-Dyé, F. (2015). Adaptations of Prokaryotes to Their Biotopes and to Physicochemical Conditions in Natural or Anthropized Environments. In J.-C. Bertrand, P. Caumette, P. Lebaron, R. Matheron, P. Normand & T. Sime-Ngando (Eds.), *Environmental Microbiology: Fundamentals and Applications: Microbial Ecology* (pp. 293-351). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Nowell, R. W., Sharp, P. M., Laue, B. E., & Green, S. (2014). The Extent of Genome Flux and Its Role in the Differentiation of Bacterial Lineages. *Genome Biology and Evolution*, *6*(6), 1514-1529. doi: 10.1093/gbe/evu123
- O'Malley, M. R., Chien, C. F., Peck, S. C., Lin, N. C., & Anderson, J. C. (2019a). A revised model for the role of GacS/GacA in regulating type III secretion by *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Mol Plant Pathol*. doi: 10.1111/mpp.12876
- O'Malley, M. R., Weisberg, A. J., Chang, J. H., & Anderson, J. C. (2019b). Re-evaluation of a Tn5::gacA mutant of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 uncovers roles for uvrC and anmK in promoting virulence. *PLoS One*, *14*(10), e0223637. doi: 10.1371/journal.pone.0223637
- Oguiza, J. A., Kiil, K., & Ussery, D. W. (2005). Extracytoplasmic function sigma factors in *Pseudomonas syringae*. *Trends Microbiol*, *13*(12), 565-568. doi: 10.1016/j.tim.2005.10.005
- Ortiz-Martín, I., Thwaites, R., Mansfield, J. W., & Beuzon, C. R. (2010). Negative regulation of the Hrp type III secretion system in *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. *Mol.Plant Microbe Interact.*, *23*(5), 682-701. doi: 10.1094/MPMI-23-5-0682 [doi]
- Osterberg, S., del Peso-Santos, T., & Shingler, V. (2011). Regulation of alternative sigma factor use. *Annu Rev Microbiol*, *65*, 37-55. doi: 10.1146/annurev.micro.112408.134219
- Otero-Asman, J. R., Wettstadt, S., Bernal, P., & Llamas, M. A. (2019). Diversity of extracytoplasmic function sigma (sigma(ECF) ) factor-dependent signaling in *Pseudomonas*. *Mol Microbiol*, *112*(2), 356-373. doi: 10.1111/mmi.14331
- Owen, J. G., & Ackerley, D. F. (2011). Characterization of pyoverdine and achromobactin in *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola 1448a. *BMC Microbiol*, *11*, 218. doi: 10.1186/1471-2180-11-218
- Paget, M. S. (2015). Bacterial Sigma Factors and Anti-Sigma Factors: Structure, Function and Distribution. *Biomolecules*, *5*(3), 1245-1265. doi: 10.3390/biom5031245
- Paget, M. S., & Helmann, J. D. (2003). The sigma70 family of sigma factors. *Genome Biol*, *4*(1), 203. doi: 10.1186/gb-2003-4-1-203

- Palleroni, N. J. (1993). *Pseudomonas* classification. A new case history in the taxonomy of gram-negative bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, *64*(3-4), 231-251.
- Palleroni, N. J. (2010). The *Pseudomonas* story. *Environ Microbiol*, *12*(6), 1377-1383. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.02041.x
- Papaix, J., Burdon, J. J., Zhan, J., & Thrall, P. H. (2015). Crop pathogen emergence and evolution in agro-ecological landscapes. *Evol Appl*, *8*(4), 385-402. doi: 10.1111/eva.12251
- Papenfort, K., & Bassler, B. L. (2016). Quorum sensing signal–response systems in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, *14*, 576. doi: 10.1038/nrmicro.2016.89
- Patterson-Fortin, L. M., Vakulskas, C. A., Yakhnin, H., Babitzke, P., & Romeo, T. (2013). Dual posttranscriptional regulation via a cofactor-responsive mRNA leader. *J Mol Biol*, *425*(19), 3662-3677. doi: 10.1016/j.jmb.2012.12.010
- Peix, A., Ramirez-Bahena, M. H., & Velazquez, E. (2009). Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infect Genet Evol*, *9*(6), 1132-1147. doi: 10.1016/j.meegid.2009.08.001
- Pelludat, C., Brem, D., & Heesemann, J. (2003). Irp9, encoded by the high-pathogenicity island of *Yersinia enterocolitica*, is able to convert chorismate into salicylate, the precursor of the siderophore yersiniabactin. *J Bacteriol*, *185*(18), 5648-5653. doi: 10.1128/jb.185.18.5648-5653.2003
- Peñaloza-Vázquez, A., Kidambi, S. P., Chakrabarty, A. M., & Bender, C. L. (1997). Characterization of the alginate biosynthetic gene cluster in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *J. Bacteriol.*, *179*(14), 4464-4472.
- Peñaloza-Vázquez, A., Preston, G. M., Collmer, A., & Bender, C. L. (2000). Regulatory interactions between the Hrp type III protein secretion system and coronatine biosynthesis in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Microbiology*, *146* ( Pt 10), 2447-2456.
- Pérez-Mendoza, D., Aragón, I. M., Prada-Ramírez, H. A., Romero-Jiménez, L., Ramos, C., Gallegos, M. T., & Sanjuán, J. (2014). Responses to elevated c-di-GMP levels in mutualistic and pathogenic plant-interacting bacteria. *PLoS One.*, *9*(3), e91645. doi: 10.1371/journal.pone.0091645 [doi];PONE-D-13-51246 [pii]
- Pérez-Mendoza, D., Felipe, A., Ferreira, M. D., Sanjuán, J., & Gallegos, M. T. (2019). AmrZ and FleQ Co-regulate Cellulose Production in *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* DC3000. *Front Microbiol*, *10*, 746. doi: 10.3389/fmicb.2019.00746
- Peréz-Mendoza, D., & Sanjuán, J. (2016). Exploiting the commons: cyclic diguanylate regulation of bacterial exopolysaccharide production. *Curr Opin Microbiol*, *30*, 36-43. doi: 10.1016/j.mib.2015.12.004
- Perry, J., Koteva, K., & Wright, G. (2011). Receptor domains of two-component signal transduction systems. *Mol Biosyst*, *7*(5), 1388-1398. doi: 10.1039/c0mb00329h
- Perry, R. D., & Fetherston, J. D. (2011). Yersiniabactin iron uptake: mechanisms and role in *Yersinia pestis* pathogenesis. *Microbes Infect*, *13*(10), 808-817. doi: 10.1016/j.micinf.2011.04.008
- Pesavento, C., & Hengge, R. (2009). Bacterial nucleotide-based second messengers. *Curr Opin Microbiol*, *12*(2), 170-176. doi: 10.1016/j.mib.2009.01.007
- Pessi, G., & Haas, D. (2001). Dual control of hydrogen cyanide biosynthesis by the global activator GacA in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *FEMS Microbiol Lett*, *200*(1), 73-78. doi: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10695.x
- Pessi, G., Williams, F., Hindle, Z., Heurlier, K., Holden, M. T., Camara, M., Haas, D., & Williams, P. (2001). The global posttranscriptional regulator RsmA modulates production of virulence determinants and N-acylhomoserine lactones in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, *183*(22), 6676-6683. doi: 10.1128/JB.183.22.6676-6683.2001
- Pierce, B. A. (2012). *Genetics: A Conceptual Approach*. W. H. Freeman.
- Pinto, D., Liu, Q., & Mascher, T. (2019). ECF  $\sigma$  factors with regulatory extensions: the one-component systems of the  $\sigma$  universe. *Molecular Microbiology*, *112*(2), 399-409. doi: 10.1111/mmi.14323

- Pisithkul, T., Patel, N. M., & Amador-Noguez, D. (2015). Post-translational modifications as key regulators of bacterial metabolic fluxes. *Current Opinion in Microbiology*, *24*, 29-37. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.12.006>
- Potrykus, K., & Cashel, M. (2008). (p)ppGpp: Still Magical? *Annual Review of Microbiology*, *62*(1), 35-51. doi: [10.1146/annurev.micro.62.081307.162903](https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162903)
- Potts, A. H., Guo, Y., Ahmer, B. M. M., & Romeo, T. (2019). Role of CsrA in stress responses and metabolism important for *Salmonella* virulence revealed by integrated transcriptomics. *PLoS One*, *14*(1), e0211430. doi: [10.1371/journal.pone.0211430](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211430)
- Potts, A. H., Vakulskas, C. A., Pannuri, A., Yakhnin, H., Babitzke, P., & Romeo, T. (2017). Global role of the bacterial post-transcriptional regulator CsrA revealed by integrated transcriptomics. *Nat Commun*, *8*(1), 1596. doi: [10.1038/s41467-017-01613-1](https://doi.org/10.1038/s41467-017-01613-1)
- Pourciau, C., Pannuri, A., Potts, A., Yakhnin, H., Babitzke, P., & Romeo, T. (2019). Regulation of Iron Storage by CsrA Supports Exponential Growth of *Escherichia coli*. *MBio*, *10*(4), e01034-01019. doi: [10.1128/mBio.01034-19](https://doi.org/10.1128/mBio.01034-19)
- Prada-Ramírez, H. A., Pérez-Mendoza, D., Felipe, A., Martínez-Granero, F., Rivilla, R., Sanjuán, J., & Gallegos, M. T. (2016). AmrZ regulates cellulose production in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Mol. Microbiol.*, *99*(5), 960-977. doi: [10.1111/mmi.13278](https://doi.org/10.1111/mmi.13278) [doi]
- Preston, G. M. (2000). *Pseudomonas syringae* pv. tomato: the right pathogen, of the right plant, at the right time. *Mol Plant Pathol*, *1*(5), 263-275. doi: [10.1046/j.1364-3703.2000.00036.x](https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2000.00036.x)
- Pueyo, C., Jurado, J., Prieto-Alamo, M. J., Monje-Casas, F., & Lopez-Barea, J. (2002). Multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction for determining transcriptional regulation of thioredoxin and glutaredoxin pathways. *Methods Enzymol*, *347*, 441-451.
- Qiu, W., Zheng, X., Wei, Y., Zhou, X., Zhang, K., Wang, S., Cheng, L., Li, Y., Ren, B., Xu, X., Li, Y., & Li, M. (2016). d-Alanine metabolism is essential for growth and biofilm formation of *Streptococcus mutans*. *Mol Oral Microbiol*, *31*(5), 435-444. doi: [10.1111/omi.12146](https://doi.org/10.1111/omi.12146)
- Quereda, J. J., & Cossart, P. (2017). Regulating Bacterial Virulence with RNA. *Annu Rev Microbiol*, *71*, 263-280. doi: [10.1146/annurev-micro-030117-020335](https://doi.org/10.1146/annurev-micro-030117-020335)
- Raaijmakers, J. M., de Bruijn, I., & de Kock, M. J. (2006). Cyclic lipopeptide production by plant-associated *Pseudomonas* spp.: diversity, activity, biosynthesis, and regulation. *Mol Plant Microbe Interact*, *19*(7), 699-710. doi: [10.1094/MPMI-19-0699](https://doi.org/10.1094/MPMI-19-0699)
- Ramette, A., Frapolli, M., Fischer-Le Saux, M., Gruffaz, C., Meyer, J. M., Defago, G., Sutra, L., & Moenne-Loccoz, Y. (2011). *Pseudomonas protegens* sp. nov., widespread plant-protecting bacteria producing the biocontrol compounds 2,4-diacetylphloroglucinol and pyoluteorin. *Syst Appl Microbiol*, *34*(3), 180-188. doi: [10.1016/j.syapm.2010.10.005](https://doi.org/10.1016/j.syapm.2010.10.005)
- Ravel, J., & Cornelis, P. (2003). Genomics of pyoverdine-mediated iron uptake in pseudomonads. *Trends Microbiol*, *11*(5), 195-200.
- Reimann, C., Valverde, C., Kay, E., & 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*(1), 276-285. doi: [10.1128/JB.187.1.276-285.2005](https://doi.org/10.1128/JB.187.1.276-285.2005)
- Reitzer, L., & Schneider, B. L. (2001). Metabolic context and possible physiological themes of sigma(54)-dependent genes in *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev*, *65*(3), 422-444, table of contents. doi: [10.1128/MMBR.65.3.422-444.2001](https://doi.org/10.1128/MMBR.65.3.422-444.2001)
- Ren, B., Shen, H., Lu, Z. J., Liu, H., & Xu, Y. (2014). The phzA2-G2 transcript exhibits direct RsmA-mediated activation in *Pseudomonas aeruginosa* M18. *PLoS One*, *9*(2), e89653. doi: [10.1371/journal.pone.0089653](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089653)
- Rico, A., McCraw, S. L., & Preston, G. M. (2011). The metabolic interface between *Pseudomonas syringae* and plant cells. *Curr Opin Microbiol*, *14*(1), 31-38. doi: [10.1016/j.mib.2010.12.008](https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.12.008)
- Rife, C., Schwarzenbacher, R., McMullan, D., Abdubek, P., Ambing, E., Axelrod, H., Biorac, T., Canaves, J. M., Chiu, H. J., Deacon, A. M., DiDonato, M., Elsliger, M. A., Godzik, A., Grittini, C., Grzechnik, S. K., Hale, J., Hampton, E., Han, G. W., Haugen, J., Hornsby, M., Jaroszewski, L., Klock, H. E.,

- Koesema, E., Kreuzsch, A., Kuhn, P., Lesley, S. A., Miller, M. D., Moy, K., Nigoghossian, E., Paulsen, J., Quijano, K., Reyes, R., Sims, E., Spraggon, G., Stevens, R. C., van den Bedem, H., Velasquez, J., Vincent, J., White, A., Wolf, G., Xu, Q., Hodgson, K. O., Wooley, J., & Wilson, I. A. (2005). Crystal structure of the global regulatory protein CsrA from *Pseudomonas putida* at 2.05 Å resolution reveals a new fold. *Proteins*, *61*(2), 449-453. doi: 10.1002/prot.20502 [doi]
- Ringel, M. T., & Bruser, T. (2018). The biosynthesis of pyoverdines. *Microb Cell*, *5*(10), 424-437. doi: 10.15698/mic2018.10.649
- Robertsen, B. K., Aman, P., Darvill, A. G., McNeil, M., & Albersheim, P. (1981). Host-Symbiont Interactions : V. THE STRUCTURE OF ACIDIC EXTRACELLULAR POLYSACCHARIDES SECRETED BY RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM AND RHIZOBIUM TRIFOLII. *Plant Physiol*, *67*(3), 389-400.
- Rodríguez-Herva, J. J., Duque, E., Molina-Henares, M. A., Navarro-Avilés, G., van, D. P., de la Torre, J., Molina-Henares, A. J., La Campa, A. S., Ran, F. A., Segura, A., Shingler, V., & Ramos, J. L. (2010). Physiological and transcriptomic characterization of a *fliA* mutant of *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol. Rep.*, *2*(3), 373-380. doi: 10.1111/j.1758-2229.2009.00084.x [doi]
- Romeo, T., & Babitzke, P. (2018). Global Regulation by CsrA and Its RNA Antagonists. *Microbiol Spectr*, *6*(2). doi: 10.1128/microbiolspec.RWR-0009-2017
- Romeo, T., & Gong, M. (1993). Genetic and physical mapping of the regulatory gene *csrA* on the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *J Bacteriol*, *175*(17), 5740-5741.
- Romeo, T., Gong, M., Liu, M. Y., & Brun-Zinkernagel, A. M. (1993). Identification and molecular characterization of *csrA*, a pleiotropic gene from *Escherichia coli* that affects glycogen biosynthesis, gluconeogenesis, cell size, and surface properties. *J Bacteriol*, *175*(15), 4744-4755.
- Romeo, T., Vakulskas, C. A., & Babitzke, P. (2013). Post-transcriptional regulation on a global scale: form and function of Csr/Rsm systems. *Environ Microbiol*, *15*(2), 313-324. doi: 10.1111/j.1462-2920.2012.02794.x
- Römling, U. (2005). Characterization of the *rdar* morphotype, a multicellular behaviour in *Enterobacteriaceae*. *Cell Mol.Life Sci*, *62*(11), 1234-1246.
- Römling, U., & Galperin, M. Y. (2015). Bacterial cellulose biosynthesis: diversity of operons, subunits, products, and functions. *Trends Microbiol*, *23*(9), 545-557. doi: 10.1016/j.tim.2015.05.005
- Römling, U., Galperin, M. Y., & Gomelsky, M. (2013). Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. *Microbiol Mol Biol Rev*, *77*(1), 1-52. doi: 10.1128/MMBR.00043-12
- Ruinelli, M., Blom, J., Smits, T. H. M., & Pothier, J. F. (2019). Comparative genomics and pathogenicity potential of members of the *Pseudomonas syringae* species complex on *Prunus* spp. *BMC Genomics*, *20*(1), 172. doi: 10.1186/s12864-019-5555-y
- Rumbaugh, K. P. (2014). Genomic complexity and plasticity ensure *Pseudomonas* success. *FEMS Microbiol Lett*, *356*(2), 141-143. doi: 10.1111/1574-6968.12517
- Saberi, F., Kamali, M., Najafi, A., Yazdanparast, A., & Moghaddam, M. M. (2016). Natural antisense RNAs as mRNA regulatory elements in bacteria: a review on function and applications. *Cellular & Molecular Biology Letters*, *21*(1), 6. doi: 10.1186/s11658-016-0007-z
- Sahr, T., Bruggemann, H., Jules, M., Lomma, M., Albert-Weissenberger, C., Cazalet, C., & Buchrieser, C. (2009). Two small ncRNAs jointly govern virulence and transmission in *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol*, *72*(3), 741-762. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06677.x
- Sahr, T., & Buchrieser, C. (2013). cDNA library construction for next-generation sequencing to determine the transcriptional landscape of *Legionella pneumophila*. *Methods Mol Biol*, *954*, 555-566. doi: 10.1007/978-1-62703-161-5\_34
- Sahr, T., Rusniok, C., Impens, F., Oliva, G., Sismeiro, O., Coppee, J. Y., & Buchrieser, C. (2017). The *Legionella pneumophila* genome evolved to accommodate multiple regulatory mechanisms controlled by the CsrA-system. *PLoS Genet*, *13*(2), e1006629. doi: 10.1371/journal.pgen.1006629
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, *4*(4), 406-425. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Santos, D. K., Rufino, R. D., Luna, J. M., Santos, V. A., & Sarubbo, L. A. (2016). Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. *Int J Mol Sci*, *17*(3), 401. doi: 10.3390/ijms17030401
- Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., & Puhler, A. (1994). Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene*, *145*(1), 69-73.
- Schechter, L. M., Vencato, M., Jordan, K. L., Schneider, S. E., Schneider, D. J., & Collmer, A. (2006). Multiple approaches to a complete inventory of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 type III secretion system effector proteins. *Mol Plant Microbe Interact*, *19*(11), 1180-1192. doi: 10.1094/MPMI-19-1180
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*, *9*(7), 676-682. doi: 10.1038/nmeth.2019
- Schlundt, A., Buchner, S., Janowski, R., Heydenreich, T., Heermann, R., Lassak, J., Geerlof, A., Stehle, R., Niessing, D., Jung, K., & Sattler, M. (2017). Structure-function analysis of the DNA-binding domain of a transmembrane transcriptional activator. *Sci Rep*, *7*(1), 1051. doi: 10.1038/s41598-017-01031-9
- Schmid, J., Sieber, V., & Rehm, B. (2015). Bacterial exopolysaccharides: biosynthesis pathways and engineering strategies. *Frontiers in Microbiology*, *6*(496). doi: 10.3389/fmicb.2015.00496
- Schnider-Keel, U., Seematter, A., Maurhofer, M., Blumer, C., Duffy, B., Gigot-Bonnefoy, C., Reimann, C., Notz, R., Defago, G., Haas, D., & Keel, C. (2000). Autoinduction of 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0 and repression by the bacterial metabolites salicylate and pyoluteorin. *J Bacteriol*, *182*(5), 1215-1225.
- Schubert, M., Lapouge, K., Duss, O., Oberstrass, F. C., Jelesarov, I., Haas, D., & Allain, F. H. (2007). Molecular basis of messenger RNA recognition by the specific bacterial repressing clamp RsmA/CsrA. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, *14*(9), 807-813. doi: nsmb1285 [pii];10.1038/nsmb1285 [doi]
- Schumacher, J., Waite, C. J., Bennett, M. H., Perez, M. F., Shethi, K., & Buck, M. (2014). Differential secretome analysis of *Pseudomonas syringae* pv tomato using gel-free MS proteomics. *Front Plant Sci.*, *5*, 242. doi: 10.3389/fpls.2014.00242 [doi]
- Schuster, M., Hawkins, A. C., Harwood, C. S., & Greenberg, E. P. (2004). The *Pseudomonas aeruginosa* RpoS regulon and its relationship to quorum sensing. *Molecular Microbiology*, *51*(4), 973-985. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03886.x
- Shenge, K. C., Mabagala, R. B., Mortensen, C. N., Stephan, D., & Wydra, K. (2007). First Report of Bacterial Speck of Tomato Caused by *Pseudomonas syringae* pv. tomato in Tanzania. *Plant Dis*, *91*(4), 462. doi: 10.1094/PDIS-91-4-0462C
- Sherwood, A. V., & Henkin, T. M. (2016). Riboswitch-Mediated Gene Regulation: Novel RNA Architectures Dictate Gene Expression Responses. *Annual Review of Microbiology*, *70*(1), 361-374. doi: 10.1146/annurev-micro-091014-104306
- Silby, M. W., Cerdano-Tarraga, A. M., Vernikos, G. S., Giddens, S. R., Jackson, R. W., Preston, G. M., Zhang, X. X., Moon, C. D., Gehrig, S. M., Godfrey, S. A., Knight, C. G., Malone, J. G., Robinson, Z., Spiers, A. J., Harris, S., Challis, G. L., Yaxley, A. M., Harris, D., Seeger, K., Murphy, L., Rutter, S., Squares, R., Quail, M. A., Saunders, E., Mavromatis, K., Brettin, T. S., Bentley, S. D., Hothersall, J., Stephens, E., Thomas, C. M., Parkhill, J., Levy, S. B., Rainey, P. B., & Thomson, N. R. (2009). Genomic and genetic analyses of diversity and plant interactions of *Pseudomonas fluorescens*. *Genome Biol.*, *10*(5), R51. doi: gb-2009-10-5-r51 [pii];10.1186/gb-2009-10-5-r51 [doi]
- Singh, S., Koehler, B., & Fett, W. F. (1992). Effect of osmolarity and dehydration on alginate production by fluorescent pseudomonads. *Curr Microbiol*, *25*(6), 335-339. doi: 10.1007/bf01577231
- Smirnova, A. V., Wang, L., Rohde, B., Budde, I., Weingart, H., & Ullrich, M. S. (2002). Control of temperature-responsive synthesis of the phytotoxin coronatine in *Pseudomonas syringae* by the unconventional two-component system CorRPS. *J.Mol.Microbiol.Biotechnol.*, *4*(3), 191-196.

- Smith, T. G., & Hoover, T. R. (2009). Deciphering bacterial flagellar gene regulatory networks in the genomic era. *Adv Appl Microbiol*, *67*, 257-295. doi: 10.1016/S0065-2164(08)01008-3
- Soberon-Chavez, G., Lepine, F., & Deziel, E. (2005). Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol*, *68*(6), 718-725. doi: 10.1007/s00253-005-0150-3
- Sondermann, H., Shikuma, N. J., & Yildiz, F. H. (2012). You've come a long way: c-di-GMP signaling. *Curr Opin Microbiol*, *15*(2), 140-146. doi: 10.1016/j.mib.2011.12.008
- Song, C., van, d., V, van de Mortel, J., Hassan, K. A., Elbourne, L. D., Paulsen, I. T., Loper, J. E., & Raaijmakers, J. M. (2014). The Rsm regulon of plant growth-promoting *Pseudomonas fluorescens* SS101: role of small RNAs in regulation of lipopeptide biosynthesis. *Microb.Biotechnol*. doi: 10.1111/1751-7915.12190 [doi]
- Sonnleitner, E., Abdou, L., & Haas, D. (2009). Small RNA as global regulator of carbon catabolite repression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *106*(51), 21866-21871. doi: 10.1073/pnas.pnas.0910308106
- Sonnleitner, E., & Haas, D. (2011). Small RNAs as regulators of primary and secondary metabolism in *Pseudomonas* species. *Appl.Microbiol.Biotechnol.*, *91*(1), 63-79. doi: 10.1007/s00253-011-3332-1 [doi]
- Spiers, A. J., Bohannon, J., Gehrig, S. M., & Rainey, P. B. (2003). Biofilm formation at the air-liquid interface by the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader requires an acetylated form of cellulose. *Molecular Microbiology*, *50*(1), 15-27. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03670.x
- Spiers, A. J., Deeni, Y. Y., Folorunso, A. O., Koza, A., Moshynets, O., & Zawadzki, K. (2013). Cellulose expression in *Pseudomonas fluorescens* SBW25 and other environmental pseudomonads. In T. G. M. V. D. Ven (Ed.), *Cellulose - Medical, Pharmaceutical and Electronic Applications*: InTech.
- Sreedharan, A., Penalzoza-Vazquez, A., Kunkel, B. N., & Bender, C. L. (2006). CorR regulates multiple components of virulence in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Mol.Plant Microbe Interact.*, *19*(7), 768-779. doi: 10.1094/MPMI-19-0768 [doi]
- Stacey, S. D., & Pritchett, C. L. (2016). *Pseudomonas aeruginosa* AlgU contributes to posttranscriptional activity by increasing *rsmA* expression in a *mucA22* strain. *J Bacteriol*, *198*(13), 1812-1826. doi: 10.1128/JB.00133-16
- Stacey, S. D., Williams, D. A., & Pritchett, C. L. (2017). The *Pseudomonas aeruginosa* two-component regulator AlgR directly activates *rsmA* expression in a phosphorylation independent manner. *J Bacteriol*. doi: 10.1128/JB.00048-17
- Steinchen, W., & Bange, G. (2016). The magic dance of the alarmones (p)ppGpp. *Molecular Microbiology*, *101*(4), 531-544. doi: 10.1111/mmi.13412
- Stevens, R. B. (1960). Cultural Practices in Disease Control. In J. G. a. D. Horsfall, A. E. (Ed.), *An Advanced Treatise* (Vol. III, pp. 357 - 429): Academic Press.
- Stock, A. M., Robinson, V. L., & Goudreau, P. N. (2000). Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem*, *69*, 183-215. doi: 10.1146/annurev.biochem.69.1.183
- Storz, G., Vogel, J., & Wassarman, K. M. (2011). Regulation by small RNAs in bacteria: expanding frontiers. *Molecular cell*, *43*(6), 880-891. doi: 10.1016/j.molcel.2011.08.022
- Streips, U. N., & Yasbin, R. E. (2002). *Modern Microbial Genetics*. Hoboken: John Wiley & Sons.
- Studholme, D. J., & Buck, M. (2000). The alternative sigma factor sigma(28) of the extreme thermophile *Aquifex aeolicus* restores motility to an *Escherichia coli* fliA mutant. *FEMS Microbiol Lett*, *191*(1), 103-107. doi: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb09325.x
- Stukenbrock, E. H., & McDonald, B. A. (2008). The Origins of Plant Pathogens in Agro-Ecosystems. *Annual Review of Phytopathology*, *46*(1), 75-100. doi: 10.1146/annurev.phyto.010708.154114
- Sundin, G. W., Wang, N., Charkowski, A. O., Castiblanco, L. F., Jia, H., & Zhao, Y. (2016). Perspectives on the Transition From Bacterial Phytopathogen Genomics Studies to Applications Enhancing Disease Management: From Promise to Practice. *Phytopathology*, *106*(10), 1071-1082. doi: 10.1094/PHYTO-03-16-0117-FI
- Swingle, B., Thete, D., Moll, M., Myers, C. R., Schneider, D. J., & Cartinhour, S. (2008). Characterization of the PvdS-regulated promoter motif in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 reveals

- regulon members and insights regarding PvdS function in other pseudomonads. *Mol. Microbiol.*, 68(4), 871-889. doi: [MMI6209 \[pii\];10.1111/j.1365-2958.2008.06209.x \[doi\]](https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06209.x)
- Taguchi, F., Shibata, S., Suzuki, T., Ogawa, Y., Aizawa, S., Takeuchi, K., & Ichinose, Y. (2008). Effects of glycosylation on swimming ability and flagellar polymorphic transformation in *Pseudomonas syringae* pv. tabaci 6605. *J Bacteriol*, 190(2), 764-768. doi: [10.1128/JB.01282-07](https://doi.org/10.1128/JB.01282-07)
- Taguchi, F., Suzuki, T., Inagaki, Y., Toyoda, K., Shiraishi, T., & Ichinose, Y. (2010). The siderophore pyoverdine of *Pseudomonas syringae* pv. tabaci 6605 is an intrinsic virulence factor in host tobacco infection. *J. Bacteriol.*, 192(1), 117-126. doi: [JB.00689-09 \[pii\];10.1128/JB.00689-09 \[doi\]](https://doi.org/10.1128/JB.00689-09)
- Taira, S., Tuimala, J., Roine, E., Nurmiäho-Lassila, E. L., Savilahti, H., & Romantschuk, M. (1999). Mutational analysis of the *Pseudomonas syringae* pv. tomato *hrpA* gene encoding Hrp pilus subunit. *Mol Microbiol*, 34(4), 737-744.
- Takeuchi, K., Kiefer, P., Reimann, C., Keel, C., Dubuis, C., Rolli, J., Vorholt, J. A., & Haas, D. (2009). Small RNA-dependent expression of secondary metabolism is controlled by Krebs cycle function in *Pseudomonas fluorescens*. *J Biol Chem*, 284(50), 34976-34985. doi: [10.1074/jbc.M109.052571](https://doi.org/10.1074/jbc.M109.052571)
- Tampakaki, A. P., Skandalis, N., Gazi, A. D., Bastaki, M. N., Sarris, P. F., Charova, S. N., Kokkinidis, M., & Panopoulos, N. J. (2010). Playing the "Harp": evolution of our understanding of *hrp/hrc* genes. *Annu Rev Phytopathol*, 48, 347-370. doi: [10.1146/annurev-phyto-073009-114407](https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-073009-114407)
- Tang, X., Xiao, Y., & Zhou, J. M. (2006). Regulation of the type III secretion system in phytopathogenic bacteria. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 19(11), 1159-1166. doi: [10.1094/MPMI-19-1159 \[doi\]](https://doi.org/10.1094/MPMI-19-1159)
- Timmermans, J., & Van Melder, L. (2009). Conditional Essentiality of the *csrA* Gene in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 191(5), 1722-1724. doi: [10.1128/jb.01573-08](https://doi.org/10.1128/jb.01573-08)
- Torres-Quesada, O., Millán, V., Nisa-Martínez, R., Bardou, F., Crespi, M., Toro, N., & Jiménez-Zurdo, J. I. (2013). Independent activity of the homologous small regulatory RNAs AbcR1 and AbcR2 in the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *PLoS One*, 8(7), e68147. doi: [10.1371/journal.pone.0068147](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068147)
- Troselj, V., Cao, P., & Wall, D. (2018). Cell-cell recognition and social networking in bacteria. *Environ Microbiol*, 20(3), 923-933. doi: [10.1111/1462-2920.14005](https://doi.org/10.1111/1462-2920.14005)
- Tu, K. C., & Bassler, B. L. (2007). Multiple small RNAs act additively to integrate sensory information and control quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Genes Dev*, 21(2), 221-233. doi: [10.1101/gad.1502407](https://doi.org/10.1101/gad.1502407)
- Tu, Y. (2013). Quantitative Modeling of Bacterial Chemotaxis: Signal Amplification and Accurate Adaptation. *Annual Review of Biophysics*, 42(1), 337-359. doi: [10.1146/annurev-biophys-083012-130358](https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-083012-130358)
- Ude, S., Arnold, D. L., Moon, C. D., Timms-Wilson, T., & Spiers, A. J. (2006). Biofilm formation and cellulose expression among diverse environmental *Pseudomonas* isolates. *Environ. Microbiol.*, 8(11), 1997-2011.
- Ullrich, M., Penaloza-Vazquez, A., Bailey, A. M., & 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(21), 6160-6169. doi: [10.1128/jb.177.21.6160-6169.1995](https://doi.org/10.1128/jb.177.21.6160-6169.1995)
- Ulrich, L. E., Koonin, E. V., & Zhulin, I. B. (2005). One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes. *Trends Microbiol*, 13(2), 52-56. doi: [10.1016/j.tim.2004.12.006](https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.12.006)
- Vakulskas, C. A., Potts, A. H., Babitzke, P., Ahmer, B. M., & Romeo, T. (2015). Regulation of bacterial virulence by Csr (Rsm) systems. *Microbiol Mol. Biol. Rev.*, 79(2), 193-224. doi: [79/2/193 \[pii\];10.1128/MMBR.00052-14 \[doi\]](https://doi.org/10.1128/MMBR.00052-14)
- Vallet-Gely, I., Novikov, A., Augusto, L., Liehl, P., Bolbach, G., Pechy-Tarr, M., Cosson, P., Keel, C., Caroff, M., & Lemaître, B. (2010). Association of hemolytic activity of *Pseudomonas entomophila*, a versatile soil bacterium, with cyclic lipopeptide production. *Appl Environ Microbiol*, 76(3), 910-921. doi: [10.1128/AEM.02112-09](https://doi.org/10.1128/AEM.02112-09)
- Valverde, C. (2009). Artificial sRNAs activating the Gac/Rsm signal transduction pathway in *Pseudomonas fluorescens*. *Arch. Microbiol.*, 191(4), 349-359. doi: [10.1007/s00203-009-0459-x \[doi\]](https://doi.org/10.1007/s00203-009-0459-x)

- Valverde, C., Heeb, S., Keel, C., & Haas, D. (2003). RsmY, a small regulatory RNA, is required in concert with RsmZ for GacA-dependent expression of biocontrol traits in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Mol.Microbiol.*, *50*(4), 1361-1379. doi: 3774 [pii]
- Van Assche, E., Van Puyvelde, S., Vanderleyden, J., & Steenackers, H. P. (2015). RNA-binding proteins involved in post-transcriptional regulation in bacteria. *Front Microbiol*, *6*, 141. doi: 10.3389/fmicb.2015.00141
- Van der Hoorn, R. A., De Wit, P. J., & Joosten, M. H. (2002). Balancing selection favors guarding resistance proteins. *Trends Plant Sci*, *7*(2), 67-71.
- Vargas, P., Farias, G. A., Nogales, J., Prada-Ramírez, H. A., Carvajal, V., Baron, M., Rivilla, R., Martín, M., Olmedilla, A., & Gallegos, M. T. (2013). Plant flavonoids target *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 flagella and type III secretion system. *Environ.Microbiol.Rep.*, *5*(6), 841-850. doi: 10.1111/1758-2229.12086 [doi]
- Ventre, I., Goodman, A. L., Vallet-Gely, I., Vasseur, P., Soscia, C., Molin, S., Bleves, S., Lazdunski, A., Lory, S., & Filloux, A. (2006). Multiple sensors control reciprocal expression of *Pseudomonas aeruginosa* regulatory RNA and virulence genes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, *103*(1), 171-176. doi: 0507407103 [pii];10.1073/pnas.0507407103 [doi]
- Visweswariah, S. S., & Busby, S. J. (2015). Evolution of bacterial transcription factors: how proteins take on new tasks, but do not always stop doing the old ones. *Trends Microbiol*, *23*(8), 463-467. doi: 10.1016/j.tim.2015.04.009
- Vogel, J., & Luisi, B. F. (2011). Hfq and its constellation of RNA. *Nat Rev Microbiol*, *9*(8), 578-589. doi: 10.1038/nrmicro2615
- Waite, C. (2015). *The regulatory network controlling Type III Secretion System-mediated pathogenicity in Pseudomonas syringe pv. tomato DC3000*. Imperial College London, London.
- Waite, C., Schumacher, J., Jovanovic, M., Bennett, M., & Buck, M. (2017). Negative Autogenous Control of the Master Type III Secretion System Regulator HrpL in *Pseudomonas syringae*. *MBio*, *8*(1). doi: 10.1128/mBio.02273-16
- Wang, Y., Li, Y., Wang, J., & Wang, X. (2018). FleQ regulates both the type VI secretion system and flagella in *Pseudomonas putida*. *Biotechnol Appl Biochem*, *65*(3), 419-427. doi: 10.1002/bab.1611
- Waters, C. M., & Bassler, B. L. (2005). QUORUM SENSING: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *21*(1), 319-346. doi: 10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131001
- Waters, L. S., & Storz, G. (2009). Regulatory RNAs in Bacteria. *Cell*, *136*(4), 615-628. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.043>
- Wei, C. F., Deng, W. L., & Huang, H. C. (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*(2), 520-536. doi: MMI4704 [pii];10.1111/j.1365-2958.2005.04704.x [doi]
- Wei, C. F., Hsu, S. T., Deng, W. L., Wen, Y. D., & Huang, H. C. (2012). Plant innate immunity induced by flagellin suppresses the hypersensitive response in non-host plants elicited by *Pseudomonas syringae* pv. averrhoi. *PLoS.One.*, *7*(7), e41056. doi: 10.1371/journal.pone.0041056 [doi];PONE-D-12-07376 [pii]
- Wei, H. L., & Collmer, A. (2018). Defining essential processes in plant pathogenesis with *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 disarmed polymutants and a subset of key type III effectors. *Mol Plant Pathol*, *19*(7), 1779-1794. doi: 10.1111/mpp.12655
- Wei, H. L., Zhang, W., & Collmer, A. (2018). Modular Study of the Type III Effector Repertoire in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 Reveals a Matrix of Effector Interplay in Pathogenesis. *Cell Rep*, *23*(6), 1630-1638. doi: 10.1016/j.celrep.2018.04.037
- Wei, W., Plovianich-Jones, A., Deng, W. L., Jin, Q. L., Collmer, A., Huang, H. C., & 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 U S A*, *97*(5), 2247-2252. doi: 10.1073/pnas.040570097

- Weilbacher, T., Suzuki, K., Dubey, A. K., Wang, X., Gudapaty, S., Morozov, I., Baker, C. S., Georgellis, D., Babitzke, P., & Romeo, T. (2003). A novel sRNA component of the carbon storage regulatory system of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, *48*(3), 657-670.
- Whalen, M. C., Innes, R. W., Bent, A. F., & Staskawicz, B. J. (1991). Identification of *Pseudomonas syringae* pathogens of *Arabidopsis* and a bacterial locus determining avirulence on both *Arabidopsis* and soybean. *The Plant Cell*, *3*(1), 49-59. doi: 10.1105/tpc.3.1.49
- Whitehead, N. A., Barnard, A. M. L., Slater, H., Simpson, N. J. L., & Salmond, G. P. C. (2001). Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, *25*(4), 365-404. doi: 10.1111/j.1574-6976.2001.tb00583.x
- Whiteley, M., Diggle, S. P., & Greenberg, E. P. (2017). Progress in and promise of bacterial quorum sensing research. *Nature*, *551*, 313. doi: 10.1038/nature24624
- Whitney, J. C., & Howell, P. L. (2013). Synthase-dependent exopolysaccharide secretion in Gram-negative bacteria. *Trends Microbiol.*, *21*(2), 63-72. doi: S0966-842X(12)00177-1 [pii];10.1016/j.tim.2012.10.001 [doi]
- Willis, D. K., Holmstadt, J. J., & Kinscherf, T. G. (2001). Genetic evidence that loss of virulence associated with *gacS* or *gacA* mutations in *Pseudomonas syringae* B728a does not result from effects on alginate production. *Appl. Environ. Microbiol.*, *67*(3), 1400-1403. doi: 10.1128/AEM.67.3.1400-1403.2001 [doi]
- Willis, D. K., Hrabak, E. M., Rich, J. J., Barta, T. M., Lindow, S. E., & Panopoulos, N. J. (1990). Isolation and characterization of a *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* mutant deficient in lesion formation on bean. *Mol Plant Microbe Interact*, *3*(3), 149-156.
- Workentine, M. L., Chang, L., Ceri, H., & Turner, R. J. (2009). The GacS-GacA two-component regulatory system of *Pseudomonas fluorescens*: a bacterial two-hybrid analysis. *FEMS Microbiol. Lett.*, *292*(1), 50-56. doi: FML1445 [pii];10.1111/j.1574-6968.2008.01445.x [doi]
- Wuichet, K., Alexander, R. P., & Zhulin, I. B. (2007). Comparative Genomic and Protein Sequence Analyses of a Complex System Controlling Bacterial Chemotaxis. In M. I. Simon, B. R. Crane & A. Crane (Eds.), *Methods Enzymol* (Vol. 422, pp. 3-31): Academic Press.
- Wuichet, K., Cantwell, B. J., & Zhulin, I. B. (2010). Evolution and phyletic distribution of two-component signal transduction systems. *Current Opinion in Microbiology*, *13*(2), 219-225. doi: 10.1016/j.mib.2009.12.011
- Xin, X. F., & 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. doi: 10.1146/annurev-phyto-082712-102321 [doi]
- Xin, X. F., Kvitko, B., & He, S. Y. (2018). *Pseudomonas syringae*: what it takes to be a pathogen. *Nat Rev Microbiol*, *16*(5), 316-328. doi: 10.1038/nrmicro.2018.17
- Yakhnin, A. V., Baker, C. S., Vakulskas, C. A., Yakhnin, H., Berezin, I., Romeo, T., & Babitzke, P. (2013). CsrA activates flhDC expression by protecting flhDC mRNA from RNase E-mediated cleavage. *Mol Microbiol*, *87*(4), 851-866. doi: 10.1111/mmi.12136
- Yakhnin, H., Aichele, R., Ades, S. E., Romeo, T., & Babitzke, P. (2017). Circuitry Linking the Global Csr- and  $\sigma^E$  Dependent Cell Envelope Stress Response Systems. *J Bacteriol*, *199*(23), e00484-00417. doi: 10.1128/jb.00484-17
- Yakhnin, H., Yakhnin, A. V., Baker, C. S., Sineva, E., Berezin, I., Romeo, T., & Babitzke, P. (2011). Complex regulation of the global regulatory gene *csrA*: CsrA-mediated translational repression, transcription from five promoters by  $\sigma^{70}$  and  $\sigma^S$ , and indirect transcriptional activation by CsrA. *Mol Microbiol*, *81*(3), 689-704. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07723.x
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., & Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, *33*(1), 103-119.
- Yin, Y., Zhang, H., Olman, V., & Xu, Y. (2010). Genomic arrangement of bacterial operons is constrained by biological pathways encoded in the genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(14), 6310-6315. doi: 10.1073/pnas.0911237107

- Young, J. M. (1991). Pathogenicity and Identification of the Lilac Pathogen, *Pseudomonas-Syringae* Pv *Syringae* Van Hall 1902. *Annals of Applied Biology*, 118(2), 283-298. doi: DOI 10.1111/j.1744-7348.1991.tb05629.x
- Yu, J., Penaloza-Vazquez, A., Chakrabarty, A. M., & Bender, C. L. (1999). Involvement of the exopolysaccharide alginate in the virulence and epiphytic fitness of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Mol.Microbiol.*, 33(4), 712-720. doi: mmi1516 [pii]
- Yu, X., Lund, S. P., Greenwald, J. W., Records, A. H., Scott, R. A., Nettleton, D., Lindow, S. E., Gross, D. C., & Beattie, G. A. (2014). Transcriptional analysis of the global regulatory networks active in *Pseudomonas syringae* during leaf colonization. *MBio.*, 5(5), e01683-01614. doi: mBio.01683-14 [pii];10.1128/mBio.01683-14 [doi]
- Zha, D., Xu, L., Zhang, H., & Yan, Y. (2014). The two-component GacS-GacA system activates *lipA* translation by RsmE but not RsmA in *Pseudomonas protegens* Pf-5. *Appl.Environ.Microbiol*, 80(21), 6627-6637. doi: AEM.02184-14 [pii];10.1128/AEM.02184-14 [doi]
- Zhan, J., Thrall, P. H., Papaix, J., Xie, L., & Burdon, J. J. (2015). Playing on a Pathogen's Weakness: Using Evolution to Guide Sustainable Plant Disease Control Strategies. *Annual Review of Phytopathology*, 53(1), 19-43. doi: 10.1146/annurev-phyto-080614-120040
- Zhang, N., Darbari, V. C., Glyde, R., Zhang, X., & Buck, M. (2016). The bacterial enhancer-dependent RNA polymerase. *Biochem J*, 473(21), 3741-3753. doi: 10.1042/BCJ20160741C
- Zheng, X. Y., Spivey, N. W., Zeng, W., Liu, P. P., Fu, Z. Q., Klessig, D. F., He, S. Y., & Dong, X. (2012). Coronatine promotes *Pseudomonas syringae* virulence in plants by activating a signaling cascade that inhibits salicylic acid accumulation. *Cell Host Microbe*, 11(6), 587-596. doi: 10.1016/j.chom.2012.04.014
- Zschiedrich, C. P., Keidel, V., & Szurmant, H. (2016). Molecular Mechanisms of Two-Component Signal Transduction. *J Mol Biol*, 428(19), 3752-3775. doi: 10.1016/j.jmb.2016.08.003
- Zuber, S., Carruthers, F., Keel, C., Mattart, A., Blumer, C., Pessi, G., Gigot-Bonnefoy, C., Schnider-Keel, U., Heeb, S., Reimann, C., & Haas, D. (2003). GacS sensor domains pertinent to the regulation of exoproduct formation and to the biocontrol potential of *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Mol Plant Microbe Interact*, 16(7), 634-644. doi: 10.1094/MPMI.2003.16.7.634
- Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res*, 31(13), 3406-3415.

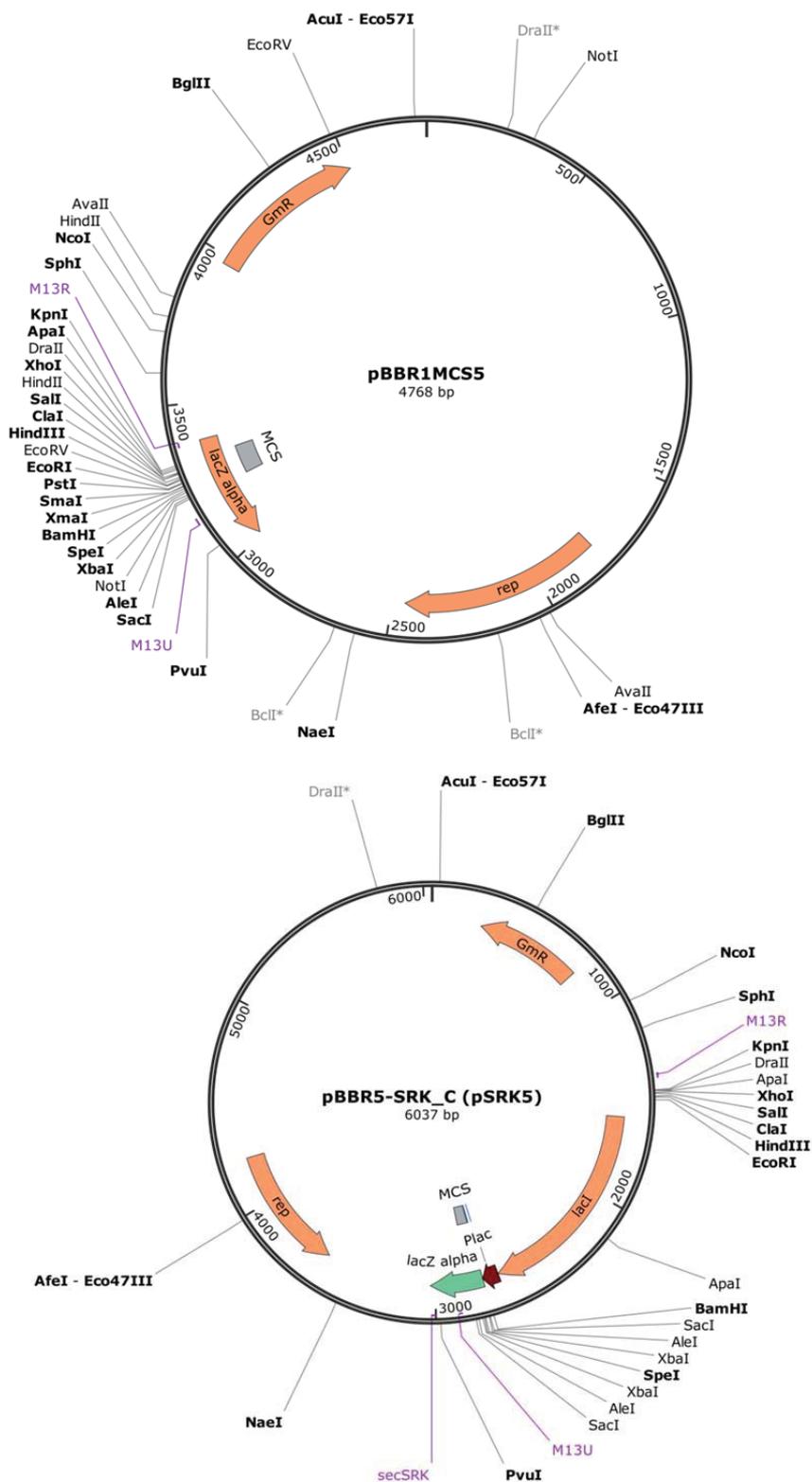


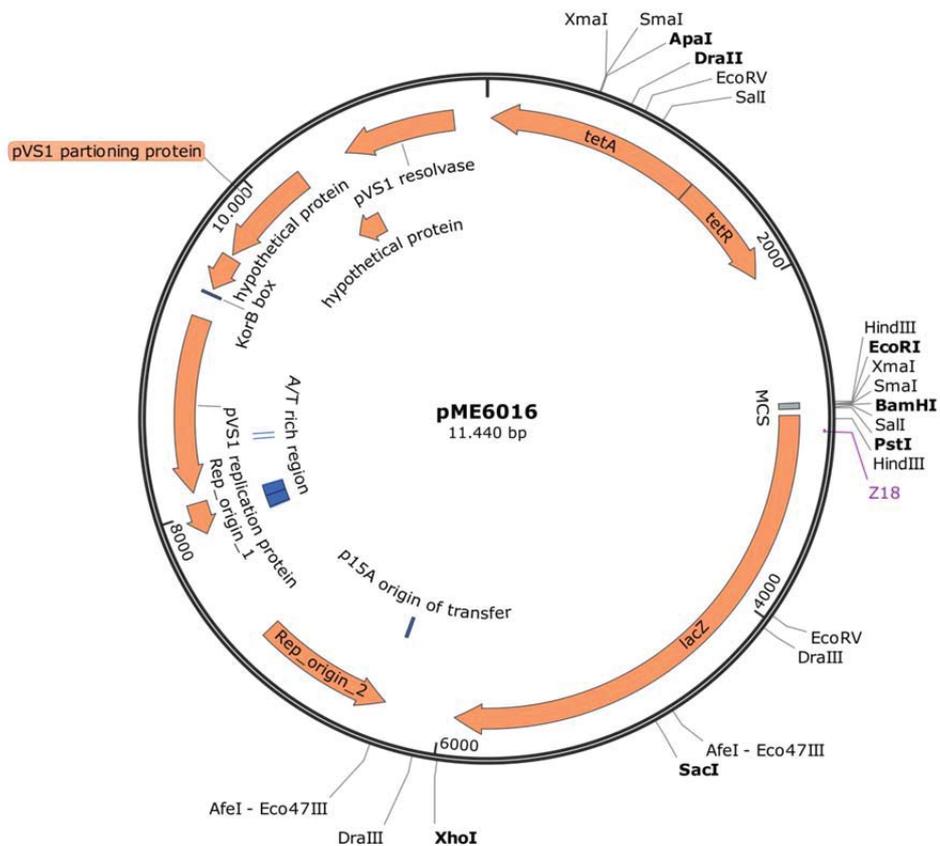
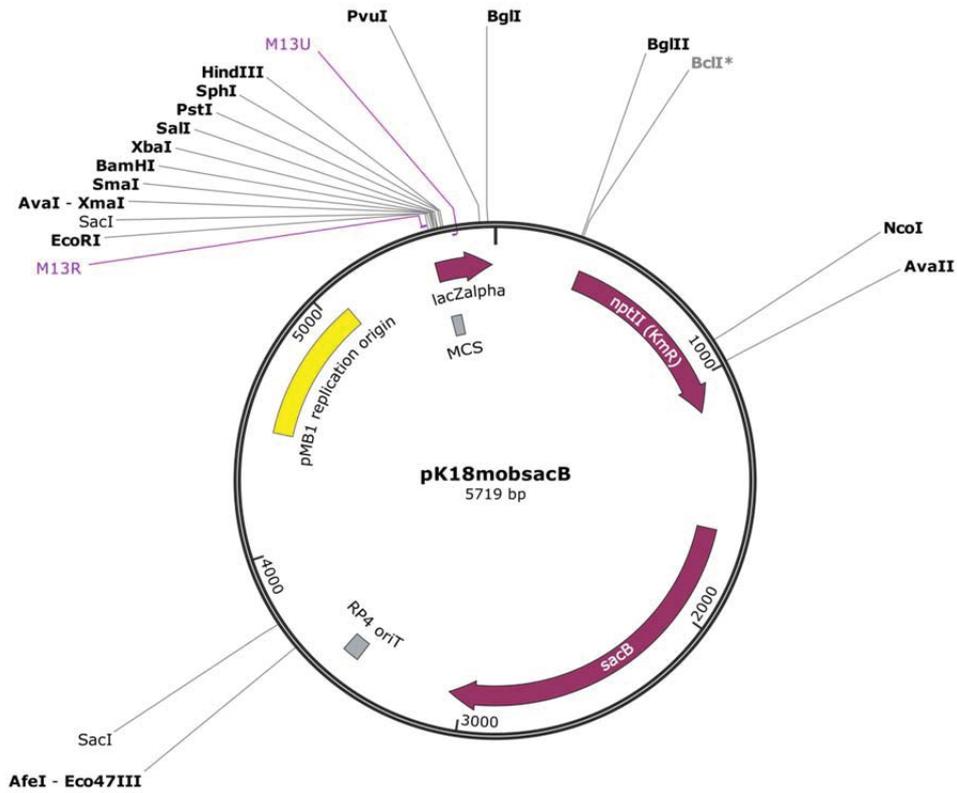
## APÉNDICES

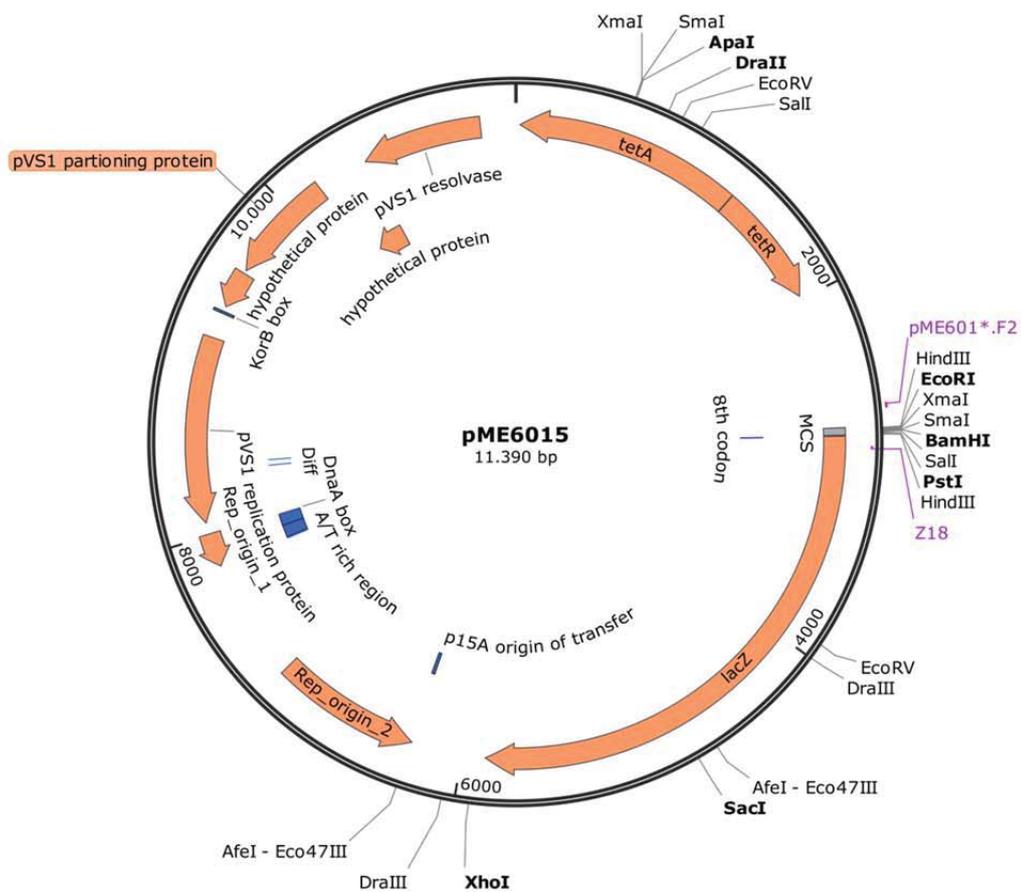


## Apéndice A. Mapas de los vectores no comerciales utilizados

Mapas genéticos de los 5 vectores utilizados para clonar fragmentos, cuyo nombre y tamaño se especifican en el centro de la figura. Están señalados sus genes, inicio de replicación, sitios de hibridación de oligonucleótidos (violeta) y sitios de restricción únicos (negrita) y dobles (texto normal). La representación se realizó a escala utilizando el software SnapGene.







**Región de clonaje en pME6013-15**

<i>EcoRI</i>	<i>SmaI</i>	<i>BamHI</i>	<i>AccI</i> <i>SalI</i>	<i>PstI</i>	<i>HindIII</i>	8 <sup>th</sup> codon <i>lacZ</i>									
GA	ATT	CCC	GGG	GAT	CCG	TCG	ACC	TGC	AGC	CAA	GCT	TGC	GAT	CCC	pME6013
<i>EcoRI</i>	<i>SmaI</i>	<i>BamHI</i>	<i>AccI</i> <i>SalI</i>	<i>PstI</i>	<i>HindIII</i>	8 <sup>th</sup> codon <i>lacZ</i>									
GAA	TTC	CCG	GGG	ATC	CGT	CGA	CCT	GCA	GCC	AAG	CTT	GCT	CCC	pME6014	
<i>EcoRI</i>	<i>SmaI</i>	<i>BamHI</i>	<i>AccI</i> <i>SalI</i>	<i>PstI</i>	<i>HindIII</i>	8 <sup>th</sup> codon <i>lacZ</i>									
G	AAT	TCC	CGG	GGA	TCC	GTC	GAC	CTG	CAG	CCA	AGC	TTC	GAT	CCC	pME6015

## Apéndice B. Características de las parejas de oligonucleótidos de RT-qPCR

En la tabla se detallan las características más relevantes de las parejas de oligonucleótidos utilizados para RT-qPCR, cuya secuencia figura en la [Tabla M4](#).

Gen	Oligonucleótidos	Tamaño del producto (pb)	Ecuación curva eficiencia (coeficiente de correlación)	Eficiencia
<i>algD</i>	algD+/algD-	159	$y = -3,318x + 26,621$ (1,00)	1
<i>csrA1</i>	csrA1+/csrA1-	117	$y = -3,234x + 29,588$ (1,00)	1,02
<i>csrA2</i>	csrA2+/csrA2-	125	$y = -3,369x + 21,395$ (1,00)	0,98
<i>csrA3</i>	csrA3+/csrA3-	155	$y = -3,353x + 18,944$ (1,00)	0,99
<i>csrA4</i>	csrA4+/csrA4-	107	$y = -3,316x + 18,782$ (1,00)	1,01
<i>csrA5</i>	csrA5+/csrA5-	112	$y = -3,280x + 18,155$ (1,00)	1,02
<i>gyrA</i>	gyrA+/gyrA-	205	$y = -3,329x + 24,675$ (0,99)	1
<i>hrpA</i>	hrpA+/hrpA-	158	$y = -3,311x + 23,858$ (1,00)	1
<i>hrpL</i>	hrpL+/hrpL-	138	$y = -3,327x + 26,951$ (0,99)	1
<i>syfA</i>	syfA+/syfA-	144	$y = -3,263x + 15,891$ (1,00)	1,02
<i>syfR</i>	syfR+/syfR-	109	$y = -3,255x + 14,975$ (1,00)	1,02

## Apéndice C. Secuencia de las escaleras de secuenciación utilizadas en *primer extension*

A continuación se detallan las secuencias de las regiones de ADN utilizadas en las reacciones de secuenciación usadas como referencia para estimar el tamaño de los productos de las reacciones de *primer extension*. La escalera ATCG se utilizó en los geles de *csrA3* y *syfR*, en el segundo caso careciendo de los 9 primeros nucleótidos (subrayados), y las escaleras E1 y E2 se utilizaron en los geles donde se corrieron las reacciones de *csrA2*. En los geles, se muestran todas las bases nitrogenadas para la secuencia ATCG y para E1 y E2, únicamente la citosina.

- ATCG

```

AAAGAATTTCGGCTCAAGGTCCTTCTTGGCAGATAATCCGCGGATTAGGCA 50
CTGCCAACTGGCCGATGTATGGCCCCTGAAACCCGGACACTGGCGTATAG 100
CCATCAATCGTGGCAGCGGCATGTGTATCCGCTTGCTACTCTGTCCCTGT 150
TTTCCGCTACAGACGCAGGATAAAAGCTTAGGCTGAATACCCAAAGACCC 200
AGTGT CACAATCAGACTTATCAGTCATTGCAAACAGCAGTTGCCGCGCAC 250
GAGCCGACCATGGTCCTTTGTTGCGCGGTTCGGAATCAGGAAAGCTCAGGC 300

```

- E1

```

CGTGGCGTTCAAGATTCTCGGCCCGATCAGCGCGGCAATATCGAAGTGG 50
ACATGATCGTGCAGAACGTTTTCGCACGATAACACCACCGATTTACCTTC 100
ACGATCCATCGCAACGACTATCAGGCGGCCTTGCAGGTGCTTGAGACGAC 150
CGCGCGTGAAATCAGTGCCCGTGAAGTTTTCCGGCGATACCAAGATTGCCA 200

```

- E2

```

TGCCAGAACAGACTTCCTCCCCCCTGTCGGTGCCTCACCTCACACAAAA 50
TCGACCTGTTACCAGGCTCGAACACACCCCGCACGACTAAACCCGCCTTC 100
CGCAAACCGCCCTTTCTACAACCTCGCACCGCACTTTCATTTGAATTTT 150
CAGAAAGCTCGGGCAATCTTTGCAAGTCATGCCTACGCTTACTACTCACGT 200

```

Apéndice D. Presencia y distribución de CsrA en *Pseudomonas* sp.

Especie	Cepa	Nº Acceso	Tipo CsrA1	Tipo CsrA2	Tipo CsrA3	Tipo CsrA4	Tipo CsrA5	RsmF	Otros
<i>P. aeruginosa</i>	8380	GCA_001548135.1		X				X	X
<i>P. aeruginosa</i>	12-4-4(59)	GCA_001482325.1		X				X	
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 15692	GCA_001729505.1		X				X	
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 27853	GCA_001618925.1		X				X	X
<i>P. aeruginosa</i>	B10W	GCA_001874465.1		X				X	X
<i>P. aeruginosa</i>	BAMCPA07-48	GCA_001632245.1		X				X	XX
<i>P. aeruginosa</i>	Carb01 63	GCA_000981825.1		X				X	
<i>P. aeruginosa</i>	Cu1510	GCA_001465155.1		X				X	
<i>P. aeruginosa</i>	DN1	GCA_001722005.1		X				X	XX
<i>P. aeruginosa</i>	E6130952	GCA_002085755.1		X				X	X
<i>P. aeruginosa</i>	F22031	GCA_000816985.1		X				X	
<i>P. aeruginosa</i>	F23197	GCA_001516245.1		X				X	
<i>P. aeruginosa</i>	F30658	GCA_001516265.1		X				X	X
<i>P. aeruginosa</i>	F63912	GCA_001594325.1		X				X	X
<i>P. aeruginosa</i>	F9670	GCA_001542835.1		X				X	
<i>P. aeruginosa</i>	F9676	GCA_001077475.1		X				XX	
<i>P. aeruginosa</i>	FA-HZ1	GCA_001750705.1		X				X	
<i>P. aeruginosa</i>	FRD1	GCA_000829885.1		X				X	
<i>P. aeruginosa</i>	H27930	GCA_001516325.1		X				X	X
<i>P. aeruginosa</i>	H47921	GCA_001516345.1		X				X	
<i>P. aeruginosa</i>	H5708	GCA_001516305.1		X				X	X
<i>P. aeruginosa</i>	IOMTU 133	GCA_001548335.1		X				X	X
<i>P. aeruginosa</i>	L10	GCA_002223805.1		X				X	X
<i>P. aeruginosa</i>	M1608	GCA_001516365.1		X				X	
<i>P. aeruginosa</i>	M37351	GCA_001516385.1		X				X	
<i>P. aeruginosa</i>	N17-1	GCA_001606045.1		X				X	X
<i>P. aeruginosa</i>	NCGM 1900	GCA_000829275.1		X				X	
<i>P. aeruginosa</i>	NCGM 1984	GCA_000829255.1		X				X	
<i>P. aeruginosa</i>	NCGM257	GCA_001547955.1		X				X	
<i>P. aeruginosa</i>	NCTC10332	GCA_001457615.1		X				X	
<i>P. aeruginosa</i>	NHmuc	GCA_001900265.1		X				X	
<i>P. aeruginosa</i>	Ocean-1155	GCA_002237405.1		X				X	X
<i>P. aeruginosa</i>	Ocean-1175	GCA_002237425.1		X				X	X
<i>P. aeruginosa</i>	PA_150577	GCA_002442855.1		X				X	X
<i>P. aeruginosa</i>	PA_154197	GCA_002075065.1		X				X	X
<i>P. aeruginosa</i>	PA_D1	GCA_001721745.1		X				X	
<i>P. aeruginosa</i>	PA_D16	GCA_001721805.1		X				X	
<i>P. aeruginosa</i>	PA_D2	GCA_001721765.1		X				X	
<i>P. aeruginosa</i>	PA_D21	GCA_001722045.1		X				X	
<i>P. aeruginosa</i>	PA_D22	GCA_001721825.1		X				X	
<i>P. aeruginosa</i>	PA_D25	GCA_001721845.1		X				X	
<i>P. aeruginosa</i>	PA_D5	GCA_001722025.1		X				X	
<i>P. aeruginosa</i>	PA_D9	GCA_001721785.1		X				X	

<i>P. aeruginosa</i>	PA1088	GCA_001792835.1	X	X	
<i>P. aeruginosa</i>	PA11803	GCA_001792875.1	X	X	
<i>P. aeruginosa</i>	Pa1207	GCA_002208645.1	X	X	X
<i>P. aeruginosa</i>	PA121617	GCA_001679685.1	X	X	XXp
<i>P. aeruginosa</i>	Pa124	GCA_002192475.1	X	X	
<i>P. aeruginosa</i>	Pa1242	GCA_002205375.1	X	X	X
<i>P. aeruginosa</i>	Pa127	GCA_002205355.1	X	X	
<i>P. aeruginosa</i>	PA14Or_reads	GCA_900095805.1	X	X	
<i>P. aeruginosa</i>	PA1RG	GCA_001293085.1	X	X	
<i>P. aeruginosa</i>	Pa58	GCA_002192495.1	X	X	XX
<i>P. aeruginosa</i>	PA7790	GCA_001870265.1	X	X	X
<i>P. aeruginosa</i>	PA8281	GCA_001792855.1	X	X	X
<i>P. aeruginosa</i>	PA83	GCA_002215345.1	X	X	
<i>P. aeruginosa</i>	Pa84	GCA_002205335.1	X	X	X
<i>P. aeruginosa</i>	PAER4_119	GCA_001879525.1	X	X	
<i>P. aeruginosa</i>	PAO1_Orsay	GCA_900070375.1	X	X	
<i>P. aeruginosa</i>	PASGNM345	GCA_002104615.1	X	X	X
<i>P. aeruginosa</i>	PASGNM699	GCA_002104595.1	X	X	X
<i>P. aeruginosa</i>	RIVM-EMC2982	GCA_002085605.1	X	X	
<i>P. aeruginosa</i>	S86968	GCA_001515845.1	X	X	
<i>P. aeruginosa</i>	SCVFeb	GCA_001900195.1	X	X	
<i>P. aeruginosa</i>	SCVJan	GCA_001900225.1	X	X	
<i>P. aeruginosa</i>	T38079	GCA_001515915.1	X	X	
<i>P. aeruginosa</i>	T52373	GCA_001516005.1	X	X	
<b><i>P. aeruginosa</i></b>	T63266	GCA_001516105.1	X	X	
<b><i>P. aeruginosa</i></b>	USDA-ARS-USMARC-41639	GCA_001518975.1	X	X	X
<i>P. aeruginosa</i>	VA-134	GCA_001447845.1	X	X	
<b><i>P. aeruginosa</i></b>	W16407	GCA_001516165.1	X	X	XX
<i>P. aeruginosa</i>	W36662	GCA_001516185.1	X	X	
<i>P. aeruginosa</i>	W45909	GCA_001516205.1	X	X	
<i>P. aeruginosa</i>	W60856	GCA_001516225.1	X	X	
<i>P. aeruginosa</i>	X78812	GCA_001542795.1	X	X	
<i>P. aeruginosa</i>	B136-33	GCA_000359505.1	X	X	
<i>P. aeruginosa</i>	C-NN2	GCA_900185255.1	X	X	
<i>P. aeruginosa</i>	DHS01	GCA_000496455.2	X	X	X
<i>P. aeruginosa</i>	DK1 substr. NH57388A	GCA_900069025.1	X	X	
<i>P. aeruginosa</i>	DK2	GCA_000271365.1	X	X	X
<i>P. aeruginosa</i>	DSM 50071	GCA_001045685.1	X	X	
<i>P. aeruginosa</i>	LES431	GCA_000508765.1	X	X	
<b><i>P. aeruginosa</i></b>	LESB58	GCA_000026645.1	X	X	
<i>P. aeruginosa</i>	M18	GCA_000226155.1	X	X	
<i>P. aeruginosa</i>	MTB-1	GCA_000504045.1	X	X	
<i>P. aeruginosa</i>	NCGM2.S1	GCA_000284555.1	X	X	
<i>P. aeruginosa</i>	PA1	GCA_000496605.2	X	X	
<i>P. aeruginosa</i>	PA1R	GCA_000496645.1	X	X	

<i>P. aeruginosa</i>	PA7	GCA_000017205.1		X			X	X
<i>P. aeruginosa</i>	PAK	GCA_000568855.2		X			X	
<i>P. aeruginosa</i>	PAO1	GCA_000006765.1		X			X	
<i>P. aeruginosa</i>	RP73	GCA_000414035.1		X			X	X
<i>P. aeruginosa</i>	SCV20265	GCA_000510305.1		X			X	
<i>P. aeruginosa</i>	SJTD-1	GCA_000271985.2		X			X	
<i>P. aeruginosa</i>	UCBPP-PA14	GCA_000014625.1		X			X	
<i>P. aeruginosa</i>	VRFPA04	GCA_000473745.3		X			X	
<i>P. aeruginosa</i>	YL84	GCA_000524595.1		X			X	
<i>P. alcaligenes</i>	NEB 585	GCA_001597285.1		X				
<i>P. alcaliphila</i>	JAB1	GCA_001941865.1		X				
<i>P. alkylphenolia</i>	KL28	GCA_000746525.1	X	X	X			
<i>P. amygdali</i> pv. <i>lachrymans</i>	NM002	GCA_002068135.1	X	X	X			X
<i>P. antarctica</i>	PAMC 27494	GCA_001647715.1	X	X	X			
<i>P. azotoformans</i>	F77	GCA_002007785.1	X	X	X			
<i>P. azotoformans</i>	S4	GCA_001579805.1	X	X	X			
<i>P. balearica</i>	DSM6083 (=SP1402)	GCA_000818015.1		X				
<i>P. brassicacearum</i>	DF41	GCA_000585995.1	X	X	X			
<i>P. brassicacearum</i>	L13-6-12	GCA_001746815.1	X	X	X			
<i>P. brassicacearum</i>	LBUM300	GCA_001449085.1	X	X	X			
<i>P. brassicacearum</i> subsp. <i>brassicacearum</i>	NFM421	GCA_000194805.1	X	X	X			
<i>P. cerasi</i>	-	GCA_900074915.1	X	X	X			X
<i>P. chlororaphis</i>	-	GCA_001602135.1		X	X			
<i>P. chlororaphis</i>	PA23	GCA_000698865.1		X	X			
<i>P. chlororaphis</i>	PCL1606	GCA_000963835.1		X	X			
<i>P. chlororaphis</i>	UFB2	GCA_001023535.1	X	X	X			
<i>P. chlororaphis</i> subsp. <i>aurantiaca</i>	JD37	GCA_000761195.1		X	X			
<i>P. chlororaphis</i> subsp. <i>aurantiaca</i>	StFRB508	GCA_002355875.1		X	X			
<i>P. cichorii</i>	JBC1	GCA_000517305.1	X	X	X			X
<i>P. citronellolis</i>	P3B5	GCA_001586155.1		X				
<i>P. citronellolis</i>	SJTE-3	GCA_001654435.1		X				XXp
<i>P. corrugata</i>	RM1-1-4	GCA_001708425.1	X	X	XX			
<i>P. cremoricolorata</i>	ND07	GCA_000759535.1	X	X	XX			X
<i>P. denitrificans</i>	ATCC 13867	GCA_000349845.1		X				
<i>P. entomophila</i>	L48	GCA_000026105.1	X	X	X			
<i>P. fluorescens</i>	FW300-N2C3	GCA_001307275.1	X	X	X			
<i>P. fluorescens</i>	FW300-N2E3	GCA_001307155.1	X	X	X			

<i>P. fluorescens</i>	L111	GCA_001708465.1	X	X	X	
<i>P. fluorescens</i>	L228	GCA_001708485.1	X	X	X	
<i>P. fluorescens</i>	L321	GCA_001708445.1	X	X	X	
<i>P. fluorescens</i>	LBUM223	GCA_000968415.1	X	X	X	
<i>P. fluorescens</i>	LBUM636	GCA_001612705.1	X	X	X	
<i>P. fluorescens</i>	PCL1751	GCA_000934565.1	X	X	X	
<i>P. fluorescens</i>	Pt14	GCA_001747385.1	X	X	X	
<i>P. fluorescens</i>	UK4	GCA_000730425.1	X	X	X	
<i>P. fluorescens</i>	A506	GCA_000262325.2	X	X	X	
<i>P. fluorescens</i>	F113	GCA_000237065.1	X	X	X	
<i>P. fluorescens</i>	NCIMB 11764	GCA_000293885.3	X	X	X	
<i>P. fluorescens</i>	Pf0-1	GCA_000012445.1	X	X	X	
<i>P. fluorescens</i>	PICF7	GCA_000963495.1	X	X	X	
<i>P. fluorescens</i>	SBW25	GCA_000009225.1		X	X	
<i>P. fragi</i>	NMC25	GCA_002128325.1		X	X	X
<i>P. fragi</i>	P121	GCA_001543265.1		X	X	
<i>P. frederiksbergensis</i>	AS1	GCA_001952935.1	X	X	X	
<i>P. frederiksbergensis</i>	ERDD5:01	GCA_001874645.1	X	X	X	Xp
<i>P. frederiksbergensis</i>	KNU-15	GCA_002355315.1	X	X	X	
<i>P. fulva</i>	12-X	GCA_000213805.1		X		
<i>P. knackmussii</i>	B13	GCA_000689415.1		X		X
<i>P. koreensis</i>	CRS05-R5	GCA_001654515.1	X	X	X	
<i>P. koreensis</i>	D26	GCA_001605965.1	X	X	X	
<i>P. mandelii</i>	JR-1	GCA_000257545.3	X	X	XXp	
<i>P. mendocina</i>	MAE1-K	GCA_002442555.1		X		
<i>P. mendocina</i>	NK-01	GCA_000204295.1		X		X
<i>P. mendocina</i>	S5.2	GCA_000733715.2		X		
<i>P. mendocina</i>	ymp	GCA_000016565.1		X		
<i>P. monteilii</i>	USDA-ARS-USMARC-56711	GCA_001534745.1	X	X	X	
<i>P. monteilii</i>	SB3078	GCA_000510285.1	X	X	X	X
<i>P. monteilii</i>	SB3101	GCA_000510325.1	X	X	X	
<i>P. mosselii</i>	BS011	GCA_002309555.1	X	X	X	X
<i>P. mosselii</i>	SJ10	GCA_000498975.2	X	X	X	
<i>P. oryzihabitans</i>	USDA-ARS-USMARC-56511	GCA_001518815.1		X		
<i>P. parafulva</i>	CRS01-1	GCA_000800255.1	X	X	X	
<i>P. parafulva</i>	PRS09-11288	GCA_002021815.1	X	X	X	
<i>P. plecoglossicida</i>	NyZ12	GCA_000831585.1	X	X	X	X
<i>P. poae</i>	RE*1-1-14	GCA_000336465.1	X	X	X	
<i>P. protegens</i>	FDAARGOS_307	GCA_002208745.1		X	X	
<i>P. protegens</i>	H78	GCA_002006545.1		X	X	
<i>P. protegens</i>	Cab57	GCA_000828695.1		X	X	

<i>P. protegens</i>	CHA0	GCA_000397205.1		X	X		
<i>P. protegens</i>	Pf-5	GCA_000012265.1		X	X		
<i>P. pseudoalcaligenes</i>	CECT5344	GCA_000297075.2		X			
<i>P. pseudoalcaligenes</i>	KF707 = NBRC 110670	GCA_002355475.1		X			
<i>P. psychrotolerans</i>	PRS08-11306	GCA_001913135.1		X			X
<i>P. putida</i>	1A00316	GCA_001515585.2	X	X	X		
<i>P. putida</i>	DLL-E4	GCA_000691565.1	X	X	X		
<i>P. putida</i>	E41	GCA_002736125.1	X	X	X		
<i>P. putida</i>	E46	GCA_002736045.1	X	X	X		
<i>P. putida</i>	IEC33019	GCA_002741075.1	X	X	X		
<i>P. putida</i>	KF715	GCA_002356095.1	X	X	X		
<i>P. putida</i>	PC2	GCA_001636055.1	X	X	X		
<i>P. putida</i>	PP112420	GCA_001886975.1	X	X	X		
<i>P. putida</i>	B6-2	GCA_000226035.3	X	X	X		X
<i>P. putida</i>	BIRD-1	GCA_000183645.1	X	X	X		
<i>P. putida</i>	DOT-T1E	GCA_000281215.1	X	X	X		
<i>P. putida</i>	F1	GCA_000016865.1	X	X	X		
<i>P. putida</i>	GB-1	GCA_000019125.1	X	X	X		
<i>P. putida</i>	H8234	GCA_000410575.1	X	X	X		X
<i>P. putida</i>	PC9 (=HB3267)	GCA_000325725.1	X	X	X		XX
<i>P. putida</i>	JB	GCA_001767335.1	X	X	X		
<i>P. putida</i>	KT2440	GCA_000007565.2	X	X	X		
<i>P. putida</i>	NBRC 14164	GCA_000412675.1	X	X	X		
<i>P. putida</i>	ND6	GCA_000264665.1	X	X	X		
<i>P. putida</i>	S12	GCA_000495455.2	X	X	X		
<i>P. putida</i>	S13.1.2	GCA_000498395.3	X	X	X		
<i>P. putida</i>	S16	GCA_000219705.1	X	X	X		
<i>P. putida</i>	SJTE-1	GCA_000271965.2	X	X	X		X
<i>P. putida</i>	W619	GCA_000019445.1	X	X	X		XX
<i>P. resinovorans</i>	NBRC 106553	GCA_000412695.1		X			Xp
<i>P. rhizosphaerae</i>	DSM 16299	GCA_000761155.1	X	X	X		X
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i>	1448A; BAA-978	GCA_000012205.1	X	X	X	XpXpXp	
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	NCPPB 3335	GCA_000164015.3	X	X	X		
<i>P. silesiensis</i>	A3T	GCA_001661075.1		X	X		X
<i>Pseudomonas</i> sp.	CCOS 191	GCA_001007005.1	X	X	X		
<i>Pseudomonas</i> sp.	DR 5-09	GCA_001655595.1	X	X	X		
<i>Pseudomonas</i> sp.	FDAARGOS_380	GCA_002591235.1	X	X	X		
<i>Pseudomonas</i> sp.	FGI182	GCA_000511325.1	X	X	X		
<i>Pseudomonas</i> sp.	GR 6-02	GCA_001655615.1	X	X	X		
<i>Pseudomonas</i> sp.	HLS-6	GCA_002753995.1	X	X	X		X
<i>Pseudomonas</i> sp.	JY-Q	GCA_001655295.1	X	X	X		X
<i>Pseudomonas</i> sp.	L10.10	GCA_001294575.1		X	X		X

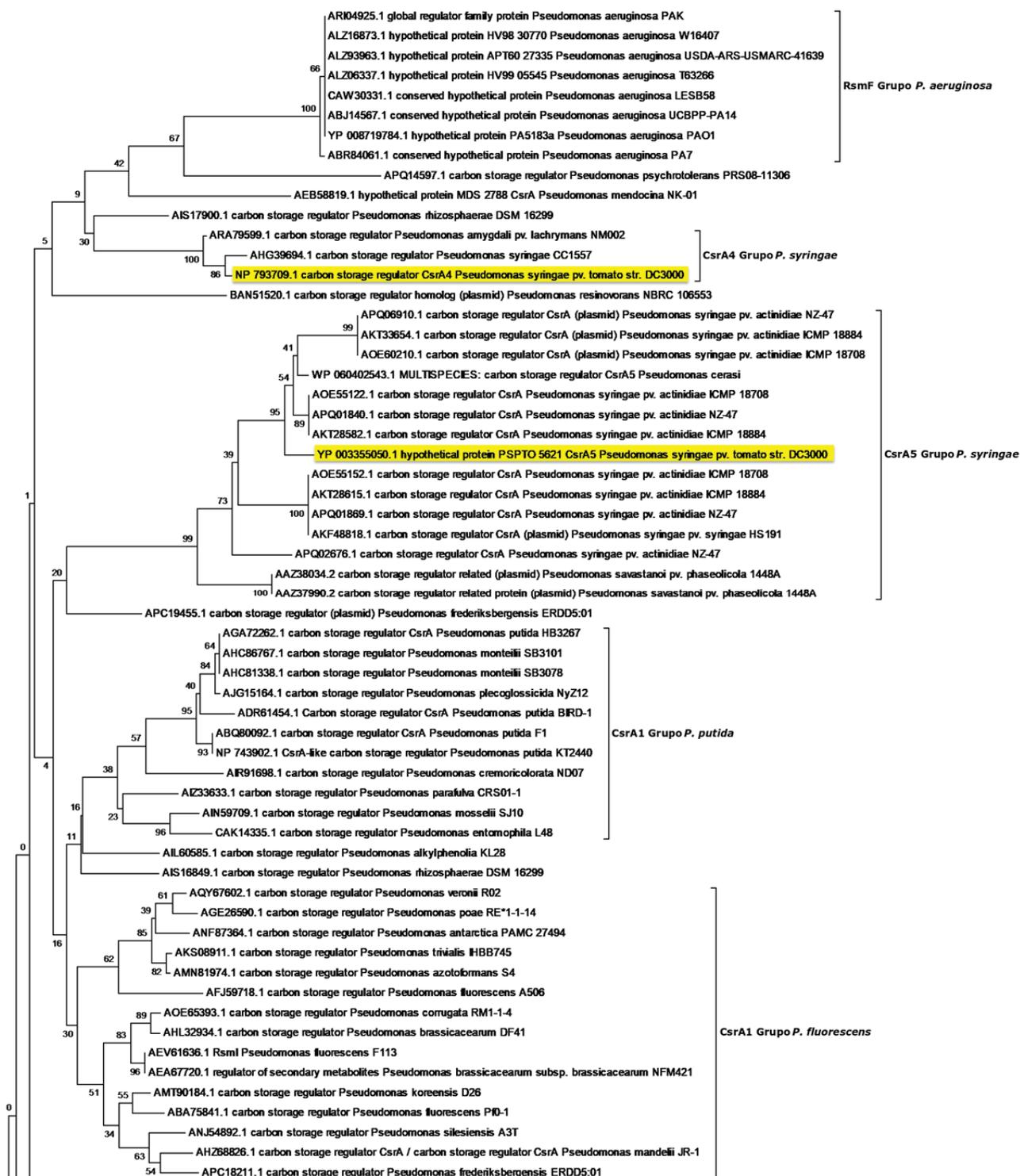
<i>Pseudomonas sp.</i>	LPH1	GCA_002037565.1		X					
<i>Pseudomonas sp.</i>	M30-35	GCA_002163625.1		X					
<i>Pseudomonas sp.</i>	MRSN12121	GCA_000931465.1		X					
<i>Pseudomonas sp.</i>	MS586	GCA_001594225.1	X	X	X				
<i>Pseudomonas sp.</i>	Os17	GCA_001547895.1		X	X				
<i>Pseudomonas sp.</i>	S-6-2	GCA_002056295.1		X					
<i>Pseudomonas sp.</i>	St29	GCA_001547915.1		X	X				
<i>Pseudomonas sp.</i>	StFLB209	GCA_000829415.1	X	X	X				
<i>Pseudomonas sp.</i>	TCU-HL1	GCA_001708505.1		X					
<i>Pseudomonas sp.</i>	TKP	GCA_000508205.1	X	X	X				
<i>Pseudomonas sp.</i>	URMO17WK12	GCA_001511755.1	X	X	X				
<i>Pseudomonas sp.</i>	URMO17WK12	GCA_001511775.1	X	X	X				
<i>Pseudomonas sp.</i>	UW4	GCA_000316175.1	X	X	X				
<i>Pseudomonas sp.</i>	VLB120	GCA_000494915.1		X	XX				X
<i>P. stutzeri</i>	273	GCA_001648195.1		X					
<i>P. stutzeri</i>	19SMN4	GCA_000661915.1		X					
<i>P. stutzeri</i>	28a24	GCA_000590475.1		X					
<i>P. stutzeri</i>	CGMCC	GCA_000219605.1		X					
	1.1803								
<i>P. stutzeri</i>	SLG510A3-8	GCA_001038645.1		X					
<i>P. stutzeri</i>	A1501	GCA_000013785.1		X					
<i>P. stutzeri</i>	CCUG 29243	GCA_000267545.1		X					
<i>P. stutzeri</i>	DSM 10701	GCA_000279165.1		X					
<i>P. stutzeri</i>	DSM 4166	GCA_000195105.1		X					
<i>P. stutzeri</i>	RCH2	GCA_000327065.1		X					
<i>P. syringae</i>	CC1557	GCA_000452705.3	X	X	X	X			
<i>P. syringae pv. actinidiae</i>	CRAFRU	GCA_002024285.1	X	X	X		XXXXp		
	12.29								
<i>P. syringae pv. actinidiae</i>	CRAFRU	GCA_002024305.1	X	X	X		XXXXp		
	14.08								
<i>P. syringae pv. actinidiae</i>	MAFF212063	GCA_002763655.1	X	X	X		XX		
<i>P. syringae pv. actinidiae</i>	NZ-45	GCA_001913215.1	X	X	X		XXXXp		
<i>P. syringae pv. actinidiae</i>	NZ-47	GCA_001913235.1	X	X	X		XXXXp		
<i>P. syringae pv. actinidiae</i>	ICMP 18708	GCA_000344355.2	X	X	X		XXXp		
<i>P. syringae pv. actinidiae</i>	ICMP 18884	GCA_000648735.3	X	X	X		XXXp		
<i>P. syringae pv. actinidiae</i>	ICMP 9853	GCA_000344335.2	X	X	X		X		
<i>P. syringae pv. lapsa</i>	ATCC 10859	GCA_001482725.1	X	X	X				
<i>P. syringae pv. syringae</i>	B301D	GCA_000988485.1	X	X	X				
<i>P. syringae pv. syringae</i>	B728a	GCA_000012245.1	X	X	X				
<i>P. syringae pv. syringae</i>	HS191	GCA_000988395.1	X	X	X		X		
<i>P. syringae pv. tomato</i>	DC3000	GCA_000007805.1	X	X	X	X	X		

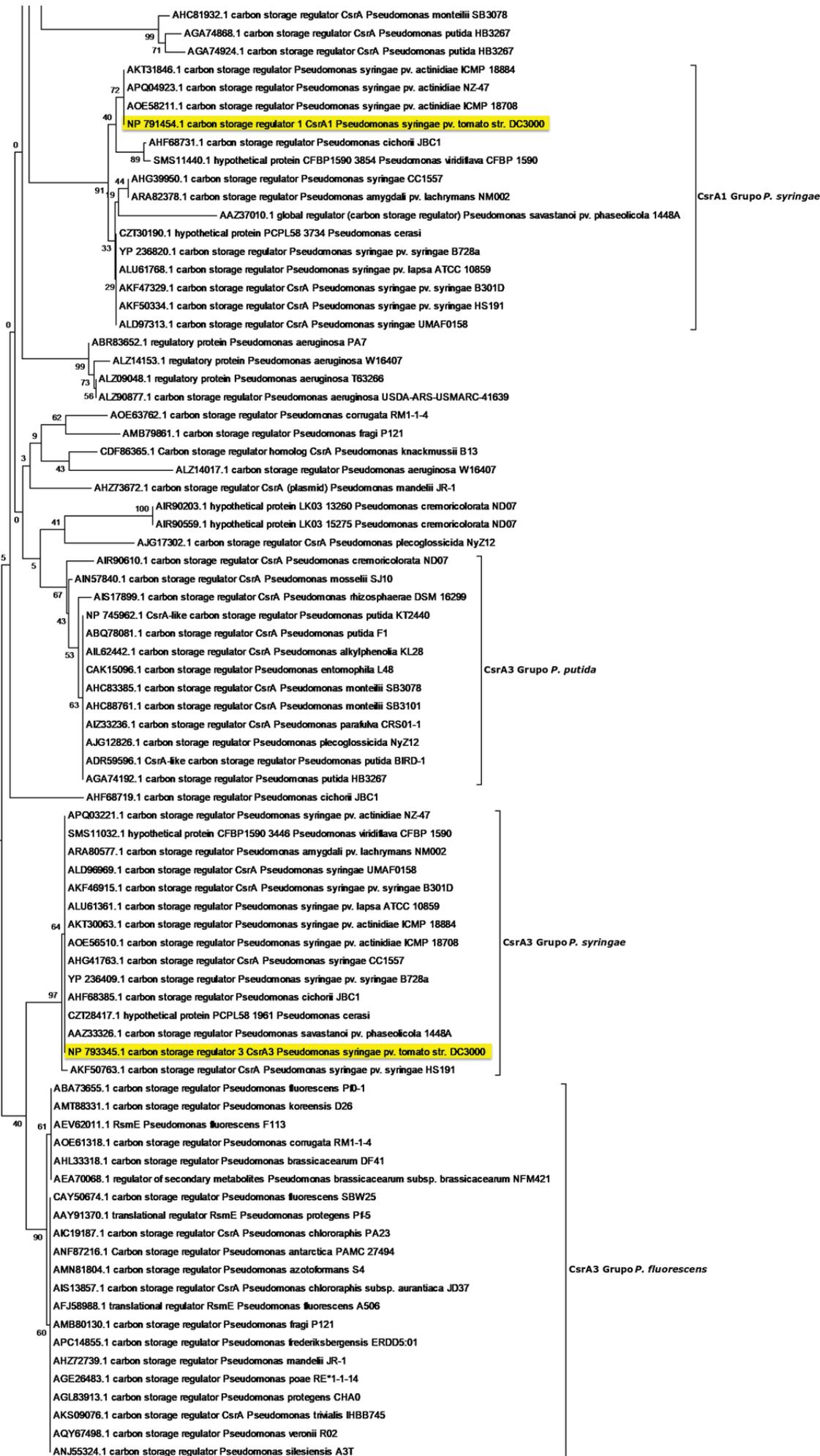
<i>P. syringae</i>	UMAF0158	GCA_001281365.1	X	X	X				
<i>P. trivialis</i>	IHBB745	GCA_001186335.1	X	X	X				
<i>P. veronii</i>	R02	GCA_002028325.1	X	X	X				
<i>P. viridiflava</i>	CFBP 1590	GCA_900184295.1	X	X	X				

X: presente, Xp: presente en un plásmido, Negrita: secuencias utilizadas para construir el árbol filogenético (Apéndice E).

## Apéndice E. Árbol filogenético de las proteínas CsrA de *Pseudomonas spp.*

Árbol filogenético construido a partir de las secuencias aminoacídicas de las proteínas CsrA de 73 cepas representativas de cepas del género *Pseudomonas* (Apéndice D) cuyo genoma había sido secuenciado. Los detalles de su construcción se especifican en la sección 7.2 de Materiales y Métodos. Las distancias se calcularon como sustituciones aminoacídicas por posición (escala en la base de la figura) y se calcularon los valores de *bootstrap* utilizando 1000 réplicas (indicados a la izquierda de cada nodo). Las variantes de CsrA presentes en Pto DC3000 están resaltadas en amarillo.





AIS16084.1 carbon storage regulator *Pseudomonas rhizosphaerae* DSM 16299  
 ADR59104.1 CsrA 2 *Pseudomonas putida* BIRD-1  
 AGA74685.1 carbon storage regulator *Pseudomonas putida* HB3267  
 AJG12190.1 carbon storage regulator *Pseudomonas plecoglossicida* NyZ12  
 AZ33512.1 carbon storage regulator *Pseudomonas parafulva* CRS01-1  
 AN59645.1 carbon storage regulator *Pseudomonas mosselii* SJ10  
 63 AHC89195.1 carbon storage regulator *Pseudomonas monteilii* SB3101  
 AHC83824.1 carbon storage regulator *Pseudomonas monteilii* SB3078  
 CAK16582.1 carbon storage regulator *Pseudomonas entomophila* L48  
 AR90025.1 carbon storage regulator *Pseudomonas cremoricolorata* ND07  
 94 ABQ77601.1 carbon storage regulator CsrA *Pseudomonas putida* F1  
 NP 746583.1 carbon storage regulator *Pseudomonas putida* KT2440  
 ALD97150.1 carbon storage regulator *Pseudomonas syringae* UMAF0158  
 NP 791668.1 carbon storage regulator 2 CsrA2 *Pseudomonas syringae* pv. tomato str. DC3000  
 CAY51566.1 carbon storage regulator homolog 2 *Pseudomonas fluorescens* SBW25  
 AAY93751.1 translational regulator RsmA *Pseudomonas protegens* Pf5  
 AAZ36783.1 carbon storage regulator *Pseudomonas savastanoi* pv. phaseolicola 1448A  
 AEA70716.1 regulator of secondary metabolites *Pseudomonas brassicacearum* subsp. *brassicacearum* NFM421  
 46 AIC21644.1 carbon storage regulator *Pseudomonas chlororaphis* PA23  
 AIL62962.1 carbon storage regulator *Pseudomonas alkylphenolia* KL28  
 ANF87861.1 Carbon storage regulator *Pseudomonas antarctica* PAMC 27494  
 AMN82372.1 carbon storage regulator *Pseudomonas azototomans* S4  
 AHL35519.1 carbon storage regulator *Pseudomonas brassicacearum* DF41  
 AIS11692.1 carbon storage regulator *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* JD37  
 CZT28190.1 hypothetical protein PCPL58 1734 *Pseudomonas cerasi*  
 AHF66517.1 carbon storage regulator *Pseudomonas cichorii* JBC1  
 AOE61783.1 carbon storage regulator *Pseudomonas comugata* RM1-1-4  
 AFJ54689.1 translational regulator RsmA *Pseudomonas fluorescens* A506  
 AEV64468.1 RsmA *Pseudomonas fluorescens* F113  
 ABA76010.1 carbon storage regulator-like protein *Pseudomonas fluorescens* P10-1  
 32 AMB80670.1 carbon storage regulator *Pseudomonas fragi* P121  
 APC17997.1 carbon storage regulator *Pseudomonas frederiksbergensis* ERDD5:01  
 AMT90344.1 carbon storage regulator *Pseudomonas korensis* D26  
 AHZ72091.1 carbon storage regulator *Pseudomonas mandelii* JR-1  
 AGL86327.1 carbon storage regulator *Pseudomonas protegens* CHA0  
 AKS08521.1 carbon storage regulator *Pseudomonas trivialis* IHBB745  
 YP 236624.1 carbon storage regulator *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a  
 AHG40131.1 carbon storage regulator *Pseudomonas syringae* CC1557  
 AOE56210.1 carbon storage regulator *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* ICMP 18708  
 AKT29747.1 carbon storage regulator *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* ICMP 18884  
 ALU61570.1 carbon storage regulator *Pseudomonas syringae* pv. *lapsea* ATCC 10859  
 AKF47135.1 carbon storage regulator CsrA *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B301D  
 AKF50540.1 carbon storage regulator CsrA *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* HS191  
 ARA82134.1 carbon storage regulator *Pseudomonas amygdali* pv. *lachrymans* NM002  
 APQ02923.1 carbon storage regulator *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* NZ-47  
 AQY68013.1 carbon storage regulator *Pseudomonas veronii* R02  
 SMS09289.1 hypothetical protein CFBP1590 1703 *Pseudomonas viridiflava* CFBP 1590  
 AGE27020.1 carbon storage regulator *Pseudomonas poae* RE\*-1-14  
 ANJ54687.1 carbon storage regulator *Pseudomonas silensensis* A3T

CsrA2 Linaje *P. fluorescens*

AAG04294.1 RsmA regulator of secondary metabolites *Pseudomonas aeruginosa* PAO1  
 ABJ10065.1 RsmA regulator of secondary metabolites *Pseudomonas aeruginosa* UCBBP-PA14  
 CAW29166.1 RsmA regulator of secondary metabolites *Pseudomonas aeruginosa* LESB58  
 ABR81556.1 carbon storage regulator *Pseudomonas aeruginosa* PA7  
 ABP79066.1 carbon storage regulator *Pseudomonas stutzeri* A1501  
 AMR67538.1 carbon storage regulator *Pseudomonas alcaligenes* NEB 585  
 AJE14756.1 carbon storage regulator *Pseudomonas balearica* DSM 6083  
 AMO75051.1 hypothetical protein PcP3B5 15810 *Pseudomonas citronellois* P3B5  
 AG23606.1 carbon storage regulator *Pseudomonas denitrificans* ATCC 13867  
 AEF23087.1 carbon storage regulator CsrA *Pseudomonas fulva* 12-X  
 CDF82964.1 hypothetical protein PKB 1603 CsrA *Pseudomonas knackmussii* B13  
 AEB57788.1 carbon storage regulator *Pseudomonas mendocina* NK-01  
 47 ABP85656.1 carbon storage regulator CsrA *Pseudomonas mendocina* ymp  
 ALZ84080.1 carbon storage regulator *Pseudomonas oryzae* USDA-ARS-USMARC-56511  
 CDM40099.1 Carbon storage regulator homolog 2 *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT 5344  
 BAN49964.1 carbon storage regulator *Pseudomonas resinovorans* NBRC 106553  
 AHY43752.1 carbon storage regulator *Pseudomonas stutzeri* 19SMN4  
 AEJ04593.1 carbon storage regulator *Pseudomonas stutzeri* ATCC 17588 LMG 11199  
 AFN77330.1 carbon storage regulator *Pseudomonas stutzeri* DSM 10701  
 ALZ10965.1 carbon storage regulator *Pseudomonas aeruginosa* T63266  
 ALZ92799.1 carbon storage regulator *Pseudomonas aeruginosa* USDA-ARS-USMARC-41639  
 ALZ12090.1 carbon storage regulator *Pseudomonas aeruginosa* W16407  
 ARI00332.1 carbon storage regulator *Pseudomonas aeruginosa* PAK  
 APU29812.1 carbon storage regulator *Pseudomonas alcaliphila* JAB1  
 APQ14113.1 carbon storage regulator *Pseudomonas psychrotolerans* PRS08-11306  
 NP 417176.1 pleiotropic regulatory protein for carbon source metabolism *Escherichia coli* str. K-12 substr. MG1655

CsrA2 Linaje *P. aeruginosa*

## Apéndice F. Alineamiento de los promotores de *csrA2* en múltiples bacterias

Alineamiento de las regiones promotoras del gen *csrA2* pertenecientes a distintas cepas de *E. coli* (Eco) y *Pseudomonas*: *P. putida* (Ppu), *P. aeruginosa* (Pae), *P. protegens* (Ppr), *P. chlororaphis* (Pchl), *P. cichorii* (Pci), *P. syringae* (Psyr) y Pto DC3000. Se señalan con negrita el codón de STOP del gen situado en 5' y el ATG de *csrA2*, en rojo las secuencias GGA (posibles sitios CsrA), en azul un inicio de transcripción determinado para Ppu y con fondo negro los inicios de transcripción determinados en este trabajo. Las regiones -10 y/o -35 se marcan con recuadros (RpoS), en gris (RpoD), en verde (AlgU) y en rosa (factor  $\sigma$  no identificado). Los asteriscos rojos indican los nucleótidos conservados en todas las cepas y los negros, los nucleótidos conservados en *Pseudomonas*.



### Apéndice G. Predicción de las dianas de CsrA en Pto DC3000

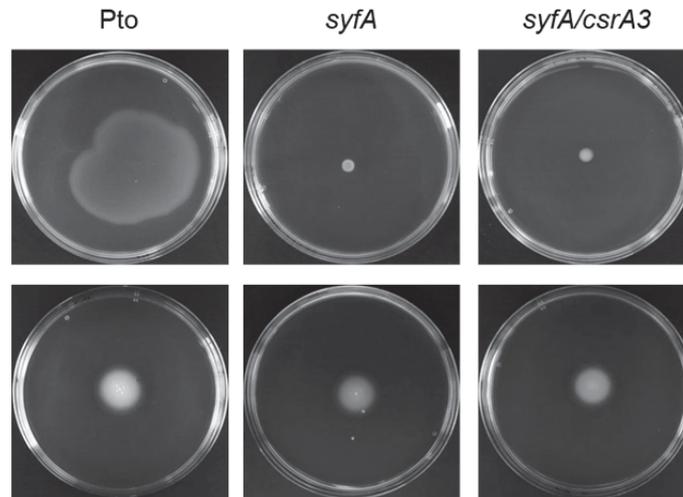
La predicción de las dianas de CsrA se realizó utilizando el algoritmo creado por Kulkarni *et al.* (2014), considerando la región desde -200 y +50 nt desde el ATG. Para que un gen sea considerado una posible diana de CsrA, su ARNm debe presentar motivos GGA cercanos al consenso, uno de los cuales debe estar localizado cerca de la secuencia SD y al menos dos que presenten una separación apropiada para la unión del dímero de CsrA. Los motivos GGA considerados son los sitios primarios (AAGGA, ACGGA, ATGGA, AGGGA y AGGA) y secundarios (CTGGA, AGAGA, CGGGA y TGGGA) de unión a CsrA cuyas secuencias habían sido determinadas previamente a partir de estudios *in vivo* e *in vitro*. Sin embargo, cabe mencionar esta herramienta no tiene en cuenta la estructura del ARNm, que supone un aspecto fundamental para la unión de CsrA. Además, este algoritmo está centrado en la búsqueda de sitios de alta afinidad cercanos a la SD, ignorando de esta manera por un lado, los sitios de baja afinidad; y por otro, los sitios presentes en ARNm con una región 5'-UTR mayor de 200 nt.

Nombre	PSPTO_	Sitios 1arios	Sitios 2arios	Nombre	PSPTO_	Sitios 1arios	Sitios 2arios	Nombre	PSPTO_	Sitios 1arios	Sitios 2arios
	0006	4	3	<i>rpoS</i>	1565	5	0		4078	3	0
	0013	3	1		1572	3	0	<i>nth</i>	4149	3	0
	0021	3	1		1591	3	0		4194	3	0
	0050	4	0		1597	4	0	<i>mucA</i>	4223	3	1
	0071	4	0	<i>aer-1</i>	1648	3	0	<i>rpoE/algU</i>	4224	3	0
	0094	3	0		1655	3	0		4240	4	0
	0099	4	0		1690	3	0		4272	3	0
	0124	3	0		1738	3	0		4275	3	0
<i>algQ</i>	0134	3	1	<i>cmk</i>	1749	3	0		4284	2	2
	0164	3	0		1752	3	1		4295	3	2
	0172	4	0		1757	4	1		4296	3	0
	0176	4	0		1810	3	1	<i>pyk</i>	4337	3	0
	0214	4	0		1851	3	0		4348	5	0
<i>hsIR</i>	0237	3	0		1910	3	1		4385	4	0
	0242	3	0	<i>HptB</i>	1965	4	1	<i>murG</i>	4408	3	0
	0336	3	4	<i>flp</i>	1972	4	0		4451	4	0
	0350	3	1		2048	3	0	<i>truB</i>	4488	3	0
	0368	3	0		2057	3	0		4524	3	1
<i>iaaL</i>	0371	4	0		2068	3	0		4545	3	0
<i>tkt</i>	0385	4	0		2083	7	0	<i>hopO1-2</i>	4594	4	1
	0450	3	0		2103	3	0		4609	3	0
	0477	4	0		2148	4	2		4627	3	0
	0479	4	0		2182	4	0		4628	3	1
<i>shcF</i>	0503	4	0		2240	3	0		4629	4	0
	5647	5	0		2260	3	1		4633	3	0
	0516	3	0		2307	3	1		4659	3	0
	0522	3	0		2334	3	0	<i>corS</i>	4705	3	0
	0525	3	1		2363	3	0	<i>cmaB</i>	4710	3	0
	0532	3	1	<i>soxA-2</i>	2450	4	0	<i>cmaC</i>	4711	3	0
<i>rpsC</i>	0633	2	2		2476	3	0		4754	3	0
	0720	3	1		2570	2	2		4770	2	2

	0734	3	0		2711	4	0		4772	5	2
	0756	4	0		2760	3	0		4787	4	0
	0766	3	0		2806	3	0		4796	4	0
	0792	4	0		2894	3	0		4872	3	1
<i>fimU</i>	0811	3	0		2908	4	0	<i>braD</i>	4918	3	0
	0834	3	0		2920	4	0	<i>orn</i>	4950	2	2
	0835	4	0		3081	3	0	<i>gshB</i>	5035	3	0
	0836	4	0	<i>malQ</i>	3127	3	1	<i>metW</i>	5050	3	1
	0848	3	0		3134	3	1		5066	3	0
	0851	3	0		3174	3	0		5073	3	0
<i>hopAT1</i>	5618	3	1		3188	3	3	<i>madL</i>	5080	4	0
	0853	3	0		3196	4	0		5114	3	0
	0859	3	1		3296	3	0	<i>pilM</i>	5132	3	0
	0916	4	0		3297	5	1		5143	3	0
	0921	3	0	<i>tliD</i>	3330	3	0		5158	4	0
	0934	4	0		3333	3	0		5160	3	0
	0986	3	0		3355	4	0		5202	3	0
	0988	3	0		3382	3	0		5206	3	2
<i>wssB</i>	1027	4	1		3436	3	0		5210	6	0
	1035	4	3		3478	3	0	<i>metI-2</i>	5261	4	0
	1089	2	2		3489	3	0	<i>ptsP</i>	5284	3	0
<i>hemH</i>	1128	3	0		3511	3	0		5322	3	1
	1137	3	0		3531	3	0		5332	3	0
	1158	3	1		3537	2	3		5350	3	0
	1164	3	0		3584	4	1		5391	3	1
<i>folB-2</i>	1181	3	0	<i>ampC</i>	3594	3	0		5410	3	2
	1187	3	0		3670	3	0		5419	3	0
	1202	4	0		5671	3	0		5447	3	0
	1245	4	0		3774	3	0		5461	3	0
	1252	5	0		3784	3	0		5466	3	0
	1269	2	2	<i>maf-1</i>	3837	4	0		5497	3	0
	1314	3	0	<i>minD</i>	3873	3	0		5498	3	2
	1339	3	0		3884	3	0		5505	5	0
<i>avrE1</i>	1377	3	1		3903	3	0		5509	3	0
<i>hrpH</i>	1378	4	0		3927	4	0	<i>cls</i>	5530	3	0
<i>hrpV</i>	1391	2	3		3934	3	0		5574	6	0
<i>hrcQb</i>	1396	3	0		4035	3	0		B0026	2	2
<i>hrpO</i>	1399	4	2		4042	2	2		B0055	3	0
	1458	3	1		4047	4	0		A0065	4	1
<i>accA</i>	1550	3	0		4057	4	0		A0069	3	0
<i>pcm</i>	1563	2	2		4064	3	2				

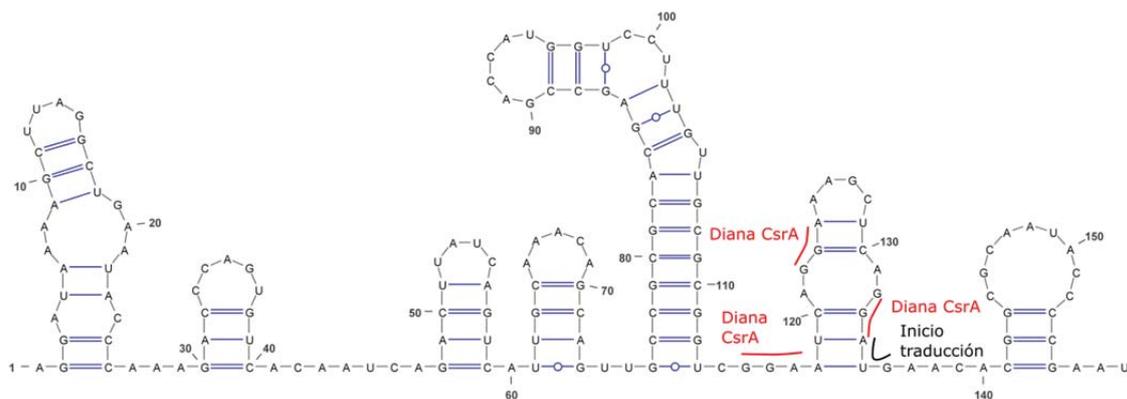
## Apéndice H. Motilidad de los mutantes *syfA* y *syfA/csrA3*

Las imágenes mostradas son representativas de la motilidad *swarming* (arriba) y *swimming* (abajo) de la cepa silvestre y los mutantes *syfA* y *syfA/csrA3*. La producción de siringafactina es necesaria para la motilidad *swarming*, pero no afecta a la motilidad *swimming* de forma significativa.



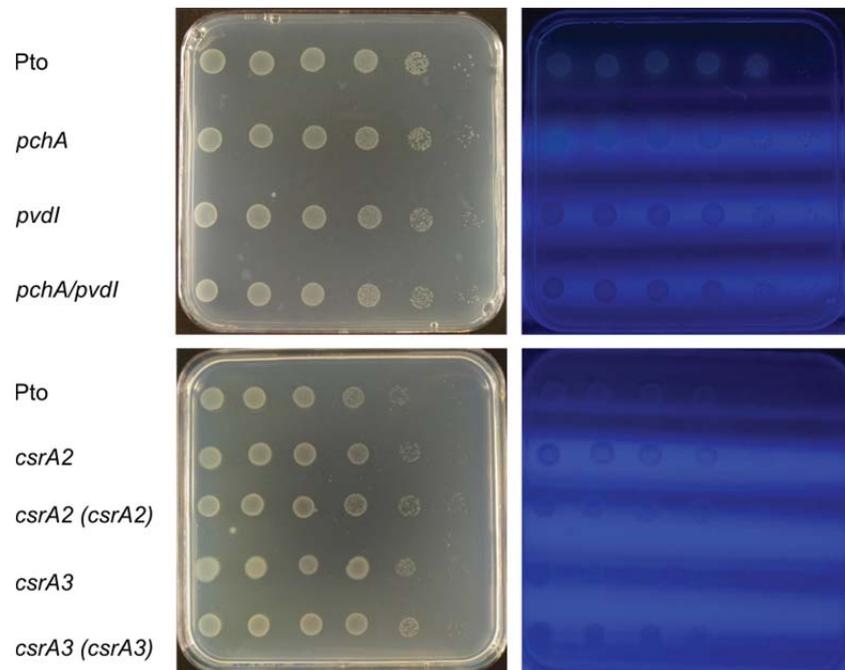
## Apéndice I. Estructura secundaria del ARN de *syfR*

Predicción y representación de la estructura del ARNm de *syfR* según lo descrito en la sección 7.4 de Materiales y métodos. La secuencia incluye desde el inicio de la transcripción hasta los primeros 25 nt codificantes y se señalan las posibles dianas de CsrA (rojo) y el codón de inicio (negro).



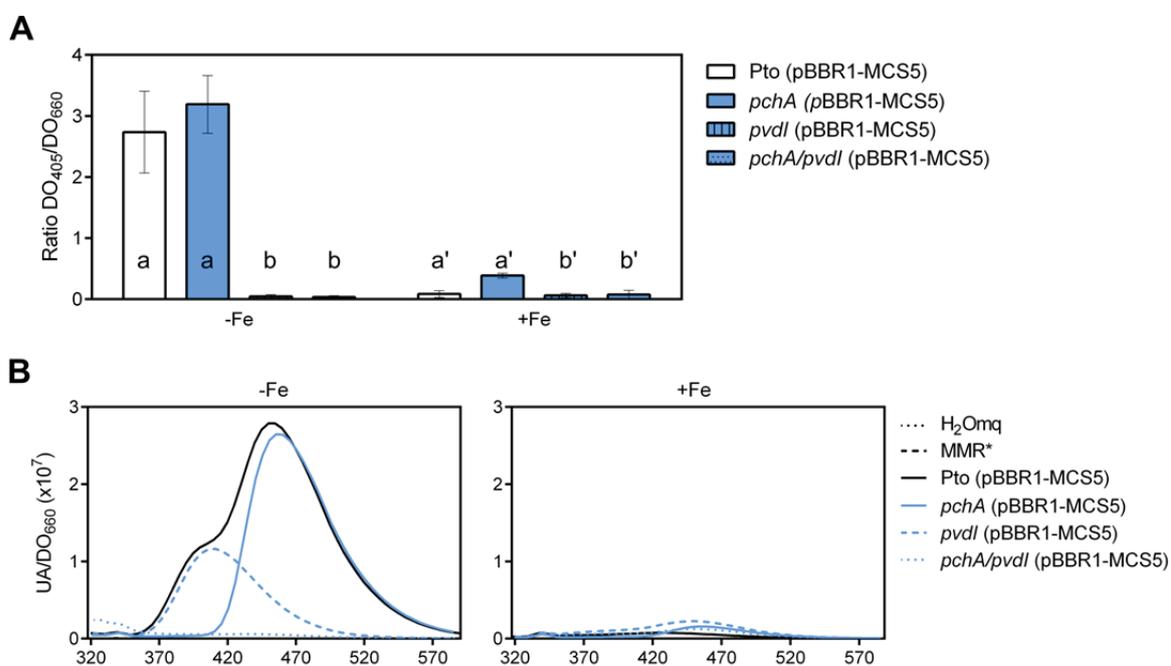
**Apéndice J. Pérdida de la fluorescencia de Pto DC3000 con altas concentraciones de hierro**

Gotas de diluciones seriadas (1:10) a partir de cultivos ajustados a  $DO_{660}=0,1$  de varias cepas crecidas a 20°C en MMR\* suplementado con  $FeCl_3$  50  $\mu M$ . Las fotografías se tomaron a los 2 días bajo luz visible (izquierda) y UV (derecha).



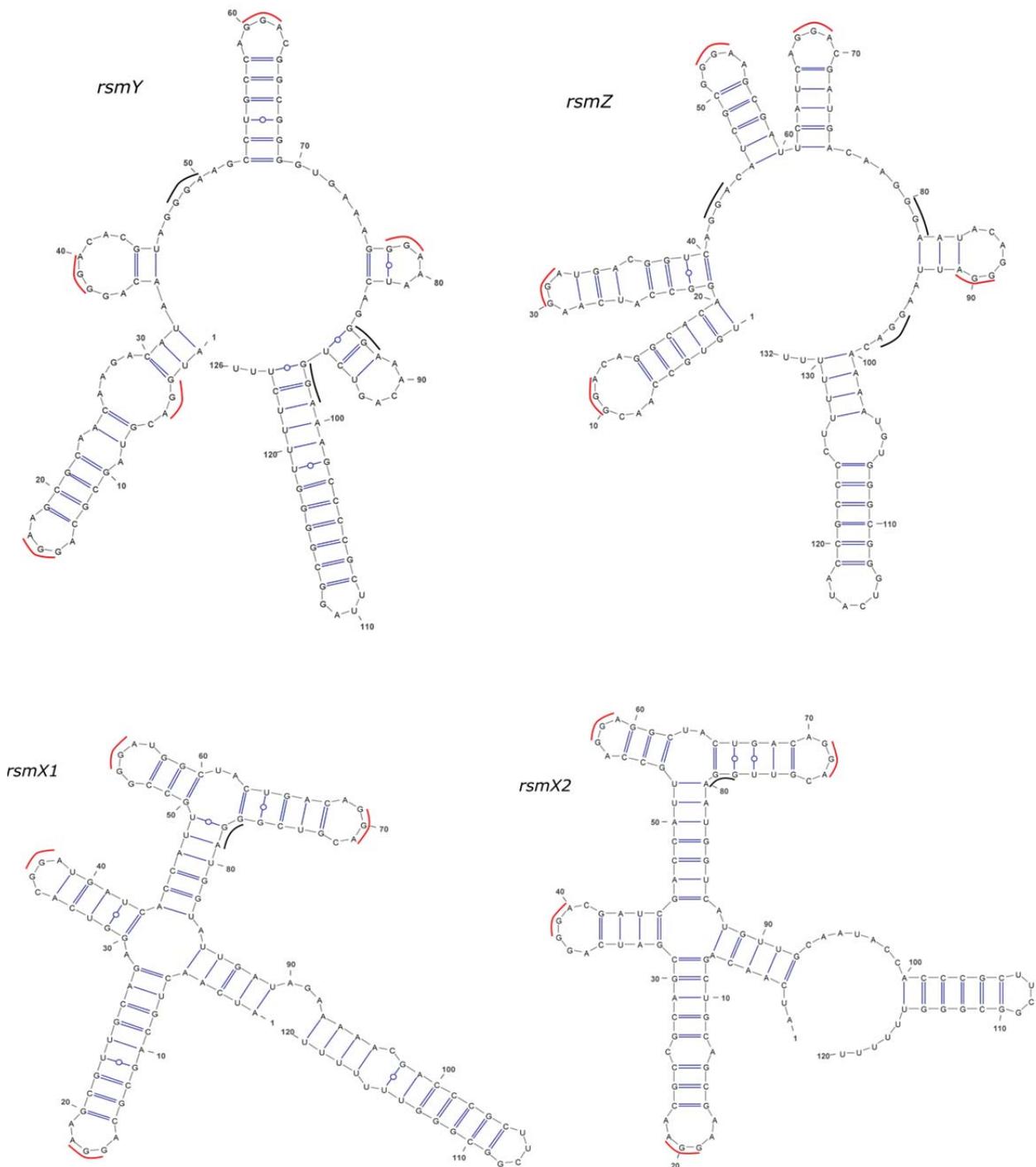
## Apéndice K. Detección de sideróforos en sobrenadantes de Pto DC3000 y mutantes en *pchA* y *pvdI* con pBBR1-MCS5.

Se muestran los datos equivalentes a los de la Figura R26 utilizando las mismas cepas, pero en este caso portando el plásmido sin inserto pBBR1-MCS5.

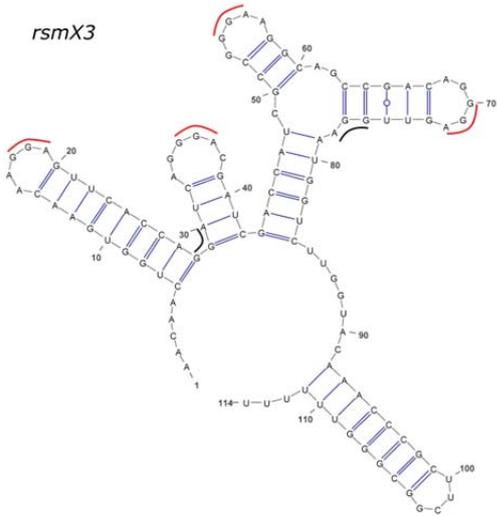


## Apéndice L. Estructura secundaria de los ARN *rsm* de Pto DC3000

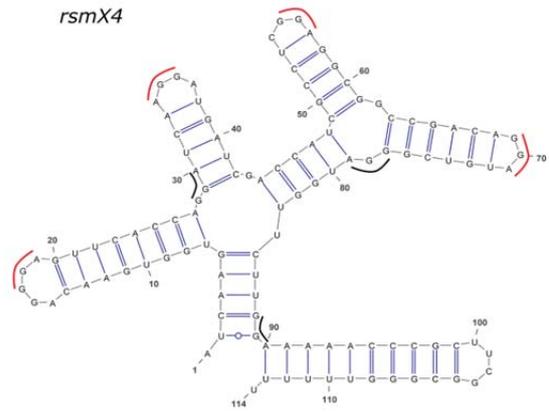
Predicción y representación de la estructura secundaria de los ARN *rsm* según lo descrito en la sección 7.4 de Materiales y métodos. Se señalan las posibles dianas de CsrA en rojo, si están situadas en los bucles de horquillas (posibles sitios de unión con alta afinidad) y negro, los que no cumplen esa característica.



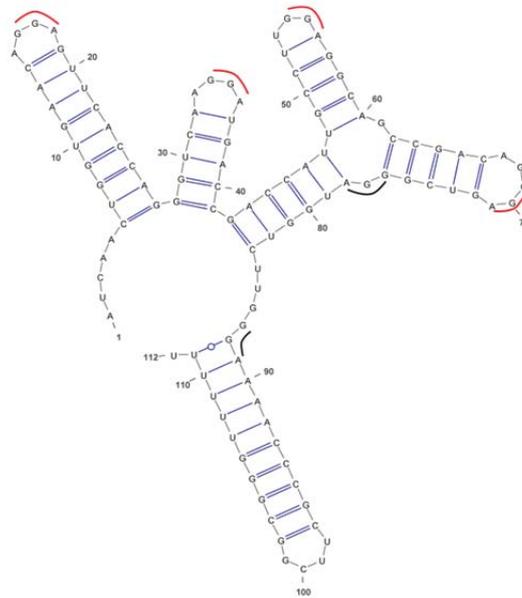
*rsmX3*



*rsmX4*



*rsmX5*



## Apéndice M. Regiones promotoras de los ARN *rsm* de Pto DC3000 y otras bacterias

Alineamiento de las regiones promotoras *rsmX1-5* y *rsmY*, la secuencia del promotor de *rsmZ* no se utilizó en el alineamiento por ser muy divergente de las anteriores y se muestra en la parte inferior para una mayor claridad. Se representa la secuencia en 5' del inicio de la transcripción y señalan con negrita los nucleótidos -10 y -35, en verde la caja Gac y otra secuencia idéntica a parte de ella, en azul la región -35 y en gris la región -10. Los asteriscos rojos indican los nucleótidos conservados en todas las cepas y los negros, los nucleótidos conservados en *rsmX*.

```

-100      -90      -80      -70      -60      -50      -40      -30      -20      -10      0
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
PrsmY      GGAGGCATCACAATTCTGACTTGAAAAAGTCGTGTAAGCATTTGCTTACACTCCGTGGTGCCAATTGACCTCTTCCCAAATAAGGGATCCAAAGTTAATCTTTGTA-C
PrsmX1     AATGTCGTGTAGTTCTTCGGTGACCGAAGGCGATAGGGAAAGGCTTACGCGAGGAGGAGTGGATCCA-CTCTGTACGCCGCCCTGGGAAAGTCGAATCTACCCC-C
PrsmX2     TTTTTTTACAGCTTAGGGACGGCGTGAGCAGGATGGGGAAAGGCTTACATCGAGAGAAGCG-ATTGG-CTCATCGACCGACATTCGCTCAATGTAGGATCCAATTC
PrsmX3     GCACGCAAATACATGGCTGAATGCCACACAGGATAGGGAAAGGCTTACACGCCAAATAGCACATTGG-CTATTTGCCACCCGTCCTCCAAAGAGCCGTAATTATGGATCC
PrsmX4     CCACCCATACGCGCGGATCGAATTAGCGAGGATAGGGAAAGGCTTACACGCGATCGAGGAACTTGG-CTATTCCGACCCTGTGCGCTACGCATAAGATTGGATCC
PrsmX5     ATGCCTATTTCTGAAATCTGCGTAGGCCAGGATGGGGAAAGGCTTACACGTGCTGAGGCGGTTGG-CTATTCCGCCCTGACGCTTGCCTCGTATATGGATCC
          * * * * *
PrsmZ     GGGGCGTGATCGGGTGGGCGGTGTGCAACCTGTGTAAGTCATCGCACGCGTGTTGTAATTATCTAGGTATCGAGGGTGAGACTTGTCTGCATGCAGTCGTTTTTTT
TATTGGCAAGCTCATGATTTAAAGCATTTTTATTTTTCAGGCGTGCTACTGCAGAAATATTCTGGAGCGTTTCGGGTGTTGCTCTGTGAGGTAAATCTCTACTATCGAAGC

```

## Apéndice N. Licencias de reproducción del material tomado de otros trabajos

En la tabla se detalla la procedencia de las figuras y tablas tomadas o modificadas de otros trabajos, indicando la figura o tabla de la tesis donde se utilizaron. En los casos donde se necesitaba una licencia de reproducción, esta se obtuvo del Copyright Clearance Center (<https://www.copyright.com/>). N/A: no aplica.

Nº	Publicación original	Revista	Editorial	Nº Licencia
<i>Figuras</i>				
11	Jones y Dangl (2006)	Nature	Springer Nature	4661881354281
13, 14	Browning y Busby (2016)	Nat Rev Microbiol	Springer Nature	4660810045077
15	Kortmann y Narberhaus (2012)	Nat Rev Microbiol	Springer Nature	4661230679330
16	Waters y Storz (2009)	Cell	Elsevier	4660840423991
17	Grenga <i>et al.</i> (2017)	FEMS Microbiol Lett	Oxford University Press	4660840656309
18	Wuichet <i>et al.</i> (2010)	Curr Opin Microbiol	Elsevier	4661780074076
19	Jung <i>et al.</i> (2012)	Curr Opin Microbiol	Elsevier	4664900874306
110	Waters y Bassler (2005)	Annu Rev Cell Dev Biol	Annual Reviews, Inc	4665791066937
111	Sonnleitner y Haas (2011)	App Microbiol Biot	Springer Nature	4661240221854
112	Vakulskas <i>et al.</i> (2015)	Microbiol Mol Biol Rev	American Society for Microbiology	N/A
113	Morris, E. R. <i>et al.</i> (2013)	Ann Rev Phytopathol	Annual Reviews, Inc	4661321046642
113	Xin y He (2013)	Ann Rev Phytopathol	Annual Reviews, Inc	4661320817111
114	Alfano <i>et al.</i> (2000)	N Natl Acad Sci USA	National Academy of Sciences	N/A
115	Galán <i>et al.</i> (2014)	Annu Rev Microbiol	Annual Reviews, Inc	4661331055238
115	Li <i>et al.</i> (2002)	EMBO J	John Wiley and Sons	4661370086887
116	Tang <i>et al.</i> (2006)	Mol Plant Microbe In	The American Phytopathological Society	N/A
117	Smirnova <i>et al.</i> (2002)	J Mol Microb Biotech	S./KARGER AG	4667001394233
118	Morimoto y Minamino (2014)	Biomolecules	MDPI	N/A
118	Dasgupta <i>et al.</i> (2003)	Mol Microbiol	John Wiley and Sons	4661390339389
119	Ravel y Cornelis (2003)	Trends Microbiol	Elsevier	4661390596779
120	Bultreys <i>et al.</i> (2006)	Appl Environ Microb	American Society for Microbiology	N/A
120	Ahmadi <i>et al.</i> (2015)	Appl Environ Microb	American Society for Microbiology	N/A
121	Hay <i>et al.</i> (2014)	Environ Microbiol	John Wiley and Sons	4665930465534
122	Berti <i>et al.</i> (2007)	J Bacteriol	American Society for Microbiology	N/A
<i>Tablas</i>				
11	Burgess (2001)	Elsevier Books	Elsevier	4686080377521
13	Vakulskas <i>et al.</i> (2015)	Microbiol Mol Biol Rev	American Society for Microbiology	N/A
14	Llamas <i>et al.</i> (2014)	FEMS Microbiol Rev	Oxford University Press	4686080712662
14	Otero-Asman <i>et al.</i> (2019)	Mol Microbiol	John Wiley and Sons	4686080867795

## Apéndice O. Artículo publicado

La editorial del artículo permite la reproducción íntegra del material por los autores del trabajo sin la necesidad de adquirir licencias.

[https://apsjournals.apsnet.org/page/copyright\\_permissions](https://apsjournals.apsnet.org/page/copyright_permissions)

# Multiple CsrA Proteins Control Key Virulence Traits in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000

María-Dolores Ferreiro,<sup>1</sup> Joaquina Nogales,<sup>1</sup> Gabriela A. Farias,<sup>1,2</sup> Adela Olmedilla,<sup>2</sup> Juan Sanjuán,<sup>1</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; and

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

Accepted 18 December 2017.

**The phytopathogenic bacterium *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 has a complex Gac-rsm global regulatory pathway that controls virulence, motility, production of secondary metabolites, carbon metabolism, and quorum sensing. However, despite the fact that components of this pathway are known, their physiological roles have not yet been established. Regarding the CsrA/RsmA type proteins, five paralogs, three of which are well conserved within the *Pseudomonas* genus (*csrA1*, *csrA2*, and *csrA3*), have been found in the DC3000 genome. To decipher their function, mutants lacking the three most conserved CsrA proteins have been constructed and their physiological outcomes examined. We show that they exert nonredundant functions and demonstrate that CsrA3 and, to a lesser extent, CsrA2 but not CsrA1 alter the expression of genes involved in a variety of pathways and systems important for motility, exopolysaccharide synthesis, growth, and virulence. Particularly, alginate synthesis, syringafactin production, and virulence are considerably de-repressed in a *csrA3* mutant, whereas growth in planta is impaired. We propose that the linkage of growth and symptom development is under the control of CsrA3, which functions as a pivotal regulator of the DC3000 life cycle, repressing virulence traits and promoting cell division in response to environmental cues.**

Bacteria use a wide variety of mechanisms for sensing environmental changes and complex global regulatory networks to reprogram numerous cellular processes in response to physiological demands. Two-component systems (TCS) consisting of a membrane-bound histidine kinase, which senses a specific external signal, and a cytoplasmic response regulator, which mediates the cellular response, enable bacteria to detect external

stimuli and generate a response that allows adaptation through changes in gene expression. The TCS GacS/GacA, present in numerous gram-negative bacteria, controls pathogenicity, plant growth promotion, survival, motility, biofilm formation, or production of secondary metabolites, such as antibiotics, quorum-sensing signals, toxins, siderophores, extracellular polysaccharides, and secreted proteins (Heeb and Haas 2001; Hrabak and Willis 1992; Lapouge et al. 2008; Laville et al. 1992; Sonnleitner et al. 2009). The GacS/GacA is a particular TCS because it acts posttranscriptionally through the RNA regulatory pathway of secondary metabolism Rsm (Brencic et al. 2009; Cha et al. 2012; Heeb et al. 2002). This signal transduction cascade is very well-known in *Pseudomonas fluorescens* CHA0 and starts with the reception of one or more signals by the membrane sensor GacS, which phosphorylates itself and the cytoplasmic GacA. Phosphorylated GacA binds to a conserved sequence called the Gac box in the promoters of some small regulatory RNAs (*rsmX*, *rsmY*, and *rsmZ*), inducing their expression. Those RNAs exhibit high affinity for two small RNA-binding proteins, RsmA and RsmE (Heeb et al. 2002; Humair et al. 2010; Kay et al. 2005; Kulkarni et al. 2006; Valverde et al. 2003). RsmA and RsmE proteins bind to certain mRNAs usually blocking their Shine-Dalgarno (SD) sequences, thereby affecting their stability, turnover and/or translation rates (Blumer et al. 1999; Reimmann et al. 2005; Schubert et al. 2007; Valverde and Haas 2008). The rsm RNAs antagonize RsmA and RsmE binding to mRNAs in a competitive manner; they contain multiple binding sites that sequester and store RsmA and RsmE, acting as ‘protein sponges’ (Blumer et al. 1999; Duss et al. 2014; Reimmann et al. 2005). RsmA and RsmE belong to the CsrA/RsmA family of small RNA-binding proteins that posttranscriptionally regulate protein synthesis. CsrA (carbon storage regulator) was first described in *Escherichia coli*, in which it plays a major role in controlling the intracellular carbon flux (Romeo et al. 1993). Subsequently, CsrA homologs were found in many  $\gamma$ -proteobacteria, in which they were sometimes called RsmA (repressor of secondary metabolism), as in *Pseudomonas aeruginosa* (Pessi et al. 2001). Initially, binding to sites overlapping the SD sequences on target mRNAs to prevent translation initiation was believed their only mode of action, but new ways of repression and even activation of transcription and translation have been recently reported (Vakulskas et al. 2015).

*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 causes bacterial speck on tomato thanks to its large repertoire of effectors that are secreted through the type III secretion system and the phytotoxin coronatine, which disrupts signaling mediated by jasmonic acid and stimulates stomatal opening, allowing the

Current address for Joaquina Nogales: Plant Biology Division, The Samuel Roberts Noble Foundation, Ardmore, OK 73401, U.S.A.

<sup>†</sup>Corresponding author: María-Trinidad Gallegos;  
E-mail: maritrini.gallegos@eez.csic.es

**Funding:** This research was supported by grant BIO2014-55075-P from the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness cofinanced by the European Regional Development Fund, a FPU contract from the Spanish Ministry of Education, Culture and Sports (FPU14/02120), and a Ciência sem Fronteiras fellowship (BEX10043/13-6, CAPES-Brazil).

\*The e-Xtra logo stands for “electronic extra” and indicates that seven supplementary figures and three supplementary tables are published online.

entry of bacteria to the apoplast. In addition, *P. syringae* pv. *tomato* possesses other tools that contribute to pathogenicity, such as flagella and biosurfactants, which facilitate its movement, or exopolysaccharides that prevent desiccation. DC3000 produces several polar flagella (Roine et al. 1997; Vargas et al. 2013) and six lipopeptides with biosurfactant activity, i.e., syringafactins A to F, which are synthesized by a nonribosomal peptide synthetase encoded by two genes, *syfA* and *syfB* (Berti et al. 2007). DC3000 displays different types of motility. Swimming is the predominant movement in liquid or viscous media and requires the presence of flagella, whereas the syringafactin is dispensable. In contrast, both flagella and syringafactin are required for swarming, a rapid and coordinated movement of the bacterial population over solid or semisolid surfaces (Berti et al. 2007; Burch et al. 2010, 2012; Nogales et al. 2015).

In DC3000 the GacS/GacA TCS activates transcription of several small regulatory RNAs and genes encoding alternative sigma factors (Chatterjee et al. 2003; Vargas et al. 2013). Bioinformatic studies revealed that DC3000 possesses seven putative small *rsm* RNAs (*rsmX1* to *rsmX5*, *rsmY*, *rsmZ*), of which *rsmY* and, partially, *rsmZ* have been shown to be controlled by GacA (Chatterjee et al. 2003; Moll et al. 2010; Vargas et al. 2013; Valverde et al. 2003). In addition, four genes encoding CsrA proteins are annotated in its genome (Kulkarni et al. 2006; Lapouge et al. 2008; Moll et al. 2010; Valverde et al. 2003). So far, the GacA has been shown to control carbon metabolism, virulence, motility, production of secondary metabolites, and quorum sensing in DC3000 (Chatterjee et al. 2003; Vargas et al. 2013). Since the components of the Gac-rsm pathway are known but their physiological roles have not been yet established, the aim of this work was to link specific CsrA alleles to phenotypes known to be GacA regulated.

## RESULTS

### CsrA proteins in *Pseudomonas* spp.

Apart from the four genes encoding CsrA proteins that were annotated in the DC3000 chromosome (PSPTO\_1629 [*csrA1*], PSPTO\_1844 [*csrA2*], PSPTO\_3566 [*csrA3*], and PSPTO\_3943 [which we called *csrA4*]), we have found another one, PSPTO\_5621, now named *csrA5*. *csrA2* and *csrA3* (189 bp), *csrA1* and *csrA4* (195 bp), and *csrA5* (225 bp) encode very similar proteins of 62, 64, and 74 amino acids, respectively. The alignment of the five sequences shows that CsrA2 and CsrA3 exhibit the highest percentage of identity at both DNA (64%) and protein (71%) levels (Fig. 1), and they are also present in most *P. syringae* pathovars, in which they are 100% identical. CsrA5 is the most distinct paralog in size and sequence, with an identity below 51% when compared with the rest of CsrA proteins (Fig. 1). Specifically, the amino acids involved in RNA binding (Schubert

et al. 2007) are more conserved in CsrA1, CsrA2, and CsrA3 than in CsrA4 or CsrA5.

Considering the multiple CsrA variants found in DC3000, the question arose as to whether this occurred in other *Pseudomonas* strains. We searched the databases for the different CsrA/RsmA orthologs within the *Pseudomonas* genus and proteins from 250 fully sequenced strains were compared (Supplementary Table S1). Also, a phylogenetic tree, with CsrA proteins from 73 representative *Pseudomonas* strains, using the *E. coli* CsrA as outgroup, allowed the distinction of several CsrA variants (Supplementary Fig. S1). CsrA2/RsmA was the most conserved protein, with high homology to *E. coli* and other  $\gamma$ -proteobacteria CsrAs (Heeb et al. 2006; Vakulskas et al. 2015). CsrA3/RsmE proteins are exclusive of the *P. fluorescens* lineage, in which they are conserved within the groups. CsrA1/RsmI is also present throughout the *P. fluorescens* lineage except in the *P. protegens* group, which only carries CsrA3/RsmE together with CsrA2/RsmA. CsrA4 and CsrA5, only present in the *P. syringae* group, and RsmN/F, specific of *P. aeruginosa* (Marden et al. 2013; Morris et al. 2013), are the most divergent with respect to CsrA2. Moreover, there are several CsrA variants present in particular strains that do not group with any of the aforementioned, due to either their different sizes, varied sequences, or both. These data are summarized in Table 1.

### Effect of *csrA* deletions on DC3000 growth in culture.

In previous transcriptomic experiments, we observed that *csrA2* and *csrA3* mRNA levels were the highest, *csrA5* were measurable but much lower and *csrA1* and *csrA4* mRNAs were undetectable, both in swarming and MMR (mannitol/glutamate minimal medium) liquid culture (Nogales et al. 2015). This, together with the fact that CsrA1, CsrA2, and CsrA3 were the most conserved proteins in *Pseudomonas* spp., prompted us to begin studying  $\Delta csrA1$ ,  $\Delta csrA2$ , and  $\Delta csrA3$  mutants lacking those alleles. First, we assessed the growth of the three mutant strains in Luria-Bertani (LB), MMR, and MMF (minimal medium simulating the plant apoplast composition) at 20 and 28°C, observing that the growth rate of the mutants was similar to that of the wild type in most of the media and temperatures. Only in MMF at 20°C,  $\Delta csrA2$  and, more pronounced,  $\Delta csrA3$  were delayed compared with the wild type, and in *trans* expression of the corresponding alleles complemented growth in those conditions (Supplementary Fig. S2).

### Alginate production and alginate biosynthesis gene expression.

We observed that the  $\Delta csrA3$  mutant was considerably more mucoid than the wild type when it was grown on LB plates at 28°C. Thinking that the mucus could be alginate, we measured its production and observed that, in those conditions,  $\Delta csrA3$

Pf1	CHA0	RsmE	MLILTRKVGESINIGD-DITITILGVSG--QQVRRIGINAPKDVAVHREEIYQRIQAGLTAPDKRETP	
Pae	PAO1	RsmA	MLILTRRVGETLMVGD-DVTVTVLGVKG--NQVRIGVNAPKEVAVHREEIYQRIQEKEDQEPNH	
Eco		CsrA	MLILTRRVGETLMIGD-EVTVTVLGVKG--NQVRIGVNAPKEVSVHREEIYQRIQAEKSSQSSY	
Pto	DC3000	CsrA2	MLILTRRCAESLIIGDGEITVTVLGVKG--NQVRIGVNAPKEVAVHREEIYLRIKKE--KDEEPSH-----	100%
		CsrA3	MLILTRKVGESINIGD-EITVTILGVQG--LQVRLGINAPKNVSVHREEIYKRIQAEIAPNQDPQ-----	64%
		CsrA1	MLVLTRD <sup>IG</sup> IGETFSIGD-DITVQILGVNG--NQVRLGISAPKDIKVHRAEVYKRIANKLSQQAAQTQP-----	64%
		CsrA4	MLCLTRRFGESIIIGN-DIKITVISGRD--GQIRLGIDAPAGLAVDRSEIRTA <sup>KL</sup> LANPRNGSERHVG-----	55%
		CsrA5	MLLLTRREGENIVIGD-GIQIQVLSVSED <sup>TG</sup> VRIQIEAPDVVEA <sup>QGR</sup> TAGNEVTDH-KPGPVITHKRRWRSLVTQ	49%

**Fig. 1.** Multiple sequence alignment of all the CsrA paralogs found in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. The percentage of identity with respect to CsrA2 is shown. RsmE (PFLCHA0\_c21410) from *P. protegens* CHA0, RsmA (PA0905) from *P. aeruginosa* PAO1, and CsrA from *Escherichia coli* (b2696) are also included, with the residues important for RNA binding shown in gray (Gutiérrez et al. 2005; Mercante et al. 2006; Schubert et al. 2007). The nonconserved residues are underlined.

significantly synthesized more alginate than all the other strains (Fig. 2A). DC3000 alginate production is very low compared with other *Pseudomonas* spp., regardless of the culture medium and temperature (Pérez-Mendoza et al. 2014; Prada-Ramírez et al. 2016). In minimal medium at 20°C, the optimal conditions for the wild type, the results were similar;  $\Delta csrA1$  and  $\Delta csrA2$  behaved like the wild type and the  $\Delta csrA3$  mutant overproduced alginate (Supplementary Fig. S3). The exopolysaccharide (EPS) produced by  $\Delta csrA3$  was, in fact, alginate, given that the double *alg8/csrA3* mutant, which lacks a glycosyltransferase involved in alginate biosynthesis (*Alg8*), is unable to produce it and has lost the mucoid aspect.

Consistent with alginate production, relative mRNA levels of *algD* (first gene of the alginate biosynthesis operon) in the  $\Delta csrA3$  mutant was eightfold higher than in the wild type. Overexpression of *csrA3* in the mutant reduced fourfold *algD* mRNA levels compared with the wild type and 28-fold compared with  $\Delta csrA3$  (Fig. 2B), suggesting that CsrA3 is a negative regulator of *algD* gene expression.

### Motility.

Since the Gac-rsm pathway regulates motility in DC3000 (Chatterjee et al. 2003; Vargas et al. 2013) and other *Pseudomonas* spp. (Burrowes et al. 2006; Heurlier et al. 2004; Kay et al. 2006; Martínez-Granero et al. 2012; Navazo et al. 2009), swimming and swarming motility assays were carried out with *gacA* and  $\Delta csrA$  mutants to establish whether the CsrA regulators contributed to that phenotype. The swimming of the three  $\Delta csrA$  mutants was similar to that of the wild type but clearly distinct from the *gacA* mutant (Fig. 3A). However, overexpression of *csrA2* and *csrA3* in their respective mutants slightly reduced this movement, whereas the  $\Delta csrA1$  mutant remained the same (Fig. 3A). Regarding swarming motility, the behavior was different among the  $\Delta csrA$  mutants:  $\Delta csrA1$  was indistinguishable from the wild type, but the surface movement of  $\Delta csrA2$  and  $\Delta csrA3$  was significantly faster than that of the parental strain, with  $\Delta csrA3$  being the best swimmer (Fig. 3B). Conversely, *gacA* cells remained at the site of inoculation. This negative effect of CsrA2 and CsrA3 on motility was confirmed by overexpressing the corresponding alleles in a plasmid, which inhibited swarming at different degrees (Fig. 3B).

Given that the  $\Delta csrA3$  mutant produced significantly more alginate than the other strains, we hypothesized that this EPS could be facilitating  $\Delta csrA3$  swarming. However, the *csrA3/alg8* double mutant spread on PG-agar (0.5% protease peptone No. 3 [Difco] and 0.2% glucose with 0.5% Difco bacto agar) plates similarly to  $\Delta csrA3$  (Supplementary Fig. S4); therefore, the increased alginate production is not responsible for the faster swarming motility exhibited by this mutant. Consequently, we analyzed other features influencing this phenotype, like flagella synthesis and biosurfactant production.

### Flagella synthesis and gene expression.

Flagella are essential for DC3000 swimming and swarming movements (Vargas et al. 2013; Nogales et al. 2015), and the increased motility of the  $\Delta csrA2$  and  $\Delta csrA3$  mutants suggested that those proteins could be functioning as negative regulators of flagellar biogenesis. To verify whether CsrA proteins regulated flagellin production, *fliC* expression was measured, in DC3000, *gacA*, the  $\Delta csrA$  mutants, and the complemented strains, by  $\beta$ -galactosidase assays using a translational fusion. *fliC* expression in the  $\Delta csrA$  and *gacA* mutants were similar to those in the wild type, and gene complementation did not have a significant effect in any of the  $\Delta csrA$  mutants (Fig. 4A). Furthermore,  $\Delta csrA1$ ,  $\Delta csrA2$ , and  $\Delta csrA3$  were indistinguishable from the wild type regarding their flagellar morphology and number, as were the complemented strains (Fig. 4B; Supplementary Fig. S5). Therefore, CsrA1, CsrA2, and CsrA3 do not control flagella production in DC3000, at least under swarming conditions.

Observing the swarmer cells by transmission electron microscopy (TEM), we noticed that those of the  $\Delta csrA3$ -complemented strain were short and coccoid-shaped differently from the wild type and the  $\Delta csrA3$  mutant. This change in morphology was also perceived in fresh samples from the auto-agglutination assays (discussed below), and it is most probably related to the higher growth rate of this strain.

### Syringafactin production and gene expression.

Given that  $\Delta csrA2$  and  $\Delta csrA3$  increased swarming was not due to altered flagella synthesis or assembly, we hypothesized that it could be attributable to an increase in biosurfactant production, as it had been previously demonstrated for a *fleQ* mutant (Nogales et al. 2015). To check this possibility, we assessed syringafactin production, observing that the surfactant halo generated by the  $\Delta csrA3$  mutant was three to four times bigger than that of the wild-type strain or the  $\Delta csrA1$  mutant (Fig. 5A). Also, a *csrA3/syfA* double mutant did not produce syringafactin and was not able to move on PG-agar plates, although its swimming motility was similar to that of the wild type. Therefore, the higher production of syringafactin by the  $\Delta csrA3$  mutant seems to be the cause of its greater swarming motility. The  $\Delta csrA2$  mutant exhibited an intermediate behavior, with a syringafactin halo 1.4- to 1.7-fold bigger than the wild type. Overexpression of *csrA2* and *csrA3* in their respective mutants caused partial and total inhibition of the biosurfactant production, suggesting that CsrA2 and, more efficiently, CsrA3 negatively regulate this process in DC3000. The latter behavior is similar to that observed with the *gacA* mutant, which did not produce syringafactin (Fig. 5A).

To elucidate the mechanisms regulating syringafactin production, *syfA* expression was quantified by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) (Fig. 5B).

**Table 1.** Presence of different CsrA variants in the *Pseudomonas* genus<sup>a</sup>

Lineage	CsrA1	CsrA2	CsrA3	CsrA4	CsrA5	RsmF	Others <sup>b</sup>
<i>P. fluorescens</i> lineage							
<i>P. fluorescens</i> group	78	100	100*				5*
<i>P. syringae</i> group	100	100	100	10	58*		5
<i>P. putida</i> group	97	100	97				26
<i>P. protegens</i> group		100	100				
<i>P. aeruginosa</i> lineage							
<i>P. aeruginosa</i> group		100				96	34
<i>P. oleovorans</i> group		100					14
<i>P. stutzeri</i> group		100					

<sup>a</sup> Frequency (shown as percentages) of the different CsrA variants across the genomes of the fully sequenced *Pseudomonas* spp., according to the classification in lineages and groups established in the genus (Mulet et al. 2010; Ramette et al. 2011). It should be mentioned that the groups include different numbers of strains. Asterisks (\*) indicate that some copies of the gene are present in a plasmid.

<sup>b</sup> Includes several CsrA-like variants that are only present in some members of the group.

*syfA* mRNA levels in  $\Delta csrA1$  were similar to those in the wild type, increased twofold in  $\Delta csrA2$  and fourfold in  $\Delta csrA3$ , and were negligible in the *gacA* mutant. In *trans* gene expression diminished *syfA* mRNA levels eightfold with *csrA3* and to the wild-type levels with *csrA2*. Next, we measured *syfA* expression using a translational fusion to *lacZ* (Fig. 5D), observing that the lack of *csrA2* and *csrA3* caused a significant increase in  $\beta$ -galactosidase activity (three- and fivefold, respectively), with respect to the wild type, but in *trans* gene expression dramatically repressed it (11-fold with *csrA2* and 16-fold with *csrA3*). Expression of *syfA* in the *gacA* mutant was also diminished 50-fold with respect to the wild type, whereas the lack of *csrA1* or its overexpression did not have any effect. In summary, these results are in agreement with that observed in syringafactin production and confirm that CsrA3 and, to a lesser extent CsrA2, are involved in its regulation. However, this negative regulation could be exerted directly on *syfA* or indirectly through SyfR, the LuxR-like transcriptional activator of the *syfABCD* operon (Berti et al. 2007; Nogales et al. 2015). For that reason, we analyzed *syfR* expression by qRT-PCR and  $\beta$ -galactosidase assays, obtaining a similar pattern (Fig. 5C and E). Therefore, CsrA3 and, to a lesser degree, CsrA2 probably inhibit SyfR translation, which in turn prevents activation of the syringafactin biosynthetic pathway.

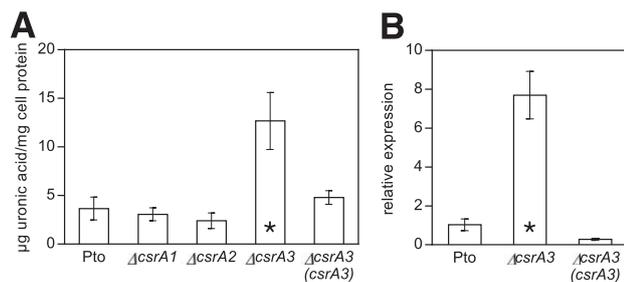
### Virulence.

To study the impact of CsrA1, CsrA2, and CsrA3 on DC3000 virulence, we carried out infection assays in tomato plants, comparing the abilities of the wild type and the mutants to multiply in tomato leaf tissues by monitoring bacterial populations and development of disease symptoms for 10 days after inoculation by spray (Fig. 6A to C). All the mutants entered the tomato leaves and grew in the apoplast, in which their populations reached a maximum at 3 days postinoculation (dpi). However,  $\Delta csrA2$  and  $\Delta csrA3$  behaved differently from the wild type and  $\Delta csrA1$ .  $\Delta csrA2$  initially grew like the wild type but, at 6 dpi, its population had decreased drastically, and  $\Delta csrA3$  did not multiply as the others, so its populations were the lowest throughout the assay (Fig. 6A). The disease symptoms caused by the wild type and all the assayed mutants were similar, small water-soaked lesions that appeared 2 to 3 days after inoculation and soon turned brown, with the surrounding tissue turning yellow (Fig. 6C). The

severity of the symptoms caused by all the  $\Delta csrA$  mutants was quantified as the extension of the necrotic areas, with results similar to that of the wild type (around 6%). These results show that the loss of CsrA1 does not modify plant growth or virulence; however, the loss of CsrA2 and, more significantly, CsrA3 have an effect on internal leaf colonization but not on symptoms. That is, those strains appear to be more virulent than the wild type despite exhibiting a reduced growth rate in plant. To verify this, the complemented  $\Delta csrA3$  mutant was assayed, observing that the growth in the plant was restored, whereas the symptoms were milder and only small halos of chlorosis without necrosis were distinguished (Fig. 6B and C). Hence, CsrA1, CsrA2, and CsrA3 do not seem to be required for DC3000 pathogenicity under the tested conditions. On the contrary, CsrA3 may be limiting the expression of some virulence factors.

It was previously observed that DC3000 elicited a hypersensitive response (HR) in tobacco (*Nicotiana tabacum*) whereas the *gacA* mutant failed (Chatterjee et al. 2003). Here, we show that the same occurs in bean (*Phaseolus vulgaris* cv. Canadian Wonder): *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 elicited typical HR when infiltrated with  $10^7$  CFU per milliliter, but the HR symptoms caused by the *gacA* mutant were significantly reduced (Fig. 6D). Other mutants, such as *corS*, which does not synthesize coronatine, *hrpL*, which neither produces a type 3 secretion system (T3SS) nor coronatine, or  $\Delta hrcQ_b-U$ , which lacks a functional T3SS but it is able to produce coronatine, were assayed to check their abilities to elicit HR (Fig. 6D). Only the mutants lacking the T3SS (*hrpL* and  $\Delta hrcQ_b-U$ ) did not elicit HR, even when they were able to produce coronatine ( $\Delta hrcQ_b-U$ ). On the contrary, a mutant unable to produce coronatine but with a functional T3SS (*corS*) caused a HR like the wild type. This agrees with an earlier proposal that the requirement for HR elicitation is a functional T3SS (Collmer et al. 2000). To determine whether the phenotype observed with the *gacA* mutant was mediated by the CsrA proteins, we analyzed the lesions caused by the  $\Delta csrA2$  and  $\Delta csrA3$  mutants and their complemented strains in bean leaves.  $\Delta csrA2$ , its complemented strain and  $\Delta csrA3$  caused a HR indistinguishable to that of the wild type. However, HR caused by  $\Delta csrA3$  harboring pBBR1-MCS5::*csrA3* was noticeably reduced (Fig. 6D).

Everything considered, the  $\Delta csrA3$  mutant is impaired in apoplast colonization but not on virulence or HR elicitation. On the contrary, growth in planta was recovered in the complemented strain, but virulence and HR symptoms were significantly reduced. Consequently, CsrA3 may be inhibiting either T3SS expression, effector export to the plant cells, or both, both in compatible and incompatible infections. Consistent with this, relative mRNA levels of *hrpL* and *hrpA* in the  $\Delta csrA3$  mutant under inducing conditions were 3.6 and 2.5 times higher, respectively, than in the wild type, whereas overexpression of *csrA3* in the mutant reduced them 1.4- and 3.0-fold (Fig. 6E). However, in the  $\Delta csrA2$  mutant, *hrpL* and *hrpA* levels were 1.4- and 1.9-fold higher than in the wild type and overexpression of *csrA2* reduced them 2.2-fold (Supplementary Fig. S6). The expression and assembly of a functional T3SS apparatus in MMF cause auto-agglutination in *P. syringae* (Ortiz-Martín et al. 2010; Taira et al. 1999). We observed large bacterial aggregates with the wild-type strain that were absent in the  $\Delta hrcQ_b-U$  preparations (Fig. 6F). The *csrA3* mutant produced more numerous aggregates, significantly larger in size and more solid than those of the wild type, whereas those of the complemented strain were smaller and less dense (Fig. 6F). Consistent with *hrpL* and *hrpA* expression, the effect of CsrA2 on auto-agglutination was subtler. In conclusion, all these results suggest that CsrA3 has a major role repressing the expression and assembly of a functional T3SS in DC3000.

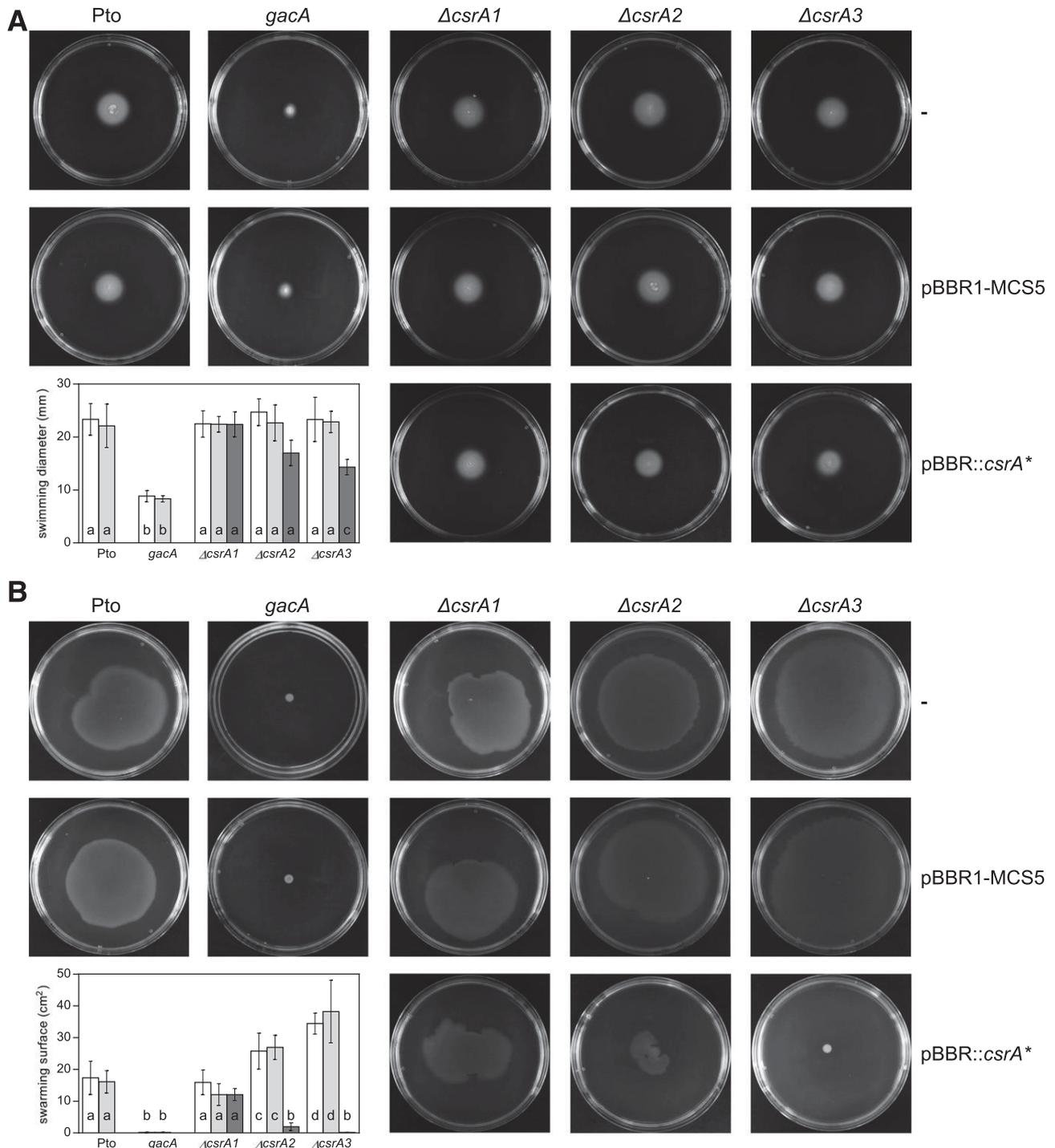


**Fig. 2.** CsrA3 inhibits alginate production in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. **A**, DC3000,  $\Delta csrA1$ ,  $\Delta csrA2$ , and  $\Delta csrA3$  were grown on Luria-Bertani (LB) plates for 2 days at 28°C, and the uronic acids produced by the different strains were measured. The complemented  $\Delta csrA3$  strain is also shown for comparison. Values are the means of four independent replicates and error bars correspond to the standard deviation. **B**, Expression analysis of *algD* in DC3000 and the  $\Delta csrA3$  mutant by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. Total RNAs were obtained from bacteria grown in LB plates at 28°C for 2 days. Expression values were normalized with the housekeeping gene *gyrA* and referred to the wild-type condition. The graph shows the average mRNA levels, and error bars correspond to the standard deviation of three biological replicates. An asterisk (\*) indicates that only the difference between  $\Delta csrA3$  and the rest of the strains were significant, as determined by one-way analysis of variance ( $P < 0.01$ ).

## DISCUSSION

To characterize the Gac-rsm system in *P. syringae* pv. *tomato* DC3000, we first identified the genes encoding its components. Seven *rsm* regulatory RNAs had been previously reported: *rsmX1* to *rsmX5*, *rsmY*, and *rsmZ* (Chatterjee et al. 2003; Moll

et al. 2010; Valverde et al. 2003; Vargas et al. 2013). This is an exceptionally high number, only surpassed by *Azotobacter vinelandii*, which has eight (Hernández-Eligio et al. 2012; Manzo et al. 2011). Bacteria with *csrA* usually have between two and three paralogs (Kay et al. 2005, 2006; Lenz et al. 2005). Regarding the CsrA type proteins, in addition to the



**Fig. 3.** CsrA2 and CsrA3 inhibit motility in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. **A**, Swimming assays. The indicated strains were punctured in the center of Luria-Bertani (0.3% agar) plates and were incubated 48 h at 20°C, when pictures were taken and swimming halos were measured. The graph shows the average diameter of the halos produced by strains without plasmid (white), with pBBR1-MCS5 (light gray), and complemented with *csrA1*, *csrA2*, or *csrA3* cloned into pBBR1-MCS5 (dark gray). Error bars correspond to the standard deviation of three biological replicates; letters a to c denote analysis of variance (ANOVA) categories with significant differences ( $P < 0.01$ ). **B**, Swarming assays. Bacterial suspensions of the indicated strains were deposited on the surface of peptone-glucose agar (0.5% agar) plates and were incubated 24 h at 20°C. The graph shows the average swarming surface and error bars correspond to the standard deviation of three biological replicates; letters a to d denote ANOVA categories with significant differences ( $P < 0.01$ ).

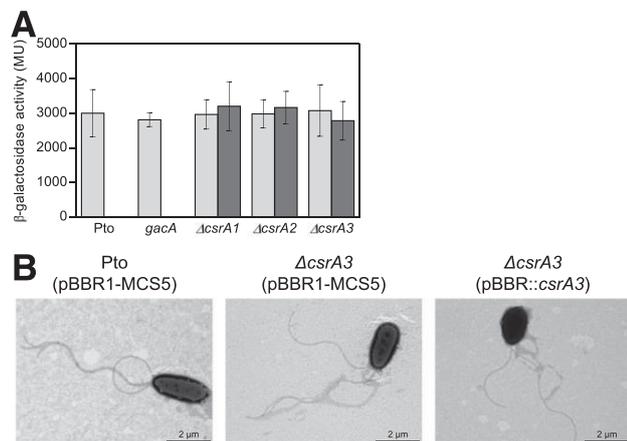
four genes that were annotated in the DC3000 genome, we have identified a fifth one, PSPTO\_5621 (Kulkarni et al. 2006; Lapouge et al. 2008; Moll et al. 2010; Valverde et al. 2003). When we compared DC3000 CsrA1 to CsrA5 with the orthologs present in the 250 fully sequenced *Pseudomonas* strains, we observed that CsrA3 orthologs are present in plant-associated and environmental bacteria belonging to the *P. fluorescens* lineage (Table 1). CsrA1-like proteins are present in the *P. fluorescens* lineage, except in the *P. protegens* group, but their sequences are substantially more diverse than those of CsrA2 or CsrA3. CsrA4 and CsrA5 only appear in the *P. syringae* group (taxid: 136849). CsrA2/RsmA is the most similar to *E. coli* and other  $\gamma$ -proteobacteria CsrA (Heeb et al. 2006; Vakulskas et al. 2015), and therefore, we propose it as the ancestral protein from which the other CsrA variants derived. In any case, the analysis of the multiple *Pseudomonas* CsrA/RsmA proteins demonstrates once again their exceptionally broad gene pool and genome plasticity (Rumbaugh 2014).

To start with the study of the complex Gac-rsm system in DC3000, we examined the physiological consequences of deleting the three most conserved CsrA proteins in *Pseudomonas* spp., namely, CsrA1, CsrA2, and CsrA3. Regarding alginate production in DC3000, the results presented here, together with the presence of a putative CsrA binding site (AGGA [Supplementary Fig. S7]) within the *algD* SD region (Kulkarni et al. 2006, 2014), strongly suggest that the Gac-Rsm system post-transcriptionally regulates *algD* via CsrA3. In *Azotobacter vinelandii* as well as various *Pseudomonas* species, disruption of the GacS/GacA TCS also leads to reduction in alginate production or *algD* expression (Lalaouna et al. 2012; Liao et al. 1994; Manzo et al. 2011; Willis et al. 2001). On the contrary, *algD* and *alg8* were upregulated in a *P. aeruginosa* *rsmA* mutant (Burrowes et al. 2006). Furthermore, RsmA binds to the 5' leader of the *algD* mRNA and represses translation in *A. vinelandii* (Manzo et al. 2011). Similarly, DC3000 CsrA3 probably binds to the *algD* mRNA, acting as

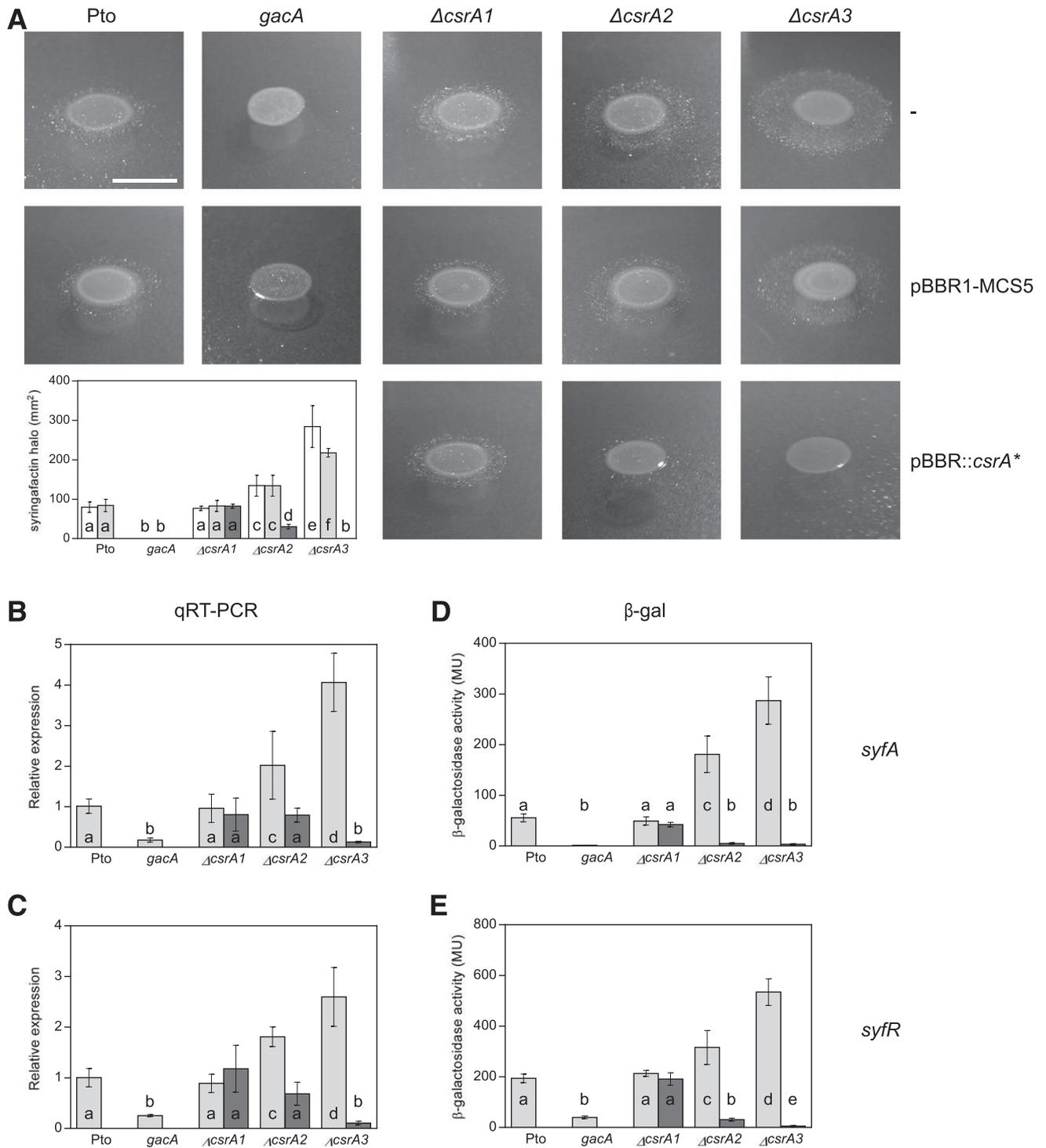
a translational repressor, and one or several of the *rsmX1* to *rsmX5*, *rsmY*, and *rsmZ* RNAs, whose transcription is activated by GacA, bind CsrA3, counteracting its repressor activity (Chatterjee et al. 2003; Moll et al. 2010; Valverde et al. 2003; Vargas et al. 2013). Nevertheless, it cannot be ruled out that one or more other genes involved in alginate production may also be molecular targets of CsrA3.

Motility is another trait controlled by the Gac-rsm system in various *Pseudomonas* strains, sometimes acting as an inhibitor and sometimes as an activator. A *P. aeruginosa* *gacA* mutant exhibits faster swarming motility and increased FliC (flagellin) and FliD (the filament capping protein) production (Kay et al. 2006). Similarly, the *P. fluorescens* F113 *gacS* and *gacA* mutants present bigger swimming halos than the wild type (Martínez-Granero et al. 2012; Navazo et al. 2009). However, DC3000 and other *P. syringae* *gacA* and *gacS* mutants were severely impaired in swimming and swarming (Chatterjee et al. 2003; Kinscherf and Willis 1999; 2002; Vargas et al. 2013). We have shown that CsrA3 and CsrA2 negatively regulate swarming motility in DC3000, similarly to RsmA in *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis*, or *Pectobacterium wasabiae*. In all those cases, the knock-out mutants were faster swimmers, whereas *csrA/rsmA* overexpression inhibited swarming (Ang et al. 2001; Kõiv et al. 2013; Liaw et al. 2003). Curiously, this effect is contrary to that observed in *P. aeruginosa* PAO1, whose *rsmA* mutant showed reduced swarming and swimming motility (Burrowes et al. 2006; Heurlier et al. 2004), *P. fluorescens* F113, in which overexpression of either *rsmA* or *rsmE* resulted in enhanced swimming motility (Martínez-Granero et al. 2012), or *P. putida* KT2440, whose mutants lacking one or several of its three RsmA proteins exhibited reduced swimming and swarming (Huertas-Rosales et al. 2016). Also, overexpression of the *P. aeruginosa* *rsmA* gene in different *P. syringae* strains inhibited swarming motility (Kong et al. 2012). Thus, although the components of the Gac-rsm pathway present in phylogenetically related bacteria and the phenotypes controlled are the same, the result of this regulation may be opposite. Therefore, identifying the target mRNAs bound by the CsrA proteins and their mode of action (repression or activation) is essential to establish the outcome of regulation.

First, we verified that the lack of flagellar functionality was not responsible for the *csrA2*- and *csrA3*-overexpressing strains swarming phenotype by performing swimming motility assays. The mutants had functional flagella in those conditions and only the overexpression of *csrA3* slightly diminished swimming (Fig. 3A). We also studied flagella production and flagellin expression under swarming conditions, observing that they were similar to the wild type (Fig. 4A to C). This agrees with the observation that CsrA3 and CsrA2 negative regulation of swarming motility takes place on *syfR* and *syfABC* expression and syringafactin production. The mutants rapidly swarmed across the plates and produced elevated amounts of syringafactin. Accordingly, *syfR* and *syfA* expression in  $\Delta csrA3$  and  $\Delta csrA2$  was higher than in the wild type, whereas *csrA3* and *csrA2* overexpression provoked the opposite effect. Thus, we have determined that *fliC* is not under CsrA3 and CsrA2 control in DC3000 (at least under swarming conditions), but the production of the biosurfactant syringafactin is. It is important to highlight that syringafactin is strictly required for DC3000 swarming motility (Berti et al. 2007; Burch et al. 2010; Nogales et al. 2015). Therefore, CsrA3 has a major role in the switch to a swarming phenotype in DC3000, CsrA2 also intervenes but less effectively, and CsrA1 does not participate at all. This is the first time that syringafactin production has been shown to be controlled by the CsrA proteins in DC3000, although Gac-rsm regulation of syringafactin was first described in *P. syringae* pv.



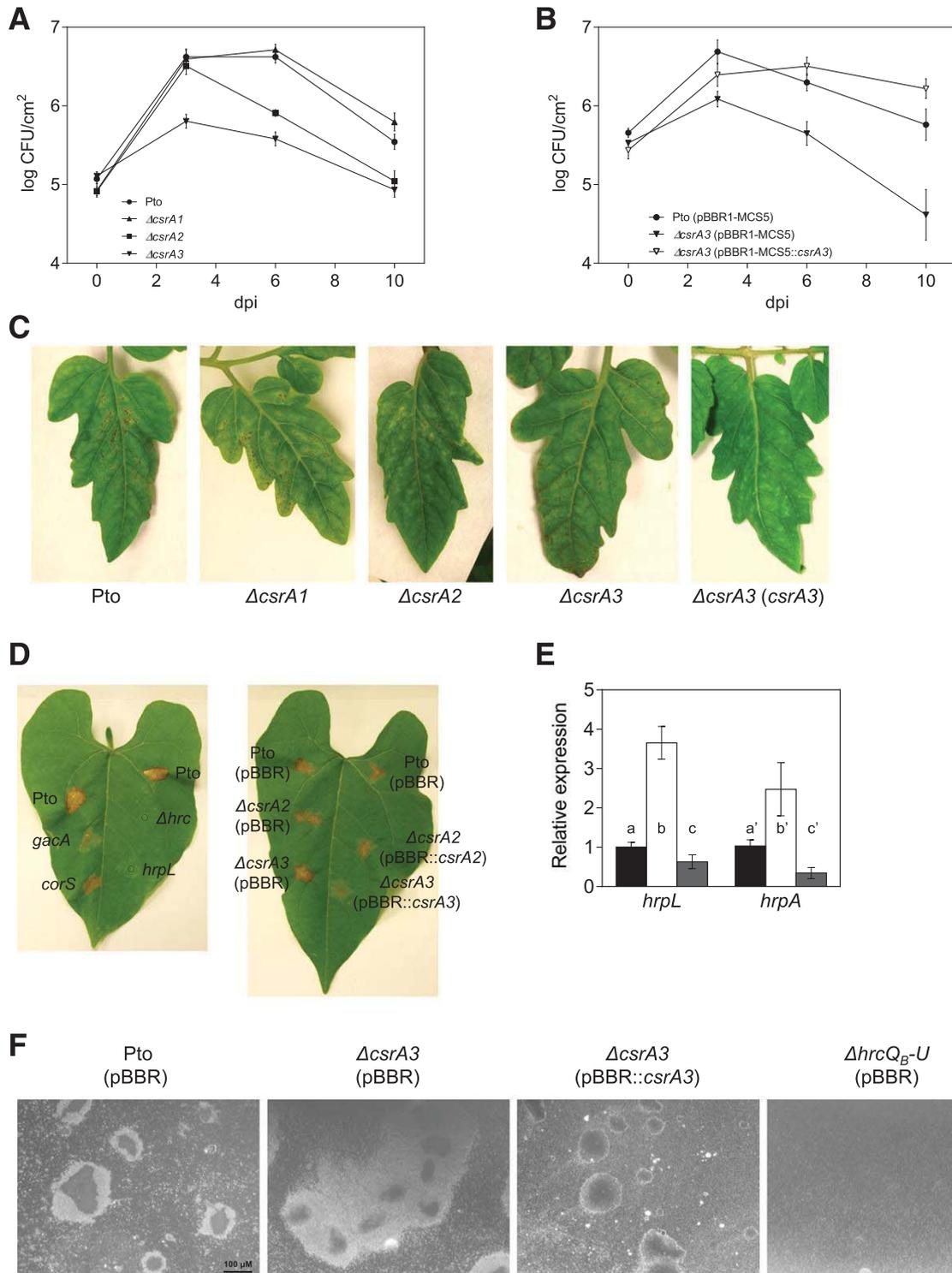
**Fig. 4.** CsrA2 and CsrA3 do not inhibit flagella synthesis in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. **A**, Expression analysis of *fliC* in DC3000 and mutants determined by  $\beta$ -galactosidase assays. Activity from a translational fusion of the *fliC* promoter to  $\text{'lacZ}$  was measured in cell extracts from the indicated strains grown in polyacrylamide gel (0.5% agar) plates for 24 h at 20°C (swarmer cells). The graph shows the average activity of strains with pBBR1-MCS5 (light gray) and complemented with pBBR1-MCS5::*csrA1*, *csrA2*, or *csrA3* (dark gray). Error bars correspond to the standard deviation of at least three biological replicates. **B**, Visualization of flagellar abundance in swarmer cells. Representative transmission electron microscopy photographs of swarmer cells negatively stained are shown. No significant differences were evident in the number of flagella per cell or their morphology.



**Fig. 5.** CsrA2 and CsrA3 inhibit syringafactin expression and production in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. **A**, Comparison of surfactant-induced halos around bacterial colonies. The indicated strains were grown on Luria-Bertani (1% agar) for 24 h at 20°C and were visualized by the atomized oil assay. The biosurfactant areas of strains without plasmid (white), with pBBR1-MCS5 (light gray), and complemented with *csrA1*, *csrA2*, or *csrA3* cloned into pBBR1-MCS5 (dark gray) were calculated and the means and standard deviations of three experiments with four replicates were plotted, with lower case letters a to f denoting analysis of variance (ANOVA) categories with significant differences ( $P < 0.01$ ). The white scale bar represents 1 cm. **B** and **C**, Expression analysis of *syfA* and *syfR* in DC3000 and mutants determined by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. Total RNAs were obtained from swarming bacteria grown on polyacrylamide gel (PAG) plates at 20°C for 24 h. Expression values were normalized with the housekeeping gene *gyrA* and referred to the wild-type condition. The graph shows the average mRNA levels, and error bars correspond to the standard deviation of three biological replicates. Lower case letters a to d denote ANOVA categories with significant differences ( $P < 0.01$ ). **D** and **E**, Expression analysis of *syfA* and *syfR* in DC3000 and mutants determined by  $\beta$ -galactosidase assays. Activity from the translational fusions of the *syfA* or *syfR* promoters to *lacZ* was determined in the indicated strains recovered from swarming plates. The measurements were carried out in cell extracts obtained from bacteria grown on PAG (0.5% agar) plates for 24 h at 20°C (swarmer cells). The graph shows the average activity, and error bars correspond to the standard deviation of three biological replicates. Lower case letters a to e denote ANOVA categories with significant differences ( $P < 0.01$ ).

*syringae* B728a (Hockett et al. 2013). Also, lipopeptide production in *P. entomophila* and *P. fluorescens* SS101 was shown to be regulated by the Gac-rsm system (Song et al. 2014; Vallet-Gely et al. 2010). Specifically, RsmA1 and RsmA2 (the CsrA2 and CsrA3 homologs, respectively) from *P. entomophila* are involved in the control of entolysin production (Vallet-Gely et al. 2010) and RsmA and RsmE (CsrA2 and CsrA3 orthologs, respectively) but not CsrA (CsrA1-like), are involved in Gac-rsm regulation of massetolide biosynthesis in *P. fluorescens* SS101 (Song et al. 2014).

Analysis of the *syfA* putative 5' leader revealed the presence of two consensus binding sites for CsrA proteins, i.e., GGA and AGGA, the latter within the SD region (Supplementary Fig. S7). Interestingly, several CsrA consensus binding sites were also found upstream of the *syfR* gene: one GGA and two AGGA motifs, one overlapping the SD and the other overlapping the first ATG. This situation is similar to that of *P. fluorescens* SS101, in which GacS controls massetolide A gene expression through a LuxR-like regulator (Song et al. 2014). Therefore, we propose that the Gac-rsm system exerts a double control on the



syringafactin biosynthesis genes in DC3000, directly through CsrA2 and CsrA3 binding to the *syfABCD* transcript and indirectly through *syfR*.

Regarding virulence, the ability of  $\Delta csrA3$  to colonize the host was severely reduced, although the symptoms were similar to those provoked by the wild type. Therefore, CsrA3 is important for endophytic colonization and disease phenotypes, since it stimulates growth in plants and limits symptom development. A similar behavior (decrease in growth rate and increased virulence) was observed in *Pectobacterium wasabiae* after disrupting its *rsmA2* gene (Köiv et al. 2013). The *rsmA2* mutant also exhibited a higher propensity to swarm and produce plant cell wall-degrading enzymes as the wild type, but, despite its efficient tissue maceration, *rsmA2* populations within the host were reduced. Our current model is that, in the absence of CsrA3, DC3000 acquires a hypervirulent phenotype characterized by enhanced swarming as well as elevated T3SS expression and effector export to the plant cells. However, the lack of control over these costly energetic processes, which involve multiple components and regulatory pathways, may result in decreased growth rate and fitness. On the contrary, the strain overexpressing *csrA3* was capable of growth in the apoplast but lacked disease symptoms. This is consistent with the previously observed behavior of a *P. syringae* pv. *syringae* *lemA* (*gacS*) mutant, which was not altered in its ability to colonize bean leaves but lost the ability to cause a pathogenic response (Willis et al. 1990). The authors suggested that lesion formation was not dependent on in planta growth. Here, we have found that the linkage of growth and symptom development seems to be under the control of CsrA3. We propose that CsrA3 functions as a pivotal regulator of the DC3000 life cycle, repressing virulence traits and coordinately promoting cell division under noninducing conditions (i.e., in laboratory media and, likely, at late stages of host infection). When DC3000 senses the plant, the activated GacS/A TCS relieves CsrA repression of swarming and T3SS, among others, inducing the infective phenotype. Further work is needed to discover new traits selectively regulated by this protein and to elucidate how growth and symptom development can be unlinked.

Overall, the GacS/GacA TCS functions in conjunction with CsrA posttranscriptional regulators to allow DC3000 to sense and adapt to changes in the environment. We have shown that CsrA1, CsrA2, and CsrA3 RNA-binding regulatory proteins exert nonredundant functions and demonstrate that the loss of CsrA2 and, mainly, CsrA3 alter the expression of a variety of systems important for motility, EPS synthesis, growth, and virulence. Particularly, alginate synthesis, syringafactin production, and virulence are considerably de-repressed, whereas

growth in planta is impaired. The phenotypic assays together with sequence analysis have allowed us to propose a series of target genes for the CsrA proteins. This provides the basis for future protein-RNA interaction assays that will allow a better understanding of the roles and modes of action of the different paralogs in DC3000.

## MATERIALS AND METHODS

### Bacterial strains, plasmids, and culture media.

The bacterial strains used are listed in Supplementary Table S2. *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 strains were routinely grown in LB medium (Sambrook et al. 1989) at 28°C or in MMR (7 mM Na-glutamate, 55 mM mannitol, 1.31 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.61 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.34 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.022 mM FeCl<sub>3</sub>, 0.85 mM NaCl) minimal medium (Robertsen et al. 1981) at 20°C. The T3SS-inducing minimal medium MMF [50 mM K-phosphate buffer, pH 5.7, 7.6 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1.7 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.7 mM NaCl, and 10 mM fructose] was used for certain experiments (Huynh et al. 1989). *P. syringae* pv. *tomato* cells were grown at 25°C in LB to an optical density at 660 nm (OD<sub>660</sub>) of 0.5, were washed, and were incubated in the T3SS-inducing MMF medium for 24 h at 20°C. When required, antibiotics were added to the cultures or plates: gentamicin (5 µg/ml), kanamycin (Km) (50 µg/ml), rifampicin (10 µg/ml), streptomycin (Sm) (25 µg/ml), and tetracycline (10 µg/ml).

We constructed plasmids bearing the *csrA1*, *csrA2*, and *csrA3* genes for in *trans* complementation. A fragment including each *csrA* gene was amplified, by PCR, from *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 chromosomal DNA, using specific oligonucleotides (Supplementary Table S3). Those DNAs were ligated into pGEM-T (Promega), were sequenced, and were cloned into pBBR1-MCS5 (Kovach et al. 1995) after digestion with *EcoRI* under the control of the plasmid *lac* promoter.

The plasmids carrying *fliC*, *syfA*, and *syfR* translational fusions to '*lacZ*' were constructed by cloning promoter fragments generated by PCR. Those PCR fragments were ligated into pGEM-T, were sequenced, and were then cloned into pME6015 after digestion with the appropriate restriction enzymes. The 593-pb *fliC* promoter fragment includes 270 nt encoding the first 90 aa of FliC, the 371-pb *syfA* promoter fragment contains 81 nt encoding the first 27 aa of SyfA, and the 399-pb *syfR* promoter fragment comprises 99 nt encoding the first 33 aa of SyfR.

Plasmid pQN8 is a pGEM-T derivative that carries a 1,380-bp fragment, generated by PCR, harboring part of the *alg8* and *algD* genes. Upon digestion with *BglII*, a unique site in *alg8*, the plasmid was ligated to a 2.056-kb  $\Omega$ Sm/Sp interposon from

←

**Fig. 6.** Bacterial growth and symptom development on tomato leaves. **A**, Time course of growth of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 and  $\Delta csrA3$  mutants in the primary leaves of tomato plants. CFU were quantified at 0, 3, 6, and 10 days postinoculation (dpi) with approximately 10<sup>8</sup> CFU/ml by spray. Data represent the average of four experiments with their standard error. At 3 dpi, only populations of the  $\Delta csrA3$  mutant were significantly different from the rest. At 6 and 10 dpi, wild-type and  $\Delta csrA1$  populations were significantly different from those of the  $\Delta csrA3$  and the  $\Delta csrA2$  mutants, as determined by one-way analysis of variance (ANOVA) ( $P < 0.01$ ). **B**, Time course of growth of DC3000 (pBBR1-MCS5),  $\Delta csrA3$  (pBBR1-MCS5), and  $\Delta csrA3$  (pBBR1-MCS5::*csrA3*) in the primary leaves of tomato plants after inoculation by spray. Data represent the average of three experiments with their standard error. The overexpression of *csrA3* in the mutant allowed similar growth to the wild type, as determined by one-way ANOVA ( $P < 0.01$ ). **C**, Development of symptoms induced on tomato leaves 10 days after inoculation with DC3000 and different mutants at 10<sup>8</sup> CFU/ml by spray. The severity of symptoms induced by  $\Delta csrA3$  (pBBR1-MCS5::*csrA3*) was significantly lower than the others. **D**, Hypersensitive response (HR) in bean when inoculated with different DC3000 mutants. Symptoms induced on bean leaves 8 dpi with DC3000 and different mutants at 10<sup>7</sup> CFU/ml. Only *hrpL* and  $\Delta hrcQb-U$  were unable to elicit HR at all, whereas symptoms caused by *gacA* and  $\Delta csrA3$  (pBBR1-MCS5::*csrA3*) were significantly reduced. **E**, Expression analysis of *hrpL* and *hrpA* in DC3000 (pBBR1-MCS5) (black bars),  $\Delta csrA3$  (pBBR1-MCS5) (white bars), and  $\Delta csrA3$  (pBBR1-MCS5::*csrA3*) (gray bars) determined by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. Total RNAs were obtained from cultures grown for 24 h in MMF [50 mM K-phosphate buffer, pH 5.7, 7.6 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1.7 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.7 mM NaCl, and 10 mM fructose]. Expression values were normalized with the housekeeping gene *gyrA* and referred to the wild-type condition. The graph shows the average mRNA levels and error bars correspond to the standard deviation of three biological replicates. Lower case letters a to c and a' to c' denote ANOVA categories with significant differences ( $P < 0.01$ ). **F**, Auto-agglutination assays. Agglutinates micrographs of the indicated strains after 24 h of incubation in MMF medium. Scale bar represents 100 µm.

pHP45ΩSm/Sp (Fellay et al. 1987) to yield pQN8ΩSm, which was used for in vivo gene replacement.

### Construction of directed mutants.

We constructed  $\Delta csrA^*$  directed mutants by deleting most of their open reading frames (ORFs). First, a region with *csrA2* or *csrA3* adjacent sequences but lacking their ORFs were amplified by PCR with specific oligonucleotides and were cloned into pK18*mobsacB*, which does not replicate in *P. syringae*. The Km<sup>R</sup> sucrose-sensitive plasmids were then electroporated into DC3000. Electro-competent cells (Choi et al. 2006) were mixed with DNA (0.3 to 0.5 µg of DNA per milliliter of cell suspension), were transferred to 0.1-cm cuvettes, and were submitted to a 1.800 V pulse for 5 ms, by using an Eppendorf electroporator 2510. Transformants were selected in Km (50 µg/ml), were screened for sucrose sensitivity (15% [wt/vol]), and were then grown in LB to force plasmid loss. Cells were then plated on LB with sucrose (15% [wt/vol]) and the sucrose-resistant and Km<sup>S</sup> colonies, which were expected to be double-recombinants, were selected and were checked by PCR or sequencing.

The *alg8* null mutant was constructed by gene replacement. The ampicillin-resistant (Ap<sup>R</sup>)Sm<sup>R</sup> pQN8ΩSm suicide plasmid was electroporated into DC3000 and transformants that acquired the inactivated gene (Sm<sup>R</sup>) were selected and were screened for Ap sensitivity (100 µg/ml). Two Sm<sup>R</sup>/Ap<sup>S</sup> clones were chosen and were confirmed by Southern blot to have the wild-type gene replaced by *alg8::ΩSm*. The double mutants *alg8/csrA3* and *syfA/csrA3* were constructed as the  $\Delta csrA3$  single mutant, but the pK18*mobsacB::ΔcsrA3* plasmid was electroporated into the *alg8* or  $\Delta syfA$  mutants.

### Alginate quantification.

Three-day plate cultures of DC3000 or mutants on MMR medium at 20°C (or on LB at 28°C) were used for alginate extraction and quantification by the carbazole method, described previously (May and Chakrabarty 1994). Briefly, cells were washed from each plate, were resuspended in 0.9% NaCl, and were then centrifuged for 30 min at 3,300 × *g*. To precipitate alginate, the supernatant was combined with three volumes of 95% ethanol, were incubated 16 h at -20°C, were centrifuged for 30 min at 38,500 × *g*, and the dried pellet was resuspended in milliQ H<sub>2</sub>O. Alginate solution (140 µl) was mixed with 1,200 µl of borate-sulfuric acid (the borate stock solution [24.74 g of H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> in 45 ml of 4 M KOH that was diluted in 100 ml of distilled water] was diluted 1:4 in concentrated sulfuric acid) and 40 µl of the 0.1% (wt/vol in absolute ethanol) carbazole. In order to develop the color reaction, the mixture was heated at 55°C for 30 min. Finally, the OD was measured at 530 nm. Alginic acid from seaweed (*Macrocystis pyrifera*; Sigma) was used as a standard in these experiments. Alginate levels of each strain were standardized by total protein of the initial sample determined by Bradford assay (Bio-Rad protein assay kit) and were expressed in micrograms of uronic acids to milligrams of total cell protein. Each experiment was repeated at least three times.

### RNA preparation and assays.

Cells were harvested from swarming plates incubated at 20°C for 24 h, LB plates incubated at 28°C for 2 days, or MMF auto-agglutination cultures, were pelleted, were frozen in liquid nitrogen, and were processed for RNA isolation using TRI ReagentLS (Molecular Research Center), as described before (Vargas et al. 2013). For qRT-PCR, we proceeded as previously described (Nogales et al. 2015; Vargas et al. 2013), and expression values were normalized with the housekeeping gene *gyrA* and referred to the wild-type condition.

### Motility experiments.

For swimming assays, DC3000 and mutants were grown on LB plates for 48 h and were resuspended in 10 mM MgCl<sub>2</sub>. The bacterial suspension (2 µl) (OD<sub>660</sub> = 2.0) were stabbed into LB plates (0.3% agar) and were incubated at 20°C for 48 h, when the swimming halo diameters were measured. For swarming assays, the 2-µl aliquots were dropped in the center of PG-agar plates, were incubated at 20°C, and were observed after 24 h. Negative staining of swarmer cells to visualize flagella by TEM was performed, as described previously (Nogales et al. 2015). Three motility plates were used for each strain, and the experiment was repeated with three independent cultures.

### Detection of syringafactin.

Syringafactin was detected with the atomized oil assay previously described (Burch et al. 2010). DC3000 and mutants were grown on LB plates for 48 h and were resuspended in sterile milliQ water. Aliquots (10 µl) (OD<sub>660</sub>=1.0) were pipetted onto the surface of LB plates, were incubated 24 h at 20°C, and were then sprayed with a mist of mineral oil. The diameter of the visible halo of brighter oil drops was measured and the area of the producing bacterial colony was calculated and was subtracted from that of the surfactant halo, to yield the adjusted halo area.

### β-galactosidase assays.

Bacterial cells from swarming plates were resuspended in milliQ water and were adjusted to an OD<sub>660</sub> of 0.5. β-galactosidase activity was determined in triplicate in permeabilized cells (Miller 1972).

### Infection assays.

Seeds of *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker (a *P. syringae* pv. *tomato* S line, i.e., a compatible host for DC3000) were germinated and were grown, with 16-h light and 8-h dark cycles, 24°C day and 16°C night temperatures, and 70% relative humidity, in a plant growth chamber. DC3000 strains grown on LB plates for 48 h at 28°C were suspended in 10 mM MgCl<sub>2</sub>, the concentration was adjusted to 10<sup>8</sup> CFU/ml, and the strains were applied to one leaf of three different plants with an airbrush until the leaf (adaxial and abaxial) surface was uniformly wet. The analysis of symptom development and sampling were performed 3 h after inoculation (time 0), when the leaves were dried, and several days after inoculation (3, 6, and 10 dpi) to monitor bacterial growth in planta. Bacteria were recovered from the infected leaves using a 10-mm diameter cork-borer, sampling 20 disks per plant. Five disks (3.9 cm<sup>2</sup>) were homogenized by mechanical disruption into 1 ml of 10 mM MgCl<sub>2</sub> and were counted by plating serial dilutions onto LB plates with the corresponding antibiotics. The severity of symptoms was evaluated as the percentage of necrotic area per leaflet induced by the inoculated strains at 10 dpi. The necrotic areas were digitally measured, using ImageJ (Abramoff et al. 2004), on five inoculated leaflets of at least three different plants.

### HR assays.

Seeds of *Phaseolus vulgaris* cv. Canadian Wonder were germinated and grown in pots, with 16-h light and 8-h dark cycles, at 24°C day and 16°C night temperatures, and 70% relative humidity, in a plant growth chamber. DC3000 strains were suspended in 10 mM MgCl<sub>2</sub> (10<sup>7</sup> CFU/ml) and were infiltrated on a small area of the abaxial leaf surface using a blunt syringe. The symptoms were visualized every day until 8 dpi. The experiments were performed two times with five replicates each.

### Auto-agglutination assays.

Bacterial strains were grown on LB plates for 48 h and were resuspended in milliQ water. Inoculums (OD<sub>660</sub> = 0.05) were incubated in LB 12 h, at 25°C, to reach an OD<sub>660</sub> = 0.5. Then, the cultures were washed twice and were adjusted to OD<sub>660</sub> = 0.5 in MMF medium and were incubated at 20°C and 90 rpm. After 24 h, two samples of each strain were taken, were wet-mounted, and were observed under a Zeiss Axioskope microscope. All experiments were performed at least three times.

### Statistical analysis.

Statistical comparison among different strains or conditions was performed by one-way analysis of variance with posthoc Tukey highly significant differences test using R.

### Sequence comparison of CsrA proteins.

The sequences were aligned using ClustalW. The dendrogram was generated by the neighbor-joining method and was rooted with the *E. coli* CsrA (b2696) sequence. These analyses were conducted with MEGA7 (Kumar et al. 2016).

### ACKNOWLEDGMENTS

We thank A. Felipe and S. Muñoz for their technical assistance. We also thank C. Waite for the *csrA1*, A. Chatterjee for the *gacA*, M. Ullrich for the *corS*, and E. López-Solanilla for the *hrcQ<sub>U</sub>* mutants. This research was supported by grant BIO2014-55075-P from the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness cofinanced by European Regional Development Fund. M.-D. Ferreiro was supported by a FPU contract from the Spanish MEC (FPU14/02120) and G. A. Farias by a Ciência sem Fronteiras fellowship (BEX10043/13-6, CAPES-Brazil). PAIDI group BIO-180 belongs to the Agrifood Campus of International Excellence ceiA3.

### LITERATURE CITED

- Abramoff, M. D., Magalhães, P. J., and Ram, S. J. 2004. Image processing with ImageJ. *Biophoton. Int.* 11:36-42.
- Ang, S., Horng, Y. T., Shu, J. C., Soo, P. C., Liu, J. H., Yi, W. C., Lai, H. C., Luh, K. T., Ho, S. W., and Swift, S. 2001. The role of RsmA in the regulation of swarming motility in *Serratia marcescens*. *J. Biomed. Sci.* 8:160-169.
- Berti, A. D., Greve, N. J., Christensen, Q. H., and 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.
- 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. U.S.A.* 96:14073-14078.
- Brenic, A., McFarland, K. A., McManus, H. R., Castang, S., Mogno, I., Dove, S. L., and Lory, S. 2009. The GacS/GacA signal transduction system of *Pseudomonas aeruginosa* acts exclusively through its control over the transcription of the RsmY and RsmZ regulatory small RNAs. *Mol. Microbiol.* 73:434-445.
- Burch, A. Y., Shimada, B. K., Browne, P. J., and Lindow, S. E. 2010. Novel high-throughput detection method to assess bacterial surfactant production. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:5363-5372.
- Burch, A. Y., Shimada, B. K., Mullin, S. W., Dunlap, C. A., Bowman, M. J., and Lindow, S. E. 2012. *Pseudomonas syringae* coordinates production of a motility-enabling surfactant with flagellar assembly. *J. Bacteriol.* 194:1287-1298.
- Burrowes, E., Baysse, C., Adams, C., and O'Gara, F. 2006. Influence of the regulatory protein RsmA on cellular functions in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, as revealed by transcriptome analysis. *Microbiology* 152:405-418.
- Cha, J. Y., Lee, D. G., Lee, J. S., Oh, J. I., and Baik, H. S. 2012. GacA directly regulates expression of several virulence genes in *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 11528. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 417:665-672.
- 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.
- Choi, K. H., Kumar, A., and 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.
- Collmer, A., Badel, J. L., Charkowski, A. O., Deng, W. L., Fouts, D. E., Ramos, A. R., Rehm, A. H., Anderson, D. M., Schneewind, O., van Dijk, K., and Alfano, J. R. 2000. *Pseudomonas syringae* Hrp type III secretion system and effector proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:8770-8777.
- Duss, O., Michel, E., Yulikov, M., Schubert, M., Jeschke, G., and Allain, F. H. 2014. Structural basis of the non-coding RNA RsmZ acting as a protein sponge. *Nature* 509:588-592.
- Fellay, R., Frey, J., and 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.
- Gutiérrez, P., Li, Y., Osborne, M. J., Pomerantseva, E., Liu, Q., and Gehring, K. 2005. Solution structure of the carbon storage regulator protein CsrA from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 187:3496-3501.
- Heeb, S., Blumer, C., and Haas, D. 2002. Regulatory RNA as mediator in GacA/RsmA-dependent global control of exoproduct formation in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *J. Bacteriol.* 184:1046-1056.
- Heeb, S., and Haas, D. 2001. Regulatory roles of the GacS/GacA two-component system in plant-associated and other gram-negative bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14:1351-1363.
- Heeb, S., Kuehne, S. A., Bycroft, M., Crivii, S., Allen, M. D., Haas, D., Cámara, M., and Williams, P. 2006. Functional analysis of the post-transcriptional regulator RsmA reveals a novel RNA-binding site. *J. Mol. Biol.* 355:1026-1036.
- Hernández-Eligio, A., Moreno, S., Castellanos, M., Castañeda, M., Nuñez, C., Muriel-Millán, L. F., and Espín, G. 2012. RsmA post-transcriptionally controls PhbR expression and polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiology* 158:1953-1963.
- Heurlier, K., Williams, F., Heeb, S., Dormond, C., Pessi, G., Singer, D., Cámara, M., Williams, P., and Haas, D. 2004. Positive control of swarming, rhamnolipid synthesis, and lipase production by the posttranscriptional RsmA/RsmZ system in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* 186:2936-2945.
- Hockett, K. L., Burch, A. Y., and Lindow, S. E. 2013. Thermo-regulation of genes mediating motility and plant interactions in *Pseudomonas syringae*. *PLoS One* 8:e59850.
- Hrabak, E. M., and Willis, D. K. 1992. The *lemA* gene required for pathogenicity of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on bean is a member of a family of two-component regulators. *J. Bacteriol.* 174:3011-3020.
- Huertas-Rosales, Ó., Ramos-González, M. I., and Espinosa-Urgel, M. 2016. Self-regulation and interplay of Rsm family proteins modulate the lifestyle of *Pseudomonas putida*. *Appl. Environ. Microbiol.* 82:5673-5686.
- Humair, B., Wackwitz, B., and Haas, D. 2010. GacA-controlled activation of promoters for small RNA genes in *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:1497-1506.
- Huynh, T. V., Dahlbeck, D., and Staskawicz, B. J. 1989. Bacterial blight of soybean: Regulation of a pathogen gene determining host cultivar specificity. *Science* 245:1374-1377.
- Kay, E., Dubuis, C., and Haas, D. 2005. Three small RNAs jointly ensure secondary metabolism and biocontrol in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102:17136-17141.
- Kay, E., Humair, B., Dénervaud, V., Riedel, K., Spahr, S., Eberl, L., Valverde, C., and Haas, D. 2006. Two GacA-dependent small RNAs modulate the quorum-sensing response in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 188:6026-6033.
- Kinscherf, T. G., and Willis, D. K. 1999. Swarming by *Pseudomonas syringae* B728a requires *gacS* (*lemA*) and *gacA* but not the acyl-homoserine lactone biosynthetic gene *ahlI*. *J. Bacteriol.* 181:4133-4136.
- Kinscherf, T. G., and Willis, D. K. 2002. Global regulation by *gidA* in *Pseudomonas syringae*. *J. Bacteriol.* 184:2281-2286.
- Köiv, V., Andresen, L., Broberg, M., Frolova, J., Somervuo, P., Auvinen, P., Tapio Palva, E., Pirhonen, M., Tenson, T., and Mäe, A. 2013. Lack of RsmA-mediated control results in constant hypervirulence, cell elongation, and hyperflagellation in *Pectobacterium wasabiae*. *PLoS One* 8:e54248.
- 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.
- Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R. M., and Peterson, K. M. 1995. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 166:175-176.

- 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.
- Kulkarni, P. R., Jia, T., Kuehne, S. A., Kerkerling, T. M., Morris, E. R., Searle, M. S., Heeb, S., Rao, J., and Kulkarni, R. V. 2014. A sequence-based approach for prediction of CsrA/RsmA targets in bacteria with experimental validation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nucleic Acids Res.* 42:6811-6825.
- Kumar, S., Stecher, G., and Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33:1870-1874.
- Lalaouna, D., Fochesato, S., Sanchez, L., Schmitt-Kopplin, P., Haas, D., Heulin, T., and Achouak, W. 2012. Phenotypic switching in *Pseudomonas brassicacearum* involves GacS- and GacA-dependent Rsm small RNAs. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:1658-1665.
- Lapouge, K., Schubert, M., Allain, F. H., and Haas, D. 2008. Gac/Rsm signal transduction pathway of gamma-proteobacteria: From RNA recognition to regulation of social behaviour. *Mol. Microbiol.* 67: 241-253.
- Laville, J., Voisard, C., Keel, C., Maurhofer, M., D efago, G., and Haas, D. 1992. Global control in *Pseudomonas fluorescens* mediating antibiotic synthesis and suppression of black root rot of tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:1562-1566.
- Lenz, D. H., Miller, M. B., Zhu, J., Kulkarni, R. V., and Bassler, B. L. 2005. CsrA and three redundant small RNAs regulate quorum sensing in *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* 58:1186-1202.
- Liao, C. H., McCallus, D. E., and Fett, W. F. 1994. Molecular characterization of two gene loci required for production of the key pathogenicity factor pectate lyase in *Pseudomonas viridiflava*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 7:391-400.
- Liaw, S. J., Lai, H. C., Ho, S. W., Luh, K. T., and Wang, W. B. 2003. Role of RsmA in the regulation of swarming motility and virulence factor expression in *Proteus mirabilis*. *J. Med. Microbiol.* 52:19-28.
- Manzo, J., Cocotl-Ya nez, M., Tzontecomani, T., Martínez, V. M., Bustillos, R., Velásquez, C., Goiz, Y., Sol s, Y., López, L., Fuentes, L. E., Nuñez, C., Segura, D., Esp n, G., and Castañeda, M. 2011. Post-transcriptional regulation of the alginate biosynthetic gene algD by the Gac/Rsm system in *Azotobacter vinelandii*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 21:147-159.
- Marden, J. N., Diaz, M. R., Walton, W. G., Gode, C. J., Betts, L., Urbanowski, M. L., Redinbo, M. R., Yahr, T. L., and Wolfgang, M. C. 2013. An unusual CsrA family member operates in series with RsmA to amplify posttranscriptional responses in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110:15055-15060.
- Martínez-Granero, F., Navazo, A., Barahona, E., Redondo-Nieto, M., Rivilla, R., and Martín, M. 2012. The Gac-Rsm and SadB signal transduction pathways converge on AlgU to downregulate motility in *Pseudomonas fluorescens*. *PLoS One* 7:e31765.
- May, T. B., and Chakrabarty, A. M. 1994. Isolation and assay of *Pseudomonas aeruginosa* alginate. *Methods Enzymol.* 235:295-304.
- Mercante, J., Suzuki, K., Cheng, X., Babitzke, P., and Romeo, T. 2006. Comprehensive alanine-scanning mutagenesis of *Escherichia coli* CsrA defines two subdomains of critical functional importance. *J. Biol. Chem.* 281:31832-31842.
- Miller, J. H. 1972. *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- 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.
- Morris, E. R., Hall, G., Li, C., Heeb, S., Kulkarni, R. V., Lovelock, L., Silistre, H., Messina, M., C mara, M., Emsley, J., Williams, P., and Searle, M. S. 2013. Structural rearrangement in an RsmA/CsrA ortholog of *Pseudomonas aeruginosa* creates a dimeric RNA-binding protein, RsmN. *Structure* 21:1659-1671.
- Mulet, M., Lalucat, J., and García-Valdés, E. 2010. DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. *Environ. Microbiol.* 12:1513-1530.
- Navazo, A., Barahona, E., Redondo-Nieto, M., Martínez-Granero, F., Rivilla, R., and Martín, M. 2009. Three independent signalling pathways repress motility in *Pseudomonas fluorescens* F113. *Microb. Biotechnol.* 2:489-498.
- Nogales, J., Vargas, P., Farias, G. A., Olmedilla, A., Sanjuán, J., and Gallegos, M. T. 2015. FleQ coordinates flagellum-dependent and -independent motilities in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Appl. Environ. Microbiol.* 81:7533-7545.
- Ortiz-Martín, I., Thwaites, R., Mansfield, J. W., and Beuz n, C. R. 2010. Negative regulation of the Hrp type III secretion system in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 23:682-701.
- Pérez-Mendoza, D., Aragón, I. M., Prada-Ramírez, H. A., Romero-Jiménez, L., Ramos, C., Gallegos, M. T., and Sanjuán, J. 2014. Responses to elevated c-di-GMP levels in mutualistic and pathogenic plant-interacting bacteria. *PLoS One* 9:e91645.
- Pessi, G., Williams, F., Hindle, Z., Heurlier, K., Holden, M. T., C mara, M., Haas, D., and Williams, P. 2001. The global posttranscriptional regulator RsmA modulates production of virulence determinants and N-acylhomoserine lactones in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 183:6676-6683.
- Prada-Ramírez, H. A., Pérez-Mendoza, D., Felipe, A., Martínez-Granero, F., Rivilla, R., Sanjuán, J., and Gallegos, M. T. 2016. AmrZ regulates cellulose production in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Mol. Microbiol.* 99:960-977.
- Ramette, A., Frappoli, M., Fischer-Le Saux, M., Gruffaz, C., Meyer, J. M., D fago, G., Sutra, L., and Mo ne-Loccoz, Y. 2011. *Pseudomonas protegens* sp. nov., widespread plant-protecting bacteria producing the biocontrol compounds 2,4-diacetylphloroglucinol and pyoluteorin. *Syst. Appl. Microbiol.* 34:180-188.
- 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.
- Robertson, B. K., Aman, P., Darvill, A. G., McNeil, M., and Albersheim, P. 1981. Host-symbiont interactions: V. The structure of acidic extracellular polysaccharides secreted by *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium trifolii*. *Plant Physiol.* 67:389-400.
- Roine, E., Wei, W., Yuan, J., Nurmiaho-Lassila, E. L., Kalkinen, 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. U.S.A.* 94:3459-3464.
- Romeo, T., Gong, M., Liu, M. Y., and Brun-Zinkernagel, A. M. 1993. Identification and molecular characterization of *csrA*, a pleiotropic gene from *Escherichia coli* that affects glycogen biosynthesis, gluconeogenesis, cell size, and surface properties. *J. Bacteriol.* 175:4744-4755.
- Rumbaugh, K. P. 2014. Genomic complexity and plasticity ensure *Pseudomonas* success. *FEMS Microbiol. Lett.* 356:141-143.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schubert, M., Lapouge, K., Duss, O., Oberstrass, F. C., Jelesarov, I., Haas, D., and Allain, F. H. 2007. Molecular basis of messenger RNA recognition by the specific bacterial repressing clamp RsmA/CsrA. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14:807-813.
- Song, C., van der Voort, M., van de Mortel, J., Hassan, K. A., Elbourne, L. D., Paulsen, I. T., Loper, J. E., and Raaijmakers, J. M. 2014. The Rsm regulon of plant growth-promoting *Pseudomonas fluorescens* SS101: Role of small RNAs in regulation of lipopeptide biosynthesis. *Microb. Biotechnol.* 8:296-310.
- Sonnleitner, E., Abdou, L., and Haas, D. 2009. Small RNA as global regulator of carbon catabolite repression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106:21866-21871.
- Taira, S., Tuimala, J., Roine, E., Nurmiaho-Lassila, E. L., Savilahti, H., and Romantschuk, M. 1999. Mutational analysis of the *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* *hrpA* gene encoding Hrp pilus subunit. *Mol. Microbiol.* 34: 737-744.
- Vakulskas, C. A., Potts, A. H., Babitzke, P., Ahmer, B. M., and Romeo, T. 2015. Regulation of bacterial virulence by Csr (Rsm) systems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 79:193-224.
- Vallet-Gely, I., Novikov, A., Augusto, L., Liehl, P., Bolbach, G., P chy-Tarr, M., Cosson, P., Keel, C., Caroff, M., and Lemaitre, B. 2010. Association of hemolytic activity of *Pseudomonas entomophila*, a versatile soil bacterium, with cyclic lipopeptide production. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:910-921.
- Valverde, C., and Haas, D. 2008. Small RNAs controlled by two-component systems. *Adv. Exp. Med. Biol.* 631:54-79.
- Valverde, C., Heeb, S., Keel, C., and Haas, D. 2003. RsmY, a small regulatory RNA, is required in concert with RsmZ for GacA-dependent expression of biocontrol traits in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Mol. Microbiol.* 50:1361-1379.
- Vargas, P., Farias, G. A., Nogales, J., Prada, H., Carvajal, V., Bar n, M., Rivilla, R., Martín, M., Olmedilla, A., and Gallegos, M. T. 2013. Plant flavonoids target *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 flagella and type III secretion system. *Environ. Microbiol. Rep.* 5:841-850.
- Willis, D. K., Holmstadt, J. J., and Kinscherf, T. G. 2001. Genetic evidence that loss of virulence associated with *gacS* or *gacA* mutations in *Pseudomonas syringae* B728a does not result from effects on alginate production. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:1400-1403.
- Willis, D. K., Hrabak, E. M., Rich, J. J., Barta, T. M., Lindow, S. E., and Panopoulos, N. J. 1990. Isolation and characterization of a *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* mutant deficient in lesion formation on bean. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 3:149-156.